

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
CAMPUS DE SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO
AMBIENTAL

VANESSA DE LUCA

**ESTUDO DA INTERAÇÃO MOLECULAR DE RETROVÍRUS ENDÓGENOS
HUMANOS E ANTÍGENOS DA MIELINA COM ANTICORPOS**

SOROCABA

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
CAMPUS DE SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO
AMBIENTAL

VANESSA DE LUCA

**ESTUDO DA INTERAÇÃO MOLECULAR DE RETROVÍRUS ENDÓGENOS
HUMANOS E ANTÍGENOS DA MIELINA COM ANTICORPOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

Orientação: Prof. Dr. Fábio de Lima Leite

SOROCABA

2018

de Luca, Vanessa

Estudo da Interação Molecular de Retrovírus Endógenos Humanos e Antígenos da Mielina com Anticorpos / Vanessa de Luca. -- 2018.
77 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador: Fábio de Lima Leite

Banca examinadora: Daiana Kotra Deda Nogueira, Doralina Guimarães Brum Souza

Bibliografia

1. Esclerose Múltipla. 2. Espectroscopia de Força Atômica. 3. Nanopartículas de Prata. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Vanessa de Luca, realizada em 26/02/2018:

Prof. Dr. Fábio de Lima Leite
UFSCar

Profa. Dra. Daiãna Kotra Deda Nogueira
UNIFESP

Profa. Dra. Doralina Guimarães Brum Souza
FMP-UNESP

Dedico este trabalho a meus pais,
Reinaldo Luiz de Luca e Lucimara da
Silveira Garcia de Luca.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Fábio de Lima Leite pela amizade, paciência, e inestimável contribuição ao longo da construção deste trabalho.

A empresa *Rheabiotech* e ao Dr. Luís Antonio Peroni, por terem fornecido os anticorpos utilizados nesta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Fábio Camargo Abdalla, ao Prof. Dr. Francisco Trivinho Strixino, a Dr. Camila Malta Romano e ao Mestre Thiago Aguiar Cacuro, por todo o auxílio e colaboração.

Aos amigos, membros do grupo de pesquisa em Nanoneurobiofísica (GNN), em especial, a Akemi Martins Higa e a Pâmela Soto Garcia, pela parceria, incentivo e ajuda em todas as situações.

A Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental (PPGBMA).

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro ao projeto que fez com que esta trajetória fosse possível.

Aos meus pais Reinaldo e Lucimara, e irmãos Matheus, Vinícius e Amanda por todo suporte que me ofereceram. O imenso carinho e amor que sempre demonstraram tem sido a minha base para nunca desistir.

Ao meu namorado Daniel por seu companheirismo constante e palavras de conselho e incentivo que fizeram grande diferença durante este percurso.

A Deus por ter sido a minha força e esperança e ter me sustentado em todos os meus dias.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar,
não seremos capazes de resolver os problemas causados
pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

RESUMO

LUCA, Vanessa de. Estudo da Interação Molecular de Retrovírus Endógenos Humanos e Antígenos da Mielina com Anticorpos (dissertação) Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental – Centro de Ciências e Tecnologias para Sustentabilidade, Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2018.

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença do sistema nervoso central de natureza inflamatória, desmielinizante e autoimune. Evidências demonstram que a desmielinização pode estar relacionada à produção de anticorpos auto reativos que reconhecem e atuam contra proteínas que compõem a bainha de mielina. Uma importante proteína envolvida nesse processo é a Glicoproteína de Oligodendrócitos da Mielina (MOG). A etiologia da EM é desconhecida, entretanto acredita-se que ela seja resultado do conjunto entre desregulação imunológica, predisposição genética e fatores ambientais. Vários aspectos do ambiente são propostos como “gatilhos” para o desenvolvimento da EM, dentre estes se encontram as infecções virais. Os Retrovírus Endógenos Humanos da família W (HERV-W) vêm sendo estudados na EM, a partir da detecção de proteínas do gene do envelope de HERV-W em pacientes portadores da doença. Infecções provenientes de vírus podem ser as responsáveis por desencadear a autoimunidade na EM por meio do mecanismo de mimetismo molecular, que consiste no reconhecimento cruzado do sistema imunológico, que passa a identificar componentes próprios como antígenos por apresentarem similaridade com agentes infecciosos. Devido à importância dos aspectos etiológicos para o entendimento do mecanismo de ação das doenças, utilizou-se técnicas aplicadas a detecção de anticorpos em nanoescala para investigar a teoria do mimetismo molecular na EM. Para isso, analisou-se sequências peptídicas da MOG semelhantes à proteína de HERV-W. Estas sequências foram submetidas a interação com anticorpos anti-HERV-W por meio das técnicas de Espectroscopia de Força Atômica e detecção óptica com nanopartículas de prata, a fim de avaliar a interação e possível ocorrência de mimetismo molecular. Os resultados foram promissores e revelaram o reconhecimento molecular e reatividade cruzada do anticorpo anti-HERV-W com epítomos específicos de HERV-W e MOG.

Palavras-chave: Esclerose Múltipla. Retrovírus Endógenos Humanos. Mimetismo Molecular. Espectroscopia de Força Atômica. Nanopartículas de Prata.

ABSTRACT

LUCA, Vanessa de. Investigation of Molecular Interaction amongst Human Endogenous Retroviruses and Myelin Antigens with antibodies (dissertation) Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental – Centro de Ciências e Tecnologias para Sustentabilidade, Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2018.

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory, demyelinating and autoimmune disease of the central nervous system. There is evidence that demyelination may be related to the production of autoreactive antibodies against myelin sheath proteins, particularly the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG). Despite the etiology of MS remains unknown, it might be due to a sum of factors, such as immune system disruption, genetic susceptibility, and environmental factors, of which viral infections are included as proposed viral triggers for the disease. Therefore, human endogenous retrovirus type W (HERV-W) has been studied in MS, from the detection of proteins of the HERV-W envelope gene in patients with the disease. Infections from viruses may be responsible for triggering autoimmunity in MS through molecular mimicry, which consists in the cross-recognition of the immune system, which begins to recognize self-components as antigens because of the similarity to infectious agents. Due to the relevance of etiological aspects to the comprehension of the mechanisms of action of the diseases, the Atomic Force Microscope (AFM) was used to investigate the molecular mimicry theory in MS. For this, MOG peptide sequences similar to HERV-W protein were analyzed. These peptide sequences were subjected to the interaction with anti-HERV-W antibodies applying atomic force spectroscopy and optical detection with silver nanoparticles, aiming to evaluate the molecular interaction and the possible occurrence of molecular mimicry. The obtained results are promising and have revealed the molecular recognition and cross-reactivity of the anti-HERV-W antibody with specific HERV-W and MOG epitopes.

Key-words: Multiple Sclerosis. Human Endogenous Retroviruses. Molecular Mimicry. Atomic Force Spectroscopy. Silver Nanoparticles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismo imunopatológico da EM.....	22
Figura 2 – Proteínas presentes na bainha de mielina e sua localização.....	23
Figura 3 – Representação do domínio extracelular, domínio transmembranar e domínio citoplasmático da MOG.....	23
Figura 4 – Sequência genética dos retrovírus (A) e seus componentes estruturais (B).....	25
Figura 5 – Regiões compartilhadas entre proteína do envelope de MSRV/HERV-W e a MOG.....	26
Figura 6 – Representação dos principais componentes do AFM e seu funcionamento.....	28
Figura 7 – Esquema de uma curva de força vs. distância típica, demonstrando o comportamento do <i>cantilever</i> em função do deslocamento do piezoelétrico.....	31
Figura 8 – Procedimentos utilizados para sintetizar nanopartículas.....	34
Figura 9 – Representação gráfica de AgNPs conjugadas com moléculas em sua superfície.....	36
Figura 10 – Representação esquemática das dimensões da ponta (a) e do <i>cantilever</i> (b).....	39
Figura 11 – Representação esquemática das etapas de funcionalização da ponta de AFM.....	40
Figura 12 – Representação esquemática das etapas de funcionalização do substrato.....	42
Figura 13 – Microscópio de força atômica preparado em meio líquido.....	44
Figura 14 – Representação da ferramenta <i>Force Volume</i> exemplificando a curva de força por ela obtida.....	45
Figura 15 – Imagem de MEV demonstrando o chip (a), a parte superior do <i>cantilever</i> (b), a parte lateral do <i>cantilever</i> (c) e a ponta de AFM utilizada nos experimentos (d).....	49
Figura 16 – Imagem de MEV exemplificando as etapas de funcionalização da ponta de AFM.....	50
Figura 17 – Comparação entre a ponta nova (a e b) e a ponta após a realização	

de um experimento de AFS (c e d).....	51
Figura 18 – Espectros de FTIR obtidos para placas de silício contendo APTES (a), PEG (b) e APTES-PEG-PEPTÍDEO (c).....	52
Figura 19 – Imagens por microscopia de fluorescência das etapas de funcionalização da mica muscovita.....	54
Figura 20 – Imagem gráfica representando os padrões de curvas de força encontrados para os peptídeos 1, 2, 3 e utilizando a ponta de AFM não funcionalizada.....	55
Figura 21 – Diagrama de caixa com a mediana, a amplitude dos valores de força de adesão e o formato das curvas de força obtidos para o peptídeo 1, o peptídeo 2, o peptídeo 3 e para a ponta de AFM não funcionalizada.....	57
Figura 22 – Gráfico de colunas com os valores médios das triplicatas realizadas nas análises de AFS para o peptídeo 1, o peptídeo 2 (a), o peptídeo 3 e ponta de AFM não funcionalizada (b).....	60
Figura 23 – Gráfico de linhas representando os valores de comprimento de onda da suspensão de AgNPs e das amostras contendo as AgNPs funcionalizadas com os peptídeo 1, 2, 3 e 4 antes e após a interação com o anticorpo anti-MSRV/HERV-W ₂₅₂₋₂₆₄	63
Figura 24 – Espectros de absorção gerados na região UV-Vis para as nanopartículas funcionalizadas com os peptídeos 1, 2 (a), 3, e 4 (b), e em interação com anticorpo anti-MSRV/HERV-W ₂₅₂₋₂₆₄	65
Figura 25 – Suspensão de nanopartículas funcionalizadas com peptídeos 1, 2, 3, e 4 antes e após interação com anticorpo anti-MSRV/HERV-W ₂₅₂₋₂₆₄	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição da nomenclatura, proteína, sequência de aminoácidos e número de resíduos dos peptídeos sintetizados.....	37
Tabela 2 – Propriedades físico-químicas dos peptídeos utilizados no estudo.....	37
Tabela 3 – Sistema utilizados para as análises por Espectroscopia de Força Atômica.....	45
Tabela 4 – Valores de comprimento de onda de absorção plasmônica e desvio padrão para as AgNPS funcionalizadas com os peptídeos 1, 2, 3 e 4 antes e após a interação com o anticorpo anti-MSRV/HERV-W ₂₅₂₋₂₆₄	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11-MUA	Ácido 11-mercaptopundecanoico
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> (Microscópio de Força Atômica)
AFS	<i>Atomic Force Spectroscopy</i> (Espectroscopia de Força Atômica)
AgNPs	Nanopartículas de prata
Anti-MSRV/HERV-W	Anti - Retrovírus Associado à Esclerose Múltipla / Retrovírus Endógenos Humanos da Família W
APTES	3-aminopropiltriétoxissilano
CFM	<i>Chemical Force Microscopy</i> (Microscopia de Força Química)
EAE	<i>Experimental Autoimmune Encephalomyelitis</i> (Encefalomielite Autoimune Experimental)
EDC	Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EM	Esclerose múltipla
Fab	Fragmento de ligação do antígeno
Fad	Força de adesão
Fc	Fragmento cristalino
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de <i>Fourier</i>)
HERV	<i>Human Endogenous Retroviruses</i> (Retrovírus Endógenos Humanos)
HERV-W	<i>Human Endogenous Retrovirus type W</i> (Retrovírus Endógenos Humanos da Família W)
MAG	<i>Myelin Associated Glycoprotein</i> (Glicoproteína Associada à Mielina)
MBP	<i>Myelin Basic Protein</i> (Proteína Básica da Mielina)
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
MOG	<i>Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein</i> (Glicoproteína de Oligodendrócitos da Mielina)
MSRV	<i>Multiple Sclerosis Associated Retrovirus</i> (Retrovírus Associado à Esclerose Múltipla)
NHS	N-hidroxissuccinimida

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato Salino)
PEG	Poli(etil)enoglicol
pI	Ponto Isoelétrico
pN	Piconewton
PLP	<i>Proteolipid Protein</i> (Proteína Proteolipídica)
SPM	<i>Scanning Probe Microscopy</i> (Microscópios de Varredura por Sonda)
STM	<i>Scanning Tunneling Microscopy</i> (Microscópio de Varredura por Tunelamento)
TEA	Trietilamina
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
3.1 Esclerose Múltipla e os Retrovírus Endógenos Humanos.....	21
3.1.1 Esclerose Múltipla.....	21
3.1.2 Retrovírus Endógenos Humanos da Família W e a Esclerose Múltipla.....	24
3.2 Microscopia de Força Atômica.....	27
3.2.1 Espectroscopia de Força Atômica.....	30
3.2.2 Microscopia de Força Química.....	32
3.3 Detecção óptica com nanopartículas de prata.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Escolha e obtenção dos peptídeos.....	37
4.2 Obtenção dos anticorpos.....	38
4.3 Funcionalização das superfícies.....	38
4.3.1 Funcionalização de pontas de AFM.....	39
4.3.2 Funcionalização do substrato.....	41
4.4 Caracterização de superfícies.....	42
4.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	42
4.4.2 Infravermelho por Transformada de Fourier.....	43
4.4.3 Microscopia de Fluorescência.....	43
4.5 Espectroscopia de Força Atômica.....	44
4.6 Detecção óptica com nanopartículas de prata.....	46
4.6.1 Síntese das nanopartículas de prata.....	47
4.6.2 Funcionalização das nanopartículas de prata com os peptídeos.....	47
4.6.3 Espectrofotometria na Região do Ultravioleta-Visível.....	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Caracterização dos processos de funcionalização das superfícies.....	49
5.1.1 Caracterização das pontas de AFM por Microscopia Eletrônica de	

Varredura (MEV).....	49
5.1.2 Caracterização por de Infravermelho por Transformada de <i>Fourier</i> (FTIR).....	51
5.1.3 Análises por Microscopia de Fluorescência.....	53
5.2 Análises por Espectroscopia de Força Atômica - Nanossensoriamento.....	54
5.2.1 Reconhecimento molecular entre complexos biológicos.....	54
5.2.2 Análise comparativa dos resultados por Espectroscopia de Força Atômica.....	56
5.2.3 Análise das triplicatas realizadas para cada sistema.....	59
5.3 Detecção óptica com nanopartículas de prata funcionalizadas.....	61
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
7 REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

Os processos biológicos de reconhecimento molecular, tais como interações antígeno-anticorpo, receptor-ligante e entre fitas de DNA complementares são de fundamental importância para a compreensão da dinâmica dos mecanismos celulares (WILCHEK; BAYER; LIVNAH, 2006). As interações específicas entre biomoléculas desempenham funções essenciais em diversos eventos, nomeadamente na sinalização celular, respostas imunes a patógenos, replicação do material genético, entre outros. Cada um desses processos é direcionado por uma combinação de forças de interação não-covalentes que atuam em escala nanométrica (WILLIAMS et al., 2004).

A nanotecnologia tem aberto caminhos para o estudo de inúmeros sistemas, possibilitando a manipulação da matéria em escala nanométrica. Ela fornece ferramentas que permitem explorar informações biológicas com grande precisão, podendo a partir dela serem investigadas novas propriedades e características de diversos materiais e estruturas, como biomoléculas (SEKHON, 2014). Dentre estas ferramentas, encontra-se a Espectroscopia de Força Atômica (AFS, do inglês *Atomic Force Spectroscopy*), técnica desenvolvida por meio do Microscópio de Força Atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*). Ela tem sido crescentemente utilizada devido ao seu potencial para mensurar as forças de interação existentes entre complexos biológicos com alta especificidade, sensibilidade de *piconewtons* (pN) e a possibilidade de realizar análises em meio líquido, sob condições fisiológicas (LEITE et al., 2012; LEITE; HERRMANN, 2005)

A técnica de AFS baseia-se na utilização de pontas de AFM modificadas quimicamente, processo que torna possível a imobilização de biomoléculas nas superfícies das pontas. Em um experimento de AFS, a ponta do AFM é submetida à interação com a amostra contida no substrato, este reconhecimento é quantificado e então expresso por meio de curvas de força vs. distância. Estas curvas possibilitam mensurar a magnitude das forças envolvidas na interação, sejam elas referentes a ligações específicas ou inespecíficas (JANSHOFF et al., 2000).

O estudo das interações que ocorrem em complexos biológicos também pode ser explorado por meio de técnicas de sensoriamento óptico em nanoescala, que se constitui uma área da nanotecnologia em que se destacam as nanopartículas de prata (AgNPs) (MOCK et al., 2002). As nanopartículas, assim como as pontas de

AFM, podem ser funcionalizadas com biomoléculas, e a interação entre o complexo nanopartícula-biomolécula com o seu ligante específico pode ser quantificada na forma de respostas ópticas de fácil interpretação geradas pelas propriedades ópticas de absorção e emissão de luz inerentes das nanopartículas, como absorbância e cor da suspensão, o que potencializa a sua aplicação na construção de nanobiossensores específicos (LISMONT; DREESEN, 2012).

Neste trabalho, aplicou-se técnicas de reconhecimento molecular para o estudo da Esclerose Múltipla (EM), doença autoimune do sistema nervoso central (SNC), caracterizada pela ocorrência de lesões à bainha de mielina dos neurônios, o que leva aos danos progressivos e à desmielinização (GOLDENBERG, 2012).

A EM acomete, predominantemente jovens adultos, com idade entre 20 a 40 anos e afeta na maioria dos casos mulheres (ATKINS; AMOR; FLETCHER, 2012). Até o momento não é conhecida a causa da doença, pesquisas sugerem que ela seja desencadeada por uma predisposição genética, somada a influência de fatores ambientais. Dentre estes fatores, a participação de infecções virais apresenta grande relevância (VIRTANEN; JACOBSON, 2012).

Sequências retrovirais endógenas podem ser consideradas como fatores de risco para o desenvolvimento da EM. Estas sequências são chamadas de Retrovírus Endógenos Humanos (HERV, do inglês *Human Endogenous Retroviruses*), e constituem-se de material genético proveniente de infecções ancestrais por retrovírus exógenos, que ao longo do tempo se inseriram no genoma humano e hoje compõem cerca de 8% dele (BRODZIAK et al., 2012). Um dos HERVs mais estudados na EM é o Retrovírus Endógeno Associado à Esclerose Múltipla (MSRV, do inglês *Multiple Sclerosis Associated Retrovirus*) pertencente ao grupo dos Retrovírus Endógenos Humanos da família W (HERV-W, do inglês *Human Endogenous Retrovirus type W*). Estudos têm estabelecido esta relação a partir do achado de RNA mensageiro circulante e proteínas do gene env (responsáveis pela formação de proteínas do envelope viral) correspondentes ao MSRV/HERV-W em fluídos de portadores da doença (PERRON et al., 1997, 2005).

A ocorrência do mimetismo molecular é altamente apontada em doenças autoimunes e pode ser uma das causas de seu desenvolvimento. Por meio deste mecanismo, células do sistema imunológico são dirigidas contra componentes próprios que apresentam similaridade com epítopos de patógenos (TRELA; NELSON; RYLANCE, 2016). Algumas proteínas que compõem a mielina são

consideradas possíveis auto antígenos, dentre estas se encontra a Proteína da Mielina de Oligodendrócitos (MOG, do inglês *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*) (HEMMER; ARCHELOS; HARTUNG, 2002), que vem sendo crescentemente estudada, e o seu potencial antigênico tem sido evidenciado em experimentos de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE, do inglês *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*), o modelo animal para a EM (MAYER; MEINL, 2012). Sequências homólogas entre um auto antígeno como a MOG e um antígeno estranho como uma proteína viral foi inicialmente considerada um requisito para tal reconhecimento cruzado na EM e evidências que corroboram essa hipótese vêm sendo levantadas (DO OLIVAL et al., 2013).

Desta forma, investigou-se neste trabalho a hipótese do mimetismo molecular na EM, possivelmente causada pela expressão viral de MSR/HERV-W. Realizou-se o estudo da interação molecular entre sequências peptídicas de MSR/HERV-W e MOG com anticorpos específicos anti-MSR/HERV-W, utilizando as técnicas de AFS e detecção óptica com nanopartículas de prata, resultado este que pode trazer contribuições para o esclarecimento do mecanismo de ação e a etiologia da EM.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a interação molecular entre epítomos de MSR/HERV-W e MOG com anticorpos anti-MSR/HERV-W, por meio do desenvolvimento de metodologias aplicadas à detecção de anticorpos em nanoescala.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar a interação entre epítomos de MSR/HERV-W e MOG e anticorpos policlonais anti-MSR/HERV-W, por meio do desenvolvimento do método e aplicação da técnica de Espectroscopia de Força Atômica;
- Caracterizar o sistema de interação desenvolvido com as pontas de AFM e o substrato de mica muscovita funcionalizado;
- Aplicar a técnica de detecção óptica com nanopartículas de prata, para avaliar as interações epítomo-anticorpo investigadas neste estudo;

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Esclerose Múltipla e os Retrovírus Endógenos Humanos

3.1.1 Esclerose Múltipla

A EM é uma doença crônica, inflamatória e autoimune do SNC, em que ocorre destruição parcial ou total da mielina com posterior dano axonal. O processo inflamatório na EM ocasiona a formação de placas de desmielinização na substância branca e cinzenta do cérebro e na medula espinhal. Estes eventos indicam a perda da bainha de mielina e fazem com que ocorra um retardo na transmissão dos impulsos nervosos. Dependendo do local atingido, eles podem ocasionar diferentes manifestações clínicas como, distúrbios sensoriais, motores e visuais, fadiga, dor e déficits neurológicos (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015).

