

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
GRUPO DE PESQUISA EM NANONEUROBIOFÍSICA – GNN

MARIANA ARNAUD DE ANDRADE

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR NANOMECÂNICO DE *CANTILEVER*
PARA DETECÇÃO DE MICRORNAS MARCADORES DE METÁSTASES DE
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO (CECP).**

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
GRUPO DE PESQUISA EM NANONEUROBIOFÍSICA – GNN

MARIANA ARNAUD DE ANDRADE

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR NANOMECÂNICO DE *CANTILEVER*
PARA DETECÇÃO DE MICRORNAS MARCADORES DE METÁSTASES DE
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO (CECP).**

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^o Dr. Fabio de Lima Leite
Co-orientação: Dr. Matias Eliseo Melendez

Sorocaba

2018

Arnaud de Andrade, Mariana

DESENVOLVIMENTO DE SENSOR NANOMECÂNICO DE
CANTILEVER PARA DETECÇÃO DE MICRORNAS MARCADORES DE
METÁSTASES DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E
PESCOÇO (CECP). / Mariana Arnaud de Andrade. -- 2018.

87 f. : 30 cm.

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

Orientador: Fabio de Lima Leite

Banca examinadora: Clarice Steffens, Elaine Cristina Mathias Silva
Zacarin

Bibliografia

1. Sensores Nanomecânicos de Cantilever. 2. Carcinoma Epidermoide de
Cabeça e Pescoço. 3. MicroRNAs. 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)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano – CRB/8 6979

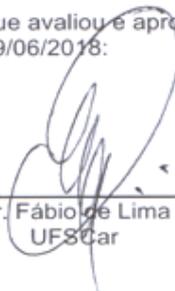


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

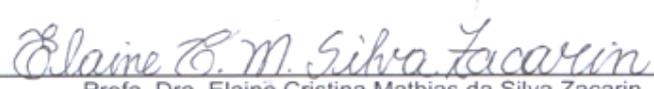
Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Mariana Arnaud de Andrade, realizada em 29/06/2018:



Prof. Dr. Fábio de Lima Leite
UFSCar

Profa. Dra. Clarice Steffens
URI



Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin
UFSCar

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Clarice Steffens e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ão) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.



Prof. Dr. Fábio de Lima Leite

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria Eneide e João Bosco, ao meu irmão e intercessor João Carlos (em memória), ao meu esposo Mateus e a nossa filha Clara, que a cada dia iluminam todas as áreas da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus minha eterna gratidão, nada teria alcançado se não fosse vontade Dele, pois somente a Tua graça me basta! Agradeço aos meus pais João Bosco e Maria Eneide, a quem devo tudo o que sou, ao meu irmão e intercessor João Carlos (em memória) e a toda minha família.

Em especial agradeço à família que construí com meu esposo Mateus e a nossa pequena Clara, que com todo amor e paciência souberem me apoiar. Agradeço a todos meus irmãos do Grupo de Oração Jovem Filhos de Davi, em especial à minha amiga Jenifer, psicóloga de todas as horas! Agradeço também ao Ministério Jovem e a toda Renovação Carismática Católica de Sorocaba, que me levam à crescer os degraus da escada de santidade todos os dias.

Agradeço a todos os docentes que me incentivavam desde a pré-escola até a pós-graduação, em especial agradeço ao meu orientador e amigo Fabio, por não desistir de mim, e a toda família GNN, que a cada dia fazem a diferença na minha vida e no meu crescimento profissional: Lívia, tutora do coração, Ari, amiga dos conselhos valiosos e das orientações nas horas vagas, Akemi, parceira dos youtubers, dos louvores e a tia mais bajuladora da Clarinha, Pam, a fofura em pessoa, Jé, a que atropela, Van, a companheira de turma, Jé Assumpção, parceira dos estudos sobre os microRNAs e a todos os demais parceiros dessa grande família! À todos muito obrigada, sem vocês eu jamais conseguiria vencer mais este desafio!

Agradeço ao Prof, Fabio Abdalla e a seu aluno Paulo, por toda ajuda com a análise por Microcopia de Fluorescência.

Toda minha gratidão ao Hospital de Câncer de Barretos, o Hospital do Amor, que na pessoa do meu co-orientador Matias e das colaboradoras Ana Carolina e Lídia, tive todo apoio e incentivo nesse trabalho, com vocês encontrei a motivação para não desistir de estudar o CECP.

Agradeço também à UFSCar e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental pela oportunidade de estudos e pesquisa. Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo nº 2015/25549-0) pelo fomento nos projetos de pesquisa que contribuíram para realização deste trabalho.

“O Senhor não olha tanto a grandeza das nossas obras.

Olha mais o amor com que são feitas”.

Santa Tereza D’Ávila.

RESUMO

ANDRADE, Mariana Arnaud de. *Desenvolvimento de sensor nanomecânico de cantilever para detecção de micrornas marcadores de metástases de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP)*. 2018. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Centro de Ciências e Tecnologias para Sustentabilidade, Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2018.

O Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço (CECP) é uma neoplasia que acomete as regiões da cavidade oral, faringe e laringe com alta incidência, chegando a aproximadamente 600 mil novos casos por ano. Casos de recorrência local e de metástases à distância após o tratamento são comuns e diminuem o índice de sobrevivência global para pacientes com CECP, culminando com o aumento das taxas de mortalidade, que não melhoram há 40 anos. A utilização de marcadores moleculares, como os microRNAs, vem sendo amplamente abordada pela comunidade científica como uma nova metodologia promissora para detecção de tumores. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um genossensor com microalavancas (*cantilevers*) de Microscopia de Força Atômica (AFM) para análise e detecção de marcadores de miRNA (miR-203 e miR-205) para estudo da metástase em linfonodos cervicais. O genossensor foi desenvolvido a partir do processo de funcionalização, que consiste na modificação química das superfícies das microalavancas, para que as fitas complementares dos marcadores de miRNAs sejam imobilizadas e, posteriormente, detectem seu alvo. Resultados obtidos apontam que a metodologia de funcionalização proposta foi eficiente, e confirmam a imobilização das fitas complementares dos marcadores de miRNAs, a partir da caracterização por Microscopia de Fluorescência e imagens morfológicas de AFM. A detecção de ambos os marcadores miR-203 e miR-205 variou de acordo com as diferentes concentrações estudadas (100, 120, 140 e 160 nM). Através do genossensor desenvolvido foi possível detectar as moléculas alvo: para o marcador miR-203 foram obtidos dados de resposta da deflexão do *cantilever* de 10 à 72 nm, já para o marcador miR-205 os dados de deflexão de 10 à 170 nm. O caráter inovador deste trabalho está contido no desenvolvimento de uma nova metodologia de detecção de metástase, que, à priori, se utiliza de amostras sintéticas dos marcadores de metástase do CECP, mas no futuro poderá ser aplicada a amostras reais de pacientes acometidos por tal patologia.

Palavras-chave: Microscópio de Força Atômica. Sensores Nanomecânicos de Cantilever. Carcinoma Epidermoide de Cabeça e Pescoço. Metástases. MicroRNAs.

ABSTRACT

ANDRADE, Mariana Arnaud de. *Development of a nanomechanical cantilever sensor for the detection of markers of metaphors of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC)*. 2018. 87 f. Dissertation (Master in Biotechnology and Environmental Monitoring) - Center for Science and Technology for Sustainability, Federal University of São Carlos, Sorocaba, 2018.

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is a neoplasm that affects the regions of the oral cavity, pharynx and larynx with high incidence, reaching approximately 600 thousand new cases per year. Cases of local recurrence and distant metastases after treatment are common and decrease the rate of overall survival for patients with HNSCC, culminating in increased mortality rates, which have not improved for 40 years. The use of molecular markers, such as microRNAs, has been widely approached by the scientific community as a promising new methodology for tumor detection. This work aimed to the development of a genossensor with microlevels (cantilevers) of Atomic Force Microscopy (AFM) for analysis and detection of miRNA markers (miR-203 and miR-205) for the study of cervical lymph node metastasis. The genossensor was developed from the functionalisation process, which consists of the chemical modification of the surfaces of the microalvans, so that the complementary tapes of the miRNAs markers are immobilized and subsequently detect their target. Results obtained indicate that the proposed functionalization methodology was efficient, and confirmed the immobilization of the complementary tapes of the miRNAs markers, from the characterization by Fluorescence Microscopy and AFM morphological images. Detection of both miR-203 and miR-205 markers varied according to the different concentrations studied (100, 120, 140 and 160 nM). Through the developed genossensor it was possible to detect the target molecules: for the miR-203 marker, 10 to 72 nm cantilever deflection data were obtained, as well as for the miR-205 marker the deflection data from 10 to 170 nm. The innovative character of this work is contained in the development of a new methodology for the detection of metastasis, which, a priori, uses synthetic samples of HNSCC metastasis markers, but in the future it may be applied to real samples of patients affected by such pathology.

Keywords: Atomic Force Microscope. Nanomechanical Cantilever Sensors. Epidermoid Carcinoma of Head and Neck. Metastases. MicroRNAs.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Regiões da cabeça e do pescoço em que o CECP geralmente se desenvolve. 18
- Figura 2.** Biogênese dos microRNAs. De acordo com a transcrição do gene de miRNA, seu transcrito, denominado pri-miRNA é marcado por METTL3, reconhecido pelo complexo DGCR8/Rnase III DROSHA e clivado em uma estrutura de grampo, denominada pre-miRNA. O pre-miRNA é transportado do núcleo ao citoplasma celular pelo complexo RAN/GTP/Exportin 5 e processado pela RNase III DICER, gerando um duplex miRNA/miRNA. Após o desenrolar do duplex, miRNA maduro pode ser incorporado ao RISC, promovendo silenciamento ou degradação do mRNA alvo, ou ainda pode ligar-se ao receptor Toll-like (TLR), desencadeando cascatas de sinalização..... 22
- Figura 3.** Número de publicações científicas utilizando microRNAs como biomarcadores tumorais..... 23
- Figura 4.** Esquema representativo da ação do miRNA-203 no contexto da biologia celular epitelial. A escala de cores preta e azul relacionam-se com o aumento da expressão das moléculas de p63 (preto) e miR-203 (azul). As setas verdes indicam à promoção e a vermelha a inibição do fator seguinte..... 25
- Figura 5.** Esquema representativo da ação do miR-203 nos processos de Transição Epitélio Mesenquimal e Invasão. As setas verdes indicam à promoção e as vermelhas a inibição do fator seguinte. 27
- Figura 6.** Esquema representativo da relação entre os miRNAs 203 e 205 e sua consequência frente aos fatores promotores da progressão tumoral e metástase. (A) Representação de uma situação de um organismo saudável; (B) Representação de uma situação de um organismo com propensão ao desenvolvimento tumoral. As setas verdes indicam à promoção e as vermelhas a inibição do fator seguinte. As setas pretas pontilhadas indicam uma possível função de miR-205 como oncogene. A seta vermelha pontilhada indica inibição parcial de miR-203 a isoforma de p63..... 29
- Figura 7.** Esquema representativo do sistema de análise da Microscopia de Força Atômica (AFM). O sistema é composto por um porta-amostra acoplado a um piezoelétrico, onde se insere o material a ser analisado; um laser que incide na ponta do *cantilever* e reflete um fotodetector; uma câmera; e uma célula líquida, que permite análises em meio líquido, que se insere no canal de entrada e evacua no canal de saída..... 32
- Figura 8.** Modos de operação dos Sensores Nanomecânicos de *Cantilever* (A) Modo estático; (B) Modo dinâmico..... 33
- Figura 9.** Modelos representativos dos processos de funcionalização e imobilização de biomoléculas em superfície. (A) Sistema Antígeno-Anticorpo; (B) Sistema Enzima-Proteína; (C) Sistema de oligonucleotídeos (DNA-complementar)..... 35

Figura 10. Modelo representativo do processo de imobilização de moléculas de DNA por adsorção eletrostática.....	36
Figura 11. Modelo representativo do processo de imobilização de moléculas de DNA por ligação covalente. Adaptado de RASHID; YUSOF, 2017.....	37
Figura 12. Modelo representativo do processo de imobilização de moléculas de DNA por ligação covalente (Au-SH). Adaptado de RASHID; YUSOF, 2017.....	38
Figura 13. Modelo representativo do processo de imobilização de moléculas de DNA por interação avidina-biotina. Adaptado de RASHID; YUSOF, 2017.....	39
Figura 14. Procedimento de funcionalização. (A) Material preparado para esterilização (placa de Petri, microalavancas e tampas de <i>ependorf</i> [®]); (B) Material levado ao UV e ozônio para esterilização no <i>ProCleaner</i> TM ; (C) Esterilização durante 20min; (D) Dissecador de vidro submetido ao fluxo de nitrogênio durante 10min; (E) 40µl de APTES e 40µl de Trietilamina foram adicionados em suas respectivas tampas de <i>ependorf</i> [®] e todo material foi inserido no dissecador de vidro; (F) Para completar o procedimento de funcionalização o material se manteve durante 45min no dissecador.....	42
Figura 15. Modelo representativo do processo de funcionalização de moléculas de APTES na superfície de nitreto de silício.....	43
Figura 16. Modelo representativo do processo de imobilização das moléculas das fitas complementares (cDNA) na superfície de nitreto de silício previamente funcionalizada com APTES.....	44
Figura 17. Procedimento de imobilização das microalavancas previamente funcionalizadas com APTES. (A) As microalavancas foram retiradas do dissecador de vidro e foram inseridas em outras tampas de <i>ependorf</i> [®] e outra placa de Petri, previamente esterilizadas representadas em B. (B) A solução de miRNA à 1_µM foi inserida em cada tampa de <i>ependorf</i> [®] e permaneceu durante 24_h. Após a lavagem com água Mili-Q as microalavancas foram submetidas a secagem em temperatura ambiente.....	45
Figura 18. Dimensões das fitas complementares aos alvos utilizados (miR-203 e miR-205) com base nas dimensões do DNA.....	46
Figura 19. Chip que dá suporte às microalavancas de AFM. (A) Imagem do fabricante; (B) Esquema representativo do chip com microalavanca retangular vista de lado e de cima.....	47
Figura 20. Sistema de medida de deflexão baseado na varredura da microalavanca de AFM em modo não contato. A flecha vermelha dentro da célula líquida representa a distância entre a mica e a microalavanca. A flecha na imagem de AFM à direita representa a perturbação no sistema durante a varredura proveniente da injeção de uma solução. A altura na imagem de AFM está representada em um.	49
Figura 21. Imagens representativas de perturbação do sistema, que geram deflexão	

reversível (seta verde) e deflexão irreversível (seta vermelha).....	51
Figura 22. Representação esquemática do sistema de aquecimento utilizado para controle de temperatura acoplado ao AFM durante as medições do sensor.....	53
Figura 23. Representação esquemática do sistema de aquecimento utilizado para controle de temperatura acoplado ao AFM durante a injeção das soluções alvo do sensor. A seta vermelha indica o momento em que o sistema é desacoplado do AFM e a seta verde indica o período pós injeção, em que o sistema de aquecimento é reacoplado ao AFM.....	54
Figura 24. Imagens de AFM da superfície de nitreto de silício no processo de funcionalização e imobilização: (A) Superfície limpa – Rms = 1,048 nm; (B) Superfície funcionalizada com APTES – Rms = 0,783 nm; (C) Superfície imobilizada com miRNA – Rms = 2,906 nm, ambas as imagens possuem 2 µm de altura e largura.	58
Figura 25. Gráfico da diferença das alturas em cada tratamento de funcionalização: superfície sem funcionalização (limpa), com APTES e com as fitas complementares aos alvos (miRNA). O gráfico foi composto pelas diagonais de cada imagem da Figura 24 e as setas indicam os pontos que apresentaram maior altura: Preta = 1,84 nm; Vermelha = 2,46 nm; Verde = 7,98 nm.....	59
Figura 26. Imagens de AFM da superfície de nitreto de silício imobilizada com miRNA (2D e 3D) e gráfico dos perfis de altura dos pontos mais altos da imagem 2D.	60
Figura 27. Progressão da análise da superfície imobilizada com miRNA: (A) 20 µm ² ; (B) 10 µm ² ; (C) 5 µm ² ; (D) 2 µm ²	62
Figura 28. Caracterização por imagens de Microscopia de Fluorescência (MF) em ambos os tratamentos, com a superfície limpa, funcionalizada com APTES e imobilizada com cDNA correspondente as moléculas complementares aos marcadores de miRNA.	63
Figura 29. Análise preliminar do sistema de detecção por meio da deflexão das microalavancas de AFM utilizando sistema padrão biotina-estreptavidina.....	64
Figura 30. Análise controle do sistema de detecção com utilização de microalavancas limpas e funcionalizadas com APTES sem a utilização do sistema de aquecimento.....	66
Figura 31. Análise controle do sistema de detecção com utilização de microalavancas limpas e funcionalizadas com APTES utilizando sistema de aquecimento.....	67
Figura 32. Esquema representativo do sistema de aquecimento desenvolvido.....	68
Figura 33. Imagens do sistema de aquecimento desenvolvido.....	68

Figura 34. Imagem representativa da relação entre a Temperatura de Melting (T _m) e a hibridização das fitas de DNA.....	69
Figura 35. Medidas do sistema de detecção com utilização de microalavancas imobilizadas com as fitas complementares ao marcador miR-205 (cDNA), utilizando sistema de aquecimento.....	70
Figura 36. Esquema representativo dos ensaios realizados no modo de operação <i>SensZ</i> , no qual movimentação do <i>cantilever</i> no eixo <i>Z</i> , que corresponde à deflexão....	71
Figura 37. Análises de detecção do sensor nanomecânico de <i>cantilever</i> exposto aos microRNAs alvo miR-203 (A) e miR-205 (B), em ambas as concentrações testadas (100, 120, 140 e 160 nM). O plano de fundo verde claro antes da injeção do alvo indica o período de estabilidade do <i>cantilever</i> , plano de fundo rosado indica o período de contato do <i>cantilever</i> com o alvo e o plano de fundo verde claro após a injeção de água Mili-Q indica a etapa de lavagem do sistema, que possibilita uma diminuição da deflexão do <i>cantilever</i>	72
Figura 38. Sensor nanomecânico de <i>cantilever</i> para a detecção de uma sequência de oligonucleotídeos alvo (BioB2-C) desenvolvido por MISHRA & HEGNER, (2014)....	74
Figura 39. Gráfico de detecção dos microRNAs-alvo miR-203 e miR-205 construído através da deflexão em função de cada concentração testada.....	75

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos expostos na literatura de MicroRNAs e suas respectivas funções em determinados tipos tumorais.....	27
Tabela 2. Materiais de consumo e equipamentos utilizados neste projeto.	43
Tabela 3. Especificações das amostras de miRNAs obtidas.	44
Tabela 4. Tabela com os parâmetros utilizados para caracterização por imagem de AFM.	51
Tabela 5. Parâmetros utilizados pela comunidade científica para construção do Protocolo de imobilização de DNA (em verde).	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM – *Atomic Force Microscopy* (Microscopia de Força Atômica)

APTES – *(3-Aminopropyl)triethoxysilane*

Cantilever – microalavanca

cDNA – *complementary DNA* (DNA complementar)

CECP – Carcinoma Epidermoide de Cabeça e Pescoço

CLL – *Chronic Lymphocytic Leukemia* (Leucemia Linfocítica Crônica)

COOH – Carboxila

CPOM – Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

DTPA – *Dithiol phosphoramidite*

DTT – *Dithiothreitol*

HPV – *Human Papiloma Virus* (Papiloma Vírus Humano)

IARC – *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional para Pesquisa em Neoplasia)

IDT – *Integrated DNA Technologies*

IR – *Infrared* (Infravermelho)

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

miRNAs ou miR – MicroRNAs

mRNA – RNA mensageiro

OMS – Organização Mundial da Saúde

oncomir ou oncomiR - Forma de microRNA envolvido em um neoplasia

PBS – *Phosphate buffered saline* – Tampão Salino com Fosfato

RISC – *RNA-Induced Silencing Complex* (Complexo de Indução do Silenciamento do RNA)

RMS – *Roughness Mean Square* (Rugosidade Média Quadrática)

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

SAM – *Self-assembled Monolayers* (Monocamadas auto-montáveis)

STM – *Scanning Tunneling Microscopy* (Microscopia de Varredura por Tunelamento)

TLR – *Toll-like receptor* (Receptor)

UV – *Ultraviolet* (Ultravioleta)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	17
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. <i>Objetivo Geral.....</i>	20
2.2 <i>Objetivos Específicos.....</i>	20
3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	21
3.1. <i>Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço.....</i>	21
3.1.1. Metástase cervical.....	22
3.2. <i>MicroRNAs</i>	23
3.2.1. O papel dos microRNAs no desenvolvimento tumoral	26
3.2.2 miRNA-203.....	28
3.2.3. miRNA-205.....	30
3.2.4. MiRNAs circulantes.....	33
3.3. <i>Microscopia de Força Atômica (AFM)</i>	33
3.3.1. Sensores Nanomecânicos de <i>Cantilever</i>	36
3.4. <i>Funcionalização e Imobilização de biomoléculas em superfícies.....</i>	37
3.4.1. Estratégias de Imobilização de DNA em superfícies.....	38
3.4.1.1. Imobilização de DNA em superfícies por adsorção.....	38
3.4.1.2. Imobilização de DNA em superfícies por ligação covalente.....	39
3.4.1.3. Imobilização de DNA em superfícies por interação avidina- biotina.....	41
4. SEÇÃO EXPERIMENTAL.....	43
4.1. <i>Materiais.....</i>	43
4.1.1. Obtenção das amostras de miRNA.....	44
4.2. <i>Metodologias empregadas.....</i>	44
4.2.1. Funcionalização da superfície das microalavancas.....	44
4.2.2. Imobilização das fitas complementares.....	46
4.2.3. Soluções de trabalho para análises de interação.....	48
4.2.4. Caracterização das superfícies.....	48
4.2.4.1. Estudo da molécula de DNA.....	48
4.2.4.2. Microscopia de Força Atômica (AFM).....	50
4.2.4.2. Microscopia de Fluorescência (MF).....	51
4.2.5. Medidas do Sensor Nanomecânico de <i>Cantilever</i> com base na deflexão das microalavancas de AFM.....	52
4.2.5.1. Tratamento de dados.....	55
4.2.5.2. Medidas com sistema de aquecimento.....	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1. <i>Protocolo de imobilização das fitas complementares.....</i>	58
5.2. <i>Caracterização da funcionalização da superfície do sensor e da imobilização das fitas complementares.....</i>	59
5.2.1. Imagens de AFM.....	59
5.2.2. Imagens de Microscopia de Fluorescência (MF).....	66
5.2.3. Padronização do sensor nanomecânico de <i>cantilever</i>	67

5.2.3.1. Controle positivo e negativo: biotina-estreptavidina.....	67
5.2.3.2. Estudo das etapas de funcionalização do sistema.....	68
5.2.4. Medidas de interação baseada na hibridização das fitas complementares e miRNAs.....	70
5.2.4.1. Desenvolvimento do Sistema de Aquecimento.....	70
5.2.5.2. Medidas de detecção dos miRNAs alvo: miR-203 e miR-205.....	73
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
7. PERSPECTIVAS.....	79
8. REFERÊNCIAS.....	80

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço (CECP) é caracterizado como uma patologia que acomete tecidos epiteliais atingindo a epiderme ou também chamado de epitélio de revestimento da cavidade oral (lábios, língua, gengiva, palato duro e assoalho), como também das regiões da faringe (orofaringe e hipofaringe) e da laringe (PEREIRA, M. C. et al., 2007; JERMAL, A., et al., 2011; MA, Y. & MACHESKY, L. M., 2015).

Assim como as demais neoplasias, a origem do CECP está intimamente relacionada a um longo e continuado contato com os agentes carcinogênicos¹, classificados como oncopromotores (agentes que promovem o desenvolvimento tumoral), gerando modificações genéticas nas células que passam a se multiplicar de maneira desordenada (SIDRANSKY, D., 2002; LIN, Y., et al. 2015). De acordo com tal progressão da doença, o acúmulo de células neoplásicas² forma um maciço celular chamado de massa tumoral. Após esse estágio, algumas células neoplásicas ainda podem se desprender do maciço formado, podendo ser transportadas para demais localidades do corpo pela via sanguínea ou linfática. Tal procedimento é denominado de metástase (CAPPELLESSO, R., et al., 2015).

Em relação à etiologia destes tumores, o tabagismo, o etilismo, a higiene oral deficitária, Papiloma Vírus Humano (HPV, do inglês Human Papiloma Virus), entre outros, atuam individualmente ou de forma combinada e contribuem para o desenvolvimento de diversas neoplasias, como o CECP (TALAMINI, R. et al., 2002; CARVALHO, A. C., 2013; RAWAL, R. M. et al., 2015).

Segundo estimativas mundiais da Agência Internacional para Pesquisa em Neoplasia (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*), da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2012 foi computado um total de 14,1 milhões de novos casos de neoplasia em todo mundo, destes, 58% dos casos chegaram ao óbito (INCA, 2011). No que diz respeito ao CECP, foram diagnosticados

¹ Agentes carcinogênicos: também chamados de agentes cancerígenos, tratam-se de substâncias que, quando em contato longo e continuado com as células do corpo humano promovem o desenvolvimento tumoral, são exemplos comuns às substâncias que compõe o cigarro e álcool (“Agentes Cancerígenos - Instituto Nacional do Câncer, 2018”, [s.d.]).

² Neoplasias: termo atualmente utilizado para caracterizar o desenvolvimento tumoral, uma vez que o termo “câncer” passou a ter caráter pejorativo (“Agentes Cancerígenos - Instituto Nacional do Câncer, 2018”, [s.d.]).

aproximadamente 600 mil novos casos por ano, sendo considerado um dos carcinomas mais comuns de todo mundo (FERLAY, J., et al., 2010).

Cerca de um terço dos pacientes acometidos por CECP são diagnosticados nos estágios iniciais do desenvolvimento tumoral. Em contrapartida, dois terços dos pacientes diagnosticados com CECP apresentam quadro clínico avançado e, destes, pelo menos 50% podem apresentar recidivas, seja localmente ou em sítios distantes, nos dois primeiros anos após o tratamento (HADDAD et al., 2008; DUVVURI et al., 2004). Além disso, o estadiamento clínico realizado na rotina nem sempre é eficiente, pois pode não detectar metástases ocultas ou de pequenos depósitos metastáticos (GREENBERG et al., 2003). Outro fator preocupante, no que diz respeito ao desenvolvimento desse tipo tumoral, é a estagnação das taxas de mortalidade de pacientes acometidos por CECP, que não diminuem há 40 anos (CHIN et al., 2004). Tendo em vista tal problemática, é de suma importância o desenvolvimento de novas tecnologias para detecção de moléculas envolvidas com diferentes estágios CECP, bem como para possibilitar auxílio ao direcionamento do tratamento dos pacientes diagnosticados com esse tipo tumoral em estágios mais avançados, como metástases.

A utilização de marcadores moleculares tem sido uma técnica aplicada amplamente na literatura para detecção de neoplasias e demais patologias (WANG, J., et al., 2015). Atualmente existem diversos marcadores moleculares para detecção de neoplasias, e.g., DNA, RNA e proteínas (SIDRANSKY, 2002). Dentre esses exemplos, os microRNAs são moléculas importantes no estudo de diversas doenças, pois são pequenas moléculas de RNA não codificantes que desempenham papel importante na regulação da expressão de vários genes, inclusive os genes supressores de tumor e oncogenes (POWRÓZEK, T., et al., 2015). A expressão de microRNAs foi notada em diferentes fases da progressão tumoral e em diferentes tipos de neoplasia, dentre esses o CECP (LU, J., et al., 2005; OLSON, P., et al., 2009). Diferentes aplicações dos microRNAs como biomarcadores de CECP são apontadas em estudos recentes, tais como para a detecção de células de CECP em amostras de saliva, além da detecção de células metastáticas (NAGADIA, R., et al., 2013; SALAZAR, C., et al., 2014; CARVALHO, A. C., et al., 2015). Devido as características dos microRNAs, tais como a sequência curta e baixa abundância, desenvolver uma plataforma de detecção rápida torna-se um grande desafio (LIU, S., et al., 2015).

Recentemente vários autores têm utilizado microRNAs para o desenvolvimento de nanossensores (KILIC et al., 2018). Esses nanodispositivos podem ser construídos de

diversas maneiras, e.g. com base no desenvolvimento de nanopartículas (DELKHAHI; RAHAIE; RAHIMI, 2017); biossensores fotoeletroquímicos (YIN et al., 2014); biossensores eletromecânicos (JOHNSON; MUTHARASAN, 2012; HUSALE; PERSSON; SAHIN, 2009a).

Desse modo, o desenvolvimento de uma técnica de sensoriamento molecular fundamentada na construção de um nanossensor baseado em sistemas microeletromecânicos (MEM) de Microscopia de Força Atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*), poderia ser aplicado em tal problemática, visto que se trata de um sensoriamento altamente sensível, preciso e com rápido tempo de resposta (MISHRA, R. & HEGNER, M., 2014; KOSAKA, P. M., et al., 2014).

Diante do pressuposto, este trabalho visa o desenvolvimento de um genossensor³ com microalavancas (*cantilevers*) de AFM para análise e detecção de marcadores moleculares de miRNA potencialmente relacionados com a fase metastática do CECP, miRNA-203 e miRNA-205 (CARVALHO, A. C., et al., 2015). O genossensor foi construído a partir da funcionalização das superfícies das microalavancas de AFM, onde foram imobilizadas as fitas complementares dos marcadores de miRNAs (LI, F., et al., 2015).

Dessa forma, as técnicas de funcionalização e imobilização das fitas complementares dos marcadores de miRNAs foram submedidas à análises de caracterização para validação da metodologia. Além disso, são necessárias análises de padronização do sistema para a construção do genossensor. Ambos os procedimentos são relatados neste trabalho.

³ Genossensor: são dispositivos também chamados de biossensores de DNA que combinam um agente de reconhecimento biológico, um DNA de cadeia simples (ssDNA) chamado DNA-sonda, com um transdutor. Os genossensores utilizam o evento de hibridação para detectar uma sequência de DNA alvo e transformam um sinal químico de reconhecimento do DNA em outro sinal mensurável, como o mecânico, por exemplo (BONANNI et al., 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Detectar a presença dos marcadores de metástases cervicais miR-203 e miR-205, por intermédio de suas fitas complementares imobilizadas em microalavancas de AFM, para possível sensoriamento de metástase do (CECP).

2.2. Objetivos Específicos

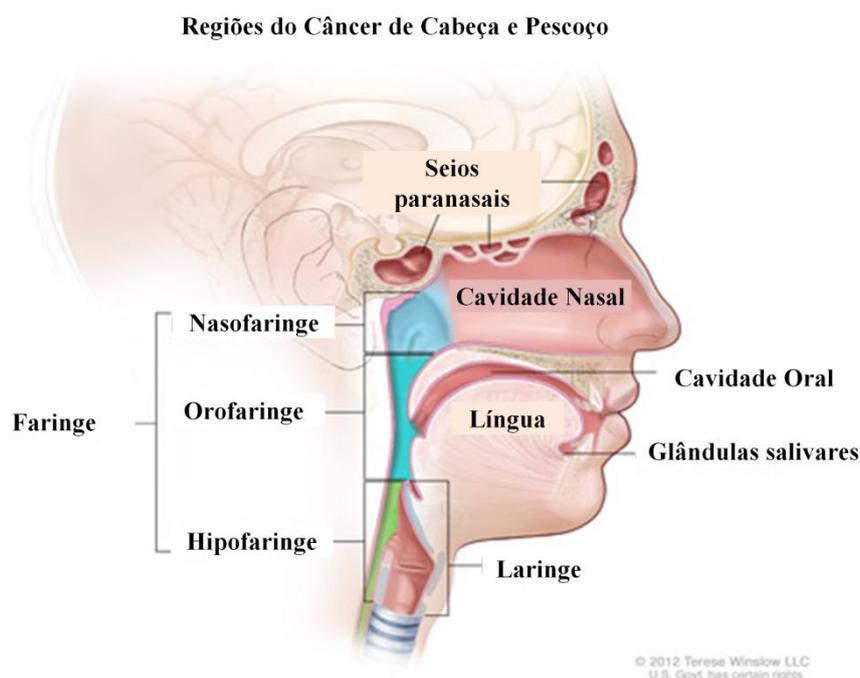
Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- i. Funcionalizar as microalavancas com uma monocamada de APTES a fim de que sejam imobilizadas as fitas complementares dos marcadores de microRNAs (miR-203 e miR-205) de modo que seja permitida a detecção dos marcadores propriamente ditos;
- ii. Caracterizar a imobilização das fitas complementares dos marcadores de microRNAs sobre as microalavancas usando as técnicas de Microscopia de Força Atômica (AFM) e Microscopia de Fluorescência (MF), com o intuito de verificar a efetividade da técnica de imobilização utilizada;
- iii. Detectar a interação específica de hibridização das fitas complementares de microRNAs e os próprios marcadores miR-203 e miR-205 a partir da deflexão das microalavancas de AFM.

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1. Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço

O Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço (CECP) trata-se de um tipo tumoral que acomete regiões do epitélio de superfícies úmidas do interior da cabeça e do pescoço, incluindo a cavidade oral (lábios, língua, gengiva, palato duro e assoalho), cavidade nasal, regiões da faringe (orofaringe e hipofaringe), laringe e glândulas salivares (Figura 1) (PEREIRA, M. C. et al., 2007; JERMAL, A., et al., 2011; MA, Y. & MACHESKY, L. M., 2015).



Fonte: (“Head and Neck Cancers - National Cancer Institute”, [s.d.]

Figura 1. Regiões da cabeça e do pescoço em que o CECP geralmente se desenvolve.

Atualmente foram computados aproximadamente 600 mil novos casos de CECP por ano, sendo considerado um dos carcinomas mais comuns de todo mundo, prevalente na regiões da Índia, do Paquistão, do Brasil, da França, Afeganistão, Bangladesh, Sri Lanka, Butão, Nepal, Irã e Maldivas (ALI et al., 2017; FERLAY, J., et al., 2010). No Brasil, para o biênio de 2018/2019, foram estimados 11.200 novos casos de neoplasia da cavidade oral em homens e 3.500 em mulheres. Esses valores correspondem a um

risco estimado de 10,86 casos novos a cada 100 mil homens, ocupando a quinta posição; e de 3,28 para cada 100 mil mulheres, sendo o 12º mais frequente entre todas as neoplasias. A região sudeste do país apresenta maior frequência desse tipo de carcinoma, a cada 100 mil pessoas, 13,77% possivelmente desenvolve a doença (“INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2018 - Síntese de Resultados e Comentários”, [s.d.]).

Casos de recorrência local e de metástases à distância após o tratamento são comuns e diminuem o índice de sobrevivência global para pacientes com CECP, culminando com o aumento das taxas de mortalidade, que não melhoram há 40 anos (“The microRNA Signatures”, [s.d.]).

A etiologia destes tumores está associada principalmente ao tabagismo, ao etilismo, e à infecção por Papilomavírus humano (HPV). Outros fatores como a higiene oral deficitária e a dieta pobre em nutrientes também podem atuar contribuindo para o desenvolvimento do CECP (TALAMINI, R. et al., 2002; CARVALHO, A. C., 2013; RAWAL, R. M. et al., 2015).

É importante destacar que, assim como as demais neoplasias, a origem do CECP está intimamente relacionada com alterações genéticas acumuladas, anormalidades cromossômicas e desordens no controle da expressão gênica. Tais modificações podem contribuir com a inativação de genes supressores de tumor e ativação de oncogenes, culminando com a transformação maligna e a malignidade invasiva das células do CECP (“The microRNA Signatures”, [s.d.]).

3.1.1. Metástase cervical

A metástase é comumente conhecida como a difusão da neoplasia em diferentes regiões do corpo do paciente acometido por algum tipo tumoral primário. Nesse contexto, a metástase envolve múltiplas etapas sequenciais e correlacionadas em que as células primárias adquirem diversas capacidades: desde o desprendimento do maciço tumoral e transporte via corrente sanguínea ou linfática, até sua proliferação e instalação em outro órgão, gerando um tumor secundário (CAPPELLESSO et al., 2015; HURST; EDMONDS; WELCH, 2009).

Nos tumores de cabeça e pescoço, a difusão metastática ocorre geralmente através do sistema linfático, sendo os linfonodos uma ponte para a dispersão do tumor

em outros sítios levando em consideração que são os primeiros órgãos a desenvolver metástases (CHRISTIANSEN; DETMAR, 2011; DE CARVALHO et al., 2015).

O desenvolvimento de metástases em linfonodos cervicais é considerado fator de prognóstico da doença. Tal processo é caracterizado pelo acesso das células do tumor primário à via linfática, posterior instalação e proliferação em linfonodos regionais, o que pode propiciar maior capacidade metastática às células invasivas (CHO et al., 2015). Contudo, não se pode descartar a resposta imune do paciente e o microambiente do linfonodo em que tais células estão instaladas, tais condições irão propiciar ou não a sobrevivência, o desenvolvimento e a posterior colonização de outro órgão como sítio secundário do tumor (PEREIRA et al., 2015).

Tais mecanismos detém grande complexidade e relacionam-se com diversos fatores, tais como alterações em oncogenes e supressores tumorais, fatores de crescimento, apoptóticos, angiogênicos, entre outros, ambos considerados como “características de neoplasias” (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

3.2. MicroRNAs

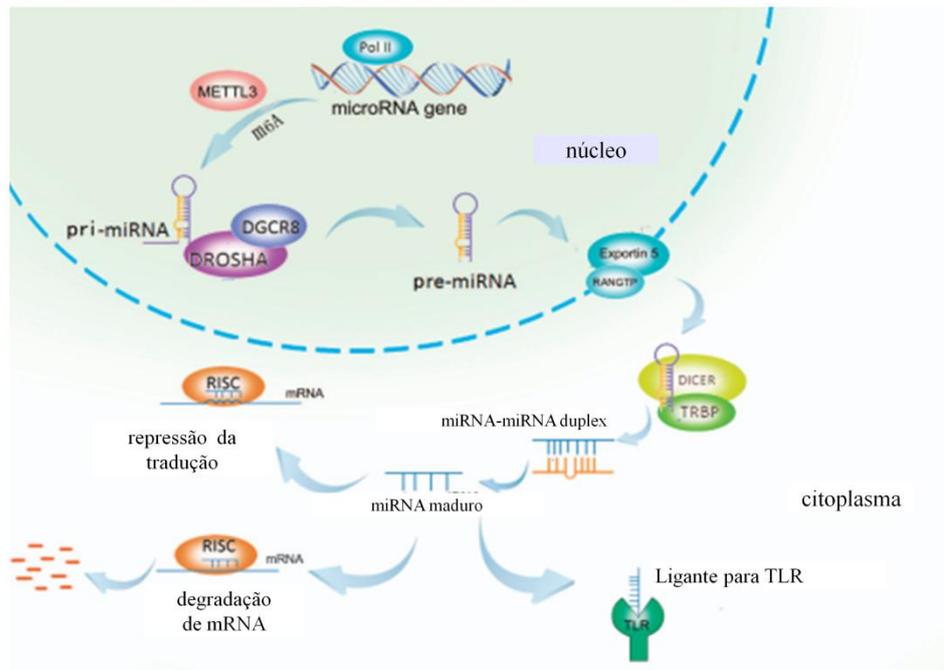
Responsáveis por regular pelo menos metade do transcriptoma humano, os microRNAs (ou *miRNAs*) são pequenas moléculas de RNA não codificantes que possuem aproximadamente 20 nucleotídeos e desempenham papel importante na regulação da expressão de vários genes envolvidos em diversos processos biológicos, incluindo apoptose, proliferação, diferenciação e metástase (AMBROS, 2004; BARTEL, 2004; FILIPOWICZ; BHATTACHARYYA; SONENBERG, 2008). Além disso, os miRNAs podem controlar inclusive a expressão de genes supressores de tumor e oncogenes (POWRÓZEK et al., 2015; WANG; CHEN; SEN, 2016).

A regulação ou controle da expressão gênica trata-se de um mecanismo que condiciona os processos de decodificação do DNA, ou seja, é um sistema gênico que regula quais genes serão expressos, a quantidade e o momento em que estes genes serão expressos dentro da célula, garantindo um ordenado funcionamento de toda maquinaria celular (DE CARVALHO et al., 2015). Os genes responsáveis por tal mecanismo são denominados genes “*housekeeping*” (limpeza ou administração da casa), que como o próprio nome diz são genes responsáveis pela manutenção celular de um organismo (MAR-AGUILAR et al., 2013). Portanto, espera-se que os níveis de expressão dos genes “*housekeeping*” se mantenham constantes em todas as células,

independentemente do tipo de tecido, fase de desenvolvimento, estágio do ciclo celular ou sinal externo (RICE et al., 2015).