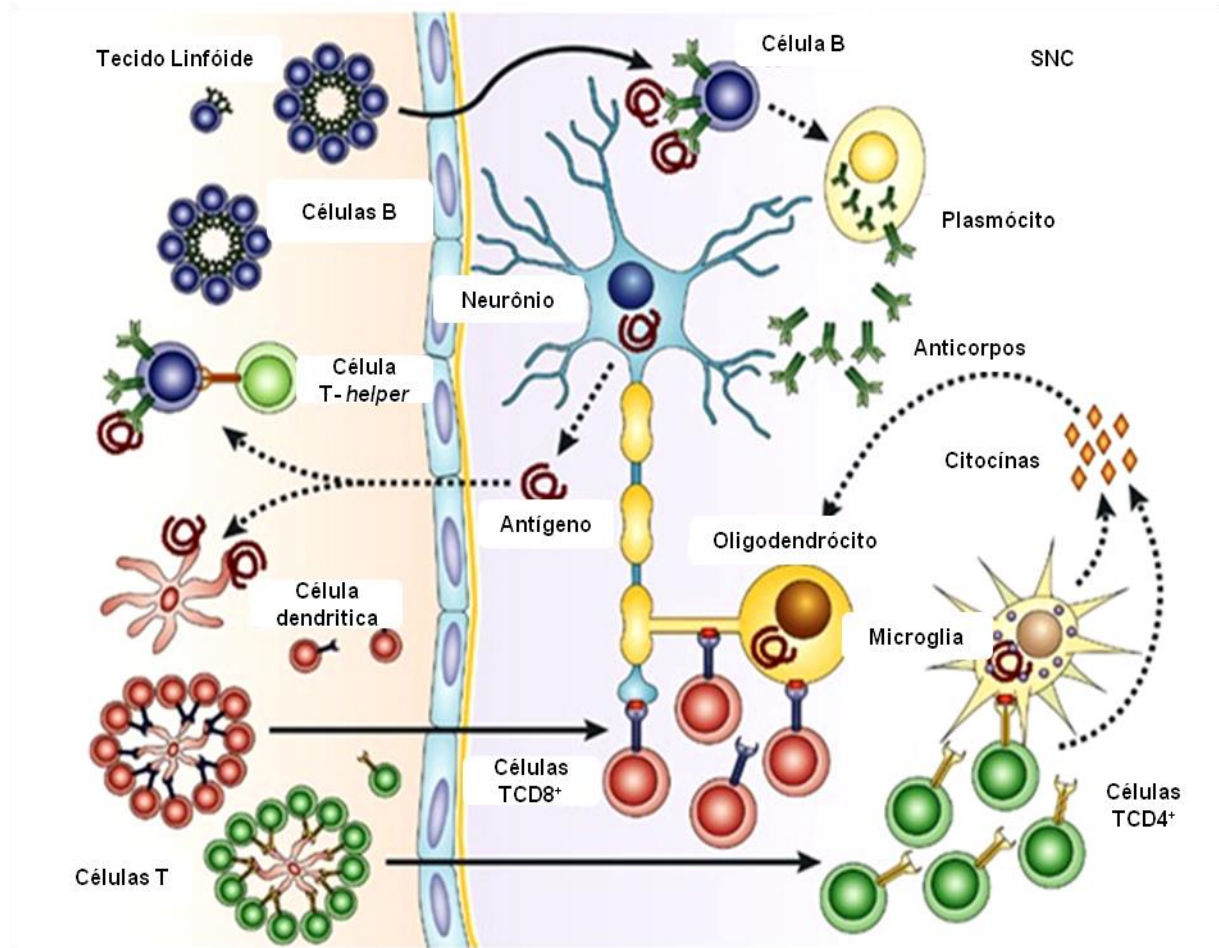
Casos de EM são predominantes em países desenvolvidos, particularmente em regiões temperadas, na Europa e na América do Norte. Ela é considerada a causa mais comum de danos neurológicos em indivíduos com idade entre 20 a 40 anos e tem uma incidência maior em mulheres (ATKINS; AMOR; FLETCHER, 2012).

O mecanismo autoimune da desmielinização na EM ainda não está completamente elucidado, entretanto estudos apontam que ele ocorra devido à infiltração de células do sistema imunológico no SNC, em razão da perda da seletividade da barreira hemato-encefálica (RIEDHAMMER; WEISSERT, 2015). Na EM ocorre uma falha na auto tolerância fazendo com que células T tornem-se auto reativas. Este fato pode estar relacionado a processos como o mimetismo molecular por ação de agentes infecciosos, ou também ser atribuído a fatores genéticos. Uma vez ativadas, ocorre a entrada de componentes do sistema imunológico no SNC (figura 1), como células TCD4⁺, T *helper*1, T *helper* 17, células B e componentes da imunidade inata, o que ocasiona um processo inflamatório, resultando em dano aos tecidos (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015).

Diversas proteínas da bainha de mielina são consideradas possíveis auto antígenos na EM sendo estas, a Proteína Proteolípídica (PLP, do inglês *Proteolipid Protein*), a Proteína Básica da Mielina (MBP, do inglês *Myelin Basic Protein*), a Glicoproteína Associada à Mielina (MAG, do inglês *Myelin Associated Glycoprotein*)

e a MOG, como mostra a figura 2 (ERCOLINI; MILLER, 2006; GERDONI et al., 2007; HEMMER; ARCHELOS; HARTUNG, 2002).

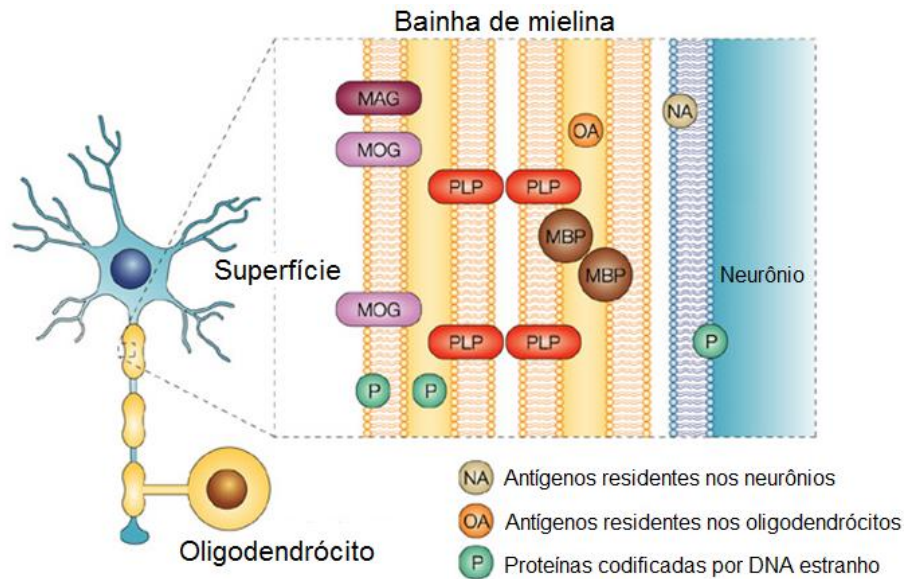
Figura 1 – Mecanismo imunopatológico da EM.



Fonte: Adaptado de Hemmer et. al., 2002

Dentre as proteínas presentes na mielina a MOG corresponde a somente 0,05% delas, entretanto ela é considerada um importante antígeno na fisiopatologia da EM. Experimentos utilizando sequências peptídicas da MOG demonstraram o seu potencial antigênico, induzindo por meio da imunização de ratos o desenvolvimento do modelo animal para a EM, a EAE (MAYER; MEINL, 2012).

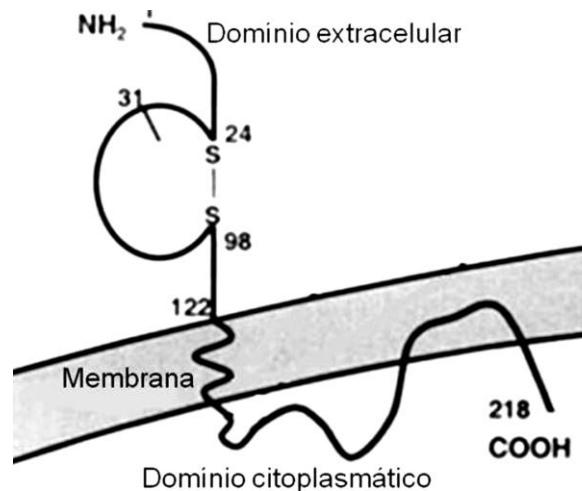
Figura 2 – Proteínas presentes na bainha de mielina e sua localização.



Fonte: Adaptado de Hemmer et al., 2002

A MOG é uma proteína transmembrana que faz parte da superfamília das imunoglobulinas. Ela é constituída por um único domínio Ig extracelular e dois segmentos hidrofóbicos associados à membrana, com uma região transmembranar e um domínio citoplasmático (figura 3). A localização mais externa na mielina (figura 2) e a presença de um domínio amino terminal expresso em sua superfície (figura 3) tornam a MOG mais susceptível a interação com anticorpos (LIÑARES; ECHEVARRIA; MAÑÁ, 2004).

Figura 3 – Representação do domínio extracelular, domínio transmembranar e domínio citoplasmático da MOG.



Fonte: Adaptado de Weissert et al., 2002

A etiologia da EM é desconhecida, contudo a hipótese patogênica mais aceita é que ela seja fruto da conjunção entre desregulação imunológica, predisposição genética e influência de fatores ambientais (GOLDENBERG, 2012).

Tem se obtido, através de diversas pesquisas, resultados promissores na identificação de fatores genéticos associados à EM, no qual se sugere que os alelos HLA-DR e HLA-DQ do HLA de classe II, localizados no cromossomo 6p21, possam conferir maior risco para o desenvolvimento da doença (KAKALACHEVA; MÜNZ; LÜNEMANN, 2011). O papel da influência ambiental, por sua vez, ainda não está bem definido. Por intermédio de estudos epidemiológicos tem sido altamente considerada a presença de infecções virais como contribuintes neste processo (VIRTANEN; JACOBSON, 2012). Diversos vírus são propostos como possíveis candidatos ao desencadeamento da EM tais como o vírus Epstein-Barr, o Herpes Vírus Humano 6, o *vírus Varicela-Zoster* e também os HERVs (MENTIS et al., 2017).

3.1.2 Retrovírus Endógenos Humanos da Família W e a Esclerose Múltipla

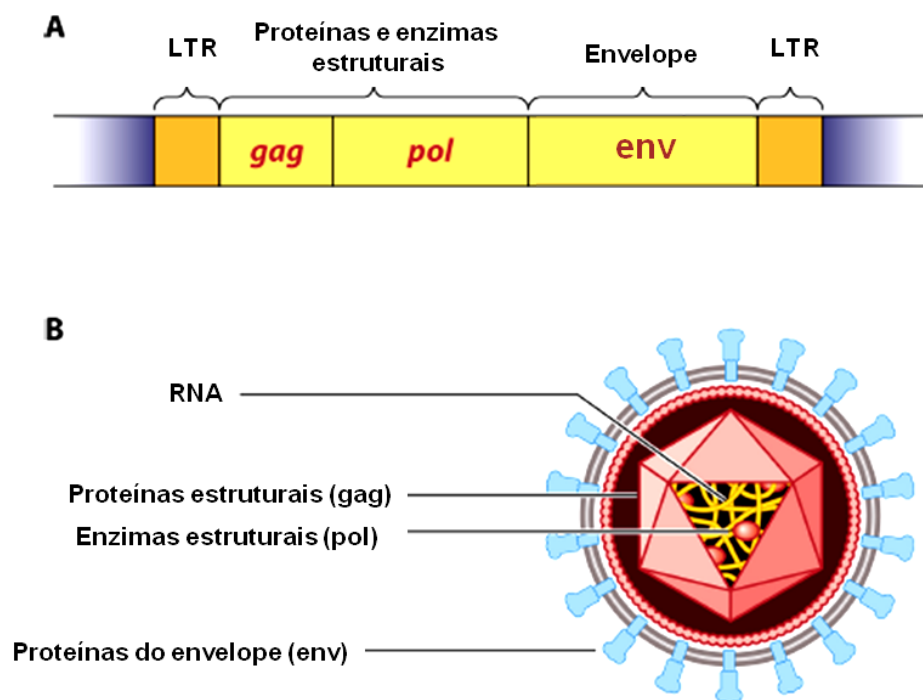
Os HERVs são provenientes de infecções ancestrais das células germinativas hospedeiras por retrovírus exógenos, e hoje constituem aproximadamente 8% do genoma humano (ARRU et al., 2007). Retrovírus exógenos infectam células hospedeiras por meio da transferência de seu material genético, composto por RNA, no citoplasma. A fita de RNA viral é então convertida em DNA, mediante a ação da enzima transcriptase reversa, e se insere no genoma do hospedeiro, utilizando a maquinaria celular do hospedeiro para produzir novas cópias de si mesmo. O fragmento de DNA viral integrante do genoma do hospedeiro, chamado de provírus, pode também infectar células germinativas, sendo disseminado no genoma do hospedeiro e transmitido para as gerações por meio da herança mendeliana, o que resulta em sequências retrovirais endógenas, conhecidas como HERVs (GREENWOOD et al., 2018).

A estrutura genética dos HERVs é semelhante a dos retrovírus exógenos. Sua sequência contém os genes gag, pol e env e em cada extremidade está presente uma região LTR (*Long Terminal Repeat*), como mostra a figura 4. O gene gag é responsável pela formação de proteínas estruturais, que compõem o capsídeo viral (estrutura protéica interna, que envolve o material genético), enquanto que por meio do gene pol são formadas as enzimas virais, com a transcriptase reversa. Já o

gene *env* codifica as proteínas que formam o envelope viral, o elemento estrutural mais externo dos vírus, o qual permite que ele se insira e infecte novas células (LI; KARLSSON, 2016). Estas sequências retrovirais endógenas com o passar do tempo foram perdendo a capacidade de se reintroduzir no DNA devido ao acúmulo de mutações e deleções, deixando de apresentar um caráter infeccioso. Entretanto elas ainda podem exercer alguma função na biologia do hospedeiro, como realizar a transcrição de determinada proteína, participar da regulação gênica ou contribuir para o aumento da variabilidade genética (MORANDI et al., 2017).

Os HERVs vêm sendo investigados na EM desde a detecção de partículas semelhantes a retrovírus no sobrenadante de cultura de células (leptomeningeais e macrófagos) obtidas do líquido de pacientes com EM (HAAHR et al., 1991; PERRON et al., 1989). A princípio essas partículas foram associadas a retrovírus exógenos e chamadas de MSRv (KOMURIAN-PRADEL et al., 1999). Posteriormente, as partículas de MSRv foram comparadas ao genoma humano, revelando sequências retrovirais endógenas estreitamente relacionadas com o MSRv, pertencentes ao grupo dos HERV-W (BLOND et al., 1999).

Figura 4 – Sequência genética dos retrovírus (A) e seus componentes estruturais (B).



Fonte: Adaptado de Greenwood et al., 2018

Estudos recentes vêm confirmando o envolvimento do MSR/HERV-W com a EM, a partir do achado de altos níveis de proteínas do gene do envelope de MSR/HERV-W e RNA mensageiro circulante no líquido cefalorraquidiano, plasma, soro e tecidos cerebrais de pacientes portadores da doença (ÁLVAREZ-LAFUENTE et al., 2008; ARRU et al., 2007; DO OLIVAL et al., 2013; PERRON et al., 2012; VILLIERS et al., 2006).

Uma das formas pelas quais componentes virais podem desencadear uma resposta autoimune é o mimetismo molecular. Neste mecanismo, células do sistema imunológico podem ser ativadas pela reatividade cruzada com agentes infecciosos que mimetizam partes de epítomos com componentes próprios, devido a presença de sequências de aminoácidos homólogas, componentes estruturais ou características físico-químicas semelhantes (TRELA; NELSON; RYLANCE, 2016). Análises de alinhamento de sequências realizadas por intermédio do estudo de Do Olival et al. (2013), permitiram identificar cinco regiões da proteína do envelope de MSR/HERV-W que possuem significativa similaridade com epítomos da MOG, como mostra a figura 5.

Figura 5 – Regiões compartilhadas entre proteína do envelope de MSR/HERV-W e a MOG.

```

HERV-W 449 LPFLGPLAII 459
      +P LGPL A+I
MOG 215 VPVLGPLVALI 225

252 IRWVTPP-TRIVCL 264
      + W PP +R+V L
66 VGWYRPPFSRVVHL 79

308 HVVPKPHNKRVP 319
      H PH RVP
194 HRTFDPHFLRVP 205

49 APSYRSLSK 57
      AP YR ++
91 APEYRGRTE 99

219 LVGPLVS 225
      ++GPLV+
217 VLGPLVA 223

```

Fonte: Adaptado de Do Olival et al., 2013

Dentre estas sequências, o fragmento MOG₆₆₋₇₉ se encontra no domínio externo da MOG, tendo assim maior suscetibilidade à interação com células do sistema imunológico. Pesquisas demonstraram também que esta sequência peptídica inclui epítopos de células T e B, que são capazes de desencadear o processo autoimune contra a bainha de mielina em ratos, verificado através de ensaios experimentais de EAE (ICHIKAWA et al., 1996; KUERTEN et al., 2007). Dessa forma, o estudo da sequência MOG₆₆₋₇₉ torna-se importante, e a possibilidade de ocorrência do mimetismo molecular entre MSR/HERV-W e MOG pode ser considerada.

3.2 Microscopia de Força Atômica

O AFM pertence à família dos Microscópios de Varredura por Sonda (SPM, do inglês *Scanning Probe Microscopy*) caracterizada por investigar as propriedades de superfícies de materiais por meio da varredura da amostra utilizando uma sonda (BLANCHARD, [s.d.]). Em contraste com outras técnicas de microscopia como a Microscopia Óptica e a Microscopia Eletrônica, a obtenção de imagens utilizando os SPMs não necessita de lentes e da focalização de luz ou elétrons. Ela é realizada por intermédio da varredura de superfícies por uma sonda afiada, a uma curta distância da amostra, fornecendo dados acerca de parâmetros químicos, mecânicos e elétricos de materiais (ALESSANDRINI; FACCI, 2005).

O desenvolvimento dos SPMs tornou possível o estudo e a manipulação de superfícies em escala atômica. Esse nível de compreensão teve alto impacto no campo da nanociência e tecnologia, proporcionando o aumento no conhecimento em pesquisa básica, fato que impulsionou o surgimento de novas áreas de estudo como a Nanoneurobiofísica (LEITE et al., 2015).

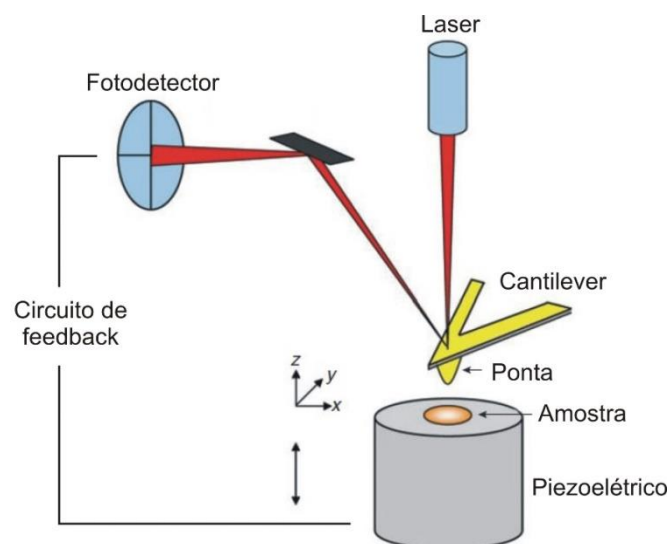
O AFM fornece recursos sensíveis que possibilita medir e mapear a informação química de superfície a nível atômico e em baixas concentrações de analito. Essas medidas são realizadas por meio da quantificação das forças atrativas ou repulsivas existentes entre uma sonda e a superfície de um material (LEITE; HERRMANN, 2005).

Os componentes principais do AFM estão demonstrados na figura 6. Ele consiste basicamente em uma sonda, um *scanner* piezoelétrico o qual comporta a

amostra, um laser que detecta a deflexão da sonda e um sistema eletrônico que registra essas deflexões e permite a análise dos dados.