Apesar de seu importante papel na regulação da expressão gênica, por serem moléculas não codificadoras de proteínas, os estudos com miRNAs se iniciaram a pouco mais de duas décadas (ALMEIDA; REIS; CALIN, 2011). Uma vez que a maioria das pesquisas era regida pelo dogma central da biologia molecular, somente os genes codificadores de proteínas eram analisados. Atualmente sabe-se que as regiões do DNA não codificadoras de proteína também são de suma importância para toda maquinaria celular (RICE et al., 2015).

Os microRNAs são produzidos a medida em que seu gene correspondente é transcrito pela RNA polimerase II, que produz grandes transcritos primários denominados pri-miRNAs (Figura 2). Em seguida os pri-miRNAs são metilados e marcados por Metiltransferase-like 3 (METTL3) para reconhecimento e processamento da proteína de ligação a RNA: DGCR8. Desse modo, os pri-miRNAs são clivados por um complexo de microprocessador, composto por DGCR8 e RNase III Drosha, em uma estrutura de grampo ou haste-laço de aproximadamente 85 nucleotídeos, denominada de pre-miRNA. Após o transporte do pre-miRNA pelo complexo RAN/ GTP/Exportin 5 do núcleo para o citoplasma, os pré-miRNAs são processados por outra enzima RNase III Dicer para um duplex miRNA/miRNA de aproximadamente 20-22 nucleotídeos. Depois de o duplex ser desenrolado, o miRNA maduro é incorporado no complexo de proteína denominado RISC (Complexo de Silenciamento Induzido por RNA), que pode promover o silenciamento de genes via clivagem e degradação de mRNA ou repressão translacional dependendo da complementaridade entre o miRNA e o transcrito de mRNA alvo. Além disso, os miRNAs podem funcionar como ligantes do receptor *Toll-like* (TLR), desencadeando cascatas de sinalização, tais como a via de inibição da produção de E-caderinas, promovendo um mecanismo pró-metástase: o desprendimento celular via transição epitélio-mesenquimal das células (PENG; CROCE, 2016; TANG et al., 2016).

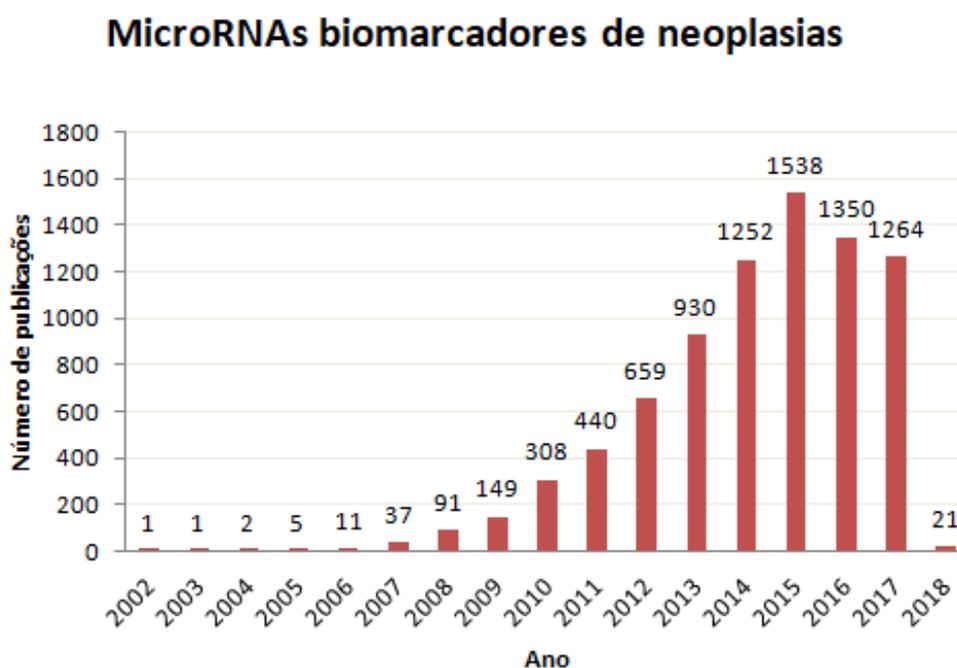


Fonte: PENG; CROCE, 2016.

Figura 2. Biogênese dos microRNAs. De acordo com a transcrição do gene de miRNA, seu transcrito, denominado pri-miRNA é marcado por METTL-3, reconhecido pelo complexo DGCR8/Rnase III DROSHA e clivado em uma estrutura de grampo, denominada pre-miRNA. O pre-miRNA é transportado do núcleo ao citoplasma celular pelo complexo RAN/GTP/Exportin 5 e processado pela RNase III DICER, gerando um duplex miRNA/miRNA. Após o desenrolar do duplex, miRNA maduro pode ser incorporado ao RISC, promovendo silenciamento ou degradação do mRNA alvo, ou ainda pode ligar-se ao receptor Toll-like (TLR), desencadeando cascatas de sinalização.

Apenas em 1993 foi descoberto o primeiro miRNA: o lin-4, responsável por regular o padrão de desenvolvimento do estágio larval do nematoide *Caenorhabditis elegans* (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993). Somente em 2002 publicou-se o primeiro estudo sugerindo a função dos miRNAs em neoplasias (CALIN et al., 2002). Tal estudo verificou que miR-15 e miR-16 eram provenientes da região cromossomal 13q14, que geralmente era suprimida em caso de leucemia linfocítica crônica (CLL). Em seguida constatou-se que em mais de 60% de células B de CLL os genes dessa região cromossômica 13q14 que originavam os miR-15 e miR-16 eram suprimidos ou regulados para baixo, indicando a função desses genes como supressores tumorais (CALIN et al., 2002; ALMEIDA; REIS; CALIN, 2011).

Desde então, diferentes aplicações dos microRNAs como biomarcadores são apontadas em estudos recentes, a Figura 3 aponta a progressão do número de publicações utilizando microRNAs como marcadores neoplásicos. Após a publicação do primeiro estudo com microRNAs, é possível perceber uma ascensão no número de publicações desde 2003, o que ressalta o interesse da comunidade científica sobre o tema.



Fonte: PUBMED, Acesso: 01 de dezembro de 2017.

Figura 3. Número de publicações científicas utilizando microRNAs como biomarcadores tumorais.

3.2.1. O papel dos microRNAs no desenvolvimento tumoral

Os microRNAs podem atuar como: (i) oncogenes (*oncomirs*), que favorecem o desenvolvimento tumoral ou (ii) supressores de tumor, que atuam de forma antagônica inibindo o desenvolvimento tumoral. Tais moléculas estão envolvidas em diversas vias desreguladas em vários tipos de neoplasia, desde as vias que regulam a divisão e morte celular (EYHOLZER et al., 2010).

Sendo assim, os microRNAs podem ser considerados importantes biomarcadores neoplásicos, pois além de serem produzidos pelas células saudáveis, podem ser sub ou superexpressos em tecidos tumorais e protegidos da atividade de RNase endógena,

refletindo seu potencial como biomarcadores extracelulares de neoplasia e outras doenças (MITCHELL et al., 2008).

Na Tabela 1 foram catalogados alguns exemplos de microRNAs que, de acordo com sua função são regulados no que diz respeito a sua expressão em tecidos tumorais. Uma vez que um determinado microRNA desempenha o papel de supressor tumoral e é superexpresso na célula sadia, na célula cancerosa este microRNA é subexpresso, como apresentado na Tabela 1, a diminuição da expressão gênica, independente do tipo tumoral desenvolvido, dos miRNA-145, miR-34a, miR-140, miR-203 e miR-205. Entretanto, uma vez que um determinado microRNA desempenha o papel de oncogene e é subexpresso na célula sadia, na célula cancerosa este microRNA é superexpresso (Tabela 1), o aumento da expressão gênica, independente do tipo tumoral desenvolvido, dos miR-21, miR-421, miR-155, miR-328 e miR-195.

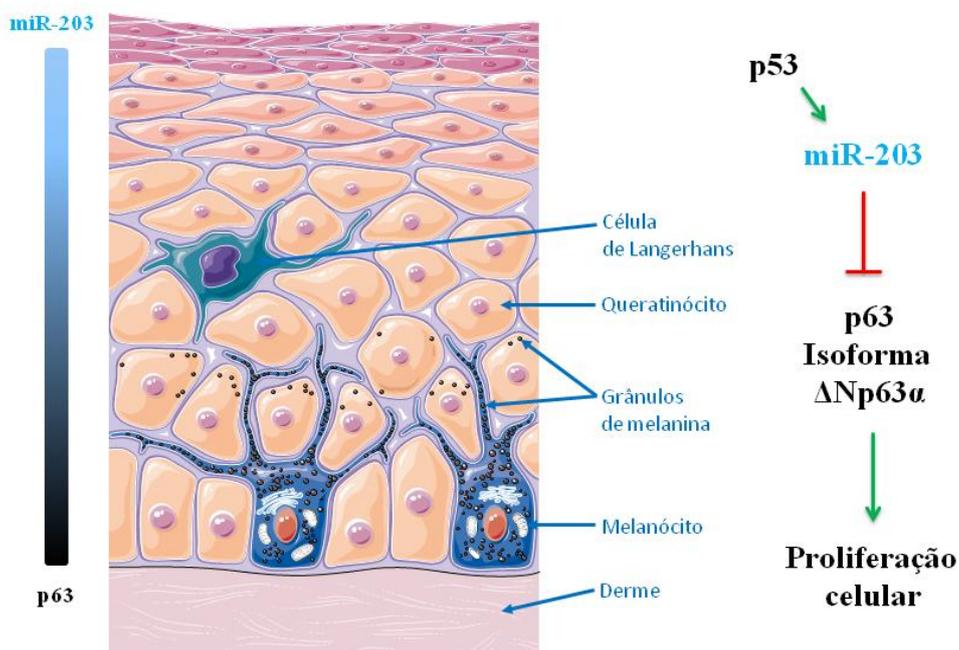
Tabela 1. Exemplos expostos na literatura de MicroRNAs e suas respectivas funções em determinados tipos tumorais.

MicroRNA	Expressão gênica	Função	Tipo de Neoplasia	Ref.
miR-145	Diminui	Supressor tumoral	Colo retal	(ARREDONDO-VALDEZ et al., 2016)
miR-34a	Diminui	Supressor tumoral	Leucemia	(VAN ROOSBROECK; CALIN, 2016)
miR-21	Aumenta	Oncogene	Linfoma	(YU et al., 2016)
miR-421	Aumenta	Oncogene	Estômago	(ZHANG et al., 2016)
miR-140	Diminui	Supressor tumoral	Ovário	(PRAHM et al., 2016)
miR-155	Aumenta	Oncogene	Mama	(CASEY et al., 2016)
miR-328	Aumenta	Oncogene	Cérebro	(WU et al., 2016)
miR-195	Aumenta	Oncogene	Próstata	(FERRO et al., 2016)
miR-203 e miR-205	Diminui	Supressor tumoral	Cabeça e Pescoço	(DE CARVALHO et al., 2015)

3.2.2 miRNA-203

O miRNA-203 é caracterizado como um supressor tumoral, ou seja, uma molécula importante para inibir a progressão tumoral (SONKOLY et al., 2012). Esta molécula atua especificamente inibindo a proliferação celular, bem como invasão e transição epitélio-mesenquimal, capacidades importantes para tumorigênese (OBAYASHI et al., 2016).

No contexto da biologia celular epitelial, o miRNA-203 atua como um interruptor molecular entre a proliferação e a diferenciação de queratinócitos, células produtoras de queratina que compõem a camada espinhosa da epiderme (Figura 4) (ZHU et al., 2013; LENA et al., 2008). Durante o processo de diferenciação celular, a capacidade proliferativa dos queratinócitos é reduzida devido ao aumento da expressão da molécula de miRNA-203, que inibe $\Delta Np63\alpha$, isoforma predominante da proteína p63 (YI et al., 2008).



Fonte: Adaptado de (“Slide kit | Servier”, [s.d.]

Figura 4. Esquema representativo da ação do miRNA-203 no contexto da biologia celular epitelial. A escala de cores preta e azul relacionam-se com o aumento da expressão das moléculas de p63 (preto) e miR-203 (azul). As setas verdes indicam à promoção e a vermelha a inibição do fator seguinte.

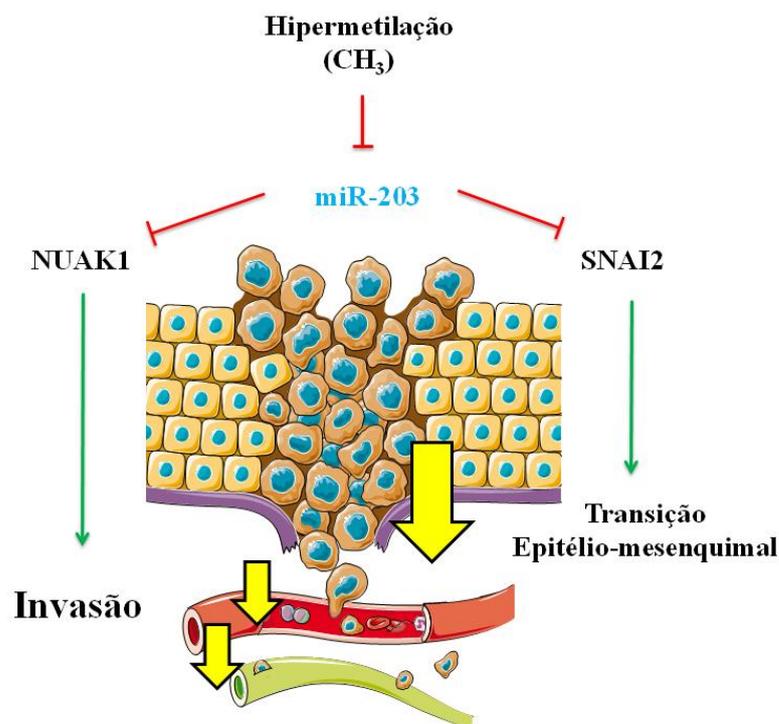
Desse modo, para regular a capacidade proliferativa dos queratinócitos, o controle da expressão de miRNA-203 é de suma importância. MCKENNA et al., (2010)

aponta que a expressão de miRNA-203 é reduzida em queratinócitos onde a função de p53 é comprometida, indicando que a expressão de miRNA-203 é dependente de p53 (MCKENNA et al., 2010). Dessa forma, os efeitos da perda de expressão da p63 sobre a proliferação de queratinócitos são dependentes da p53, como demonstrado no esquema da Figura 4.

O miR-203 pode estar ausente ou apenas expresso em níveis baixos em células da camada basal proliferativa dependente de p63, enquanto sua expressão aumenta à medida que ocorre a diferenciação dos queratinócitos, reprimindo diretamente a isoforma $\Delta Np63\alpha$ da região suprabasal (Figura 4) (YI et al., 2008). Tal mecanismo de regulação de p63 pelo miR-203 é comum em humanos, ratos, cães e galinhas (LENA et al., 2008,).

Vale destacar que a $\Delta Np63\alpha$ é geralmente superexpressa em até 80% dos carcinomas primários de CECP (ROCCO et al., 2006). Nesse contexto, estudos apontam que, além de inibir a proliferação celular, o miR-203 pode ser uma das vias utilizadas por p53, que induz apoptose em células de CECP após irradiação Ultravioleta (UV) (MARCHBANK et al., 2003).

Outro papel importante que o miRNA-203 desempenha é o de inibidor de dois mecanismos celulares importantes para o desenvolvimento da metástase tumoral: o processo de transição epitélio-mesenquimal e o de invasão celular, principalmente nos casos de CECP que possuem uma grande capacidade de invasão (OBAYASHI et al., 2016). Já foi descrito que o miRNA-203 inibe a ação da SNAI2, que reduz a expressão da proteína E-caderina (proteína que promove a aderência celular) e é correlacionada com a transição epitélio-mesenquimal em CECP (DING et al., 2013). Além disso, de acordo com Obayashi et al., 2016 o miRNA-203 regula a expressão de NUA1, correlacionada com diferenciação histológica irregular, invasividade e metástase de linfonodos em casos de CECP (Figura 5).



Fonte: Adaptado de (“Slide kit | Servier”, [s.d.]

Figura 5. Esquema representativo da ação do miR-203 nos processos de Transição Epitélio Mesenquimal e Invasão. As setas verdes indicam à promoção e as vermelhas a inibição do fator seguinte.

Conseqüentemente, a inibição de miRNA-203 através da hipermetilação promove a invasão e a transição epitélio-mesenquimal (KOZAKI et al., 2008). Dessa forma, o gene que origina o miRNA-203 passa a ser regulado negativamente, como se dá na linhagem de Carcinoma de Células Escamosas MSCC-1, altamente invasiva (OBAYASHI et al., 2016; KUDO et al., 2003).

3.2.3. miRNA-205

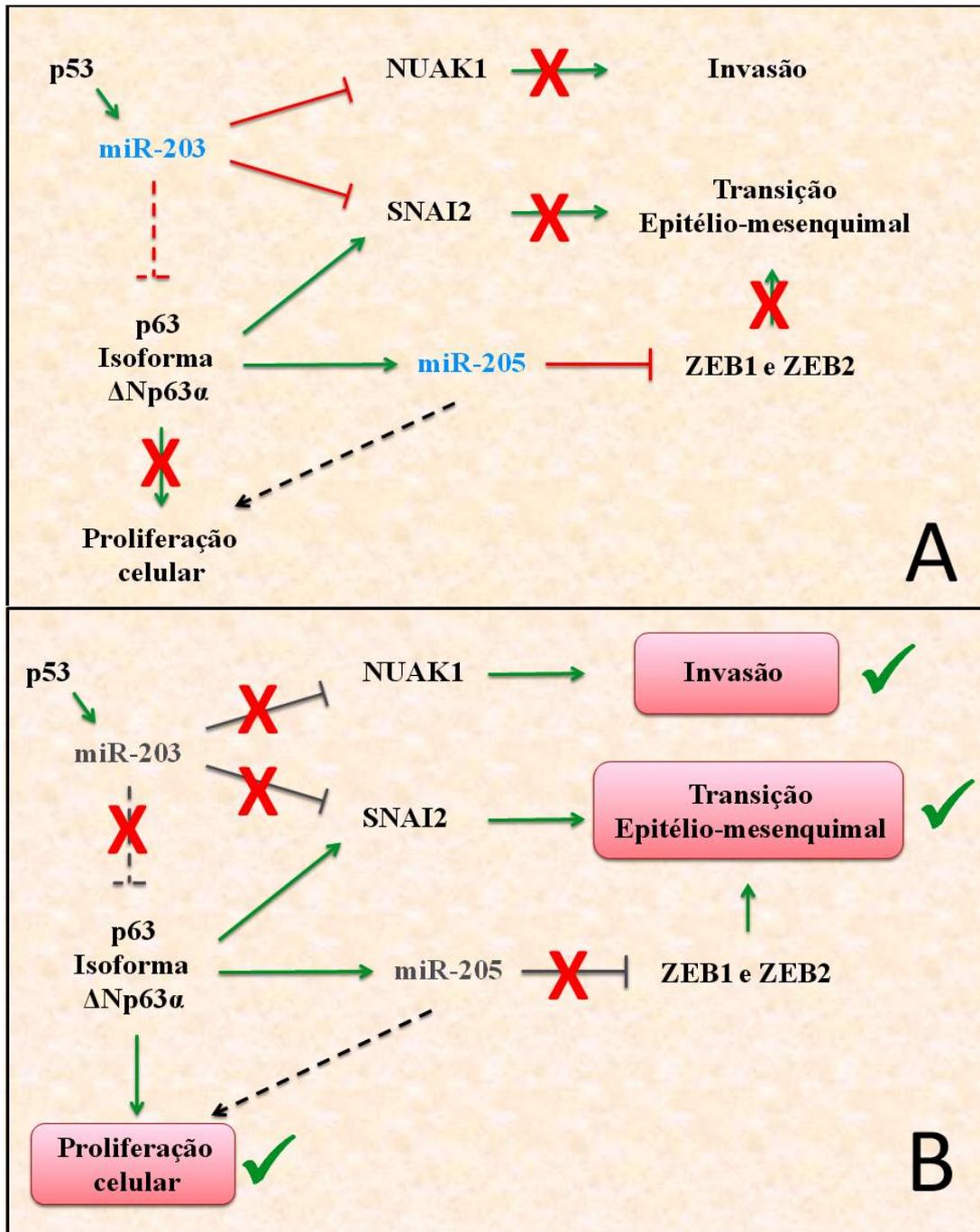
A caracterização de miRNA-205 como supressor tumoral ou oncogene é um tanto quanto complexa. Estudos apontam que miRNA-205 atua tanto como supressor tumoral, quanto oncogenes (VOSGHA et al., 2014; ZHANG et al., 2016).