No AFM a superfície da amostra é percorrida por uma ponta de varredura localizada na extremidade de uma haste flexível, denominada *cantilever*. A amostra é colocada sobre o *scanner* piezoelétrico que se move, com precisão de dimensões atômicas, nos eixos x, y e z quando uma voltagem é aplicada. Para formar uma imagem a ponta do AFM entra em contato muito próximo com a superfície da amostra. Alterações na topografia da superfície ou nas forças de interação ponta-amostra fazem com que o *cantilever* sofra deformações e seja defletido. Essa interação é monitorada por um feixe de laser posicionado na parte superior do *cantilever*. As deflexões do *cantilever* alteram o ângulo do feixe de laser, que é refletido para um fotodetector sensível a posição. Um circuito de *feedback* é acoplado junto ao sensor de deflexão do *cantilever* e é usado para manter constante a separação ponta-amostra. Este circuito controla a distância entre a ponta e a amostra mediante a movimentação do piezoelétrico no eixo z, de modo que seja mantida uma força constante entre elas. A imagem é então reconstruída, com auxílio de um *software* específico, por meio dos dados das deflexões do *cantilever* nos eixos x, y e z (KOBORI, 2014; OLIVEIRA; OTHERS, 2010).

Figura 6 – Representação dos principais componentes do AFM e seu funcionamento.



Fonte: Adaptado de Hinterdorfer e Dufrêne, 2006

O *cantilever* e a ponta são os responsáveis por realizar a varredura da amostra, mapeando e medindo as forças de interação, sendo assim os elementos sensores do AFM. Comercialmente encontram-se sondas fabricadas por diversos materiais, em geral os mais utilizados são o silício (Si) ou o nitreto de silício (Si₃N₄) (HERRMANN; DA SILVA; BERNARDES FO, 1997).

Para se chegar a resoluções em escala nanométrica é de grande importância que o *cantilever* possua uma alta flexibilidade, de modo que atinja a máxima deflexão em razão a uma determinada força. Estas propriedades mecânicas do *cantilever* são caracterizadas por sua constante de mola e frequência de ressonância (BUTT; CAPPELLA; KAPPL, 2005).

A constante de mola do *cantilever* é definida como a relação entre a força aplicada na extremidade livre do *cantilever* e a sua deflexão, fornecendo informações referentes ao seu grau de rigidez. Ela depende da geometria e do material pelo qual o *cantilever* é feito. O *cantilever* precisa ter uma constante de mola baixa, menor que 1 (N/m), para que haja uma maior sensibilidade. Já a frequência de ressonância é a frequência natural de vibração do *cantilever*. É importante que a frequência seja alta, maior que 10 (KHz), pois ela está associada com a velocidade da varredura (TORTONESE, 1997).

A constante de mola do *cantilever* e a distância em que a ponta se encontra da superfície da amostra são fatores que influenciam na quantidade de força medida durante as análises. A força de interação ponta-amostra pode ser expressa pela lei de Hooke:

$$F = - k.x$$

em que, F corresponde a força (N), k é a constante elástica da mola (N/m) e x é a deflexão do *cantilever* (m) (DE OLIVEIRA et al., 2012).

A geometria da ponta é outro fator que influencia na qualidade da imagem a ser formada. Pontas mais afiadas apresentam uma imagem mais precisa da topografia da amostra, com uma resolução alta e menos chances de distorção. Isto porque, como todas as imagens de AFM são uma convolução da geometria da sonda e da superfície, se a ponta não for capaz de atingir estruturas com cavidades profundas ela não irá demonstrar uma representação correta da amostra (EATON; WEST, 2010).

A obtenção de imagens topográficas pelo AFM é realizada principalmente por três modos de operação: modo contato, modo não-contato e modo intermitente. Essa classificação está relacionada com a distância em que a ponta se encontra da superfície da amostra no momento da varredura e a natureza das forças de interações entre elas.

O modo contato foi o primeiro proposto para o AFM e têm a vantagem de permitir a obtenção de imagens com alta resolução a uma velocidade rápida. Nele a ponta de AFM varre a amostra mantendo a menor distância possível (poucos angstroms). A principal força de interação neste modo são as forças repulsivas de *van de Walls*. Quando se utiliza o modo não-contato a força atuante é a de atração de *van der Walls*, sendo usado para o estudo das forças de longo alcance. Nele a ponta permanece a uma distância fixa da amostra (de 10 a 100nm), mas em geral não permite uma boa resolução da imagem. Por fim, no modo intermitente o *cantilever* sofre oscilações em alta frequência e a sua vibração faz com que os potenciais de forças variem entre atrativas e repulsivas. Neste modo a velocidade da varredura é baixa, o que permite a análise de amostras mais sensíveis, como polímeros e materiais biológicos, sem danificá-las (HERRMANN; DA SILVA; BERNARDES FO, 1997).

O AFM possibilita o trabalho em diversos ambientes, como ar, vácuo, líquido, temperaturas baixas e temperaturas elevadas. O meio líquido é usualmente utilizado para o estudo de materiais biológicos. Este tipo de meio permite que o AFM opere em condições fisiológicas e também elimina as forças de capilaridade que poderiam estar presentes na interação ponta-amostra. Com isso, a estrutura das biomoléculas é mantida estável e suas propriedades são conservadas (BHUSHAN; MARTI, 2010).

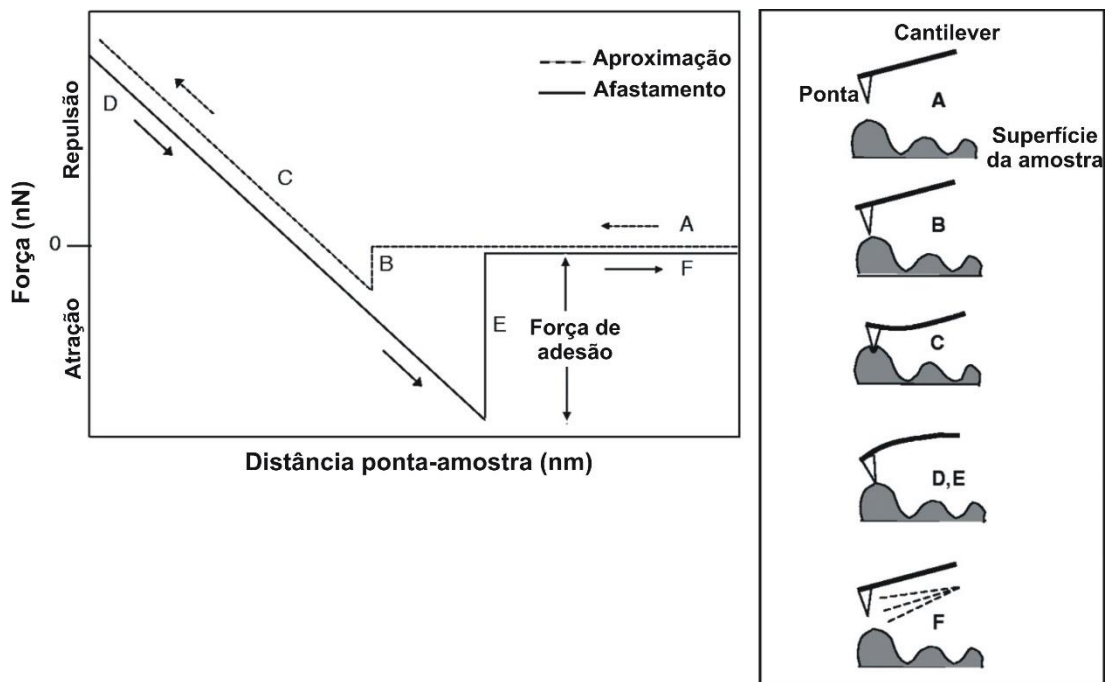
3.2.1 Espectroscopia de Força Atômica

O AFM além de ser uma importante ferramenta utilizada para a obtenção de imagens topográficas de materiais em escala nanométrica, também apresenta um grande potencial para investigar as forças de interação existentes entre a sonda e a superfície da amostra. Estes resultados são obtidos por meio da técnica de Espectroscopia de Força Atômica. Esta técnica consiste no posicionamento da ponta de AFM em um local fixo, paralelo à superfície da amostra. Com o deslocamento do piezoelétrico no eixo z, a ponta aproxima-se gradualmente até entrar em contato

direto com a amostra, e em seguida retrai-se. Isto resulta em uma curva de força vs. distância, que demonstra a relação entre a deflexão do *cantilever* e a distância em que a ponta se encontra da superfície da amostra (GIOCONDO et al., 2012; JANSHOFF et al., 2000).

As curvas de força permitem quantificar a magnitude das forças de interação, permitindo a obtenção de dados acerca de propriedades adesivas e parâmetros viscoelásticos de materiais. Na figura 7 está representada esquematicamente uma curva de força vs. distância.

Figura 7 – Esquema de uma curva de força vs. distância típica, demonstrando o comportamento do *cantilever* em função do deslocamento do piezoeletrico.



Fonte: Adaptado de Shahin et al., 2005

No primeiro momento de uma curva de força (A), o *cantilever* e a ponta encontram-se a uma longa distância da amostra e nenhuma força é detectada. A aproximação da ponta faz com que ela seja abruptamente atraída, até entrar em contato direto com a amostra (B). Devido às forças de interação ponta-amostra (principalmente forças de *van der Waals*) o *cantilever* pode sofrer deflexões deslocando-se em direção a amostra, no caso das forças atrativas, ou se afastando sob a influência de forças repulsivas. A ponta é pressionada contra a superfície o que faz com que o *cantilever* se desloque para cima (C). No ponto D o movimento

da ponta é invertido e ela começa a ser retraída. Durante o afastamento, a adesão entre a ponta e a amostra, faz com que a ponta alcance uma distância que vai além do contato inicial. Em seguida ocorre a ruptura dessa interação (E) e a ponta volta a sua posição inicial (F). O intervalo entre os pontos E e F corresponde a força de adesão (F_{ad}). Este valor é de fundamental importância em estudos de reconhecimento molecular, pois demonstra a força necessária para que a ponta seja despreendida da amostra. Isto possibilita medir, com alta sensibilidade, interações entre moléculas (HINTERDORFER; DUFRÊNE, 2006).

3.2.2 Microscopia de Força Química

O estudo das forças de interação a partir da AFS tem se tornado uma área promissora, a qual permite entender mecanismos físicos e biológicos envolvidos no reconhecimento específico de biomoléculas. Estes resultados são possíveis por meio de modificações químicas nas sondas do AFM utilizando a técnica conhecida como Microscopia de Força Química (CFM, do inglês *Chemical Force Microscopy*) (NOY, 2006).

O conceito de CFM foi introduzido por Lieber e colaboradores, em 1994. Ele consiste na funcionalização da superfície de pontas de AFM (e muitas vezes da superfície da amostra), mediante a inserção de moléculas com grupos funcionais específicos, estruturadas de modo a formarem monocamadas orgânicas. Este processo permite que biomoléculas alvo sejam imobilizadas nas superfícies, formando um sistema ideal ponta-amostra que, através de forças de *Van der Waals* ou ligações covalentes, descrevem as interações existentes entre a ponta e a amostra de interesse (FRISBIE et al., 1994; NOY; VEZENOV; LIEBER, 1997).

A imobilização de biomoléculas é realizada, principalmente, em substratos como silício, vidro, mica e ouro. É necessário que a interação entre a biomolécula e a superfície inorgânica seja de uma grandeza maior que as forças que mantem os ligantes no reconhecimento ponta-amostra. Desta forma, a funcionalização é feita preferencialmente através de ligações covalentes. Também é de fundamental importância que a biomolécula permaneça em sua estrutura nativa e seja orientada de modo a deixar disponíveis seus sítios de interação (BIZZARRI; CANNISTRARO, 2010).

Desde a introdução da técnica de CFM, foram descritas diversas metodologias para a funcionalização das superfícies. Um dos primeiros métodos aplicados baseia-se na formação monocamadas auto montáveis de tiol em pontas de AFM revestidas de ouro. A ligação das biomoléculas neste método é possível devido à capacidade do ouro em formar ligações covalentes com o átomo de enxofre (VEZENOV; NOY; ASHBY, 2005).

Outra metodologia bastante utilizada para a modificações químicas de pontas de AFM são as monocamadas de compostos de silano. Neste processo, chamado de silanização, compostos derivados de silano reagem com hidroxilas presentes nas superfícies (alguns substratos já possuem os grupamentos hidroxilas, enquanto outros necessitam de um pré-tratamento), por meio de soluções com solventes orgânicos ou por deposição química de vapor (DE SMET et al., 2011).

A modificação química das superfícies da ponta do AFM e da amostra contida no substrato por meio da CFM permite que o AFM atue na detecção e no sensoriamento de biomoléculas alvo. O *cantilever* e a ponta de AFM realizam medidas pontuais de interação, como uma sensibilidade de piconewtons, possibilitando a análise das forças atuantes entre as moléculas. (FERREIRA; JUNIOR; RÓZ, 2014). Neste sistema, as interações entre as biomoléculas são quantificadas por intermédio de curvas de força vs. distância (descritas no item 3.3.5), obtidas pela técnica de AFS. As curvas de força possibilitam investigar a maneira como as biomoléculas interagem, como são formados os complexos ligante-receptor e também a orientação que estas assumem na ponta e no substrato (HINTERDORFER et al., 1998).

A partir das curvas de força é possível obter valores da força de adesão, a qual evidencia a força necessária para que ocorra a ruptura da interação. Estes valores estão diretamente relacionados com o reconhecimento dos grupos funcionais contidos na ponta e na amostra. Desta forma, conferem informações a respeito do quão específico é determinado sistema (STEFFENS et al., 2012).

A capacidade de detectar eventos de reconhecimento específico pela técnica de AFS têm aberto caminhos para diversos estudos relacionados às biomoléculas. O sucesso destes estudos advém de sua particularidade única de quantificar as forças de interação e realizar medidas de curvas de força vs. distância sem comprometer a integridade das amostras. Este fato é de fundamental importância para investigar o comportamento de moléculas biológicas, verificando seu sítio ativo, o modo como

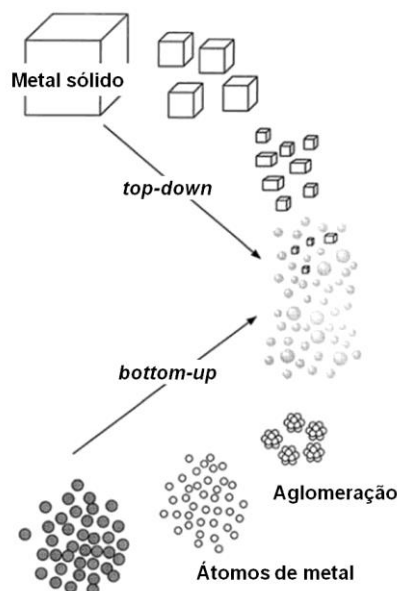
elas se interagem, sua estrutura, entre outras características que talvez passassem despercebidas com o uso de outros métodos que alterem suas características essenciais (CANNISTRARO; BIZZARRI, 2012).

3.3 Detecção óptica com nanopartículas de prata

O trabalho com materiais em nanoescala possibilita o aproveitamento de características e propriedades muitas vezes ausentes quando estes estão em macroescala, isso devido ao aumento da razão entre superfície e volume causado pela diminuição do tamanho desses materiais (NAIN; CHAUHAN, 2009). Este fato potencializa a utilização de materiais nanoestruturados, como as nanopartículas, para diversos estudos e desenvolvimento de produtos nanotecnológicos, que podem ser aplicados na medicina e em pesquisas relacionadas ao reconhecimento de interações biológicas (HOWES; RANA; STEVENS, 2014).

A preparação de nanopartículas pode ser realizada por meio de dois procedimentos, como mostra a figura 8: o primeiro, denominado *top-down*, consiste em processos físicos em que as nanoestruturas são desenvolvidas a partir de um bloco maior de material. Já a segunda abordagem, denominada *bottom up*, consiste em processos químicos, em que as nanopartículas são construídas átomo a átomo, por meio de uma síntese química (ZAHMAKIRAN; ÖZKAR, 2011).

Figura 8 - Procedimentos utilizados para sintetizar nanopartículas.



Fonte: Adaptado de Zahmakiran et al., 2011

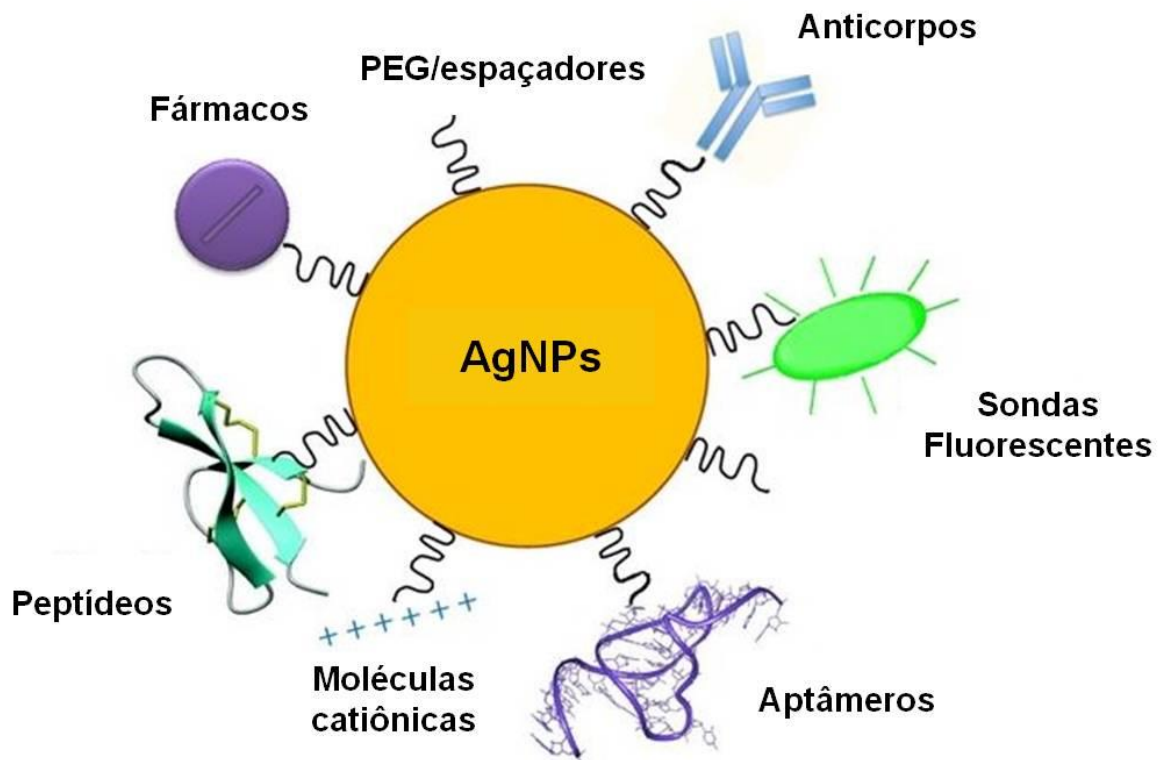
O processo químico de síntese vem sendo crescentemente utilizado para aplicações em sistemas biológicos, pois as nanopartículas em suspensão apresentam uma melhor dispersão em meio líquido, o que favorece a ocorrência de interações moleculares (WEI et al., 2015). Neste processo sintético, utiliza-se um precursor metálico em conjunto com um agente redutor e um agente estabilizante em uma reação de redução química controlada por parâmetros físico-químicos, como temperatura, pH, tempo de reação e concentração dos reagentes (NAIN; CHAUHAN, 2009).

As nanopartículas de prata (AgNPs) têm sido estudadas e aplicadas em diversas áreas, como na área médica e industrial, devido às suas características vantajosas, como uma boa área superficial, boa condutividade, alto potencial catalítico e propriedades antimicrobianas, favorecendo o desenvolvimento de produtos (G GUZMÁN; DILLE; GODET, 2009).

As AgNPs também apresentam grande potencial para o desenvolvimento de sensores biológicos (HOWES; RANA; STEVENS, 2014). Isto porque, nanopartículas metálicas, como as AgNPs, apresentam propriedades fotoquímicas de absorção e emissão de luz, que as tornam capazes de detectar moléculas específicas, gerando respostas ópticas observáveis. Este fato é atribuído a um fenômeno óptico chamado de ressonância plasmônica (MOCK et al., 2002). Neste fenômeno, ocorre uma oscilação coletiva dos elétrons, em uma frequência de ressonância igual a frequência da radiação eletromagnética incidente, que resulta em uma separação das cargas elétricas na superfície das partículas. O reconhecimento de moléculas específicas na superfície das nanopartículas ocasiona uma diminuição da ressonância plasmônica, devido à aproximação dos campos elétricos das partículas, o que leva a aglomeração dos sistemas e conseqüentemente uma mudança de cor das suspensões (ROSARIN; MIRUNALINI, 2011).

Nanopartículas de prata podem ser conjugadas a biomoléculas, por meio de um processo de funcionalização química, em que moléculas como anticorpos, proteínas e peptídeos são imobilizadas em sua superfície, podendo ser utilizadas na detecção de seu ligante específico (figura 9) (NGHIEM et al., 2010). Este fato possibilita a utilização destas partículas como nanobiossensores, altamente sensíveis e específicos, sendo possível mensurar o reconhecimento entre as moléculas, por meio da transdução do sinal químico de interação em sinais ópticos que podem ser observados à olho nu (ROSARIN; MIRUNALINI, 2011).