O miR-205 age como um supressor de tumor através da proliferação e invasão ou como um oncogene através da facilitação da iniciação e proliferação do tumor, dependendo do contexto tumoral específico e dos genes alvo (QIN et al., 2013). No trabalho de Haleh Vosgha e colaboradores 2014 foi evidenciado o múltiplo papel do

miRNA-205 na regulação de diferentes vias relacionadas com o desenvolvimento tumoral, como a indução da transição epitélio mesenquimal, uma vez que a expressão ZEB1 e ZEB2, indutores dessa transição, deixam de ser regulados com a baixa expressão de miR-205 (HURST; EDMONDS; WELCH, 2009; MCKENNA et al., 2010; VOSGHA et al., 2014).

A isoforma de p63, $\Delta Np63\alpha$, também exerce um importante papel na regulação do miRNA-205, contribuindo para a supressão da transição epitélio-mesenquimal. A $\Delta Np63\alpha$ liga-se na região reguladora do sítio de iniciação do gene miRNA-205HG, que abriga o miRNA-205, coordenando sua transcrição (TRAN et al., 2013).

Além disso, a $\Delta Np63\alpha$ também pode contribuir com a indução transição epitélio-mesenquimal, uma vez que promove a expressão de SNAI2. Aqui pode ser ressaltada a importância do miRNA-203, descrito no item anterior. Desse modo, é possível correlacionar a importância dos dois marcadores (miRNA-203 e miRNA-205), pois ambos desempenham funções importantes para o desenvolvimento tumoral (Figura 6).



Fonte: Do autor, 2016.

Figura 6. Esquema representativo da relação entre os miRNAs 203 e 205 e sua consequência frente aos fatores promotores da progressão tumoral e metástase. (A) Representação de uma situação de um organismo saudável; (B) Representação de uma situação de um organismo com propensão ao desenvolvimento tumoral. As setas verdes indicam à promoção e as vermelhas a inibição do fator seguinte. As setas pretas pontilhadas indicam uma possível função de miR-205 como oncogene. A seta vermelha pontilhada indica inibição parcial de miR-203 a isoforma de p63.

Segundo TRAN et al., 2013 o miRNA-205 também foi encontrado em queratinócitos do epitélio de células escamosas, regulado positivamente durante a diferenciação. Além disso, no trabalho de Carvalho e colaboradores, ambos miRNA-203 e miRNA-205 foram encontrados com alta precisão em linfonos acometidos por CECP, através das técnicas de qRT-PCR, garantindo que tais marcadores são importantes para o diagnóstico de metástases de CECP (DE CARVALHO et al., 2015).

3.2.4. MiRNAs circulantes

Além de atuarem dentro da célula, os miRNA também podem ser encontrados nos fluidos corpóreos dos pacientes acometidos por algum tipo tumoral. Estudos apontam que ambos miRNA-203 e miRNA-205 foram encontrados no soro de pacientes com neoplasia cervical (MA et al., 2014; ZAVESKY et al., 2015).

Tais moléculas se estabilizam no meio extracelular devido ao seu transportador, que consistem em vesículas membranosas, tais como os exossomos (MITCHELL et al., 2008; ZAVESKY et al., 2015).

Uma vez constatado o importante papel dos microRNAs como biomarcadores neoplásicos, faz-se necessário o desenvolvimento de novas técnicas de detecção e análise de tais marcadores que encontram-se até mesmo em fluidos como soro e plasma (MOLDOVAN et al., 2013). A nanotecnologia vem dando suporte para técnicas com alta sensibilidade e especificidade para detecção de diversos marcadores moleculares, nos quais os miRNAs se incluem.

3.3. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A AFM foi criada pelos pesquisadores Binnig, Quate e Gerber em 1986 (BINNIG; QUATE; GERBER, 1986). Tal técnica permite análises tanto de materiais condutores, quanto de semicondutores, um diferencial ainda não apresentado por sua precursora: a Microscopia de Varredura por Tunelamento (do inglês *Scanning Tunneling Microscopy*, STM), desenvolvida em 1981 pela IBM (BINNIG; ROHRER, 1985). Além disso, a AFM conciliou a alta resolução da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com a capacidade de se obter imagens em meio aquoso da Microscopia Óptica de Transmissão, permitindo o estudo de várias propriedades de

superfície da amostra, tais como a topografia, atrito, forças de adesão e características mecânicas em geral (STEFFENS et al., 2012; LEITE; HERRMANN, 2005).

Diversas amostras podem ser analisadas por meio do AFM, dentre as quais se podem destacar conformação das moléculas, formação de biofilmes e camadas monomoleculares, entre outros. A grande vantagem desta tecnologia é a habilidade de se analisar materiais em condições ambientes ou em ambientes fisiológicos próprios para a análise do material biológico, permitindo, desse modo, estudar a topografia da superfície com um alto grau de precisão e resolução de força (DEDA et al., 2013; MOREAU et al., 2012; LEITE; HERRMANN, 2005).

Os princípios de funcionamento da AFM são facilmente compreendidos quando comparados com uma antiga vitrola. O AFM utiliza a ponta fixada a uma haste, denominada *cantilever* que deflete, ou seja, muda de posição, em função da interação da ponta com a superfície, assim como na vitrola, onde a agulha se movimenta na medida em que perpassa pela superfície do disco de vinil (Figura 7) (BINNIG; QUATE; GERBER, 1986). A deflexão do *cantilever* é medida por um sistema a laser que detecta sua posição, produzindo um sinal enviado ao circuito de realimentação do microscópio, e, a distância entre a ponta e a amostra é controlada por um scanner piezo-elétrico a fim de manter constante a força de interação detectada entre a ponta e a amostra (STEFFENS et al., 2012; LEITE; HERRMANN, 2005).

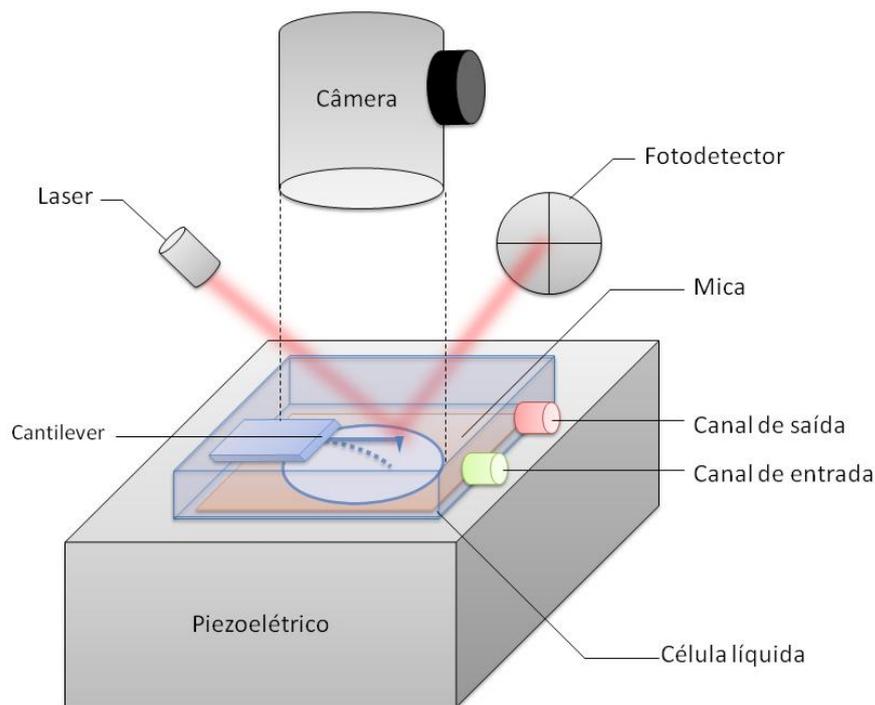


Figura 7. Esquema representativo do sistema de análise da Microscopia de Força Atômica (AFM). O sistema é composto por um porta-amostra acoplado a um piezoelétrico, onde se insere o material a ser analisado; um laser que incide na ponta do *cantilever* e reflete um fotodetector; uma câmera; e uma célula líquida, que permite análises em meio líquido, que se insere no canal de entrada e evacua no canal de saída.

A resolução das imagens depende da dimensão da sonda, normalmente de silício (Si) ou nitreto de silício (Si_3Ni_4), que varre a amostra. Esta sonda também chamada de “ponta” de AFM possui a dimensão de sua extremidade na ordem de poucos nanômetros, garantindo ao AFM alta capacidade de resolução de imagens de diferentes materiais, como os biológicos, que se mantém em meio aquoso (FRITZ, 2008; STEFFENS et al., 2012)

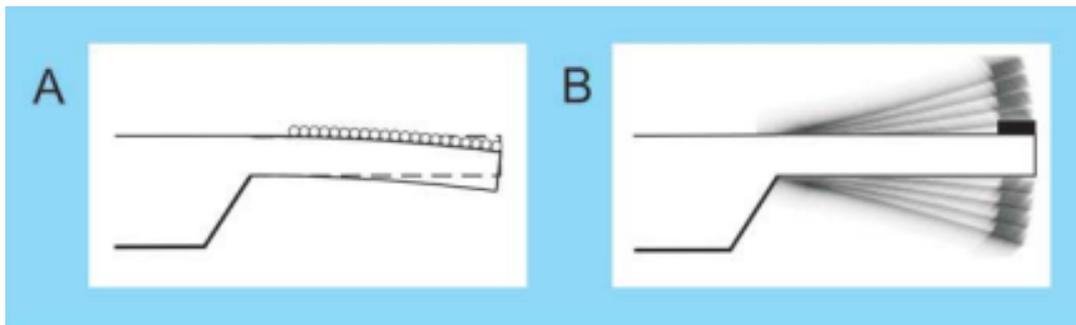
Além disso, a propriedade mecânica de deflexão pode ser também utilizada como resposta de um biossensor, pois o AFM consegue detectar pequenas variações de curvatura das microalavancas, tal propriedade é utilizada na construção de sensores nanomecânicos de *cantilever* (FRITZ, 2008).

3.3.1. Sensores Nanomecânicos de *Cantilever*

Os sensores nanomecânicos de *cantilever*, com base na Microscopia de Força Atômica, se aplicam em análises de amostras de escala nanométrica fazendo uso de um *cantilever*, que além de dar suporte às pontas de AFM, também podem ser utilizados para medir a interações moleculares (ZHANG et al., 2006).

O sistema de biossensores baseados em *cantilever* (ou também chamado de biossensor eletromecânico) é caracterizado em função da deflexão do *cantilever* a partir das interações moleculares que ocorrem em sua superfície, com base no mecanismo de transdução de sinal (KILIC et al., 2018). No AFM, um laser é focado na extremidade flexível de um *cantilever* e refletido para um detector sensível à posição. De acordo com a mudança na posição do ponto de reflexão no detector sensível à luz pode ser facilmente calculada uma deflexão *cantilever*. A fim de melhorar esta captação da deflexão, os *cantilevers* podem ser cobertos com uma fina camada metálica refletora (normalmente dourada) em um dos lados. Desse modo, as mudanças no ambiente ao redor ou diretamente na superfície dos *cantiléveres* criam uma tensão mecânica na

superfície que leva a sua expansão ou contração. Se essa tensão atuar somente em um lado do *cantilever*, a estrutura assimetricamente se dobrará e o *cantilever* se desviará. Para materiais isotrópicos simples, a tensão superficial (σ) relaciona o trabalho reversível de deformação de uma superfície (dw) à mudança na área superficial (dA) por: $dw = \sigma \times dA$. Ao se tratar de processos espontâneos, isto é, $dw < 0$, e assumindo uma tensão positiva ($\sigma > 0$), dA tem que ser negativa, a superfície contrai e a tensão é tida como tração. Já para um estresse superficial negativo ($\sigma < 0$), dA tem que ser positiva, a superfície expande e a tensão é tida como compressão (FRITZ, 2008). Tal metodologia pode ser aplicada de dois modos diferentes: modo estático e dinâmico (Figura 8) (LANG; HEGNER; GERBER, 2005).



Fonte: LANG; HEGNER; GERBER, 2005.

Figura 8. Modos de operação dos Sensores Nanomecânicos de *Cantilever* (A) Modo estático; (B) Modo dinâmico.

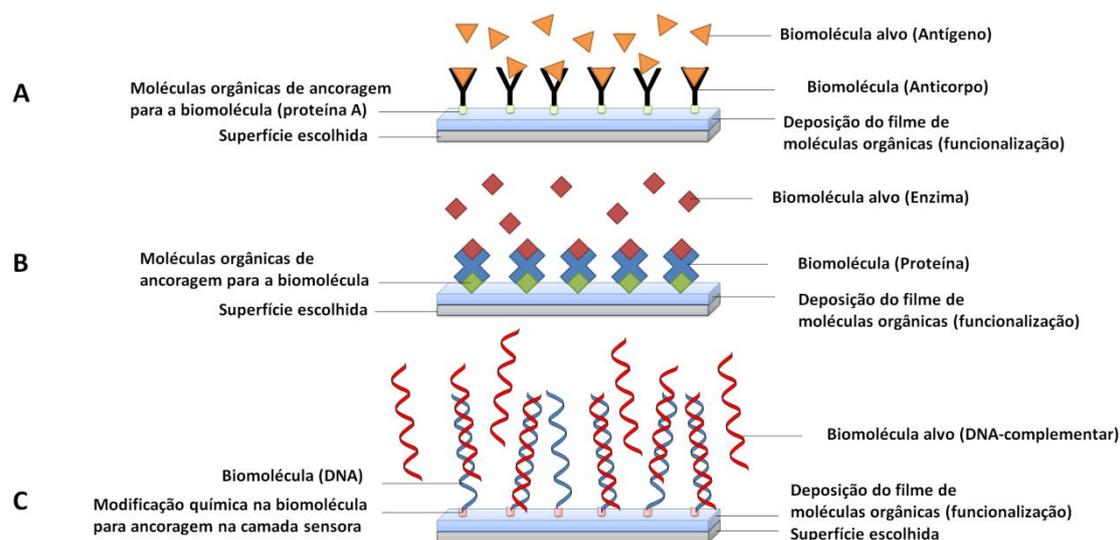
O modo de operação estático (escolhido para ser aplicado neste trabalho) explora o movimento do *cantilever*, chamado de deflexão, a partir de uma tensão mecânica e tensão superficial produzido por meio da interação molecular ocorrida em sua superfície. Já o modo de operação dinâmico estuda a mudança de massa de um movimento oscilatório do *cantilever* chamado de frequência de ressonância, que muda em função da adsorção de biomoléculas e, conseqüentemente, da interação molecular (FRITZ, 2008; LANG; HEGNER; GERBER, 2005).

Diversos trabalhos utilizam Sensores Nanomecânicos de *Cantilever* para estudo de interações intermoleculares, inclusive o reconhecimento por complementariedade de sequências nucleotídicas, ou também chamado processo de hibridização de DNA (DOMÍNGUEZ et al., 2017; JAIN, 2017; MISHRA; HEGNER, 2014; COSNIER; MAILLEY, 2008; ZHANG et al., 2006; STACHOWIAK et al., 2006;

MUKHOPADHYAY et al., 2005; CALLEJA et al., 2005; SHU et al., 2005;; HANSEN et al., 2001), tais sensores de DNA também são denominados genossensores (PIVIDORI; MERKOÇI; ALEGRET, 2000).

3.4. Funcionalização e Imobilização de biomoléculas em superfícies

Os processos de funcionalização e imobilização de biomoléculas consistem em etapas cruciais para a construção dos sensores de AFM, dentre eles os nanomecânicos de cantilever. A funcionalização trata-se da modificação química de uma determinada superfície com a utilização de moléculas orgânicas com o intuito de controlar ou modificar as propriedades desta superfície, tais como rugosidade (LAPSHIN et al., 2010), hidrofobicidade (ALEKHIN et al., 2010), carga superficial (BERTAZZO; REZWAN, 2010), energia de superfície, biocompatibilidade (BERTAZZO et al., 2009) e reatividade (LONDON et al., 2013; MCCREERY; BERGREN, 2012). Já o processo de imobilização é baseado na ligação de biomoléculas a superfícies por meio da interação dos grupos químicos disponíveis de ambas (BHUSHAN et al., 2005; WAGNER, 1998). Desse modo, de acordo com o sistema de detecção escolhido é construída a camada sensora, baseada nos processos de funcionalização e imobilização de biomoléculas em superfícies, dentre as quais incluem proteínas, enzimas, anticorpos, DNA, RNA, entre outros (RODRIGUES et al., 2017). Na Figura 9, é apresentado um modelo representativo das etapas de funcionalização e imobilização de biomoléculas em superfície, ambas caracterizadas pelas interações moleculares dos grupos químicos disponíveis no sistema.



Fonte: Do autor, 2018.

Figura 9. Modelos representativos dos processos de funcionalização e imobilização de biomoléculas em superfície. (A) Sistema Antígeno-Anticorpo; (B) Sistema Enzima-Proteína; (C) Sistema de oligonucleotídeos (DNA-complementar).

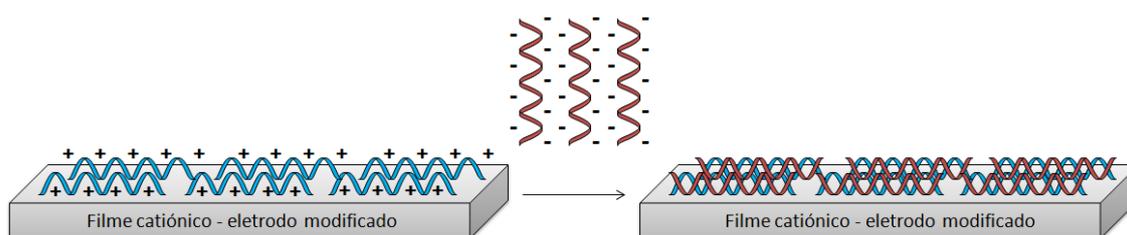
3.4.1. Estratégias de Imobilização de DNA em superfícies

A imobilização de DNA pode ser realizada em diversas superfícies, tais como: materiais carbonados (grafite, grafeno e nanotubos de carbono); superfícies de ouro, sílica e silício (XIAONING; HONGMEI, 2014). No que diz respeito aos sensores de DNA, a construção da camada sensora está intimamente relacionada com a definição do método de imobilização de DNA para efetividade do genossensor, a fim de que o reconhecimento do alvo de DNA complementar ocorra através da hibridização (XU et al., 2015). A escolha de um bom método de imobilização promove uma boa orientação da sonda de DNA imobilizada e, conseqüentemente alta reatividade e para hibridização com o alvo (ULIANAS et al., 2012). Dentre as técnicas de imobilização de DNA empregadas em sensores destacam-se as metodologias baseadas em adsorção, ligação covalente e interação avidina-biotina (RASHID; YUSOF, 2017).

3.4.1.1. Imobilização de DNA em superfícies por adsorção

Trata-se do procedimento mais simples de imobilização de DNA, uma vez que não depende de reagentes para modificação química da superfície de trabalho, e não

requer modificação na sonda de DNA (PIVIDORI; MERKOÇI; ALEGRET, 2000). As sondas de DNA são imobilizadas na superfície de trabalho através da adsorção eletrostática entre grupos fosfato de carga negativa presentes nas moléculas de DNA sobre superfícies carregadas positivamente, como exposto na Figura 10 (RASHID; YUSOF, 2017). Trabalhos de Oliveira et al. (2015) e Velusamy et al. (2011) demonstram que de acordo com a aplicação de um potencial eletroquímico positivo, a imobilização de sondas de DNA pode ser melhorada e estabilizada (OLIVEIRA et al., 2015; VELUSAMY et al., 2011).



Fonte: Do autor, 2018.

Figura 10. Modelo representativo do processo de imobilização de moléculas de DNA por adsorção eletrostática.

Entretanto, mesmo com as vantagens de tal técnica apresentar menos complexidade e uso mínimo de reagentes químicos, existem algumas limitações, como a orientação aleatória das moléculas de DNA, que podem influenciar a eficiência da hibridação. Além disso, as moléculas de DNA podem ficar suscetíveis ao risco de dessorção ou desprendimento das moléculas de DNA por influência de pH, força iônica e temperatura (RASHID; YUSOF, 2017).

3.4.1.2. Imobilização de DNA em superfícies por ligação covalente

Na técnica de imobilização de DNA por ligação covalente, a sonda de DNA é modificada quimicamente pela adição de um grupo de tióis (SH) ou aminas (NH₂) em uma de suas extremidades 3' ou 5', a fim de que ocorra covalentemente sua ligação à superfície metálica ou ao grupo funcional específico aplicado na superfície de trabalho (Figura 11) (RASHID; YUSOF, 2017).

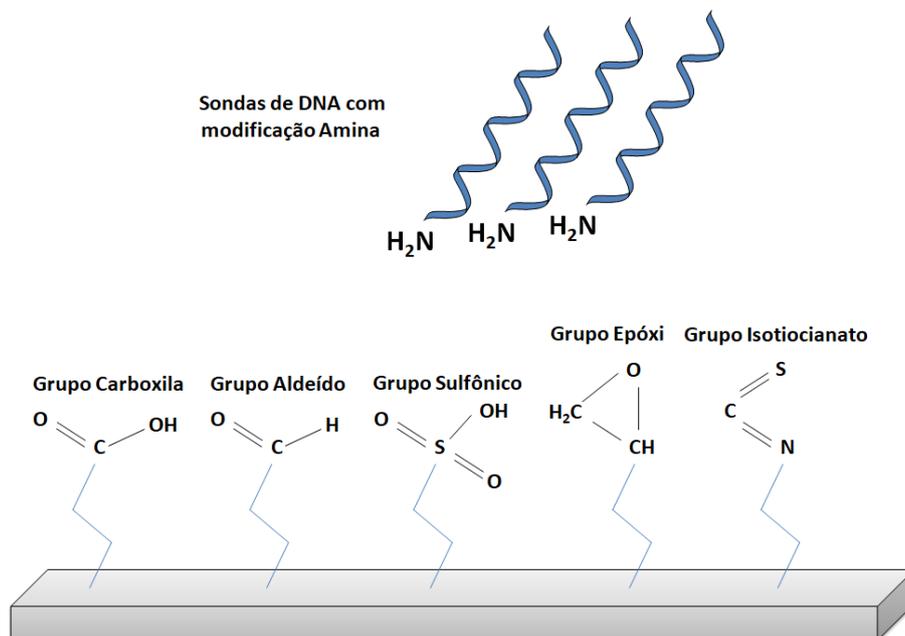


Figura 11. Modelo representativo do processo de imobilização de moléculas de DNA por ligação covalente. Adaptado de RASHID et al., 2017.

Diversos trabalhos expostos na literatura científica relatam o uso de sondas de DNA com terminação NH_2 para imobilização covalente com os vários grupos funcionais na superfície de trabalho modificada, dentre os quais foram representados na Figura 11 (RASHID; YUSOF, 2017). Os reagentes de carbodiimida (*N*-hidroxissuccinimida (NHS) e *1*-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)) são utilizados principalmente na ligação covalente entre o grupo carboxila e a sonda de DNA com modificação amina (NH_2) para ativação do grupo carboxila em O^- que pode se ligar facilmente ao grupo NH_2 (MALECKA et al., 2014; ZHANG et al., 2013; SASSOLAS; LECA-BOUVIER; BLUM, 2008).

Os métodos de imobilização covalente de DNA entre sondas de DNA com modificação tiol e superfície de ouro (Au) também são amplamente aplicados, uma vez que, forma uma monocamada automontável (SAM, do inglês *self-assembled monolayers*) de sondas de DNA na superfície do eletrodo devido à uma forte interação de afinidade entre o grupo tiol (SH) e a superfície do ouro (Au), formando a ligação covalente ouro- enxofre (Au-S) Figura 12 (RASHID; YUSOF, 2017; SASSOLAS; LECA-BOUVIER; BLUM, 2008).

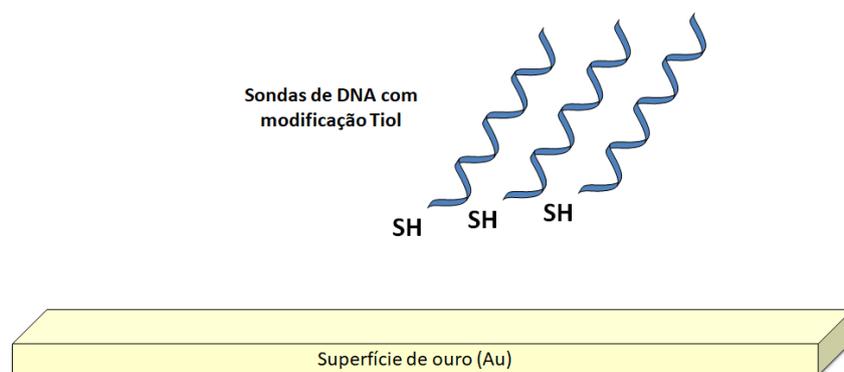


Figura 12. Modelo representativo do processo de imobilização de moléculas de DNA por ligação covalente (Au-SH). Adaptado de RASHID et al., 2017.

Visto que, de acordo com a existência da forte afinidade entre grupos funcionais disponíveis na superfície de trabalho e os grupos químicos disponíveis nas extremidades das moléculas de DNA, a técnica de ligação covalente, baseada no processo de construção de monocamadas automontáveis (SAM), proporciona uma boa orientação vertical da sonda de DNA podendo resultar em uma alta eficiência de hibridação de DNA (WANG et al., 2011; LU et al., 2007).

3.4.1.3. Imobilização de DNA em superfícies por interação avidina-biotina

Outra estratégia de imobilização de DNA é através do complexo avidina (ou estreptavidina)-biotina. Esse complexo é caracterizado pela alta afinidade, estabilidade, resistência à temperatura, pH, detergentes desnaturados e solventes orgânicos (PIVIDORI; MERKOÇI; ALEGRET, 2000). Esta técnica pode ser aplicada através da modificação da biotina em uma das extremidades 3' ou 5' da molécula de DNA e posterior apresentação de tais moléculas à superfície de trabalho modificada com avidina/estreptavidina (Figura 13).

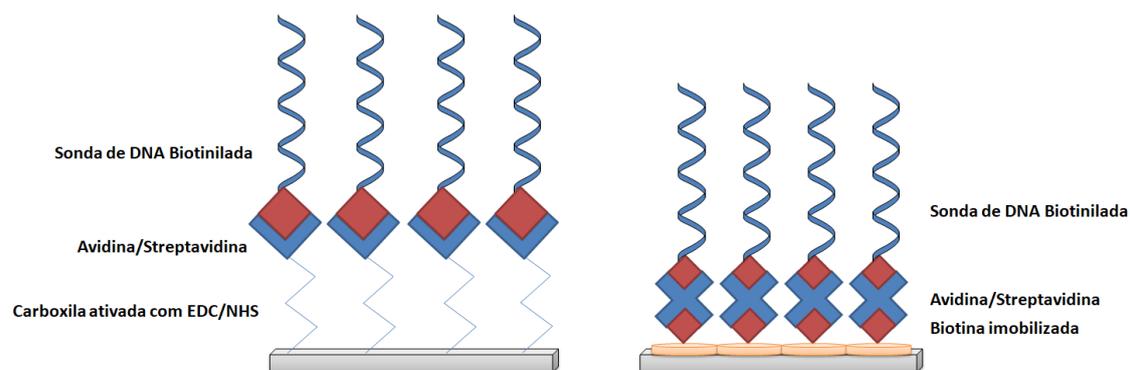


Figura 13. Modelo representativo do processo de imobilização de moléculas de DNA por interação avidina-biotina. Adaptado de RASHID et al., 2017.

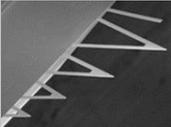
A metodologia de imobilização mais comum utilizado é a reação de acoplamento EDC / NHS entre o grupo carboxila ativado e a avidina/estreptavidina como descrito em trabalhos anteriores (RASHID; YUSOF, 2017). Outros estudos empregam a construção de um “sanduíche” de biotina/avidina (estreptavidina)/biotina (CALVO-MUÑOZ et al., 2005; DUPONT-FILLIARD et al., 2004). Na aplicação dessa estratégia, a molécula de biotina é primeiramente imobilizada sobre uma superfície de trabalho para preparar a camada de avidina e promover a imobilização da sonda de DNA biotilada (Figura 13). Desse modo, a camada de avidina atua como uma "ponte" entre a superfície modificada com biotina e sondas de DNA biotiladas.

4. SEÇÃO EXPERIMENTAL

4.1. Materiais

Para o desenvolvimento do projeto proposto foram utilizados os materiais catalogados na Tabela 2.

Tabela 2. Materiais de consumo e equipamentos utilizados neste projeto.

	Descrição	Empresa	Imagem
Microscópio de Força Atômica	Modelo – Solver Nano	NT-MDT®	
UV/Ozone ProCleaner™ Plus		BioForce Nanosciences®	
<i>Cantilever</i> ou microalavancas de AFM	Composição: Nitreto de silício, com uma das faces revestida com ouro; Modelo – MLCT-OW Microalavanca B retangular: f: 10-20 Hz k: 0,02N/m Comprimento: 210µm; Largura: 20µm.	Bruker®	
Dissecador de vidro			
APTES	3-Aminopropyl)triethoxysilane	Sigma Aldrich®	
Trietilamina	Triethylamine	Sigma Aldrich®	
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)	Sigma Aldrich®	
NHS	N-Hydroxysuccinimide	Sigma Aldrich®	
PBS	Phosphate buffered saline tablet	Sigma Aldrich®	
Biotina	Biotin	Sigma Aldrich®	
Estreptavidina	Streptavidin	Sigma Aldrich®	
Álcool	Ethyl alcohol, pure	Sigma Aldrich®	
Acetona	Acetona PA ACS (CH ₃) ₂ CO	Quemis®	
Mica	Muscovite Mica	Sigma Aldrich®	

4.1.1. Obtenção das amostras de miRNA

As sequências de miR-203 e miR-205, bem como suas sequências complementares com modificação carboxila, foram sintetizadas pelas empresas IDT e FastBio (especificações descritas na Tabela 3).

Tabela 3. Especificações das amostras de miRNAs obtidas.

	Sequência	Empresa
miR-203	5'-GTGAAATGTTTAGGACCACTAG-3'	IDT/FastBio
miR-203 complementar 1	COOH-5'-CTAGTGGTCCTAAACATTTTCAC-3'	FastBio
miR-205	5'-TCCTTCATTCCACCGGAGTCTG-3'	IDT/FastBio
miR-205 complementar 1	COOH-5'-CAGACTCCGGTGAATGAAGGA-3'	FastBio

As amostras de miR-203 e miR-205 e suas fitas complementares, uma vez diluídas em PBS à 1 μ M, foram mantidas na mesma solução tampão a -20°C. As amostras com modificações carboxila na extremidade 5' (fitas complementares dos miR-203 e miR-205) foram produzidas pelas empresas IDT e FastBio fornecidas em colaboração com o Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do Hospital de Câncer de Barretos (HCB) através do Prof^o. Matias Eliseo Melendez (co-orientador deste trabalho) e o Grupo de Pesquisa em Nanoneurobiofísica, coordenado pelo Prof^o. Fabio de Lima Leite, orientador deste trabalho.

4.2. Metodologias empregadas

4.2.1. Funcionalização da superfície das microalavancas

O processo de funcionalização trata-se da modificação química da superfície da microalavanca com o objetivo de garantir o acoplamento de biomoléculas para que as superfícies sejam submetidas a interações. Neste trabalho a metodologia de funcionalização das microalavancas de AFM foi fundamentada no protocolo já utilizado em outros trabalhos (RODRIGUES et al., 2017; BUENO, C. C., et al., 2014; DA SILVA, A. C. N. et al., 2014), sendo adequada aos grupos funcionais disponíveis.

Inicialmente os materiais utilizados (placa de Petri, microalavancas e tampas de *epENDORF*®) foram previamente esterilizados em luz UV e ozônio no *ProCleaner*TM

durante 20 min. Além disso, o dissecador de vidro foi submetido ao fluxo de nitrogênio durante 10 min para manter o ambiente inerte. Posteriormente, os *cantilevers* a serem funcionalizados foram depositadas na placa de Petri com o lado superior disponível, juntamente com uma tampade *ependorf*® com 40 µL de APTES (para a silanização) e outra com 40µL de Trietilamina (para manter o pH) e colocadas no dissecador de vidro que permanecia fechado isento de fluxo por 45min (Figura 14).



Fonte: Do autor, 2018.

Figura 14. Procedimento de funcionalização. (A) Material preparado para esterilização (placa de Petri, microalavancas e tampas de *ependorf*®); (B) Material levado ao UV e ozônio para esterilização no *ProCleaner*TM; (C) Esterilização durante 20min; (D) Dissecador de vidro submetido ao fluxo de nitrogênio durante 10min; (E) 40µL de APTES e 40µL de Trietilamina foram adicionados em suas respectivas tampas de *ependorf*® e todo material foi inserido no dissecador de vidro; (F) Para completar o procedimento de funcionalização o material se manteve durante 45min no dissecador.

Dessa forma, o processo de funcionalização foi realizado a partir da vaporização do reagente APTES (*3-Aminopropyltriethoxysilane*), que se liga à superfície da alavanca, previamente esterilizada em luz UV e ozônio no *ProCleaner*TM da

BioforceNanoscience, para a silanização da superfície (Figura 15). Conforme a silanização foram expostos radicais amina, para a ligação covalente entre o APTES e a carboxila das biomoléculas que serão imobilizadas na superfície de nitreto de silício.

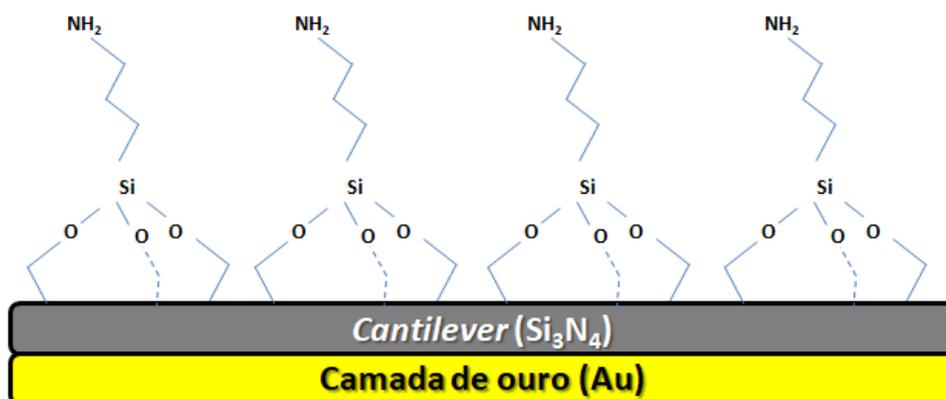


Figura 15. Modelo representativo do processo de funcionalização de moléculas de APTES na superfície microalavanca composta de nitreto de silício (Si₃N₄) e uma camada de ouro (Au).

4.2.2. Imobilização das fitas complementares

O processo de imobilização trata-se da etapa de acoplamento das biomoléculas a uma superfície, neste caso, a superfície das microalavancas. Nesse trabalho a técnica de imobilização empregada foi baseada na funcionalização prévia da microalavanca com APTES e interação molecular com as fitas complementares dos marcadores miR-203 e miR-205 que detinham modificação COOH na extremidade 5' (Figura 16). As soluções das fitas complementares que foram diluídas em solução tampão, também chamadas de sondas de miRNA, foram preparadas à uma concentração de 1µM, contendo uma solução de EDC 2 mM e NHS 5 mM para ativação do grupo carboxila presente na extremidade 5' das sondas (TEH et al., 2005).

No que diz respeito à técnica de imobilização têm-se que as microalavancas previamente funcionalizadas possuem radicais amina livres, portanto, foram utilizadas fitas complementares dos marcadores miRNA-203 e miRNA-205 com modificação carboxila na extremidade 5'. A ligação covalente entre os radicais amina livre das microalavancas funcionalizadas e o radical carboxila das fitas sintetizadas garante o

acoplamento das fitas complementares dos marcadores miRNA-203 e miRNA-205 na superfície das microalavancas, sendo realizado o processo de imobilização.

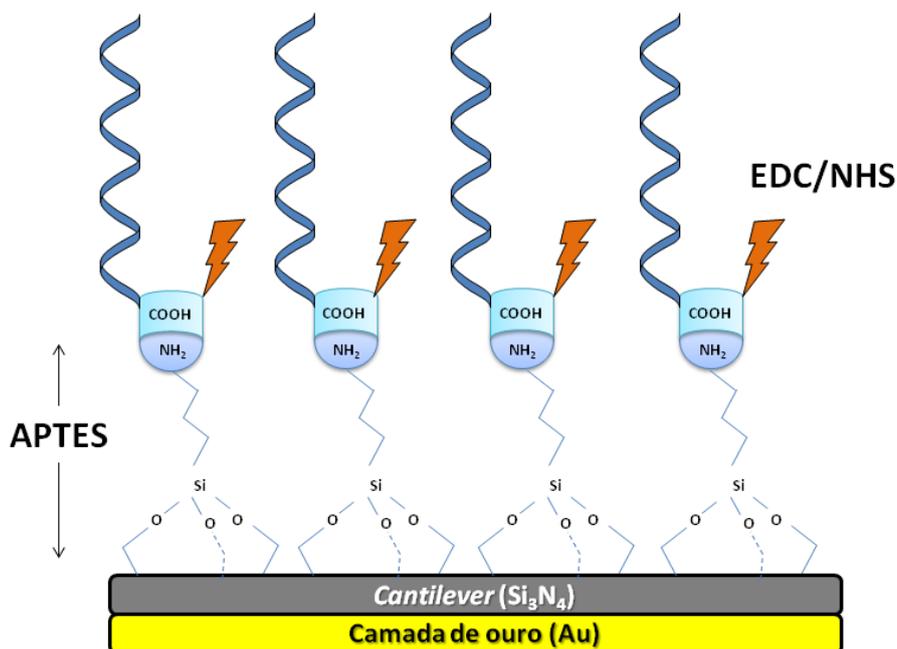


Figura 16. Modelo representativo do processo de imobilização das moléculas das fitas complementares (cDNA) na superfície de nitreto de silício previamente funcionalizada com APTES.

Nesse procedimento as microalavancas, após o processo de funcionalização com APTES foram retiradas do dissecador de vidro, transferidas com ajuda de uma pinça para outras tampas de *ependorf*® vazias e, em outra placa de Petri, previamente esterilizadas no *ProCleaner*TM durante 20 min. Em seguida foram imersas em solução de 1µM miRNA durante 24h. Posteriormente foram lavadas com água Mili-Q e secas em temperatura ambiente de 37°C (Figura 17). Logo após a imobilização eram efetuados os testes de interação, um teste por microalavanca, que, após a análise, ficavam armazenadas em PBS à 4°C.



Fonte: Do autor, 2017.

Figura 17. Procedimento de imobilização das microalavancas previamente funcionalizadas com APTES. (A) As microalavancas foram retiradas do dissecador de vidro e foram inseridas em outras tampas de *ependorf*® vazias e outra placa de Petri, previamente esterilizadas representadas em B. (B) A solução de miRNA à 1 μ M foi inserida em cada tampa de *ependorf*® e permaneceu durante 24 h. Após a lavagem com água Mili-Q as microalavancas foram submetidas a secagem em temperatura ambiente.