Figura 9 - Representação gráfica de AgNPs conjugadas com moléculas em sua superfície.



Fonte: Adaptado de Masserinil, 2013

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Escolha e obtenção dos peptídeos

Foram selecionados para a investigação os fragmentos peptídicos MSR/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄ e MOG₆₆₋₇₉, descritos no trabalho de Olival et al. (2013). Como amostras controles, foram escolhidas as sequências MSR/HERV-W₄₉₋₅₇ e MBP₈₅₋₉₉. A nomenclatura utilizada no trabalho e a sequência de aminoácidos dos peptídeos estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 – Descrição da nomenclatura, proteína, sequência de aminoácidos e número de resíduos dos peptídeos sintetizados.

Nomenclatura	Proteína	Sequência de aminoácidos	Número de resíduos
Peptídeo 1	MSR/HERV-W ₂₅₂₋₂₆₄	IRWVTPPTRIVCL	13
Peptídeo 2	MOG ₆₆₋₇₉	VGWYRPPFSRVVHL	14
Peptídeo 3	MSR/HERV-W ₄₉₋₅₇	APSYRSLSK	9
Peptídeo 4	MBP ₈₅₋₉₉	ENPVVHFFKNIIVTPR	15

A síntese e purificação dos peptídeos MSR/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄, MOG₆₆₋₇₉, MSR/HERV-W₄₉₋₅₇, e MBP₈₅₋₉₉ foram realizadas comercialmente pela empresa *Aminotech* - Pesquisa e Desenvolvimento Ltda. (Diadema, SP). Para assegurar a identidade e pureza dos peptídeos, análises de Espectroscopia de Massa e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foram realizadas pela empresa. A tabela 2 apresenta dados referentes às propriedades físico-químicas de cada peptídeo.

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas dos peptídeos utilizados no estudo.

	Peptídeo 1	Peptídeo 2	Peptídeo 3	Peptídeo 4
Peso Molecular	1553.92 g/mol	1712.99 g/mol	1008.13 g/mol	1797.06 g/mol
Ponto Isoelétrico	pH 10.7	pH 10.99	pH 10.5	pH 10.11

Carga em pH 7	1.9	2.1	2	1.1
Solubilidade	Baixa solubilidade em água	Baixa solubilidade em água	Boa solubilidade em água	Baixa solubilidade em água

* Dados obtidos por meio do site pepcalc.com

4.2 Obtenção dos anticorpos

Os anticorpos policlonais anti-peptídeo 1 foram obtidos em parceria com a empresa *Rheabiotech*– Desenvolvimento, Produção e Comercialização de Produtos de Biotecnologia Ltda. (Campinas, SP). Eles foram produzidos em coelhos a partir da sequência peptídica de MSR/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄ (peptídeo 1). Para comprovar a especificidade dos anticorpos, a empresa realizou análises por ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), purificação por cromatografia de afinidade à proteína G e quantificação pelo método de *Bradford*.

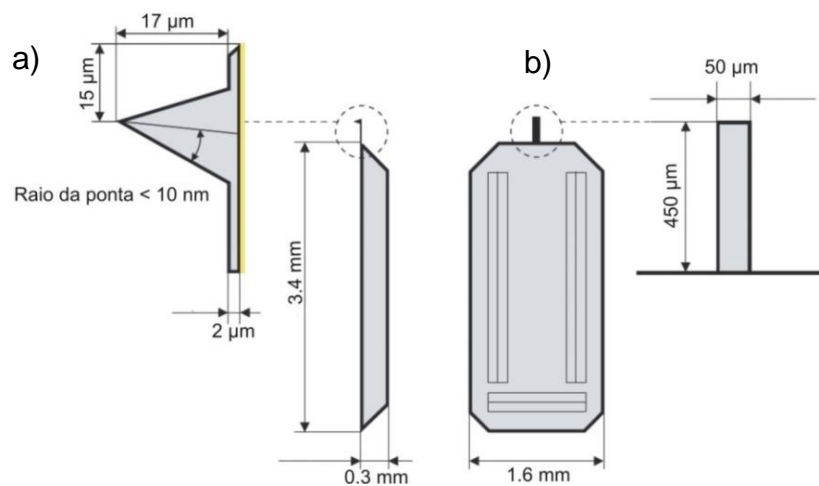
4.3 Funcionalização das superfícies

O processo de funcionalização é realizado para que biomoléculas sejam imobilizadas em superfícies de pontas de AFM e no substrato de mica muscovita, podendo assim ser submetidas a interações em um experimento de AFS. Esta metodologia baseou-se em protocolos já utilizados e estabelecidos na literatura (BUENO et al., 2014; DA SILVA et al., 2013; ETCHEGARAY; BUENO; TESCHKE, 2010; FISCHER, 2010; GARCIA et al., 2015; SCHWARTZ; ALVAREZ; SAILOR, 2007; ZENG; LI; SHAO, 2012), porém fez-se a adequação aos grupos funcionais disponíveis para ligação com as biomoléculas utilizadas neste estudo. Os fragmentos peptídicos foram imobilizados nas pontas de AFM, enquanto os anticorpos foram imobilizados no substrato de mica muscovita.

4.3.1 Funcionalização de pontas de AFM

Para a funcionalização, foram utilizados *cantilevers* retangulares de silício (Si) (ContaAl-G, Budget Sensors - Innovative Solutions Bulgaria Ltd., Bulgária) que apresentam um raio de curvatura da ponta < 10 nm, constante de mola de 0,2 N/m, frequência de ressonância de 13 kHz e superfície reflexiva de 30nm de alumínio. As especificações do *cantilever* e da ponta estão representadas na figura 10.

Figura 10 – Representação esquemática das dimensões da ponta (a) e do *cantilever* (b).



Fonte: www.budgetsensors.com

Inicialmente, as pontas de AFM foram esterilizadas em luz ultravioleta (UV) (240nm) e ozônio (ProCleaner™, modelo UV.PC.220 Plus, BIOFORCE Nanosciences) durante 20 min. Em seguida, as pontas permaneceram por 45 min na câmara de reação, junto com recipientes contendo 40µL de 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES 98% - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e 40µL de trietilamina (TEA 99% - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para a deposição dos vapores e silanização das superfícies. A estrutura do APTES é formada por um grupo silano em uma das extremidades e um grupo amina na outra. Ele atua ancorando biomoléculas em uma superfície sólida (como pontas de AFM) e também como espaçador conferindo maior liberdade a molécula. Sua utilização tem como vantagem a facilidade do preparo e a obtenção de monocamadas uniformes e estáveis. A ligação do APTES nas superfícies faz com que seu grupo amina esteja

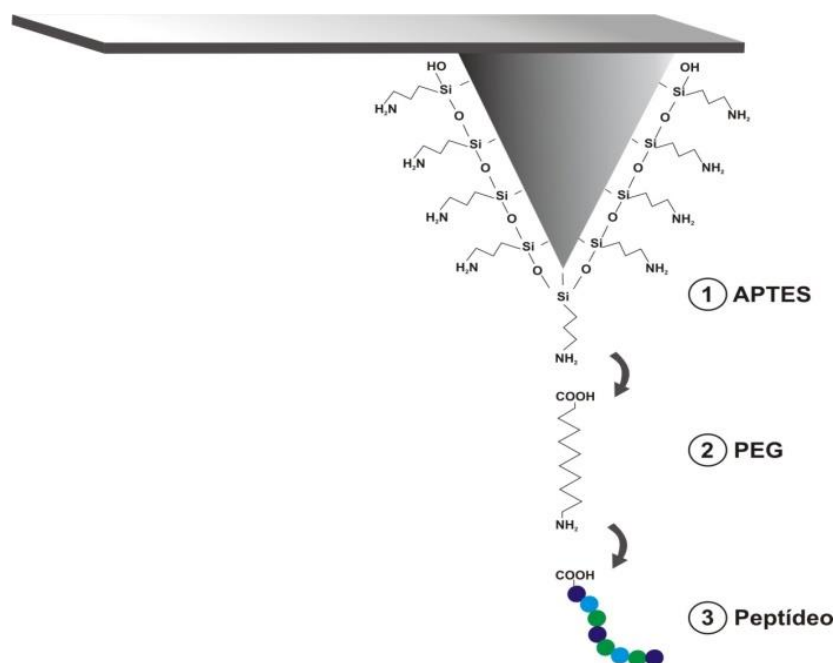
disponível para interação, podendo ligar-se covalentemente a outras biomoléculas (VASHIST et al., 2014).

O passo seguinte consistiu na imersão das pontas na solução de ácido polietilenoglicol 2-aminoetil eter (PEG - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Esta solução foi ativada por meio da adição do cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) 0,4M e o N-hidroxissuccinimida (NHS) 0,1M. O PEG possui em uma de suas terminações um grupo carboxila capaz de reagir e ligar-se covalentemente ao grupo amina proveniente do APTES. A sua utilização aumenta o potencial da funcionalização, propiciando a molécula uma maior mobilidade, evitando distorções e sua desnaturação, que pode ocorrer devido ao contato com a superfície (BIZZARRI; CANNISTRARO, 2010, 2014).

As pontas permaneceram imersas nessa solução por 2h, à 4°C. Após esse período, as pontas de AFM foram lavadas três vezes com água Milli-Q e imersas em solução contendo o peptídeo (20µg/mL) ativado pelo complexo EDC/NHS. Neste passo, o grupo terminal amina do PEG reage com a carboxila do peptídeo, unindo-se a ele covalentemente.

Esta solução foi mantida por 12h, à 4°C. As pontas foram então retiradas e utilizadas para a análise no AFM (ver figura 11).

Figura 11 – Representação esquemática das etapas de funcionalização da ponta de AFM.



Fonte: Elaborado pela autora

4.3.2 Funcionalização do substrato

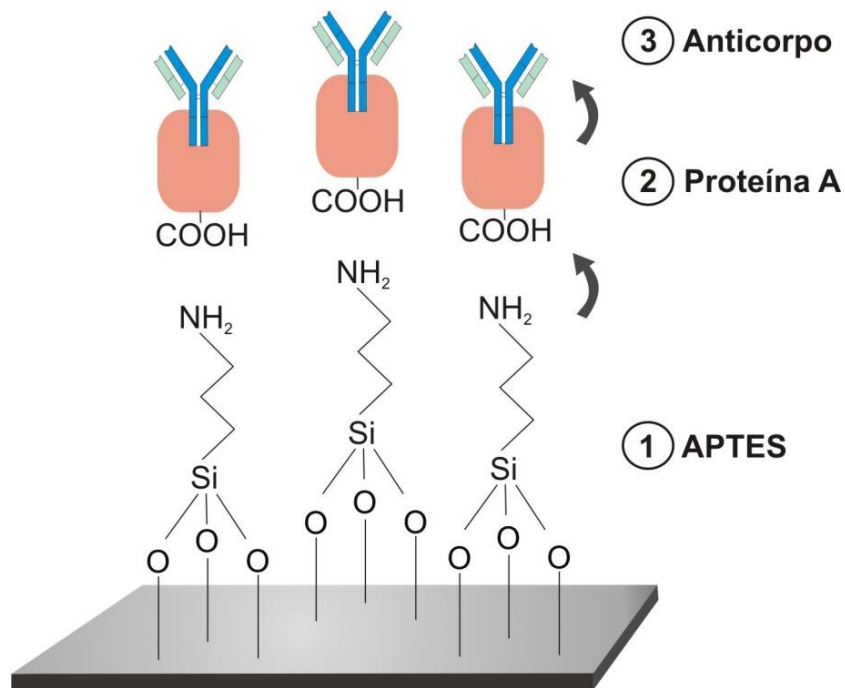
O substrato utilizado foi a mica muscovita (*Ted Pella, Inc, Redding, California, USA*) a qual possui dimensões de 15x15 mm.

Para a funcionalização, as micas muscovitas foram primeiramente clivadas utilizando uma fita adesiva e, em sequência, passaram pelo procedimento de limpeza utilizando ozônio e luz UV, no equipamento *ProCleaner*. Após isso, as micas foram submetidas ao processo de silanização mediante a evaporação de 40µL dos compostos APTES e TEA.

Terminados estes passos, as micas foram imersas em solução contendo a proteína A recombinante (*Thermo Scientific Pierce™*) (0,1mg/mL), ativada pelo complexo EDC/NHS. As carboxilas da proteína A interagem com o grupamento amina do APTES promovendo a sua ligação. As micas permaneceram imersas nesta solução por 2h, à 4°C. Em seguida, elas foram lavadas três vezes com água Milli-Q e imersas em solução contendo os anticorpos (100µg/mL). A funcionalização do substrato utilizando a proteína A promove a orientação dos anticorpos, tornando estes posicionados com o seus sítios de interação (fragmento Fab) disponíveis para o reconhecimento do peptídeo contido na ponta de AFM. Estudos demonstraram que a proteína A apresenta uma alta afinidade pelo fragmento Fc do anticorpo, ligando-se a ele. Assim, ela tem sido utilizada em diversos protocolos de imobilização orientada de anticorpos (CARUSO; RODDA; FURLONG, 1996; STARODUB et al., 2005; TRILLING; BEEKWILDER; ZUILHOF, 2013).

As micas muscovitas imersas em solução permaneceram incubadas em estufa à 37°C, durante 12h (Ver figura 12).

Figura 12 – Representação esquemática das etapas de funcionalização do substrato.



Fonte: Elaborado pela autora

4.4 Caracterização de superfícies

A fim de verificar se as superfícies funcionalizadas estavam efetivamente revestidas pelas biomoléculas de interesse, foi realizada a caracterização da ponta de AFM por meio das técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), e a caracterização da mica muscovita por Microscopia de Fluorescência.

4.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A caracterização de pontas de AFM pela Microscopia Eletrônica de Varredura possibilita a obtenção de imagens de alta resolução da ponta que permitem avaliar a sua integridade bem como indícios do processo de funcionalização. O MEV utilizado foi o modelo Hitachi TM 3000 Table Microscope.

Para a análise, as pontas foram colocadas sob a fita adesiva de carbono e posicionadas no equipamento, para serem observadas em diversos aumentos. As

pontas de AFM analisadas foram: a) ponta não funcionalizada sem uso; b) ponta funcionalizada sem uso e c) ponta funcionalizada após medidas de curvas de força.

4.4.2 Infravermelho por Transformada de Fourier

As análises por meio do Infravermelho por Transformada de *Fourier* foram realizadas a fim de se verificar os compostos utilizados na funcionalização da ponta de AFM, como também identificar os grupos químicos envolvidos nas ligações das moléculas. Para isso utilizou-se um equipamento *Nicolet IR200 FT-IR*, da *Thermo Scientific™*.

Devido ao fato da ponta e o *cantilever* possuírem dimensões reduzidas, o que inviabilizaria sua análise no equipamento, as superfícies utilizadas foram placas de silício. Cada placa passou pelo procedimento de limpeza, permanecendo por 30 minutos na luz UV e ozônio (*ProCleaner*). Em seguida reproduziu-se o mesmo protocolo utilizado na funcionalização das pontas de AFM. Foram analisadas placas contendo: a) APTES, b) PEG e c) placa funcionalizada com APTES-PEG-Peptídeo.

Para os dados referentes ao FTIR foram elaborados gráficos de espectroscopia na região do infravermelho do espectro eletromagnético, por meio de *softwares* gráficos de análise de dados e estatística.

4.4.3 Microscopia de Fluorescência

Realizaram-se análises por microscopia de fluorescência para caracterizar a as etapas de funcionalização da mica muscovita. Para isso, foi utilizado um microscópio trinocular *Leica DM 4000B* com câmera digital *Leica DFC310 FX*. As imagens foram visualizadas por meio do módulo *Leica Image Analysis*.

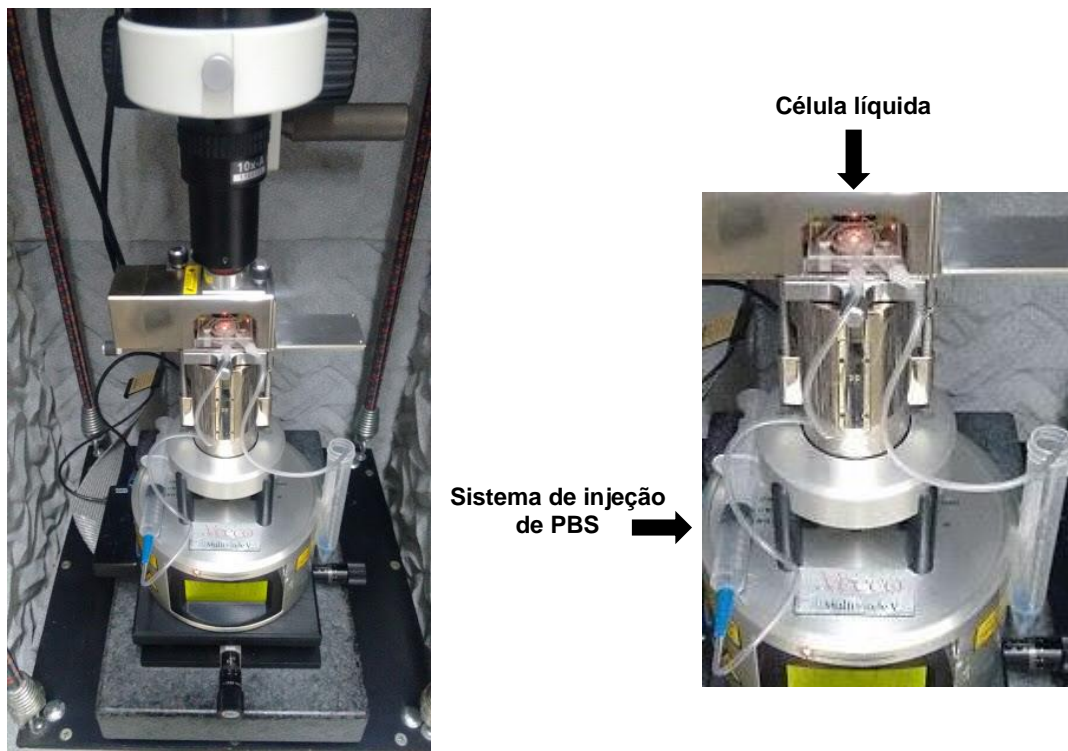
Foram preparadas para a análise: a) a mica não funcionalizada, b) a mica contendo o APTES, c) a mica contendo o APTES e a Proteína A e d) a mica contendo todas as etapas da funcionalização, sendo estas o APTES, a proteína A e o anticorpo anti-MSRV/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄. Com exceção da mica não funcionalizada, todas as amostras foram marcadas com o anticorpo secundário anti-*Rabbit* conjugado com FITC (F0382 - Sigma Aldrich). Para a marcação, as micas foram lavadas três vezes com a solução de PBS/BSA 1%, permanecendo imersas na solução por alguns minutos. Em seguida, as micas foram imersas na solução em

PBS do anticorpo secundário anti-*Rabbit*, a uma diluição de 1:100, permanecendo incubadas por 2h, na geladeira. Após esse período, as micas foram lavadas cinco vezes com a solução de PBS/BSA 1% e mantida a 4°C, ao abrigo da luz, até serem realizadas as análises.

4.5 Espectroscopia de Força Atômica

Os experimentos de AFS foram desenvolvidos com um AFM Veeco, sistema *Multimode-V*, com pacote *PicoForce*, como mostra a figura 13.

Figura 13 – Microscópio de força atômica preparado em meio líquido.



Fonte: Elaborado pela autora

Após a funcionalização das pontas de AFM e do substrato de mica muscovita, foram realizadas medidas de curva de força vs. distância, a fim de quantificar a força de adesão existente na interação entre os peptídeos imobilizados na ponta e os anticorpos imobilizados no substrato.

As análises foram realizadas em meio líquido utilizando o sistema composto pela célula líquida. A cada medida injetou-se o Tampão Fosfato Salino (PBS – do

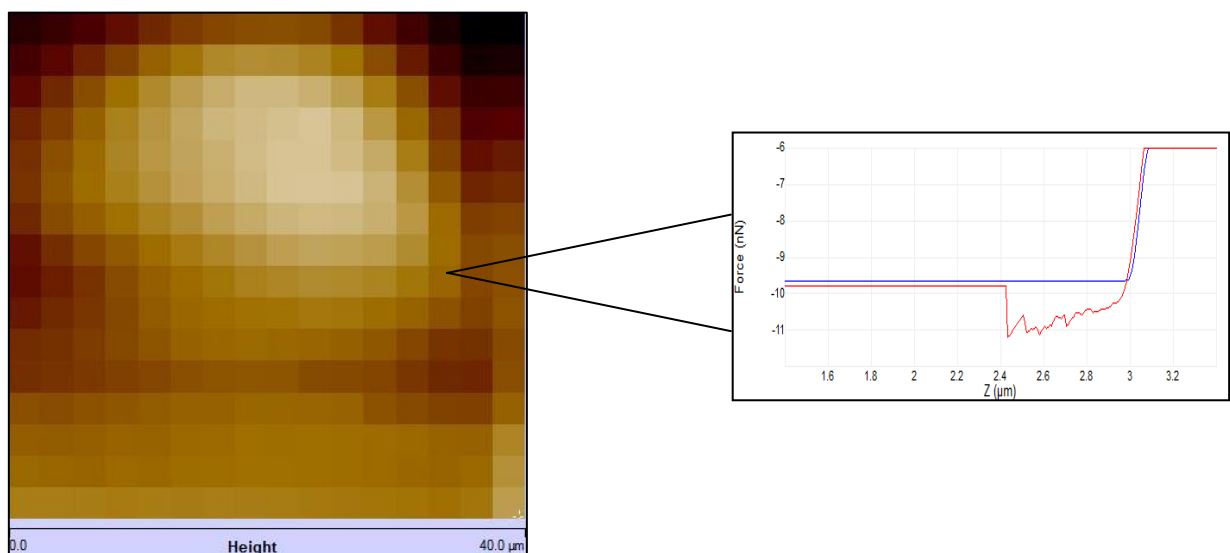
inglês *Phosphate Buffered Saline*) pH 7,4, aquecido à 37°C, por ser essa a temperatura ótima para interação com os anticorpos (YEOW; TABOR; GARNIER, 2017). Realizaram-se medidas por AFS para os sistemas descritos na tabela 3.