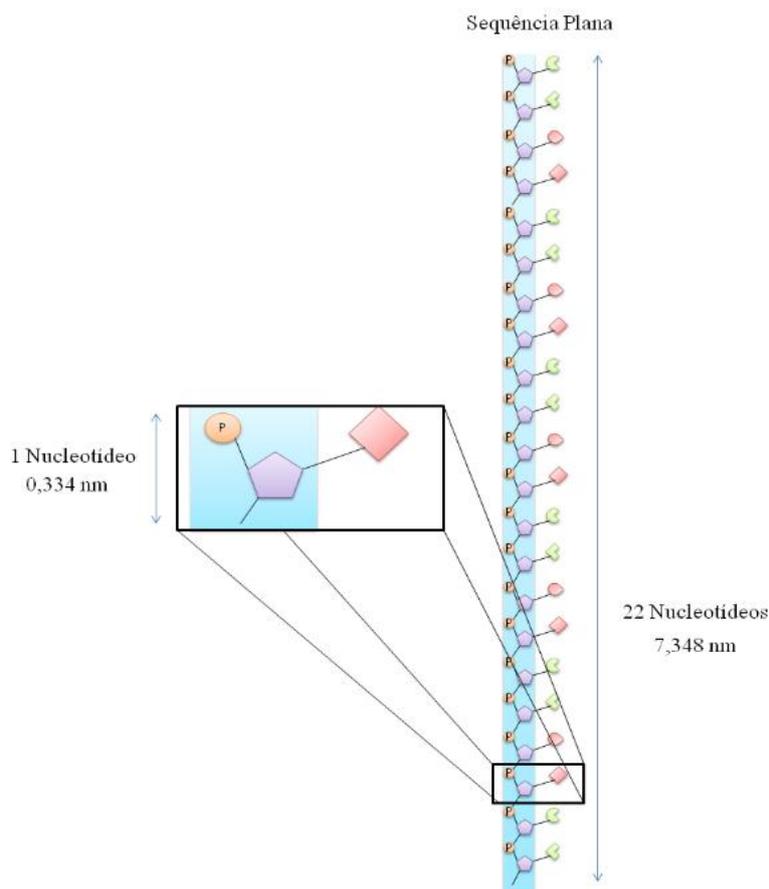
4.2.3. Soluções de trabalho para análises de interação

Com base em trabalhos previamente descritos na literatura, para os testes de interação as sequências de miR-203 e miR-205 foram preparadas e diluídas em água Mili-Q nas seguintes concentrações: 100, 120, 140 e 160 nM (DUFFY, et al., 2018; MISHRA & HEGNER, 2014; HUBER et al., 2006; ZHANG et al., 2006; MCKENDRY et al., 2002).

4.2.4. Caracterização das superfícies

4.2.4.1. Estudo da molécula de DNA

Com base nas dimensões do DNA, um nucleotídeo em média possui 3,34 Å de comprimento, o que corresponde a 0,334 nm (MANDELKERN et al., 1981). Dessa forma, pode-se calcular o comprimento das fitas complementares aos miRNA alvos miR-203 e miR-205, uma vez que ambas possuem 22 nucleotídeos, medindo, portanto 7,348 nm (Figura 18). Contudo, tais dimensões são reais apenas em solução aquosa, que mantém a amostra em seu estado fisiológico, o que garante sua conformação para hibridização (LIU et al., 2005).



Fonte: Do autor, 2018.

Figura 18. Dimensões das fitas complementares aos alvos utilizados (miR-203 e miR-205) com base nas dimensões do DNA.

CHIORCEA PAQUIM et al., realizou uma análise de imobilização de oligonucleotídeos em meio líquido e em ar. Em ambos os tratamentos constatou-se a imobilização de DNA, os resultados apresentados evidenciam que houve apenas 0,48nm de diferença entre a altura do DNA nos diferentes tratamentos (CHIORCEA PAQUIM et al., 2004). Além disso, os dois métodos de caracterização de DNA, em ar e em solução, são aplicados em níveis nanométricos com diferentes técnicas (“DNA Nanostructure as Smart Carriers for Drug Delivery - Springer”, [s.d.]).

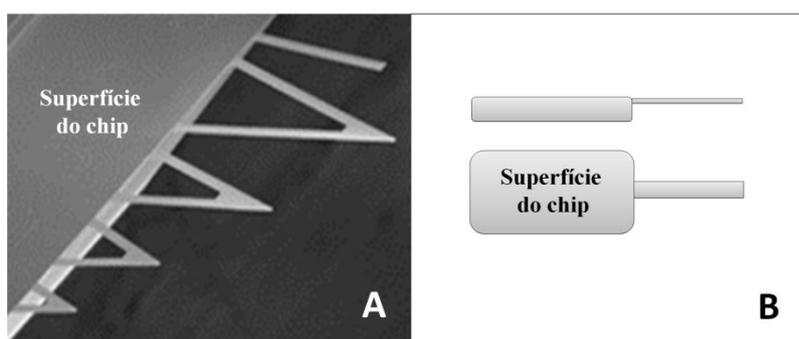
Desse modo, as superfícies foram secas e, posteriormente, submetidas às análises por AFM e Microscopia de Fluorescência a fim de averiguar o protocolo de imobilização construído, que detém a etapa de secagem, inserida com base em trabalhos

anteriores (ARROYO-HERNÁNDEZ; TAMAYO; COSTA-KRÄMER, 2009; MERTENS et al., [s.d.]; RAMOS et al., 2009).

4.2.4.2. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A caracterização por AFM foi utilizada para a verificação da homogeneidade da superfície da alavanca funcionalizada, antes e depois do processo de imobilização. Isso faz com que seja possível obter informações sobre a rugosidade da superfície, que compromete a eficiência do genossensor. Quanto mais homogêneo estiver o reagente (APTES) na superfície, ou mais homogênea for a superfície limpa da microalavanca, as fitas complementares de microRNAs ficam dispostas de maneira mais organizada, aumentando a eficiência da resposta do biossensor.

No processo de funcionalização e imobilização descrito nos itens anteriores, não apenas as microalavancas ficam cobertas pelos reagentes ou biomoléculas, mas também todo o corpo do chip que dá suporte a elas (Figura 19). Desta maneira, o chip que a princípio seria usado apenas para uma medida de sensoriamento por microalavanca, pode ser reutilizado para realização das imagens de AFM. A superfície destes chips tem área de aproximadamente 6 mm, o que é suficiente para o estudo das superfícies funcionalizadas e imobilizadas por AFM.



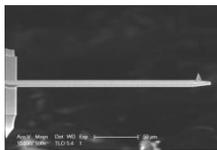
Fonte: Adaptado de Bruker®, 2017.

Figura 19. Chip que dá suporte às microalavancas de AFM. (A) Imagem do fabricante; (B) Esquema representativo do chip com microalavanca retangular vista de lado e de cima.

As análises de caracterização por imagens de AFM foram realizadas na superfície dos chips em que estão inseridas as microalavancas de AFM, após terem sido

preparados pelo processo de funcionalização e imobilização (tópicos 4.2.1 e 4.2.2), foram secos em fluxo de nitrogênio durante 30 minutos e analisados no modo *tapping* ou contato intermitente (AFM – NT-MDT Solver Nano), com áreas de varredura de 20 à $1\mu\text{m}^2$ (Tabela 4), foram analisados 8 chips em cada etapa. As análises de rugosidade de superfície foram realizadas utilizando o software *Gwyddion 2.37 SPM Data analysis*. (ARROYO-HERNÁNDEZ; TAMAYO; COSTA-KRÄMER, 2009; MERTENS et al., [s.d.]; RAMOS et al., 2009).

Tabela 4. Tabela com os parâmetros utilizados para caracterização por imagem de AFM.

Parâmetros	
Modo de operação AFM	<i>TappingMode®</i> / Contato intermitente
	Modelo AN-NSG03 (<i>Bruker®</i>)
	Material: Si, N-type, 0,01 – 0,025 ohm/cm
Cantilever utilizado para as imagens de AFM	Cantilever/microalavanca: Comprimento - 135 μm ; Largura - 30 μm ; Espessura – 1,5 μm Raio da ponta < 10nm, f: 90kHz e K: 1,7N/m-
	
Áreas de varredura	De 20 a 1 μm^2

4.2.4.2. Microscopia de Fluorescência (MF)

Para realização da microscopia de fluorescência, foi utilizado o fluoróforo DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole* - Thermo Fisher Scientific®), cuja reação primária com os nucleotídeos timina (T) forma um subproduto fluorescente, o qual emite luz na faixa do azul. Nos ensaios de conjugação, os *cantilevers* previamente imobilizados com as fitas complementares de miR-205 foram imersos em solução de DAPI previamente preparada na concentração de 300 nM em PBS utilizando uma solução estoque de 5 mg/mL.

Após 5 minutos de conjugação, os *cantilevers* foram submetidos à lavagem com PBS e imediatamente analisados em microscopia de fluorescência convencional Leica DM 4000b acoplada em sistema de digitalização de imagens pela câmera Leica DFC310 FX. Com o intuito de confirmar a imobilização das fitas complementares na superfície dos *cantilevers*, o equipamento foi previamente calibrado para selecionar automaticamente o respectivo filtro de fluorescência de acordo com o comprimento de

onda do DAPI a partir do *software* do sistema Leica FIM (*Fluorescence Intensity Manager*).

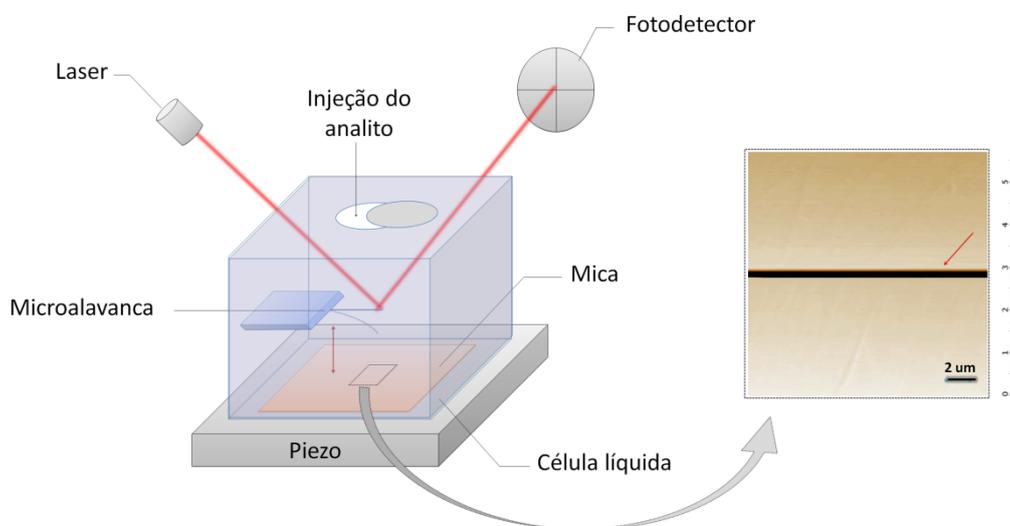
Para comparação também foram submetidos à análise de MF *cantilevers* que não passaram pelos processos de funcionalização e imobilização.

4.2.5. Medidas do Genossensor Nanomecânico de *Cantilever* com base na deflexão das microalavancas de AFM

O modo estático (deflexão óptica) foi escolhido para o Sensor Nanomecânico de *Cantilever* a fim de avaliar somente a interação intermolecular entre as fitas complementares e de miRNA, (MISHRA; HEGNER, 2014; ZHANG et al., 2006).

Para padronização do sistema de detecção, utilizou-se o sistema de reconhecimento biotina-estreptavidina, o qual é utilizado como modelo pela comunidade científica (DUNDAS; DEMONTE; PARK, 2013). Dessa forma, as microalavancas de AFM foram funcionalizadas por vaporização de APTES, como descrito anteriormente e imobilizadas com biotina (1mM) por imersão durante 2h.

A análise de deflexão foi realizada durante 40min de acordo com a varredura da microalavanca de AFM sobre a superfície da mica em modo não contato, a uma distância de 1 mm, sendo a área de varredura de $20\mu\text{m}^2$ (Figura 20).



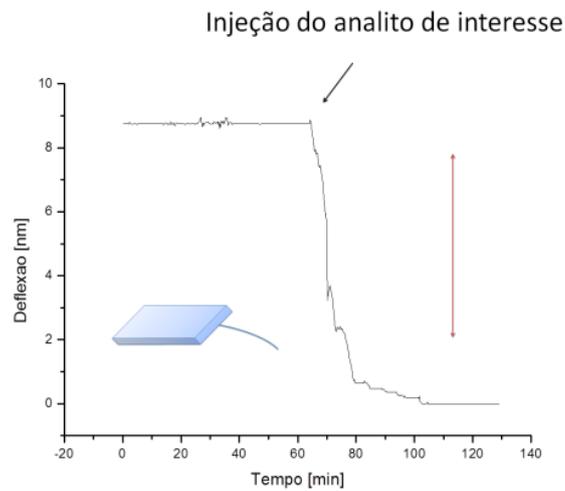
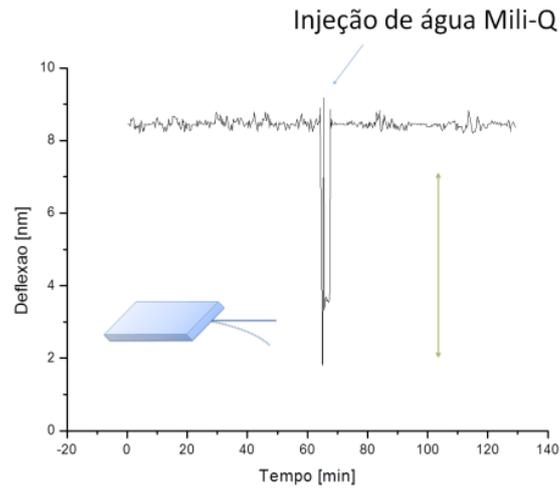
Fonte: Do autor, 2017.

Figura 20. Sistema de medida de deflexão baseado na varredura da microalavanca de AFM em modo não contato. A flecha vermelha dentro da célula líquida representa a distância entre a mica e a microalavanca.

A flecha na imagem de AFM à direita representa a perturbação no sistema durante a varredura proveniente da injeção de uma solução. A altura na imagem de AFM está representada de 0 à 5 μm .

Durante a varredura é obtida uma imagem de AFM da superfície da mica que muda sua altura, de acordo com as perturbações ocasionadas no sistema, representada pela seta vermelha (Figura 20).

A deflexão das microalavancas está diretamente relacionada às perturbações no sistema, oriundas das injeções de 1mL das soluções de trabalho: água Mili-Q e a solução do analito de interesse (estreptavidina à 2,85 nM, no caso do sistema de padronização). A diferença entre as deflexões é determinada pela concentração e conteúdo da solução, se essa apresenta ou não o analito de interesse. Uma vez injetada água Mili-Q, através da agitação da solução no sistema ocorre uma deflexão reversível da microalavanca. Já quando é injetada a solução do analito de interesse, ocorre a deflexão não reversível, que se mantém ao longo do tempo, uma vez que através da interação intermolecular houve uma tensão superficial na microalavanca funcionalizada (Figura 21).



Fonte: Do autor, 2017.

Figura 21. Imagens representativas de perturbação do sistema, que geram deflexão reversível (seta verde) e deflexão irreversível (seta vermelha).

Após a medida de análise da deflexão da microalavanca, as imagens obtidas são tratadas no programa *Gwiddion SPM Data Analysis 2.37*®, em que é traçado um perfil de altura em cada imagem para a obtenção dos gráficos de deflexão.

Com base nesse mecanismo foram realizadas as análises com miRNAs, o que difere é a utilização do sistema de aquecimento durante o testes, que será descrito no item 4.2.5.2.

4.2.5.1. Tratamento de dados

Após a obtenção dos perfis de altura de cada imagem, para a construção dos dados gráficos de deflexão por tempo, cada perfil é tratado no programa Origin 6.0, levando em conta as médias das medidas realizadas em duplicata.

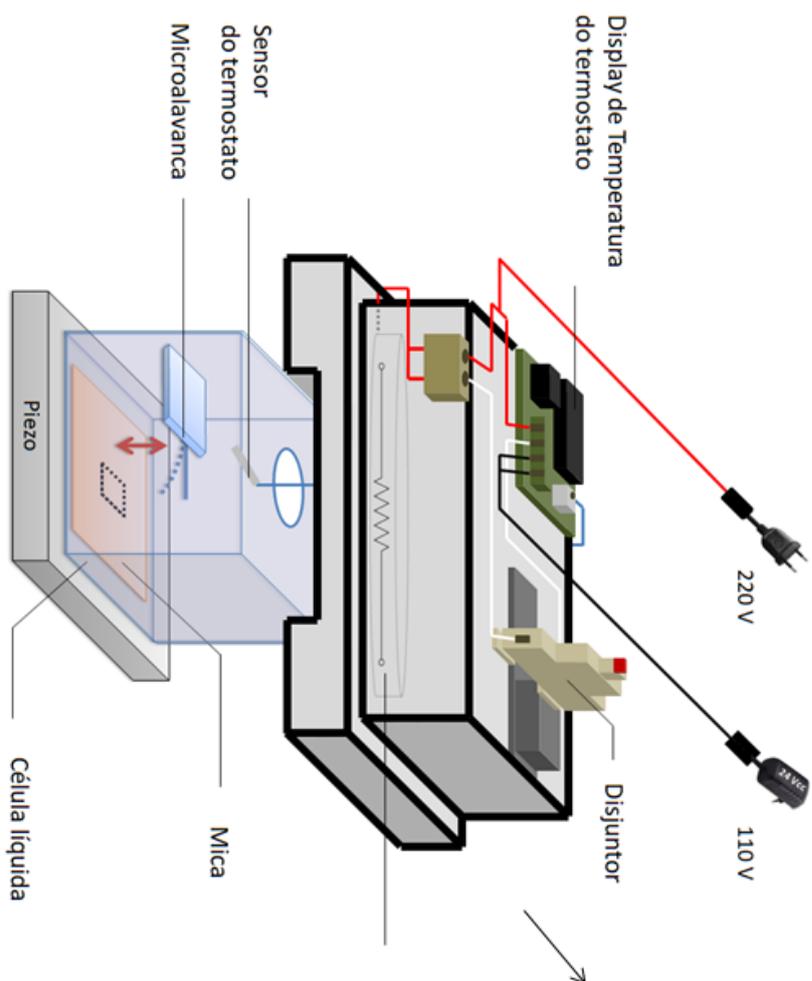
4.2.5.2. Medidas com sistema de aquecimento

Durante as análises de deflexão foi adicionado um sistema de aquecimento, a fim de que a temperatura fosse controlada, tanto para minimizar os ruídos no sistema de detecção, quanto para propiciar o anelamento e reconhecimento das fitas de DNA, processo dependente de aquecimento. Desse modo, foi acoplado ao AFM um sistema de aquecimento composto por um termostato eletrônico *on-off*, no qual pode ser programado uma temperatura de controle por meio de uma resistência elétrica de aquecimento.

Inicialmente o sistema de aquecimento foi ligado fora do contato com o AFM a fim de que se atingisse o controle térmico de 37°C. Após a preparação do AFM para o início da medida foi acoplado o sistema de aquecimento, como exposto na Figura 22. Em seguida, foi verificada uma possível oscilação no aquecimento da resistência e, após a estabilização foi iniciada à medida de interação.

A

Sistema de Aquecimento



B

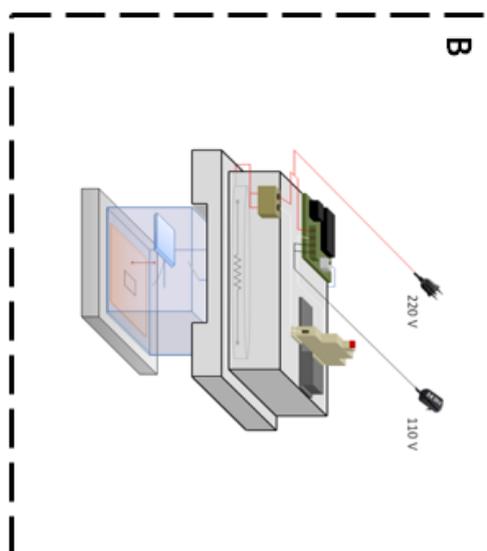


Figura 22. Representação esquemática do sistema de aquecimento utilizado para controle de temperatura acoplado ao AFM durante as medições do sensor.

O sistema de aquecimento era retirado do AFM apenas para injeção da solução com as moléculas de miRNA-alvo, como exposto na Figura 23. E imediatamente reposicionado para continuidade da análise.