Tabela 3 – Sistema utilizados para as análises por Espectroscopia de Força Atômica.

Sistemas	Ponta de AFM	Mica
1	Peptídeo 1	anti-MSRV/HERV-W ₂₅₂₋₂₆₄
2	Peptídeo 2	anti-MSRV/HERV-W ₂₅₂₋₂₆₄
3	Peptídeo 3	anti-MSRV/HERV-W ₂₅₂₋₂₆₄
4	Ponta não funcionalizada	anti-MSRV/HERV-W ₂₅₂₋₂₆₄

Para a obtenção das curvas de força, utilizou-se a ferramenta *Force Volume* disponível no *software NanoScope 7.0*. Esta estratégia de medidas permite que seja realizado o mapeamento de uma área específica da mica, na qual cada curva de força é mensurada em um local diferente da mica. A figura 14 demonstra o *Force Volume* de uma área de 40 μm^2 da mica, em que cada quadrado da imagem (*pixel*) representa uma nova curva de força.

Figura 14 – Representação da ferramenta *Force Volume* exemplificando a curva de força por ela obtida.



Fonte: Elaborado pela autora

Obteve-se 150 curvas de força para cada sistema estudado. Elas foram analisadas de forma individual, considerando a força referente ao último pico identificado (SORCI et al., 2013). As amostras foram realizadas em triplicata.

Ajustou-se o tempo de interação entre a ponta funcionalizada e o substrato em 5 segundos e estabeleceu-se o set point de 0,5 V (ADAMS et al., 2012).

O tratamento das curvas de força foi realizado com o auxílio do *software NanoScope Analysis v 1.70 (Bruker Corporation)*. Para estes dados foram elaborados gráficos de colunas e diagramas de caixa utilizando-se de *softwares* gráficos de análise de dados e estatística. O diagrama de caixa é uma ferramenta de tratamento estatístico, utilizada para compara um conjunto de dados com diferentes distribuições, sendo de interesse em sistemas biológicos devido ao grau de variação das análises. Por meio dele é possível visualizar a dispersão dos resultados, a tendência central (mediana), a forma de distribuição e simetria (correspondentes aos valores mínimos e valores máximos dos dados), além de valores atípicos e extremos que são plotados como pontos individuais (SPITZER et al., 2014).

4.6 Detecção óptica com nanopartículas de prata

O método de detecção utilizando nanopartículas de prata (AgNPs) foi desenvolvido em colaboração com a mestrande Akemi Martins Higa (Processo FAPESP 2015/06847-0), baseado no processo de funcionalização descrito no trabalho de Tang et al. (2010).

A funcionalização das AgNPs com os peptídeos, permite a sua aplicação como nanobiossensores, para a detecção de moléculas-alvo, como os anticorpos (YUAN et al., 2012). Essa interação é detectável, devido às propriedades fotoquímicas de absorção e emissão de luz das nanopartículas, por meio da quantificação das mudanças no espectro de absorção e, também, pela observação da cor das suspensões, que indicam a ocorrência de um reconhecimento molecular específico (SHIM; LIM; NAM, 2008; SPAMPINATO et al., 2016).

4.6.1 Síntese das nanopartículas de prata

A síntese das AgNPs foi realizada a partir da redução química do nitrato de prata pelo citrato de sódio, utilizando-se o método do citrato (KIMLING et al., 2006).

Inicialmente, preparou-se uma solução aquosa de 100 mL de nitrato de prata (AgNO_3 , 99%, Labsynth, Diadema, São Paulo) (1,0 mmol/L). Esta solução foi mantida sob agitação e aquecida até alcançar a temperatura de 90°C. Em seguida, adicionou-se a essa solução 1 mL de uma solução aquosa de citrato de sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$, 99%, Labsynth, Diadema, São Paulo) (0,3 mol/L) e esta continuou sob agitação e aquecimento até apresentar uma coloração amarela, característica da formação das AgNPs em suspensão. Após isso, foram adicionados 200 μL de uma solução aquosa de hidróxido de amônia (28%), a fim de estabilizar as nanopartículas (GORUP et al., 2011). A suspensão de AgNPs foi então resfriada até chegar a temperatura ambiente e armazenada à 4°C, ao abrigo da luz.

4.6.2 Funcionalização das nanopartículas de prata com os peptídeos

As AgNPs foram funcionalizadas covalentemente com os peptídeos MSR/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄, MOG₆₆₋₇₉, MSR/HERV-W₄₉₋₅₇ e MBP₈₅₋₉₉ denominados, respectivamente, como peptídeo 1, peptídeo 2, peptídeo 3 e peptídeo 4.

O processo de funcionalização consistiu na modificação química da superfície das nanopartículas por meio da ligação Ag-S, promovida pelo ácido 11-mercaptoundecanoico (11-MUA 95% Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA). Em 1,5 mL da suspensão de AgNPs adicionou-se 175 μL da solução etanólica de 11-MUA (0,025 mM). Esperou-se o tempo de 2h em temperatura ambiente. Em sequência, foram adicionados 162,5 μL do composto EDC (0,04 mM) e 162,5 μL de NHS (0,3 mM) para formação de um grupo funcional amino-reativo, a fim de que os grupamentos amina dos peptídeos pudessem ser ligados à superfície modificada das nanopartículas, pela formação de uma ligação amida. A suspensão permaneceu por 40 min em temperatura ambiente. Por fim, adicionou-se 500 μL da solução de peptídeo, a uma diluição de 1:500, à suspensão de nanopartículas, a qual foi mantida em temperatura ambiente pelo período de 2h e armazenadas à 4°C, por 12h.

Para a análise da detecção do anticorpo de interesse, foram realizados os ensaios de interação, que consistiram na adição de 500 µL da solução do anticorpo anti-MSRV/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄, a uma diluição de 1:500, à suspensão de AgNPs funcionalizadas com os peptídeos. A suspensão foi mantida em reação por 1h à 37°C, para formação do complexo AgNPs-peptídeo-anticorpo (TANG; DONG; REN, 2010).

4.6.3 Espectrofotometria na Região do Ultravioleta-Visível

A técnica de espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) foi empregada para verificar a interação das AgNPs funcionalizadas com os peptídeos com o anticorpo anti-MSRV/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄.

Para esta análise, utilizou-se um espectrofotômetro (*Shimadzu UV-Vis-NIR 3600*) na região ultravioleta-visível do espectro eletromagnético (200 - 800 nm), com intervalo de leitura de 0,1 nm.

A análise dos dados obtidos no UV-Vis e a elaboração dos gráficos foram feitas por intermédio de *softwares* gráficos de análise de dados e estatística.

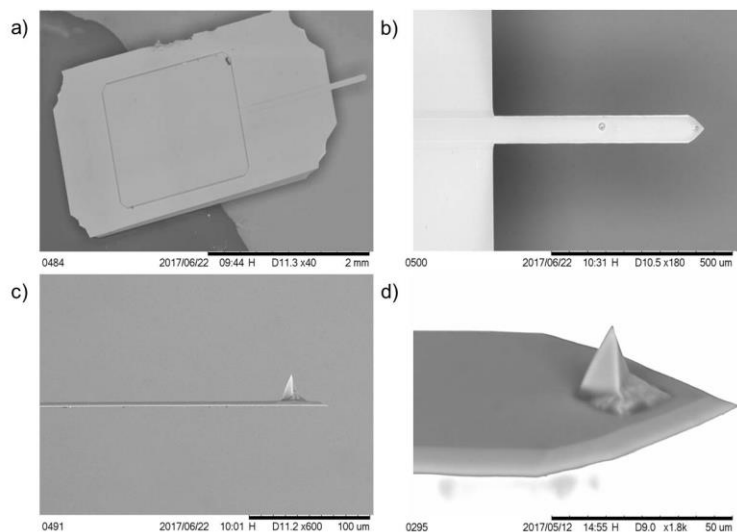
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos processos de funcionalização das superfícies

5.1.1 Caracterização das pontas de AFM por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A caracterização por meio do MEV permitiu a obtenção de imagens da superfície do chip evidenciando o *cantilever* retangular e a ponta localizada em sua extremidade, como está demonstrado na figura 15.

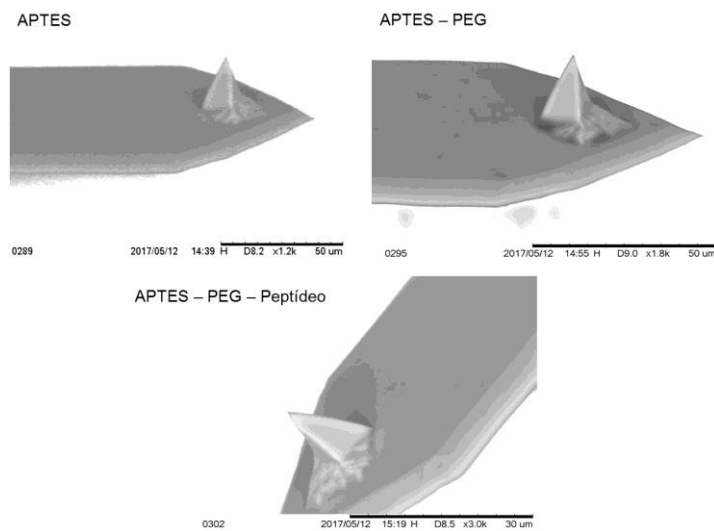
Figura 15 - Imagem de MEV demonstrando o chip (a), a parte superior do *cantilever* (b), a parte lateral do *cantilever* (c) e a ponta de AFM utilizada nos experimentos (d).



Foram realizadas imagens de MEV, em vários aumentos, correspondentes a todas as etapas da funcionalização, sendo estas o processo de silanização a partir do APTES, a adição do composto PEG e por fim a adição da solução contendo o peptídeo. Os resultados expressos na figura 16 demonstraram que a integridade da ponta de AFM se manteve em todas as etapas, não havendo nenhum dano proveniente da funcionalização. Entretanto, não foi possível observar as biomoléculas aderidas à ponta ou indícios da funcionalização devido ao limite de resolução do equipamento e decorrente ao preparo e concentração das amostras.

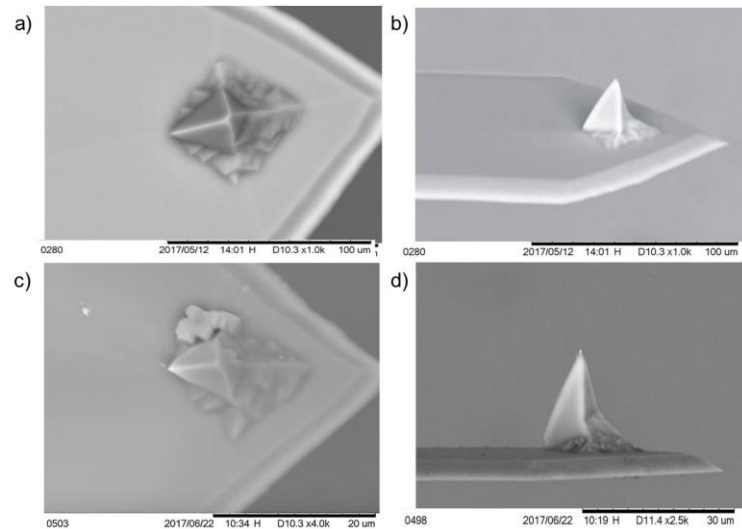
Devido a isso, a caracterização da funcionalização da ponta de AFM foi realizada utilizando a técnica de FTIR, como está descrito no tópico a seguir.

Figura 16 - Imagem de MEV exemplificando as etapas de funcionalização da ponta de AFM.



Obtiveram-se também imagens da ponta de AFM nova após passar pelo procedimento de limpeza e da ponta de AFM funcionalizada seguida de sua utilização em um experimento de AFS (figura 17). Nota-se que ambas permaneceram íntegras, o que sugere que a quantidade de dados (curvas de força) obtidos neste sistema por meio da ponta não provoca um desgaste significativo. Este fato possibilita a aplicação de procedimentos de limpeza e recilagem da ponta de AFM que já foram usadas, por meio de soluções ácidas, sugeridas por diversos trabalhos (DE SOUZA; ANDRADE; NEVES, 2002; MRINALINI; JAYANTH, 2016; SIRGHI et al., 2006), podendo ser estudada a sua reutilização.

Figura 17 - Comparação entre a ponta nova (a e b) e a ponta após a realização de um experimento de AFS (c e d).



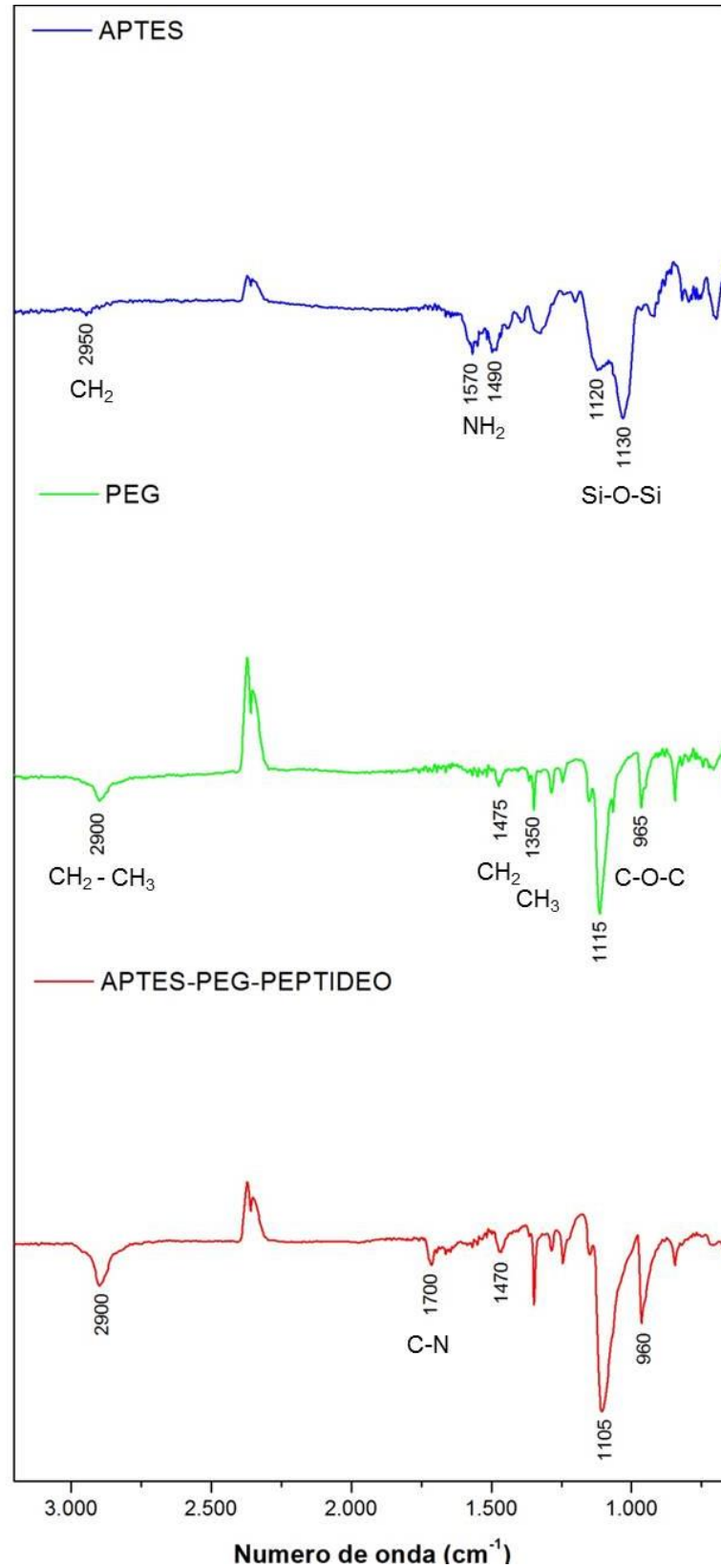
5.1.2 Caracterização por Infravermelho por Transformada de *Fourier* (FTIR)

A técnica de FTIR baseia-se na quantificação das vibrações moleculares de compostos químicos, sendo que cada composto apresenta uma banda de vibração específica, que está relacionada a uma frequência da radiação infravermelha. Assim, por meio da vibração é possível identificar os grupos funcionais presentes nas moléculas (BAKER et al., 2014). Ela foi aplicada a fim de se verificar a efetividade da funcionalização das pontas de AFM e a caracterização dos compostos utilizados. Os espectros obtidos no FTIR foram analisados por meio da comparação com dados disponíveis na literatura.

Como exposto na figura 18, a placa de silício contendo o APTES apresentou bandas de absorção características com picos a $1120 - 1130 \text{ cm}^{-1}$, que correspondem ao estiramento do grupo Si-O-Si. A região mostrada a $1570 \text{ cm}^{-1} - 1490 \text{ cm}^{-1}$ indica a deformação angular do grupo terminal NH_2 do APTES e a banda expressa a 2950 cm^{-1} sinaliza o estiramento do grupamento CH_2 (GUNDA et al., 2014; LAPIN; CHABAL, 2009; WANG et al., 2015).

O espectro referente ao PEG (figura 18) evidencia o estiramento de CH_2 e CH_3 na região de 2900 cm^{-1} e a deformação angular de CH_2 em 1475 cm^{-1} e CH_3 1350 cm^{-1} . O pico localizado próximo de 1115 cm^{-1} e 965 cm^{-1} indica respectivamente o estiramento assimétrico e simétrico de C-O-C (ZHANG et al., 2015).

Figura 18 – Espectros de FTIR obtidos para placas de silício contendo APTES (a), PEG (b) e APTES-PEG-PEPTÍDEO (c).

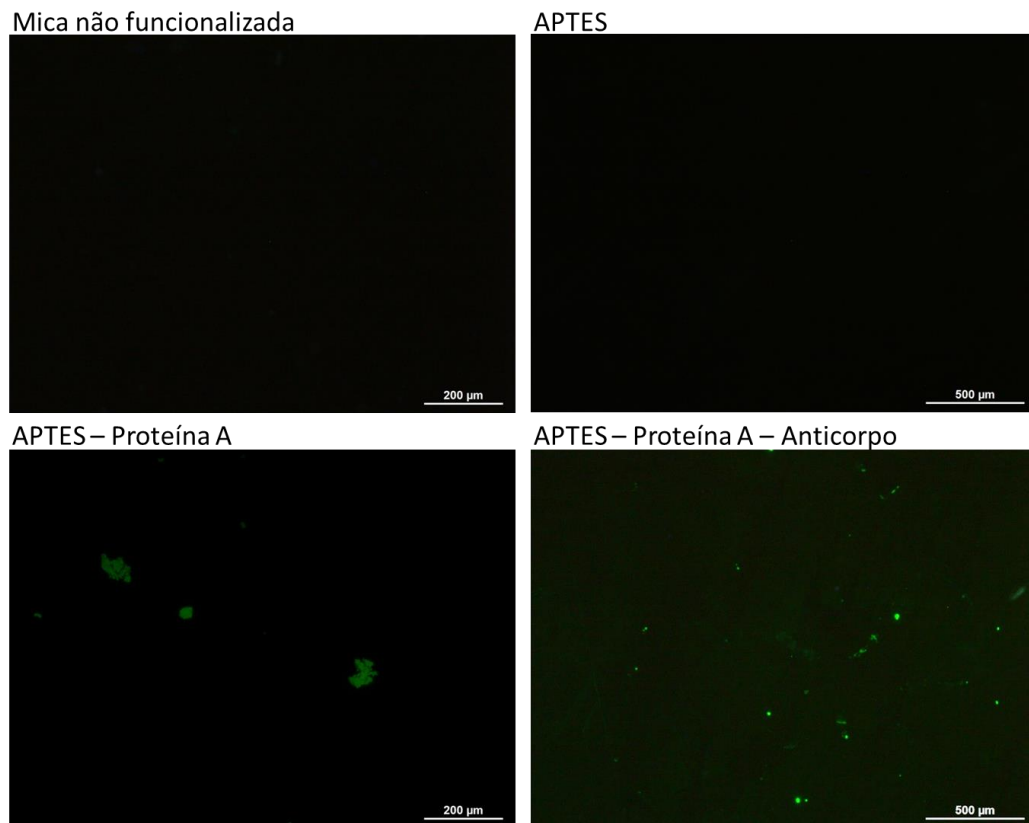


Na placa de silício correspondente a todas as etapas da funcionalização (APTES, PEG e o peptídeo) (ver figura 18) é possível observar a presença dos picos correspondentes ao PEG, como a banda expressa a 2900 cm^{-1} que se refere aos grupos CH_2 e CH_3 . A banda correspondente à região proximal de 1700 cm^{-1} indica a ligação C-N (FENG et al., 2008), o que evidencia o processo de funcionalização, demonstrando a interação entre APTES-PEG-Peptídeo. Na funcionalização das pontas de AFM, a amina terminal do APTES reage com a carboxila livre do PEG, e o PEG por sua vez liga-se por meio de seu grupo amina terminal ao grupamento carboxila do peptídeo, ambos mediante a uma ligação amida entre carbono e o nitrogênio.