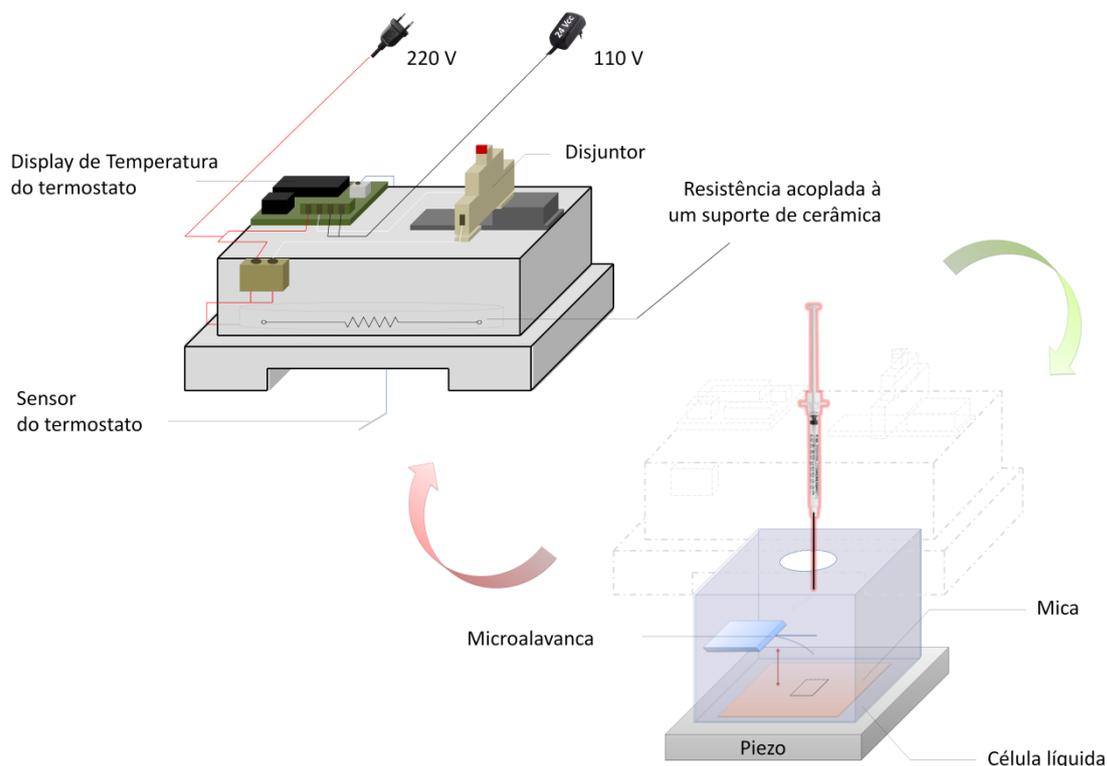


Figura 23. Representação esquemática do sistema de aquecimento utilizado para controle de temperatura acoplado ao AFM durante a injeção das soluções alvo do sensor. A seta vermelha indica o momento em que o sistema é desacoplado do AFM e a seta verde indica o período pós injeção, em que o sistema de aquecimento é reacoplado ao AFM.

Tal sistema foi utilizado para todas as análises: controle (microalavanca limpa), controle (microalavanca com APTES) e as análises de interação com os microRNAs-alvo (miR-203 e miR-205).

5. Resultados e Discussão

5.1. Protocolo de imobilização das fitas complementares

Com base na literatura foram investigados os parâmetros adequados e os métodos frequentemente utilizados para construção do protocolo de imobilização de DNA em superfícies. As superfícies selecionadas para imobilização são as que compõem o chip o qual acopla as microalavancas de AFM: ouro e nitreto de silício, comumente utilizadas pelo Grupo de Pesquisa em Nanoneurobiofísica (BUENO, C. C., et al., 2014; DA SILVA, A. C. N. et al., 2014).

De acordo com as superfícies selecionadas, com os métodos anteriormente aplicados e com os materiais previamente disponíveis, foi construído, fundamentado na literatura, um protocolo de funcionalização e imobilização de DNA (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros utilizados pela comunidade científica para construção do Protocolo de imobilização de DNA (parâmetros utilizados neste trabalho em verde).

Parâmetros	Referência
Concentração das fitas complementares aos alvos miR-203 e miR-205	10 nM (HUBER et al., 2006)
	1 µM (MERTENSA et al., 2011), (ARROYO-HERNÁNDEZ; TAMAYO; COSTA- KRÄMER, 2009)
	2 µM (LECHUGA et al., 2006)
	20 µM (MISHRA; HEGNER, 2014)
	1 mM (MERTENS et al., 2008)
	10 mM (ZHANG et al., 2006)
Solvente das sondas	PBS (MERTENSA et al., 2011)
	TEAA 50 mM (HUBER et al., 2006)
	Hepes / NaOH (TUUKKANEN et al., 2007)
	24,8°C (MERTENS et al., 2008)
Ativação das sondas para imobilização	EDC/NHS (TEH et al., 2005)
Temperatura de trabalho	37°C (ARROYO-HERNÁNDEZ; TAMAYO; COSTA- KRÄMER, 2009)
Tempo de imobilização	30 min (MISHRA; HEGNER, 2014)
	48 h (MERTENSA et al., 2011)
	24 h (ARROYO-HERNÁNDEZ; TAMAYO; COSTA- KRÄMER, 2009),

		(MERTENS et al., 2008)
	20h	(RAMOS et al., 2009)
Solução de lavagem	50 mM TEAA	(MISHRA; HEGNER, 2014), (ZHANG et al., 2006), (HUBER et al., 2006)
	PBS e Mili-Q	(MERTENSA et al., 2011), (ARROYO-HERNÁNDEZ; TAMAYO; COSTA-KRÄMER, 2009), (RAMOS et al., 2009)
	Mili-Q	(MERTENS et al., 2008)
Solução de armazenamento pós-imobilização	D-PBS	(MISHRA; HEGNER, 2014)
	5xSSC com 1 M NaCl	(ZHANG et al., 2006)
Período máximo de armazenamento	1 dia à 1 semana	(MISHRA; HEGNER, 2014)
Temperatura de armazenamento	4°C	(MISHRA; HEGNER, 2014)
	4,8°C	(ZHANG et al., 2006)

A partir da construção do protocolo, foram realizados testes de caracterização das superfícies funcionalizadas e imobilizadas para averiguar a eficiência das metodologias empregadas.

5.2. Caracterização da funcionalização da superfície do sensor e da imobilização das fitas complementares

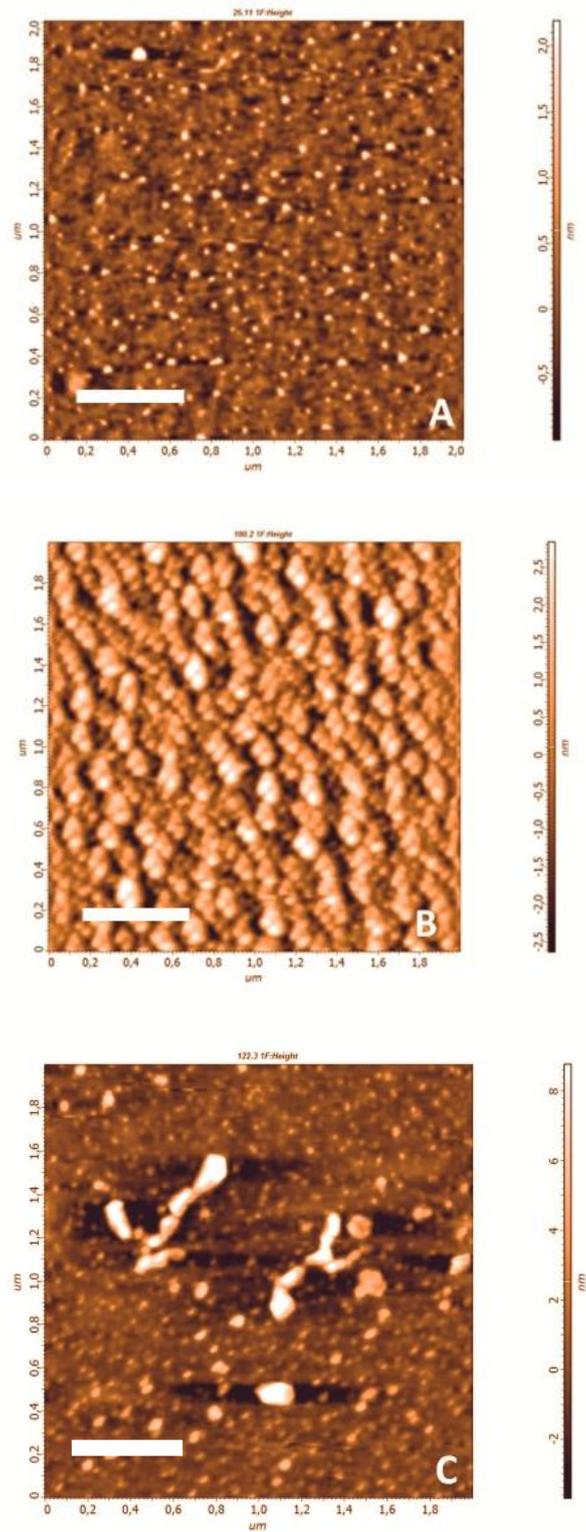
Para a construção do sensor nanomecânico de *cantilever* são necessárias às etapas de funcionalização e imobilização das biomoléculas na superfície. Desse modo, foram realizadas imagens de AFM, bem como análise por Microscopia de Fluorescência para que fosse possível caracterizar as superfícies utilizadas para o desenvolvimento do genossensor. Contudo, antes da análise foi necessário realizar um estudo da molécula a ser imobilizada na superfície, a fim de que fosse possível compreender seu comportamento frente às técnicas de imobilização empregadas.

5.2.1. Imagens de AFM

A partir das imagens de AFM realizadas na superfície de nitreto de silício (chip da superfície de suporte do *cantilever*) foi possível comparar a altura e a rugosidade da

superfície desde o início das etapas de funcionalização por silanização (APTES) e de imobilização das moléculas de cDNA, complementares ao alvo miR-203. Devido ao fato das fitas complementares dos dois alvos (miRNA-203 e miRNA-205) possuírem o mesmo número de nucleotídeos, influenciando na semelhança de altura das fitas em superfície, foi utilizada apenas a fita complementar ao alvo miR-203.

Na Figura 24 podemos observar as imagens topográficas da superfície nos três estágios de obtenção do genosensor: superfície sem funcionalização (A), funcionalizada com APTES (B) e imobilizada com miRNA (C). Os valores de rugosidade média (Rms) apontam que após a funcionalização com APTES a superfície apresentou homogeneidade, uma vez que houve uma diminuição de Rms. Além disso, também foi possível observar o aumento do valor de rugosidade média em C, que pode corroborar com a presença das moléculas de miRNA devido ao fato destas possuírem maior altura de acordo com a literatura (MOISEEV et al., 2006; STEEL et al., 2000).

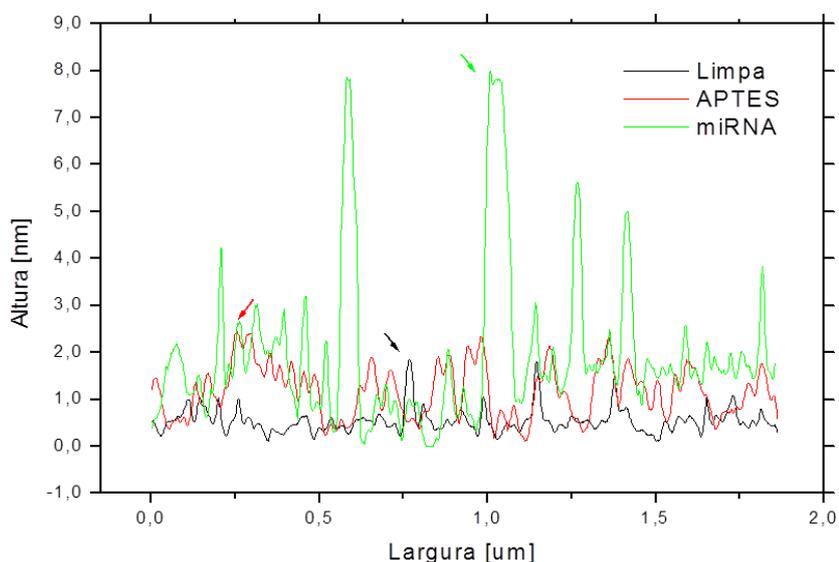


Fonte: Do autor, 2017.

Figura 24. Imagens de AFM da superfície de nitreto de silício no processo de funcionalização e imobilização: (A) Superfície sem funcionalização – Rms = 1,048 nm; (B) Superfície funcionalizada com

APTES – Rms = 0,783 nm; (C) Superfície imobilizada com miRNA – Rms = 2,906 nm., ambas as imagens possuem 2 μ m de altura e largura. Faixa de escala 0,5 μ m.

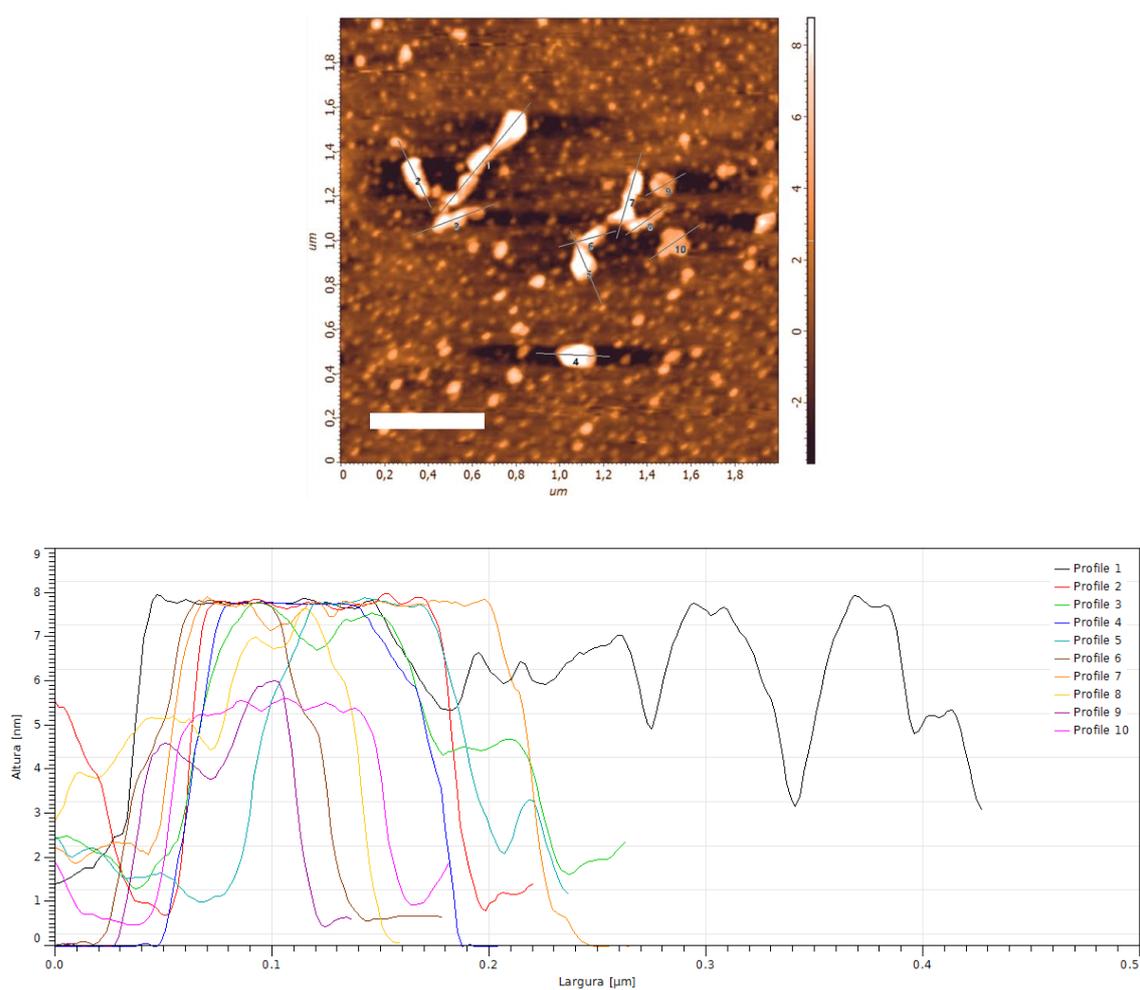
Também foram traçados perfis de altura em ambos os tratamentos da Figura 24, a fim de que fosse possível comparar com mais detalhe a diferença entre as alturas nas etapas de funcionalização e imobilização (Figura 25). De acordo com a Figura 25, é possível observar que, em comparação com a superfície limpa e funcionalizada com APTES, a altura da superfície imobilizada com miRNA é superior na maioria dos picos. Tal fato era esperado por conta da ancoragem das moléculas de miRNA. Também foram comparados os picos mais altos de cada perfil e pode-se observar uma crescente nos valores: Superfície limpa 1,84 < APTES 2,46 < miRNA 7,98 nm., correspondendo à técnica de monocamadas automontáveis, do inglês *self-assembled monolayers* (SAM) (JR et al., 2016; WINK et al., 1997)



Fonte: Do autor, 2017.

Figura 25. Gráfico da diferença das alturas em cada tratamento de funcionalização: superfície sem funcionalização (limpa), com APTES e com as fitas complementares aos alvos (miRNA). O gráfico foi composto pelas diagonais de cada imagem da Figura 24 e as setas indicam os pontos que apresentaram maior altura: Preta = 1,84 nm; Vermelha = 2,46 nm; Verde = 7,98 nm.

Para verificar a imobilização das moléculas de miRNA, foram traçados perfis de altura nos pontos altos da Figura 24 – C (Figura 26). De acordo com o estudo feito da molécula da DNA, foi possível estimar a altura para a molécula de miRNA com base na quantidade e altura do nucleotídeos, citada na literatura. Desse modo, foram avaliados os pontos mais altos da Figura 24 - C a fim de que fosse possível comparar com a altura real obtida da amostra da superfície imobilizada com miRNA com a altura estimada dessa molécula.



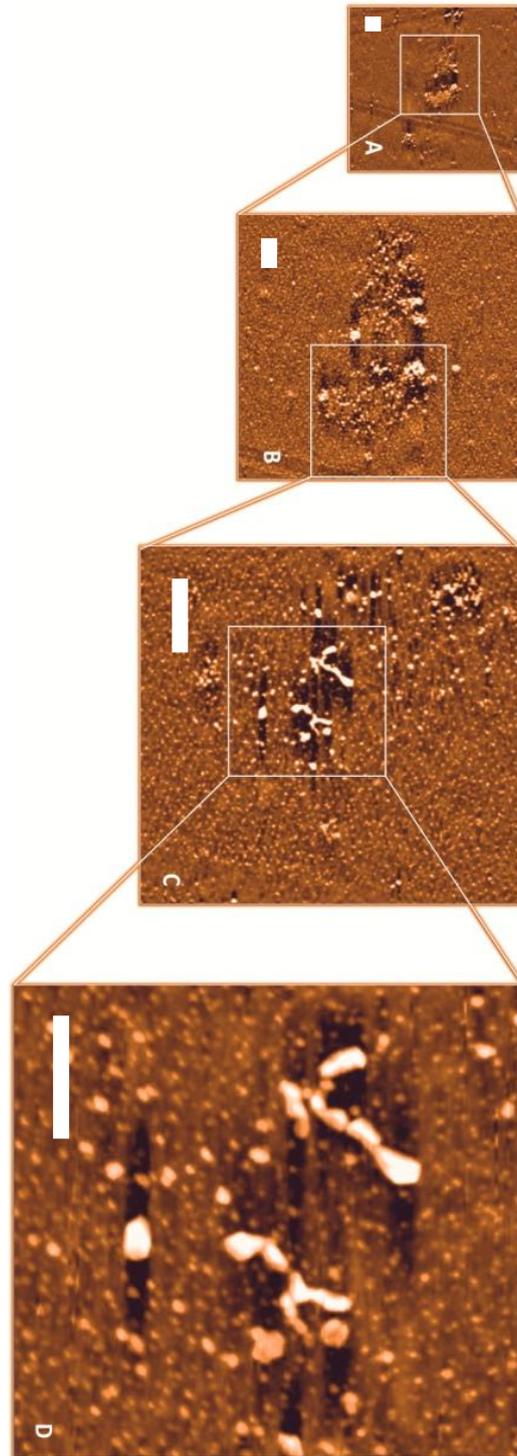
Fonte: Do autor, 2017.

Figura 26. Imagens de AFM da superfície que dá suporte ao cantilevere imobilizada com as fitas complementares ao alvo miRNA (2D) e gráfico dos perfis de altura dos pontos mais altos da imagem 2D. Faixa de escala 0,5 μm .

As alturas obtidas nos diferentes perfis dos pontos mais altos da imagem estão próximas à 8nm, o que indica que provavelmente corresponda à altura das moléculas de miRNA ancoradas apenas pela extremidade 5', que detém modificação carboxila e reage com os grupos amina disponíveis pela molécula de APTES. Comparando com a altura estimada de 7,348 nm, a altura obtida ultrapassa apenas 8,87% da altura estimada. Além disso, dados da literatura, que evidenciam a altura da molécula de DNA imobilizada na vertical próximos à 8 nm corroboram com o resultado de altura obtido e com a posição vertical das moléculas das fitas complementares ao alvo de miRNA, de acordo com análise por fluorescência (MOISEEV et al., 2006; STEEL et al., 2000).