5.1.3 Análises por Microscopia de Fluorescência

Os resultados obtidos pela microscopia de fluorescência (figura 19), demonstraram a ausência de fluorescência nas imagens correspondentes a mica limpa e a mica após a silanização pelo APTES. Na mica funcionalizada com o APTES e a proteína A foi possível observar a presença de aglutinados, possivelmente causados por uma homogeneização insuficiente do anticorpo secundário, podendo ser também resquícios que não foram eliminados pela lavagem com o PBS. Foi possível observar a emissão de fluorescência, apresentando a coloração verde por toda a amostra, somente na mica contendo todas as etapas da funcionalização, por meio da ligação do anticorpo secundário *anti-Rabbit* ao anticorpo policlonal anti-MSRV/HERV₂₅₂₋₂₆₄, produzido em coelhos. Este fato confirma a funcionalização do anticorpo na mica, por meio da sua imobilização pela interação com a proteína A (CARUSO; RODDA; FURLONG, 1996; SORCI et al., 2013; TRILLING; BEEKWILDER; ZUILHOF, 2013), podendo ser verificado a formação de uma camada uniforme de revestimento do anticorpo, o que viabiliza a sua interação com o peptídeo contido na ponta de AFM.

Figura 19 – Imagens por microscopia de fluorescência das etapas de funcionalização da mica muscovita.



5.2 Análises por Espectroscopia de Força Atômica - Nanossensoriamento

5.2.1 Reconhecimento molecular entre complexos biológicos

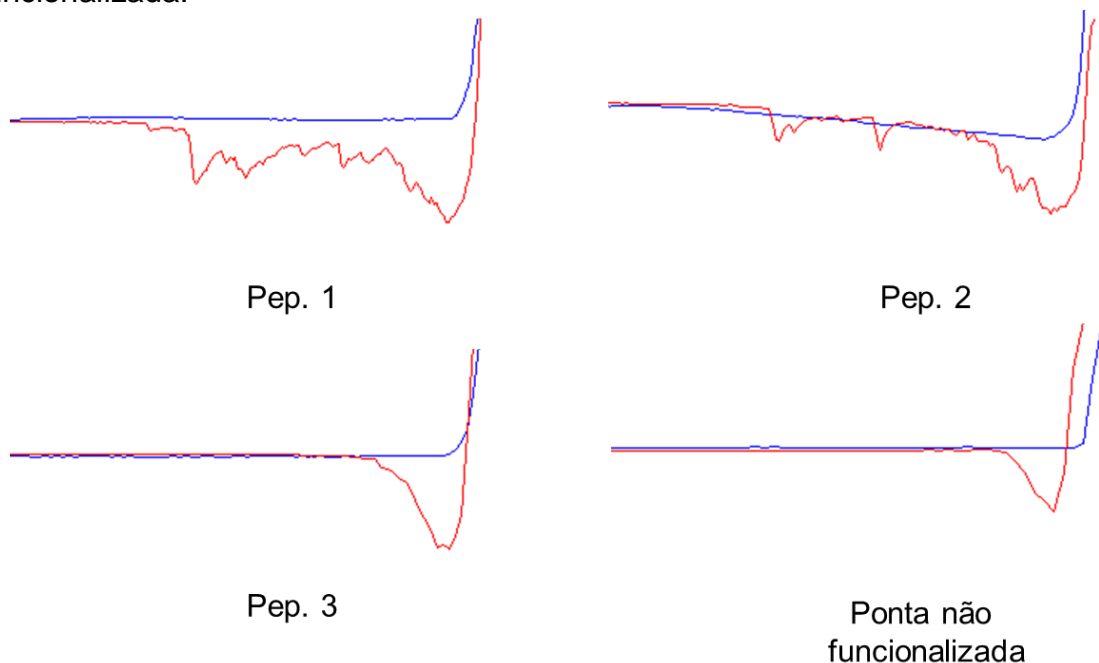
A funcionalização química de superfícies tem potencializado o estudo do reconhecimento específico entre moléculas biológicas e aberto caminhos para diversas pesquisas nesta área, incluindo as análises por AFS (BOWERS et al., 2012).

As curvas de força vs. distância, obtidas por experimentos de AFS, provenientes de sistemas de reconhecimento molecular específico, como em interações antígeno-anticorpo, apresentam formatos característicos, no qual tipicamente se observa a formação de múltiplos picos em sua fase de retração (representada pela linha vermelha na figura 20) (DAMMER et al., 1996). Nestes sistemas, a ponta após entrar em contato com o substrato é retraída e então ocorre o desenovelamento da biomolécula, que é alongada até o ponto em que ela se desprende, resultando no aparecimento de picos e um formato característico de

dente de serra nas curvas de força. O último pico representado corresponde à força de ruptura entre as biomoléculas e indica a força de adesão do sistema (OTT et al., 2017). Reconhece-se também uma curva de força específica pelo formato da linha de retração (em vermelho, na figura 20), em geral a ponta antes de tocar a amostra apresenta um comportamento não linear. Já em relação a interações inespecíficas não é esperado a formação de picos nas curvas e o seu caimento durante a fase de retração é linear (BIZZARRI; CANNISTRARO, 2014; OTT et al., 2017).

Os padrões dos formatos de curvas de força encontrados nos experimentos de AFS estão exemplificados na figura 20. Observou-se curvas de força com formatos específicos (curvas com múltiplos picos) para os peptídeos 1 e 2, e formatos inespecíficos (curvas lineares) para o peptídeo 3 e no sistema utilizando a ponta de AFM não funcionalizada.

Figura 20 - Imagem gráfica representando os padrões de curvas de força encontrados para os peptídeos 1, 2, 3 e utilizando a ponta de AFM não funcionalizada.



Embora se tenha estabelecido os padrões de curvas para as interações, pode ocorrer o aparecimento de curvas de forças com uma grande variedade de formas e a determinação e distinção de interações específicas e inespecíficas torna-se uma tarefa complexa. Os estudos de Bowers et al., (2013) demonstraram que o formato das curvas por si só não revela a especificidade da ligação. De acordo com os

autores é fundamental verificar os valores de força de adesão para cada complexo e também utilizar um sistema eficiente de bloqueio de interações inespecífica, que minimizem as chances de erros e viés na análise dos resultados. Neste sentido, a utilização do PEG, neste trabalho, como espaçador contribui na distinção de eventos de reconhecimento específico e não específico entre a ponta e a amostra. Por consistir maior mobilidade para a molécula imobilizada na ponta de AFM, há maiores chances que esta reconheça seu ligante específico, minimizando o impacto de interações inespecíficas (BIZZARRI; CANNISTRARO, 2014; BOWERS et al., 2012). Foram utilizados como base para as análises os valores de força de adesão correspondentes à interação antígeno-anticorpo, mencionados na literatura em trabalhos semelhantes, estando eles na faixa entre 20 – 250 pN (SULCHEK et al., 2005; HINTERDORFER; DUFRÊNE, 2006; MÜLLER et al., 2009). O tempo em que a ponta permanece em contato com o substrato e a força aplicada no contato são fatores que podem interferir substancialmente na intensidade e especificidade da interação. Em nosso caso, tanto o tempo quanto a força aplicada foram mantido constantes. Forças maiores de contato podem proporcionar um maior reconhecimento, entretanto pode-se levar também ao reconhecimento de interações inespecíficas, sendo mais eficiente minimizar as forças para garantir resultados que representem as interações.

5.2.2 Análise comparativa dos resultados por Espectroscopia de Força Atômica

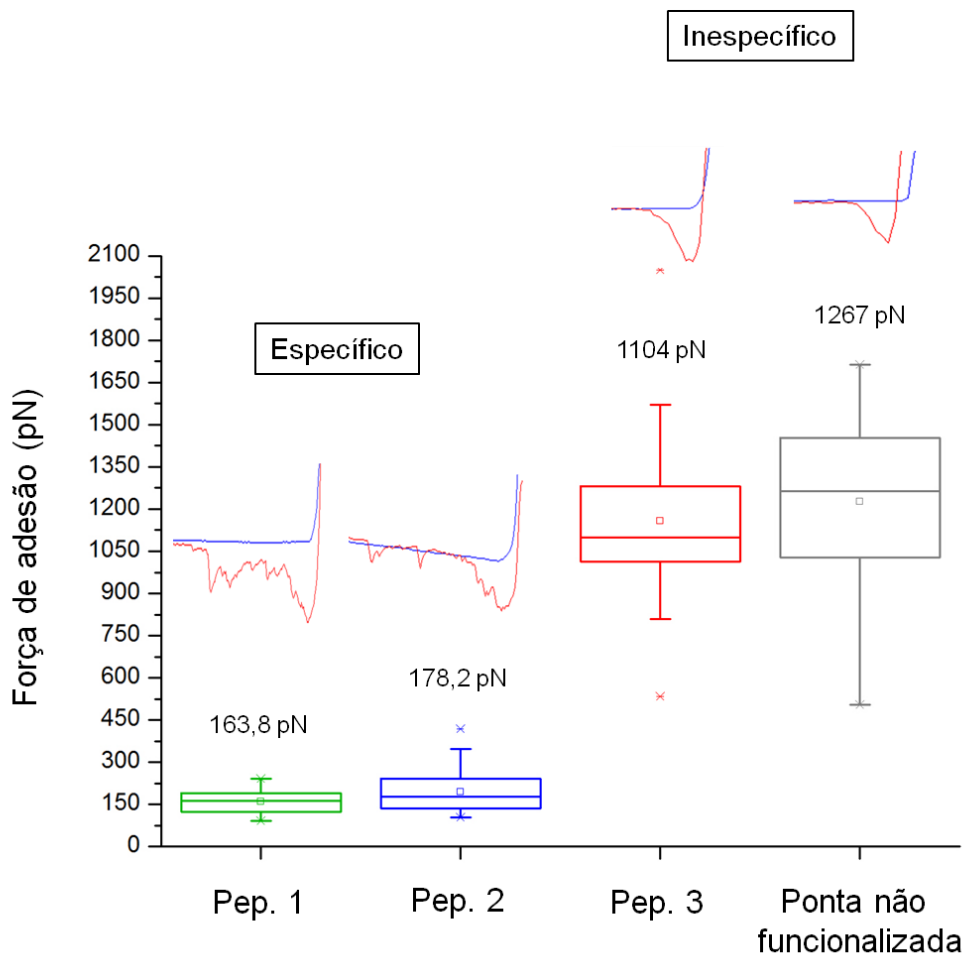
Por meio deste trabalho, foram realizadas medidas por AFS utilizando os peptídeos MSR/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄ (controle positivo - peptídeo 1), MOG₆₆₋₇₉ (teste de mimetismo molecular - peptídeo 2) e MSR/HERV-W₄₉₋₅₇ (controle negativo - peptídeo 3). Também foram realizados testes controle com a ponta de AFM não funcionalizada (controle negativo).

Realizou-se a triplicata das análises por AFS para os sistemas estudados, sendo que para cada amostra foram analisadas 50 curvas de força. Elaborou-se um diagrama de caixa demonstrando a distribuição dos valores de força de adesão para cada um dos sistemas (figura 21). Os valores de força de adesão foram quantificados na escala de *piconewtons* (pN) (10^{-12} N).

O anticorpo policlonal anti-MSRV/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄ foi produzido a partir do peptídeo 1 e assim interage especificamente a ele, com isso objetivou-se através desse sistema verificar a eficiência da funcionalização e determinar os padrões para a interação antígeno-anticorpo (controle positivo). A mediana da força de adesão obtida por meio da interação do peptídeo 1 com o anticorpo anti-MSRV/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄ foi de 164 pN e o intervalo encontrado foi de 91 – 242 pN. Neste sistema, todas as curvas de força apresentaram formatos característicos de interações específicas.

De modo a analisar a interação molecular entre o peptídeo 2 e o anticorpo anti-MSRV/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄, realizou-se medidas de curvas de força tendo obtido o valor da mediana para as forças de adesão em 178 pN, o intervalo das forças encontradas foi de 104 – 345 pN. Neste sistema, foram encontradas curvas específicas, com formatos similares aos obtidos com o peptídeo 1.

Figura 21 – Diagrama de caixa com a mediana, a amplitude dos valores de força de adesão e o formato das curvas de força obtidos para o peptídeo 1, o peptídeo 2, o peptídeo 3 e para a ponta de AFM não funcionalizada.



Estudos empregando a técnica de *Single Molecule Force Spectroscopy* determinaram valores de força de adesão para interações entre moléculas individuais de complexos de reconhecimento biológico. No que tange as interações entre receptor e ligante, como antígeno – anticorpo os valores encontrados para a força de dissociação das moléculas encontram-se na média de 20 a 200 pN (MÜLLER et al., 2009). Por intermédio da AFS a ponta contendo o peptídeo interage com vários anticorpos imobilizados no substrato, sendo os valores de força de adesão correspondentes à ruptura de diversas interações antígeno – anticorpo, assim é possível a observação de forças maiores que as encontradas por *Single Molecule Force Spectroscopy*. Os resultados apresentados na figura 21 exibiram valores de força de adesão semelhantes para os sistemas contendo o peptídeo 1 e o peptídeo 2, estando também as medianas dos valores dentro do esperado para uma interação antígeno-anticorpo. (OTT et al., 2017; ZLATANOVA; LINDSAY; LEUBA, 2000). Nota-se que em ambos os casos se obteve curvas com formatos típicos de interações específicas, o que é uma evidência de um reconhecimento cruzado pelo anticorpo anti-MSRV/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄.

Este fato corrobora com a hipótese levantada no trabalho de Olival et al. (2013), que considera o mimetismo molecular entre a proteína viral MSRV/HERV-W e a proteína MOG, localizada na bainha de mielina, como possível desencadeador do mecanismo autoimune na EM..

Outros trabalhos tem demonstrado o potencial antigênico de sequências de HERV-W e da MOG, como nos estudos de Mameli et al. (2015), em que foram detectados anticorpos presentes no soro de pacientes com esclerose múltipla que reconhecem sequências peptídicas de HERV-W, como a sequência HERV-W-env₂₄₈₋₂₆₂ (NSQCIRWVTPPTQIV), que inclui fragmentos do peptídeo 1 (MSRV/HER-W₂₅₂₋₂₆₄), utilizado neste trabalho. Também tem sido considerada na literatura a capacidade antigênica do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) para a indução da EAE, o qual contém epítomos do peptídeo 2, correspondente a MOG₆₆₋₇₉ (KUERTEN et al., 2007).

Devido a diversos estudos considerarem a influência do MSRV na patologia da EM, Curtin e colaboradores (2012) estão em fase de desenvolvimento de um anticorpo monoclonal humanizado que reconhece a proteína do gene do envelope do MSRV/HERV-W, a fim de utiliza-lo como terapia para a EM. O anticorpo, denominado *GNbAC1 (GeNeuro Innovation SAS)* está em fase 2 dos testes clínicos,

e com sua utilização espera-se neutralizar o MRSV, inibindo seus efeitos pró-inflamatórios e desmielinizantes no cérebro (CURTIN et al., 2015; ZIMMERMANN et al., 2015).

A análise referente à interação do peptídeo 3 com o anticorpo anti-MSRV/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄ apresentou a mediana de força de adesão de 1104 pN. Nesse sistema o formato das curvas de força em geral foi linear, no qual não se observou a formação de picos correspondentes a interações específicas.

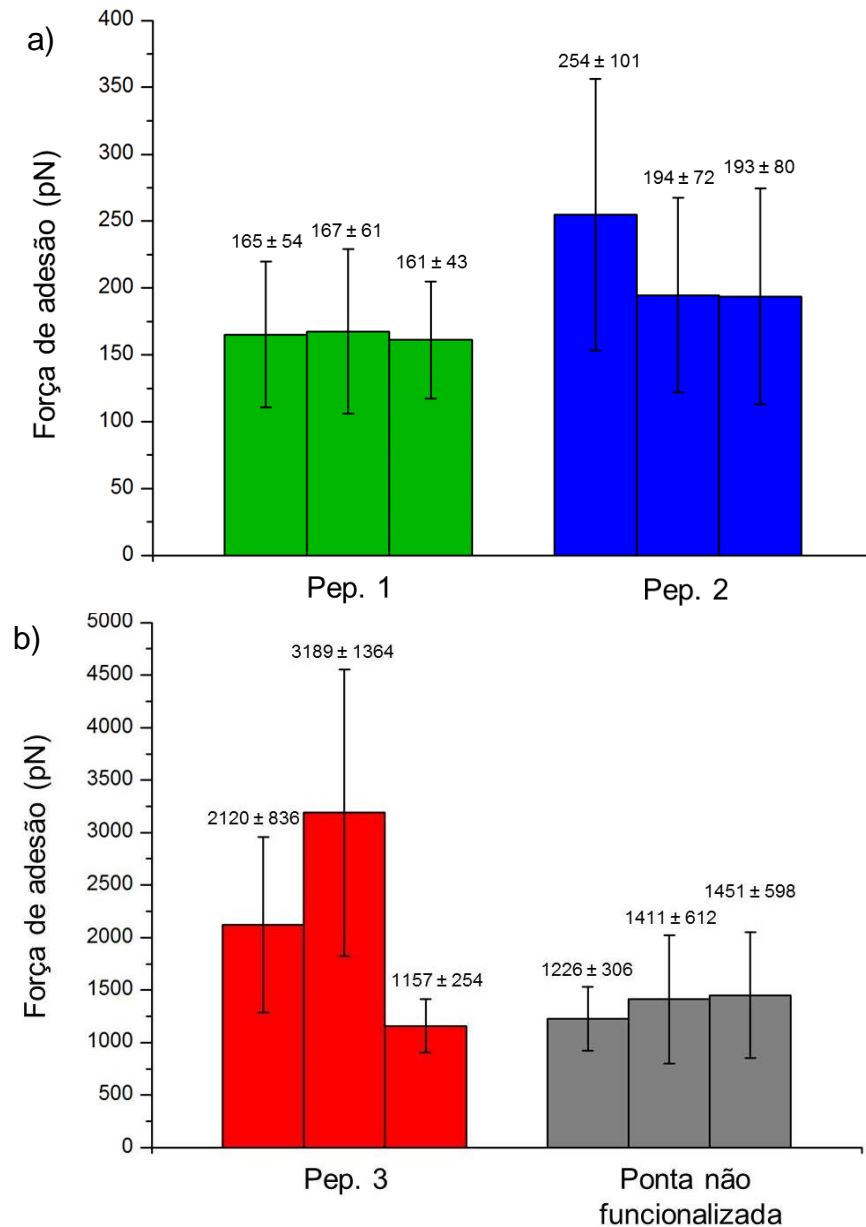
A interação da ponta de AFM não funcionalizada com os anticorpos imobilizados na mica apresentou um valor de força de adesão mediana de 1267 pN. Para este conjunto, todas as curvas possuíam o formato esperado para uma interação inespecífica, ou seja, com padrão linear (Figura 20).

Os valores obtidos para as amostras controle podem estar relacionados à interação da ponta com algum local da mica, da ponta com outros reagentes ou podem ser correspondentes a forças covalentes entre complexos, apresentando assim valores de força maiores do que o esperado em uma interação não covalente como a antígeno – anticorpo (MÜLLER et al., 2009). Tanto a ponta de AFM não funcionalizada, como o peptídeo 3 apresentaram formatos de curvas lineares, demonstrando não haver o reconhecimento específico nestes sistemas.

5.2.3 Análise das triplicatas realizadas para cada sistema

O gráfico de colunas apresentado na figura 22 mostra as médias das triplicatas realizadas para cada sistema, sendo estes o peptídeo 1, o peptídeo 2, o peptídeo 3 e a ponta de AFM não funcionalizada.

Figura 22 – Gráfico de colunas com os valores médios das triplicatas realizadas nas análises de AFS para o peptídeo 1, o peptídeo 2 (a), o peptídeo 3 e ponta de AFM não funcionalizada (b).



Pode-se observar que as análises utilizando o peptídeo 1 e o peptídeo 2 apresentaram valores médios semelhantes. Por se tratarem de interações específicas era esperado que elas se encontrassem dentro de um intervalo conhecido de forças, como foi verificado, sendo assim um sistema mais homogêneo. Já as interações inespecíficas, como as observadas para o peptídeo 3 e a ponta de AFM não funcionalizada, são decorrentes de outras forças atrativas em que não é observado um equilíbrio na ligação, desta forma pode-se quantificar uma grande

variedade de forças, o que resulta em uma maior diferença nos intervalos e valores médios obtidos (BOWERS et al., 2013).

Os resultados das análises por AFS comprovam o reconhecimento molecular do peptídeo 1 e o peptídeo 2 pelo anticorpo anti-MSRV/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄, verificado pelos valores de força de adesão, como também por meio do formato específico das curvas de força encontrados para estes sistemas. Esse fato corrobora com a hipótese do mimetismo molecular, o qual evidencia a reatividade cruzada do anticorpo anti-MSRV/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄ para tais sequências peptídicas.

5.3 Detecção óptica com nanopartículas de prata funcionalizadas

De modo a complementar e a fim de validar os resultados obtidos pela técnica de AFS, aplicou-se o método de detecção óptica utilizando nanopartículas de prata funcionalizadas com peptídeos. Foram utilizados para análise os peptídeos MSRV/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄ (controle positivo), MOG₆₆₋₇₉ (teste de mimetismo molecular), HERV-W₄₉₋₅₇ (controle negativo) e MBP₈₅₋₉₉ (controle negativo), sendo estes chamados respectivamente de peptídeo 1, peptídeo 2, peptídeo 3 e peptídeo 4. Para a escolha dos peptídeos controle levou-se em consideração o ponto isoelétrico (pI) de cada um, em que foram selecionadas sequências que apresentam valores semelhantes de pI, de modo a minimizar a possibilidade de aglomeração do sistema por diferenças de cargas (PFEIFFER et al., 2014). As análises foram feitas em triplicata, sendo apresentado o valor médio dos resultados das triplicatas realizadas.

O reconhecimento molecular do anticorpo com as nanopartículas funcionalizadas com peptídeos promove variações no espaço entre as nanopartículas em suspensão. A ligação dos anticorpos nas superfícies funcionalizadas das nanopartículas faz com que sejam formadas ligações de hidrogênio entre os complexos nanopartícula funcionalizada-anticorpo, o que diminui o espaço entre as AgNPs, ocasionando a aglomeração do sistema (BORASE et al., 2015; JOHNSON; EVANS; BRYDSON, 1998). Esse processo pode ser detectado pela espectrofotometria UV-Vis, por meio da análise do deslocamento de picos de absorção plasmônica. Analisa-se inicialmente o pico de absorção referente à suspensão de AgNPs funcionalizadas com os peptídeos, em sequência quantifica-se a absorção após a interação com o anticorpo. A observação de um deslocamento de pico para regiões maiores de comprimento de onda é decorrente da interação entre

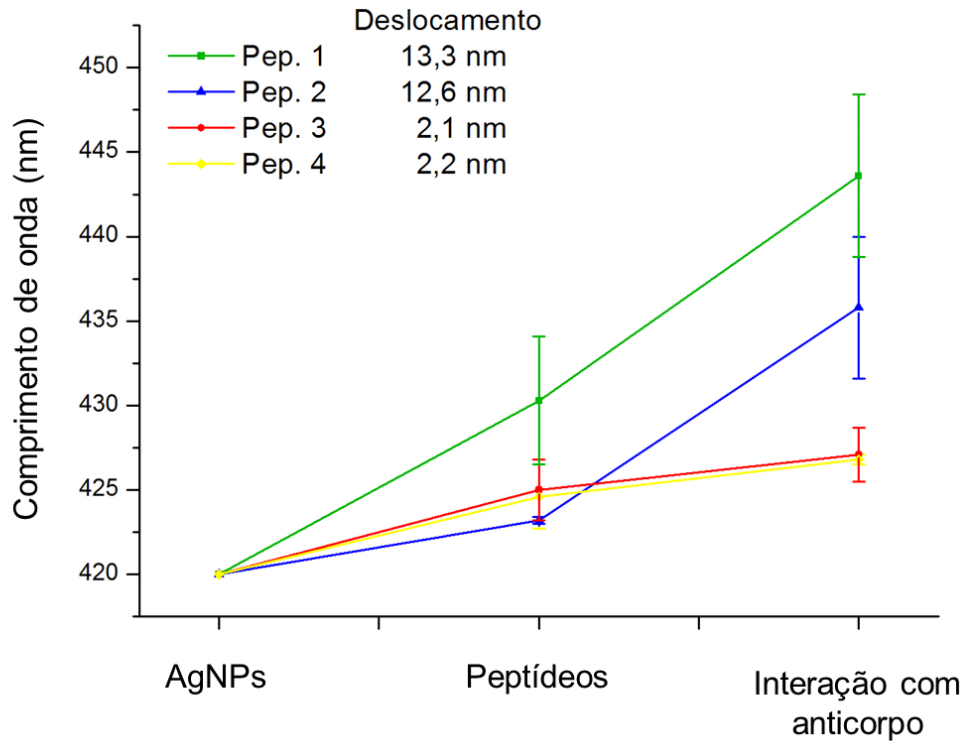
as partículas e aglomeração do sistema, caracterizando eventos entre ligantes específicos (FREDERIX et al., 2003).

Os resultados das análises por espectrofotometria UV-Vis estão representados por meio do gráfico de linhas na figura 23. A suspensão contendo somente as AgNPs apresentaram uma absorção plasmônica característica em 420 nm. As análises com AgNPs funcionalizadas com os peptídeos revelaram o deslocamento dos picos em todos os sistemas. A absorção plasmônica referente ao peptídeo 1 foi de 430,3 nm e para o peptídeo 2 de 423,2 nm. Em relação aos peptídeos controle foram obtidos os valores de 425 nm para o peptídeo 3, e 424,6 nm para o peptídeo 4 (tabela 4). Esses valores foram utilizados como referenciais nas análises de deslocamento no espectro de absorção ocasionado pela interação com os anticorpos.

A reação das AgNPs funcionalizadas com o peptídeo 1 e o seu anticorpo específico anti-MSRV/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄ resultou na absorção em 443,6 nm, ou seja, o deslocamento para este sistema foi de 13,3 nm. Também foi verificado o deslocamento no sistema funcionalizado com o peptídeo 2 de 12,7 nm, com absorção plasmônica em 435,8 nm. Essa variação no comprimento de onda máximo sinaliza que houve a interação de ambos os peptídeos com o anticorpo anti-MSRV/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄, por meio da diminuição do espaço entre as partículas, formando assim aglomerados (SHIPWAY; KATZ; WILLNER, 2000).

As amostras controle indicaram o deslocamento para o peptídeo 3 em 2,1 nm com absorção em 427,1 nm e para o peptídeo 4 a absorção foi de 426,8 tendo um deslocamento de 2,2 nm. Os deslocamentos observados nesses sistemas são consideravelmente menores dos que os apresentados para o peptídeo 1 e 2, fato que evidencia a não ocorrência do reconhecimento molecular para estes peptídeos.

Figura 23 – Gráfico de linhas representando os valores de comprimento de onda da suspensão de AgNPs e das amostras contendo as AgNPs funcionalizadas com os peptídeo 1, 2, 3 e 4 antes e após a interação com o anticorpo anti-MSRV/HERV- $W_{252.264}$.



Como o intervalo da leitura utilizado nas análises foi de 0,1 nm, os resultados indicam um deslocamento de 133 unidades para o peptídeo 1 e 127 unidades para o peptídeo 2. Enquanto que para o peptídeo 3 o deslocamento foi de 21 unidades e para o peptídeo 4 de 22 unidades. Tais resultados corroboram com a hipótese do mimetismo molecular, por meio do reconhecimento específico do peptídeo 1 e 2 pelo anti-MSRV/HERV- $W_{252-264}$, sendo os valores observados para estes peptídeos substancialmente maiores do que para os peptídeos 3 e 4.

Pode-se observar que os sistemas específicos, compostos pelo peptídeo 1 e o peptídeo 2, apresentaram um desvio padrão maior após a interação com o anticorpo, em comparação com os peptídeos controle. Isto é decorrente a maior interação e aglomeração existente nestes sistemas, que faz com que haja uma maior variação nos resultados obtidos.

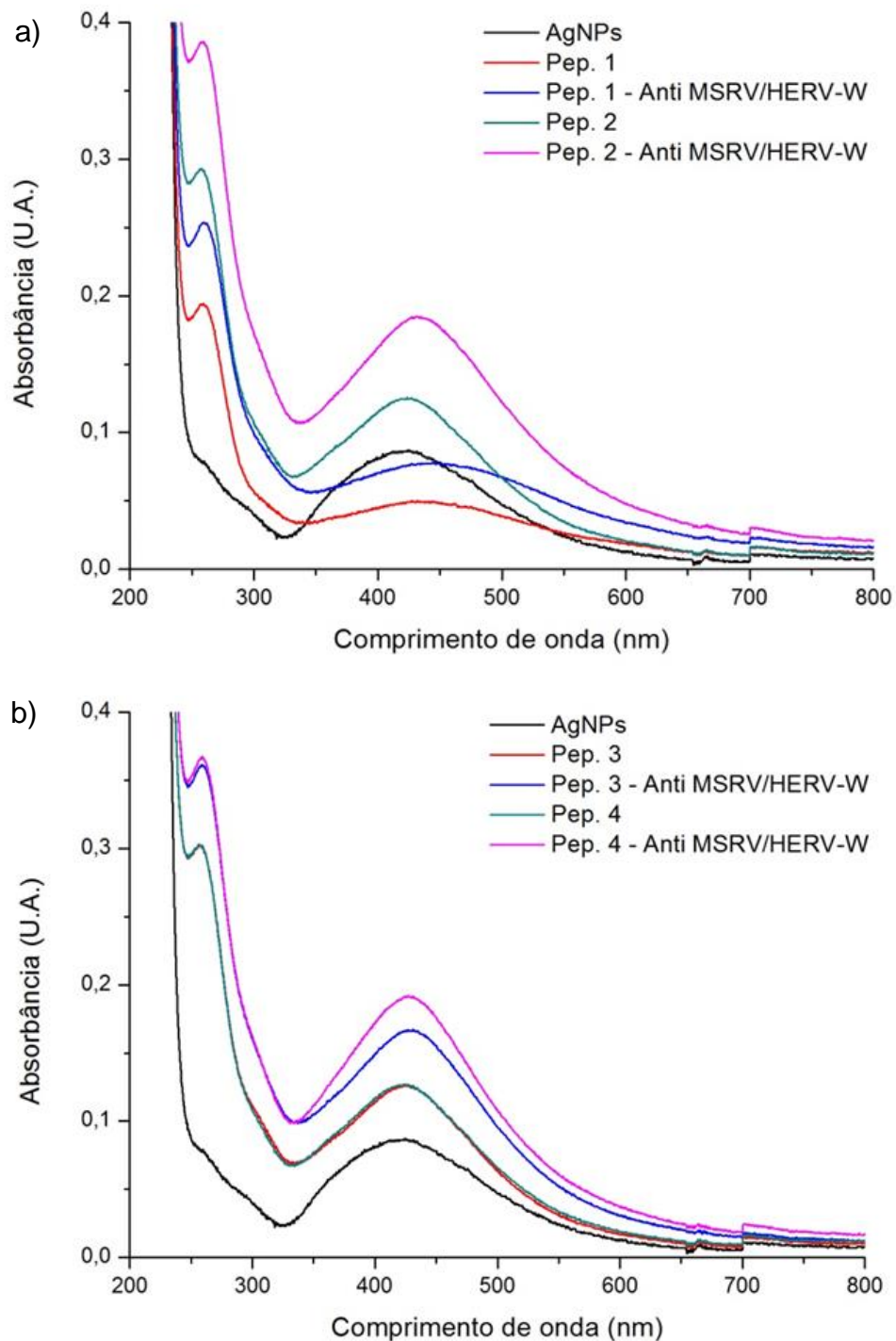
Tabela 4 - Valores de comprimento de onda de absorção plasmônica e desvio padrão para as AgNPs funcionalizadas com os peptídeos 1, 2, 3 e 4 antes e após a interação com o anticorpo anti-MSRV/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄.

	AgNPs funcionalizadas	Interação com anticorpo	Deslocamento de picos
Peptídeo 1	430,3 nm ± 3,8	443,6 nm ± 4,8	13,3 nm
Peptídeo 2	423,2 nm ± 0,2	435,8 nm ± 4,2	12,7 nm
Peptídeo 3	425 nm ± 1,8	427,1 nm ± 1,6	2,1 nm
Peptídeo 4	424,6 nm ± 1,9	426,8 nm ± 0,3	2,2 nm

Os espectros de absorção gerados na região de UV-Vis (figura 24) demonstram que ocorre uma maior interação no sistema das AgNPs funcionalizadas com o peptídeo 1, observado pelo alargamento dos picos de absorção antes e após a interação com o anticorpo, bem como pela coloração final das suspensões (figura 25). Este fato demonstra a especificidade da interação, tratando-se de um sistema específico antígeno-anticorpo (JOSEPH et al., 2003). Outro ponto a ser analisado se deve ao fato deste peptídeo apresentar em sua sequência o aminoácido cisteína. A cisteína possui um grupo tiol (-SH) em sua cadeia lateral, o qual tem como característica a formação de complexos com íons metálicos, como a prata, desta forma ele pode ligar-se diretamente as AgNPs, podendo haver o aumento de moléculas funcionalizadas (QI et al., 2014).

O pico de absorção UV correspondente a ~280 nm, observado em todos os peptídeos, indica a presença de grupos aromáticos na cadeia lateral dos aminoácidos. Entre estes aminoácidos encontram-se o triptofano (W), a tirosina (Y) e a fenilalanina (F), que apresentam absorção na faixa de 230 – 300 nm (ANTOSIEWICZ; SHUGAR, 2016).

Figura 24 – Espectros de absorção gerados na região UV-Vis para as nanopartículas funcionalizadas com os peptídeos 1, 2 (a), 3, e 4 (b), e em interação com anticorpo anti-MSRV/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄.



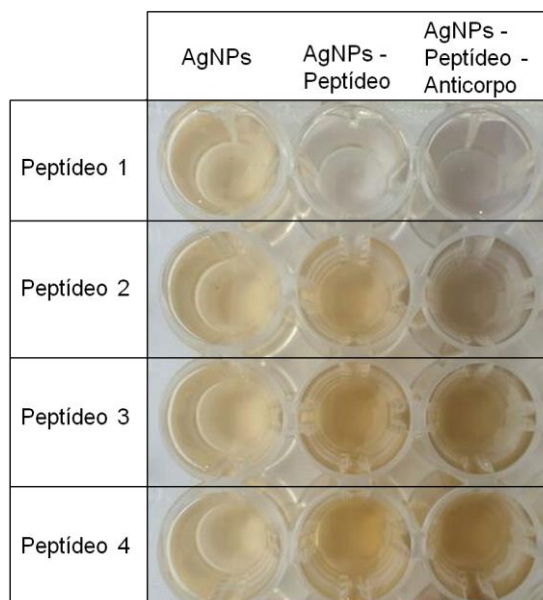
Em relação aos espectros obtidos para os peptídeos 3 e 4, é possível observar que eles mantiveram-se uniformes e mais estáveis, com um padrão semelhante a suspensão contendo somente as AgNPs. A suspensão de

nanopartículas funcionalizadas com os peptídeos foi normalizada, de modo que estivesse na mesma diluição das amostras em que houve a interação com o anticorpo, desta forma o aumento da absorbância nos sistema contendo o anticorpo é decorrente de um maior número de moléculas em suspensão.

Os resultados também demonstraram sinais ópticos de variação de cor, como pode ser observado na figura 25. Os deslocamentos observados nos espectros UV-Vis condizem com a variação colorimétrica contida nas amostras. Para os peptídeos 1 e 2, em que o deslocamento foi maior, observou-se mudança de cor. O peptídeo 1 que inicialmente apresentava uma cor amarela clara, após a interação com o anticorpo passou a obter a cor cinza. De forma semelhante, o peptídeo 2 passou de uma coloração amarela para uma cor mais intensa acinzentada. Já em relação aos peptídeos 3 e 4, em que o deslocamento foi substancialmente menor, a tonalidade manteve-se semelhante, na mesma faixa de coloração inicial apenas com as AgNPs funcionalizadas, o que indica a ausência de interação nestes sistemas.

Os resultados de interação molecular, obtidos por meio da detecção óptica com AgNPs complementam e afirmam as análises feitas por AFS. Em ambas as técnicas demonstrou-se o reconhecimento específico do anticorpo anti-MSRV/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄ pelo peptídeo 1 e a reatividade cruzada deste anticorpo para o peptídeo 2, o que é um forte indício da possível ocorrência de mimetismo molecular neste sistemas.

Figura 25 – Suspensão de nanopartículas funcionalizadas com peptídeos 1, 2, 3, e 4 antes e após interação com anticorpo anti-MSRV/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram realizadas, neste trabalho, a caracterização da ponta de AFM e da mica muscovita, a fim de se verificar a funcionalização das superfícies. As imagens de MEV forneceram informações a respeito da integridade da ponta de AFM antes e após as análises de AFS, garantindo que a mesma se encontra livre de danos que poderiam comprometer a obtenção das curvas de força.

A caracterização por FTIR permitiu verificar as bandas dos compostos utilizados para imobilização das biomoléculas, o que indicou a efetividade da funcionalização.

A partir da microscopia de fluorescência foi possível caracterizar a funcionalização da mica muscovita, confirmando a ligação do anticorpo anti-MSRV/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄ no substrato.

Utilizando-se a técnica de AFS foi possível avaliar a interação do anticorpo anti-MSRV/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄ com os peptídeos de MOG e HERV-W, por meio da funcionalização química da ponta de AFM e do substrato de mica muscovita.

As análises das curvas de força permitiram a obtenção de padrões para as interações específicas e inespecíficas dos sistemas estudados. Os valores de força de adesão encontrados foram correspondentes ao esperado para uma interação antígeno-anticorpo, além de terem sido obtidas curvas de força com formatos característicos de um reconhecimento entre biomoléculas.

O método de detecção óptica com nanopartículas de prata foi eficiente para o reconhecimento da interação antígeno – anticorpo, verificado pela espectrofotometria UV-Vis. Essa técnica possibilitou também a detecção a olho nu da interação entre os ligantes por meio da mudança de cor das amostras, ressaltando o seu potencial como nanobiossensor.

O reconhecimento específico do peptídeo MOG₆₆₋₇₉, visualizado por meio da técnica de AFS e pelo deslocamento de absorção plasmônica das AgNPs nos espectros de UV-Vis, corroboram com a hipótese do mimetismo molecular na EM que evidencia a reatividade cruzada pelo anticorpo anti-MSRV/HERV-W₂₅₂₋₂₆₄.

7 REFERÊNCIAS

ADAMS, E. et al. Atomic force microscopy: a tool for studying biophysical surface properties underpinning fungal interactions with plants and substrates. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 835, p. 151–164, 2012.

ALESSANDRINI, A.; FACCI, P. AFM: a versatile tool in biophysics. **Measurement Science and Technology**, v. 16, n. 6, p. R65–R92, 1 jun. 2005.

ÁLVAREZ-LAFUENTE, R. et al. Herpesviruses and human endogenous retroviral sequences in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 14, n. 5, p. 595–601, 1 jun. 2008.

ANTOSIEWICZ, J. M.; SHUGAR, D. UV–Vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure. Part 2: selected applications. **Biophysical Reviews**, v. 8, n. 2, p. 163–177, 4 maio 2016.

ARRU, G. et al. Multiple Sclerosis and HERV-W/MSRV: A Multicentric Study. **International journal of biomedical science: IJBS**, v. 3, n. 4, p. 292–297, dez. 2007.

ATKINS, G.; AMOR, S.; FLETCHER, J. **The Biology of Multiple Sclerosis**. [s.l.] Cambridge University Press, 2012.

BAKER, M. J. et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. **Nature Protocols**, v. 9, n. 8, p. 1771–1791, ago. 2014.

BHUSHAN, B.; MARTI, O. Scanning Probe Microscopy – Principle of Operation, Instrumentation, and Probes. In: BHUSHAN, P. B. (Ed.). **Springer Handbook of Nanotechnology**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 573–617.

BIZZARRI, A. R.; CANNISTRARO, S. The application of atomic force spectroscopy to the study of biological complexes undergoing a biorecognition process. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 2, p. 734–749, 2010.

BIZZARRI, A. R.; CANNISTRARO, S. Antigen-antibody biorecognition events as discriminated by noise analysis of force spectroscopy curves. **Nanotechnology**, v. 25, n. 33, p. 335102, 22 ago. 2014.

BLANCHARD, C. R. Atomic Force Microscopy. **THE CHEMICAL EDUCATOR**, v. 1, n. 5, p. 1–8, [s.d.].

BLOND, J.-L. et al. Molecular Characterization and Placental Expression of HERV-W, a New Human Endogenous Retrovirus Family. **Journal of Virology**, v. 73, n. 2, p. 1175–1185, 2 jan. 1999.

BORASE, H. P. et al. Bio-Functionalized Silver Nanoparticles: a Novel Colorimetric Probe for Cysteine Detection. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 7, p. 3479–3493, 1 abr. 2015.

BOWERS, C. M. et al. A general and efficient cantilever functionalization technique for AFM molecular recognition studies. **Biopolymers**, v. 97, n. 10, p. 761–765, out. 2012.

BOWERS, C. M. et al. Effect of Compressive Force on Unbinding Specific Protein–Ligand Complexes with Force Spectroscopy. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 17, p. 4755–4762, 2 maio 2013.

BRODZIAK, A. et al. The role of human endogenous retroviruses in the pathogenesis of autoimmune diseases. **Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 18, n. 6, p. RA80-RA88, 1 jun. 2012.

BUENO, C. C. et al. Nanobiosensor for Diclofop Detection Based on Chemically Modified AFM Probes. **IEEE Sensors Journal**, v. 14, n. 5, p. 1467–1475, maio 2014.

BUTT, H.-J.; CAPPELLA, B.; KAPPL, M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. **Surface Science Reports**, v. 59, n. 1–6, p. 1–152, out. 2005.

CANNISTRARO, S.; BIZZARRI, A. R. Biological Applications of Dynamic Force Spectroscopy. In: **Dynamic Force Spectroscopy and Biomolecular Recognition**. [s.l.] CRC Press, 2012. p. 163–192.

CARUSO, F.; RODDA, E.; FURLONG, D. N. Orientational Aspects of Antibody Immobilization and Immunological Activity on Quartz Crystal Microbalance Electrodes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 178, n. 1, p. 104–115, 1 mar. 1996.

CURTIN, F. et al. GNbAC1, a humanized monoclonal antibody against the envelope protein of multiple sclerosis-associated endogenous retrovirus: a first-in-humans randomized clinical study. **Clinical Therapeutics**, v. 34, n. 12, p. 2268–2278, dez. 2012.

CURTIN, F. et al. Preclinical and early clinical development of GNbAC1, a humanized IgG4 monoclonal antibody targeting endogenous retroviral MSR-Env protein. **mAbs**, v. 7, n. 1, p. 265–275, 2015.

DA SILVA, A. C. N. et al. Nanobiosensors Based on Chemically Modified AFM Probes: A Useful Tool for Methyl Detection. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 2, p. 1477–1489, 24 jan. 2013.

DAMMER, U. et al. Specific antigen/antibody interactions measured by force microscopy. **Biophysical Journal**, v. 70, n. 5, p. 2437–2441, maio 1996.

DE OLIVEIRA, R. R. L. et al. **Measurement of the nanoscale roughness by atomic force microscopy: basic principles and applications**. [s.l.] INTECH Open Access Publisher, 2012.

DE SMET, L. C. et al. **Organic surface modification of silicon nanowire-based sensor devices**. [s.l.] INTECH Open Access Publisher, 2011.

DE SOUZA, C. P.; ANDRADE, M. S.; NEVES, B. R. A. Implementation of recycling routes for scanning probe microscopy tips. **Microscopy and Microanalysis: The Official Journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada**, v. 8, n. 6, p. 509–517, dez. 2002.

DENDROU, C. A.; FUGGER, L.; FRIESE, M. A. Immunopathology of multiple sclerosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 9, p. 545–558, set. 2015.

DO OLIVAL, G. S. et al. Genomic analysis of ERVWE2 locus in patients with multiple sclerosis: absence of genetic association but potential role of human endogenous retrovirus type W elements in molecular mimicry with myelin antigen. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 172, 2013.

EATON, P.; WEST, P. **Atomic Force Microscopy**. [s.l.] Oxford University Press, 2010.

ERCOLINI, A. M.; MILLER, S. D. Mechanisms of immunopathology in murine models of central nervous system demyelinating disease. **Journal of Immunology**, v. 176, n. 6, p. 3293–3298, 15 mar. 2006.

ETCHEGARAY, A.; BUENO, C. DE C.; TESCHKE, O. Identification of microcistin LR at the molecular level using atomic force microscopy. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1843–1848, 2010.

FENG, B. et al. Synthesis of Fe₃O₄/APTES/PEG diacid functionalized magnetic nanoparticles for MR imaging. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 328, n. 1, p. 52–59, 1 out. 2008.

FERREIRA, M.; JUNIOR, O.; RÓZ, A. **Grandes áreas da nanociência: Coleção nanociência e nanotecnologia: princípios e aplicações**. [s.l.] Elsevier Brasil, 2014.

FISCHER, M. J. E. Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 627, p. 55–73, 2010.

FREDERIX, F. et al. Biosensing Based on Light Absorption of Nanoscaled Gold and Silver Particles. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 24, p. 6894–6900, 1 dez. 2003.

FRISBIE, C. D. et al. Functional Group Imaging by. **Science**, v. 265, p. 30, 1994.

G GUZMÁN, M.; DILLE, J.; GODET, S. Synthesis of Silver Nanoparticles by Chemical Reduction Method and Their Antibacterial Activity. **PWASET**, v. 33, 1 jan. 2009.

GARCIA, P. S. et al. A Nanobiosensor Based on 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase Enzyme for Mesotrione Detection. **IEEE Sensors Journal**, v. 15, n. 4, p. 2106–2113, abr. 2015.

GERDONI, E. et al. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Annals of Neurology**, v. 61, n. 3, p. 219–227, 1 mar. 2007.

GIOCONDO, M. et al. **Atomic Force Spectroscopies: A Toolbox for Probing the Biological Matter**. [s.l.] INTECH Open Access Publisher, 2012.

GOLDENBERG, M. M. Multiple Sclerosis Review. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 37, n. 3, p. 175–184, mar. 2012.

GORUP, L. F. et al. Moderating effect of ammonia on particle growth and stability of quasi-monodisperse silver nanoparticles synthesized by the Turkevich method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 360, n. 2, p. 355–358, 15 ago. 2011.

GREENWOOD, A. D. et al. Transmission, Evolution, and Endogenization: Lessons Learned from Recent Retroviral Invasions. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 82, n. 1, mar. 2018.

GUNDA, N. S. K. et al. Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker. **Applied Surface Science**, v. 305, p. 522–530, 2014.

HAAHR, S. et al. Just another dubious virus in cells from a patient with multiple sclerosis? **The Lancet**, v. 337, n. 8745, p. 863–864, 6 abr. 1991.

HEMMER, B.; ARCHELOS, J. J.; HARTUNG, H.-P. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 3, n. 4, p. 291–301, abr. 2002.

HERRMANN, P. S.; DA SILVA, M. A.; BERNARDES FO, R. Microscopia de varredura por força: uma ferramenta poderosa no estudo de polímeros. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v. 97, p. 51–61, 1997.

HINTERDORFER, P. et al. A mechanistic study of the dissociation of individual antibody-antigen pairs by atomic force microscopy. **Nanobiology**, v. 4, n. 3, p. 177, 1998.

HINTERDORFER, P.; DUFRÊNE, Y. F. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. **Nature Methods**, v. 3, n. 5, p. 347–355, 1 maio 2006.

HOWES, P. D.; RANA, S.; STEVENS, M. M. Plasmonic nanomaterials for biodiagnostics. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 11, p. 3835–3853, 7 jun. 2014.

ICHIKAWA, M. et al. Analysis of the fine B cell specificity during the chronic/relapsing course of a multiple sclerosis-like disease in Lewis rats injected with the encephalitogenic myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 35-55. **The Journal of Immunology**, v. 157, n. 2, p. 919–926, 15 jul. 1996.

JANSHOFF, A. et al. Force spectroscopy of molecular systems—single molecule spectroscopy of polymers and biomolecules. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 39, n. 18, p. 3212–3237, 2000.

JOHNSON, S. R.; EVANS, S. D.; BRYDSON, R. Influence of a Terminal Functionality on the Physical Properties of Surfactant-Stabilized Gold Nanoparticles. **Langmuir**, v. 14, n. 23, p. 6639–6647, 1 nov. 1998.

JOSEPH, Y. et al. Self-Assembled Gold Nanoparticle/Alkanedithiol Films: Preparation, Electron Microscopy, XPS-Analysis, Charge Transport, and Vapor-Sensing Properties. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 30, p. 7406–7413, 1 jul. 2003.

KAKALACHEVA, K.; MÜNZ, C.; LÜNEMANN, J. D. Viral triggers of multiple sclerosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, Molecular Basis of Multiple Sclerosis. v. 1812, n. 2, p. 132–140, 1 fev. 2011.

KIMLING, J. et al. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. **The Journal of Physical Chemistry. B**, v. 110, n. 32, p. 15700–15707, 17 ago. 2006.

KOBORI, T. Protocols for Specimen and Substrate Preparation and Data Correction Methods. In: **Atomic Force Microscopy in Nanobiology**. [s.l.] Pan Stanford Publishing, 2014. p. 13–31.

KOMURIAN-PRADEL, F. et al. Molecular Cloning and Characterization of MSRV-Related Sequences Associated with Retrovirus-like Particles. **Virology**, v. 260, n. 1, p. 1–9, 20 jul. 1999.

KUERTEN, S. et al. MP4- and MOG:35–55-induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal cord and cerebellum. **Journal of Neuroimmunology**, v. 189, n. 1, p. 31–40, 1 set. 2007.

LAPIN, N. A.; CHABAL, Y. J. Infrared Characterization of Biotinylated Silicon Oxide Surfaces, Surface Stability, and Specific Attachment of Streptavidin. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 25, p. 8776–8783, 25 jun. 2009.

LEITE, F. L. et al. Theoretical models for surface forces and adhesion and their measurement using atomic force microscopy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 10, p. 12773–12856, 8 out. 2012.

LEITE, F. L.; HERRMANN, P. S. P. Application of atomic force spectroscopy (AFS) to studies of adhesion phenomena: a review. **Journal of adhesion science and technology**, v. 19, n. 3–5, p. 365–405, 2005.

LI, F.; KARLSSON, H. Expression and regulation of human endogenous retrovirus W elements. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 124, n. 1–2, p. 52–66, fev. 2016.

LIÑARES, D.; ECHEVARRIA, I.; MAÑÁ, P. Single-step purification and refolding of recombinant mouse and human myelin oligodendrocyte glycoprotein and induction of EAE in mice. **Protein Expression and Purification**, v. 34, n. 2, p. 249–256, 1 abr. 2004.

LINDORFF-LARSEN, K. et al. Simultaneous determination of protein structure and dynamics. **Nature**, v. 433, n. 7022, p. 128–132, 13 jan. 2005.

LISMONT, M.; DREESEN, L. Comparative study of Ag and Au nanoparticles biosensors based on surface plasmon resonance phenomenon. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications**, v. 32, n. 6, p. 1437–1442, 1 ago. 2012.

MAMELI, G. et al. Epitopes of HERV-Wenv induce antigen-specific humoral immunity in multiple sclerosis patients. **Journal of Neuroimmunology**, v. 280, p. 66–68, 15 mar. 2015.

MASSERINI, M. **Nanoparticles for Brain Drug Delivery**. Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/238428/>>. Acesso em: 5 fev. 2018.

MAYER, M. C.; MEINL, E. Glycoproteins as targets of autoantibodies in CNS inflammation: MOG and more. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, v. 5, n. 3, p. 147–159, maio 2012.

MENTIS, A.-F. A. et al. Viruses and endogenous retroviruses in multiple sclerosis: From correlation to causation. **Acta Neurologica Scandinavica**, p. n/a-n/a, [s.d.].

MOCK, J. J. et al. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. **The Journal of Chemical Physics**, v. 116, n. 15, p. 6755–6759, 2 abr. 2002.

MORANDI, E. et al. The association between human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. **PLOS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0172415, 16 fev. 2017.

MORIKIS, D.; LAMBRIS, J. D. Physical methods for structure, dynamics and binding in immunological research. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 12, p. 700–707, dez. 2004.

MRINALINI, R. S. M.; JAYANTH, G. R. A System for Replacement and Reuse of Tips in Atomic Force Microscopy. **IEEE/ASME Transactions on Mechatronics**, v. 21, n. 4, p. 1943–1953, ago. 2016.

MÜLLER, D. J. et al. Force probing surfaces of living cells to molecular resolution. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 6, p. 383–390, jun. 2009.

NAIN, R.; CHAUHAN, R. P. Colloidal synthesis of silver nano particles. **Asian Journal of Chemistry**, v. 21, p. S113-116, 1 jan. 2009.

Nanoneurobiophysics: new challenges for diagnosis and therapy of neurologic disorders. **Nanomedicine**, v. 10, n. 23, p. 3417–3419, 26 nov. 2015.

NGHIEM, T. H. L. et al. Synthesis, capping and binding of colloidal gold nanoparticles to proteins. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 1, n. 2, p. 025009, 2010.

NOY, A. Chemical force microscopy of chemical and biological interactions. **Surface and interface analysis**, v. 38, n. 11, p. 1429–1441, 2006.

NOY, A.; VEZENOV, D. V.; LIEBER, C. M. Chemical force microscopy. **Annual Review of Materials Science**, v. 27, n. 1, p. 381–421, 1997.

OLIVEIRA, O. N.; OTHERS. Atomic Force Microscopy Study of Conductive Polymers. **Nanostructured Conductive Polymers**, p. 375–410, 2010.

OTT, W. et al. Single-molecule force spectroscopy on polyproteins and receptor-ligand complexes: The current toolbox. **Journal of Structural Biology**, v. 197, n. 1, p. 3–12, jan. 2017.

PERRON, H. et al. Leptomeningeal cell line from multiple sclerosis with reverse transcriptase activity and viral particles. **Research in Virology**, v. 140, p. 551–561, 1 jan. 1989.

PERRON, H. et al. Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 14, p. 7583–7588, 8 jul. 1997.

PERRON, H. et al. Human endogenous retrovirus (HERV)-W ENV and GAG proteins: physiological expression in human brain and pathophysiological modulation in multiple sclerosis lesions. **Journal of Neurovirology**, v. 11, n. 1, p. 23–33, fev. 2005.

PERRON, H. et al. Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 18, n. 12, p. 1721–1736, 1 dez. 2012.

PFEIFFER, C. et al. Interaction of colloidal nanoparticles with their local environment: the (ionic) nanoenvironment around nanoparticles is different from bulk and determines the physico-chemical properties of the nanoparticles. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 11, n. 96, 6 jul. 2014.

QI, L. et al. Thiol reactive probe based on fluorescence resonance energy transfer between fluorescein and Au nanoparticles. **Acta Chimica Slovenica**, v. 61, n. 1, p. 73–79, 2014.

RIEDHAMMER, C.; WEISSERT, R. Antigen Presentation, Autoantigens, and Immune Regulation in Multiple Sclerosis and Other Autoimmune Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 322, 2015.

ROSARIN, F. S.; MIRUNALINI, S. Nobel Metallic Nanoparticles with Novel Biomedical Properties. **Journal of Bioanalysis & Biomedicine**, v. 3, n. 4, 28 jun. 2011.

SCHWARTZ, M. P.; ALVAREZ, S. D.; SAILOR, M. J. Porous SiO₂ interferometric biosensor for quantitative determination of protein interactions: binding of protein A to immunoglobulins derived from different species. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 1, p. 327–334, 1 jan. 2007.

SEKHON, B. S. Nanotechnology in agri-food production: an overview. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 7, p. 31–53, 20 maio 2014.

SHAHIN, V. et al. Glucocorticoids remodel nuclear envelope structure and permeability. **Journal of cell science**, v. 118, n. 13, p. 2881–2889, 2005.

SHIM, S.-Y.; LIM, D.-K.; NAM, J.-M. Ultrasensitive optical biodiagnostic methods using metallic nanoparticles. **Nanomedicine (London, England)**, v. 3, n. 2, p. 215–232, abr. 2008.

SHIPWAY, A. N.; KATZ, E.; WILLNER, I. Nanoparticle Arrays on Surfaces for Electronic, Optical, and Sensor Applications. **ChemPhysChem**, v. 1, n. 1, p. 18–52, 4 ago. 2000.

SILVA, D. et al. Nanobiosensors Exploiting Specific Interactions Between an Enzyme and Herbicides in Atomic Force Spectroscopy. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, p. 6678–6684, [s.d.].

SIRGHI, L. et al. Cleaning and Hydrophilization of Atomic Force Microscopy Silicon Probes. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 51, p. 25975–25981, 1 dez. 2006.

SORCI, M. et al. Oriented covalent immobilization of antibodies for measurement of intermolecular binding forces between zipper-like contact surfaces of split inteins. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 12, p. 6080–6088, 18 jun. 2013.

SPAMPINATO, V. et al. Surface Analysis of Gold Nanoparticles Functionalized with Thiol-Modified Glucose SAMs for Biosensor Applications. **Frontiers in Chemistry**, v. 4, 29 fev. 2016.

SPITZER, M. et al. BoxPlotR: a web tool for generation of box plots. **Nature methods**, v. 11, n. 2, p. 121–122, fev. 2014.

STARODUB, N. F. et al. Antibody immobilisation on the metal and silicon surfaces. The use of self-assembled layers and specific receptors. **Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)**, v. 66, n. 1–2, p. 111–115, abr. 2005.

STEFFENS, C. et al. Atomic force microscopy as a tool applied to nano/biosensors. **Sensors**, v. 12, n. 6, p. 8278–8300, 2012.

SULCHEK, T. A. et al. Dynamic force spectroscopy of parallel individual Mucin1–antibody bonds. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 46, p. 16638–16643, 15 nov. 2005.

TANG, L.; DONG, C.; REN, J. Highly sensitive homogenous immunoassay of cancer biomarker using silver nanoparticles enhanced fluorescence correlation spectroscopy. **Talanta**, v. 81, n. 4–5, p. 1560–1567, 15 jun. 2010.

TORTONESE, M. Cantilevers and tips for atomic force microscopy. **IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine**, v. 16, n. 2, p. 28–33, mar. 1997.

TRELA, M.; NELSON, P. N.; RYLANCE, P. B. The role of molecular mimicry and other factors in the association of Human Endogenous Retroviruses and autoimmunity. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 124, n. 1–2, p. 88–104, fev. 2016.

TRILLING, A. K.; BEEKWILDER, J.; ZUILHOF, H. Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview. **The Analyst**, v. 138, n. 6, p. 1619–1627, 21 mar. 2013.

VANCE, M. E. et al. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 6, p. 1769–1780, 21 ago. 2015.

VASHIST, S. K. et al. Immobilization of antibodies and enzymes on 3-aminopropyltriethoxysilane-functionalized bioanalytical platforms for biosensors and diagnostics. **Chemical reviews**, v. 114, n. 21, p. 11083–11130, 2014.

VEZENOV, D. V.; NOY, A.; ASHBY, P. Chemical force microscopy: probing chemical origin of interfacial forces and adhesion. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v. 19, n. 3–5, p. 313–364, 1 jan. 2005.

VILLIERS, J. N. P. DE et al. Analysis of viral and genetic factors in South African patients with multiple sclerosis. **Metabolic Brain Disease**, v. 21, n. 2–3, p. 156–162, 1 set. 2006.

VIRTANEN, J. O.; JACOBSON, S. Viruses and multiple sclerosis. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 11, n. 5, p. 528–544, ago. 2012.

WANG, Q. et al. Evaluation of Medicine Effects on the Interaction of Myoglobin and Its Aptamer or Antibody Using Atomic Force Microscopy. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 4, p. 2242–2248, 17 fev. 2015.

WEI, L. et al. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. **Drug discovery today**, v. 20, n. 5, p. 595–601, maio 2015.

WEISSERT, R. et al. High immunogenicity of intracellular myelin oligodendrocyte glycoprotein epitopes. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 169, n. 1, p. 548–556, 1 jul. 2002.

WILCHEK, M.; BAYER, E. A.; LIVNAH, O. Essentials of biorecognition: the (strept) avidin–biotin system as a model for protein–protein and protein–ligand interaction. **Immunology letters**, v. 103, n. 1, p. 27–32, 2006.

WILLIAMS, D. H. et al. Understanding noncovalent interactions: ligand binding energy and catalytic efficiency from ligand-induced reductions in motion within receptors and enzymes. **Angewandte Chemie (International Ed. in English)**, v. 43, n. 48, p. 6596–6616, 10 dez. 2004.

YEOW, N.; TABOR, R. F.; GARNIER, G. Mapping the distribution of specific antibody interaction forces on individual red blood cells. **Scientific Reports**, v. 7, p. 41956, 3 fev. 2017.

YUAN, Y. et al. Silver nanoparticle based label-free colorimetric immunosensor for rapid detection of neurogenin 1. **The Analyst**, v. 137, n. 2, p. 496–501, 21 jan. 2012.

ZAHMAKIRAN, M.; ÖZKAR, S. Metal nanoparticles in liquid phase catalysis; from recent advances to future goals. **Nanoscale**, v. 3, n. 9, p. 3462–3481, 1 set. 2011.

ZENG, H.; LI, Y.; SHAO, H. Simple and Efficient Method for N-Boc Protection of Amines Using PEG-400 as a Reaction Medium Under Mild Conditions. **Synthetic Communications**, v. 42, n. 1, p. 25–32, 1 jan. 2012.

ZHANG, C. et al. Incorporation of poly(ethylene glycol) grafted cellulose nanocrystals in poly(lactic acid) electrospun nanocomposite fibers as potential scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 49, p. 463–471, 1 abr. 2015.

ZIMMERMANN, M. et al. Immunologic monitoring during a phase 2a trial of the GNBAC1 antibody in patients with MS. **Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation**, v. 2, n. 5, p. e144, out. 2015.

ZLATANOVA, J.; LINDSAY, S. M.; LEUBA, S. H. Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, Single Molecule Biochemistry and Molecular Biology. v. 74, n. 1, p. 37–61, 1 jul. 2000.