A fim de que dúvidas quanto a ancoragem da molécula de miRNA fossem sanadas, foi encontrado na literatura que uma molécula de DNA, composta pelos mesmo componentes da molécula de miRNA imobilizada, mas ancorada de maneira estendida na superfície possui apenas 2nm, corroborando com os dados de altura obtidos, que apontam para ancoragem do miRNA apenas por uma de suas extremidades (PYNE et al., 2014).

Além disso, para que fosse possível analisar a evolução da análise da superfície imobilizada com miRNA a Figura 27 apresenta imagens de AFM da amostra de menor para maior detalhe (de A à D). Foi possível observar que as moléculas de miRNA se agruparam, este fato pode ter ocorrido em função da compressão do ar ou da concentração utilizada, uma vez que foi descrita a utilização de concentrações em ordem de grandeza de atomolar (aM) (HUSALE; PERSSON; SAHIN, 2009b).

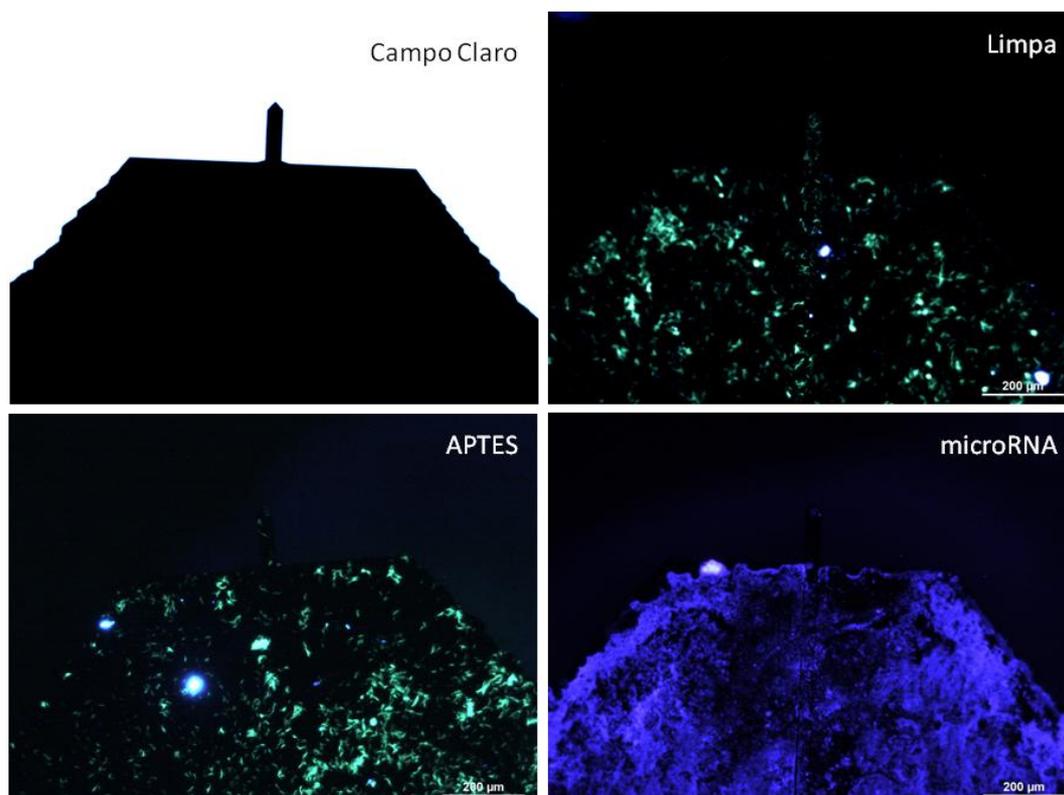


Fonte: Do autor, 2017.

Figura 27. Progressão da análise da superfície imobilizada com miRNA: (A) $20\mu\text{m}^2$; (B) $10\mu\text{m}^2$; (C) $5\mu\text{m}^2$; (D) $2\mu\text{m}^2$. Faixa de escala 0,5 μm .

5.2.2. Microscopia de Fluorescência (MF)

De acordo com a análise por imagens da Microscopia de Fluorescência (MF) foi possível comparar e verificar a eficiência do processo de imobilização das fitas de cDNA correspondentes as moléculas complementares aos marcadores de miRNA. Na Figura 28 podem-se observar as imagens obtidas com MF e campo claro.



Fonte: Do autor, 2017.

Figura 28. Caracterização por imagens de Microscopia de Fluorescência (MF) em ambos os tratamentos, com a superfície limpa, funcionalizada com APTES e imobilizada com cDNA correspondente as moléculas complementares aos marcadores de miRNA.

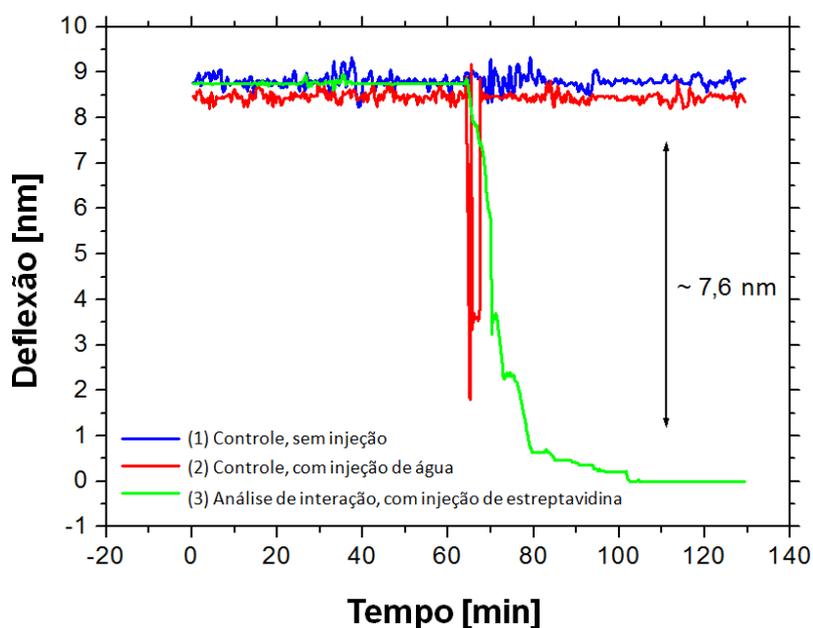
De acordo com diferença de coloração da superfície de ambos os tratamentos correspondentes a todas as etapas de funcionalização e imobilização pôde-se detectar a deposição das moléculas de DNA por toda a cobertura do chip e na extremidade da microalavanca. Nos tratamentos “limpa” e “APTES” pode-se observar a marcação verde, inespecífica para o marcador DAPI, de coloração, perceptível no tratamento “microRNA”. A marcação inespecífica de cor esverdeada presente nos tratamentos “limpa” e “APTES” é devido à reflexão da superfície de silício que compõem o chip.

5.2.3. Padronização do sensor nanomecânico de *cantilever*

5.2.3.1. Controle positivo e negativo: biotina-estreptavidina

As análises preliminares de deflexão foram inicialmente testadas em um sistema padrão de interação molecular: biotina-estreptavidina (DUNDAS; DEMONTE; PARK, 2013). O sistema foi preparado com as microalavancas limpas em duas condições controle: (1) controle, sem a perturbação da injeção e (2) controle, com injeção de água Mili-Q. Além disso, sistema foi preparado com a microalavanca previamente imobilizada com biotina (3) análise de interação, com injeção de estreptavidina.

De acordo com a Figura 29 foi possível observar a deflexão por pequenas vibrações provenientes de ruídos do sistema (linha azul), a deflexão reversível proveniente da perturbação ocasionada pela injeção de água (linha vermelha), e a deflexão irreversível referente à injeção de estreptavidina e, conseqüentemente a interação intermolecular entre biotina-estreptavidina, que gerou uma tensão superficial da microalavanca previamente imobilizada com biotina.



Fonte: Do autor, 2017.

Figura 29. Análise preliminar do sistema de detecção por meio da deflexão das microalavancas de AFM utilizando sistema padrão biotina-estreptavidina.

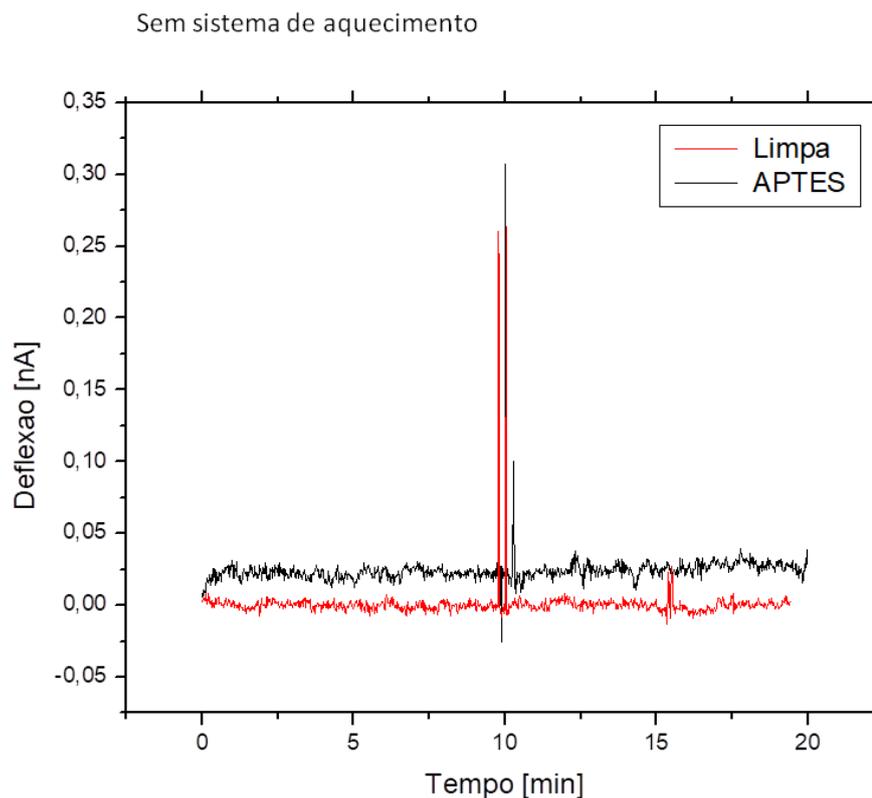
Outros trabalhos já aplicaram sensores nanomecânicos de *cantilever* para esse sistema e, de acordo com a concentração utilizada de 1 à 10 μM , corroboram com o resultado apresentado (SHU; LAUE; SESHIA, 2007; SHEKHAWAT; TARK; DRAVID, 2006; RAITERI et al., 2001). Foi injetada no sistema uma solução de estreptavidina de 2,85nM, gerando um sinal de 7,6nm de deflexão (Figura 29 – linha verde). Shu et al., 2005 utilizou um nível de concentração de estreptavidina de 1 nM e, segundo o autor tal concentração parece estar no limite inferior de detecção, gerando um sinal mínimo detectável de cerca de 5 nm. Desse modo, o resultado de deflexão obtido corresponde a 65% do sinal comparado ao sistema de Shu et al. 2005. Já no estudo de Shekhawat et al. 2006, é apresentado um dado que ao injetar 100 nM de estreptavidina foi obtido um sinal de 50nm. Entretanto, é importante ressaltar que cada sistema possui suas particularidades, além do que a reprodutibilidade é fundamental para consolidar os dados obtidos (RAITERI et al., 2001).

A reprodutibilidade do sensor nanomecânico de AFM vem sendo discutida em função das dificuldades de reprodução do sistema, tais como diferença entre *cantilevers*, qualidade dos reagentes, erro do operador, entre outros. Contudo ainda assim é possível obter dados confiáveis, na medida em que o estresse superficial for comparado em cada etapa da funcionalização e imobilização, e em diferentes concentrações do analito de interesse, pontos que serão ressaltados na próxima etapa deste trabalho (KOSAKA et al., 2013).

5.2.3.2. Estudo das etapas de funcionalização do sistema

A fim de avaliar o sistema de detecção, foram realizadas medidas em cada etapa de funcionalização, utilizando apenas microalavancas limpas e funcionalizadas com APTES, com a injeção de água, ambas as análises foram realizadas em triplicata. Como exposto na Figura 30, no início de ambas as medidas a microalavanca permaneceu em relativo equilíbrio, apresentando apenas pequenas vibrações em função dos ruídos do sistema, uma vez que se trata de um sistema nanométrico extremamente sensível. Em seguida, é possível notar que aos 10min, com a injeção de água, ocorreu uma perturbação no sistema de maneira mais acentuada, culminando com uma ampla deflexão e retorno a posição inicial de equilíbrio. Tal comportamento expõe que não

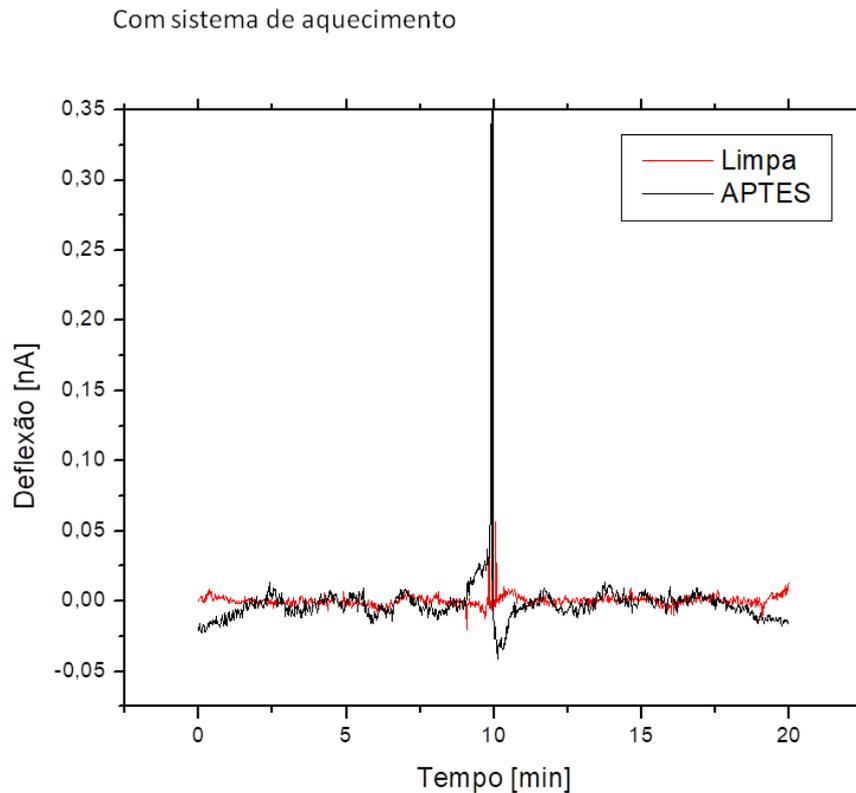
houve detecção, resultado esperado, uma vez que as microalavancas não estavam funcionalizadas e foi injetado no sistema somente água deionizada.



Fonte: Do autor, 2017.

Figura 30. Análise controle do sistema de detecção com utilização de microalavancas limpas e funcionalizadas com APTES sem a utilização do sistema de aquecimento.

Ainda se tratando das medidas controle, foram avaliadas também em triplicata, microalavancas limpas e funcionalizadas com APTES com a utilização do sistema de aquecimento a fim de verificar possíveis interferências que o aumento da temperatura causaria no sistema. Como exposto na Figura 31, é possível notar que ocorreu o mesmo comportamento da Figura 30, contudo, como tal sistema foi construído para análise de interação intermolecular de biomoléculas dependentes de temperatura, como os microRNAs, faz-se necessário pautar as análises controle com a utilização do sistema de aquecimento.



Fonte: Do autor, 2017.

Figura 31. Análise controle do sistema de detecção com utilização de microalavancas limpas e funcionalizadas com APTES utilizando sistema de aquecimento.

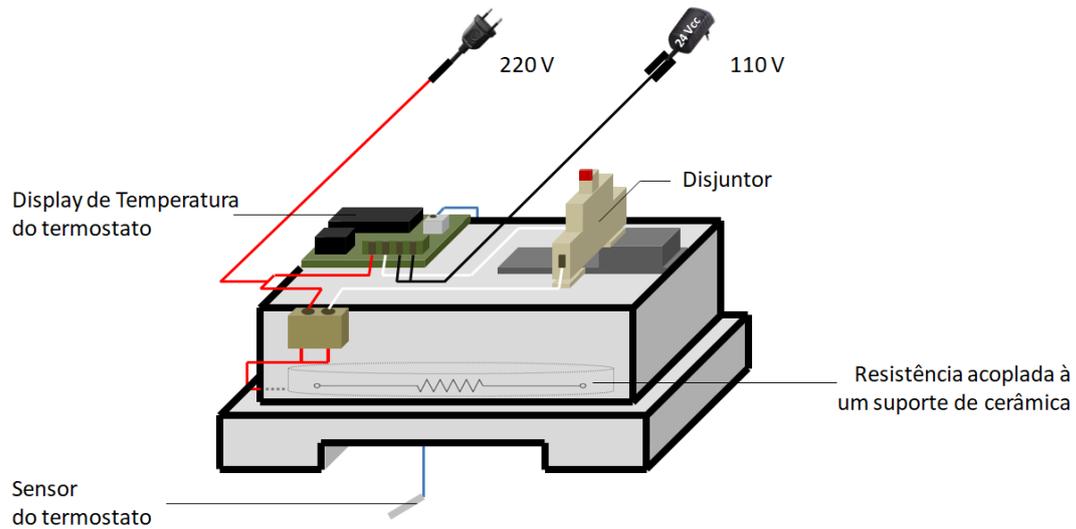
5.2.4. Medidas de interação baseada na hibridização das fitas complementares e miRNAs

5.2.4.1. Desenvolvimento do Sistema de Aquecimento

Para que as fitas de DNA se reconheçam, bem como para redução dos ruídos no sistema de detecção, fez-se necessário o desenvolvimento de um sistema de aquecimento para ser acoplado ao AFM durante as análises do Sensor Nanomecânico de *Cantilever*.

O sistema foi desenvolvido baseado em um termostato *on-off*, programado para aquecer uma resistência elétrica à uma faixa de 36 à 37°C. O sistema é composto por uma resistência elétrica, vinculada à um suporte de cerâmica, um circuito elétrico, que regula o aquecimento da resistência a medida em que a temperatura é captada pelo

sensor de termostato e, um disjuntor, com intuito de assegurar a estabilidade de corrente elétrica do sistema (Figura 32), ambos os componentes foram acoplados em um suporte de polietileno (Figura 33).



Fonte: Do autor, 2017.

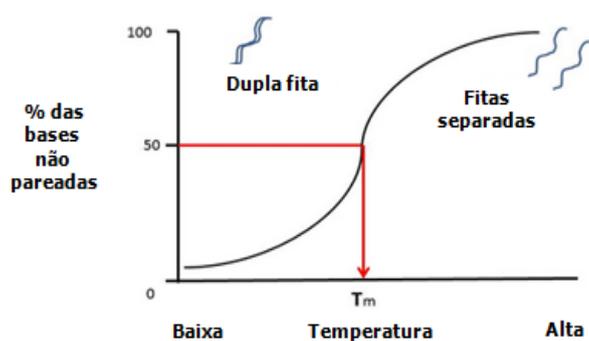
Figura 32. Esquema representativo do sistema de aquecimento desenvolvido.



Fonte: Do autor, 2017.

Figura 33. Imagens do sistema de aquecimento desenvolvido.

A temperatura influi de forma significativa neste sistema de detecção, uma vez que as fitas de DNA possuem temperaturas de desnaturação, ou também chamadas de Temperatura de Melting (T_m), que rompe as ligações de hidrogênio que mantêm a hibridização entre a fita complementar e seu alvo (NICASIO-COLLAZO et al., 2014). A Temperatura de Melting (T_m) indica que 50% das fitas se mantêm de forma simples e os demais 50% das fitas se mantêm em dupla-fita, como exposto na Figura 34 (MACDONALD; JERRIS; BENNETT, 2018).



Fonte: MACDONALD; JERRIS; BENNETT, 2018.

Figura 34. Imagem representativa da relação entre a Temperatura de Melting (T_m) e a hibridização das fitas de DNA.

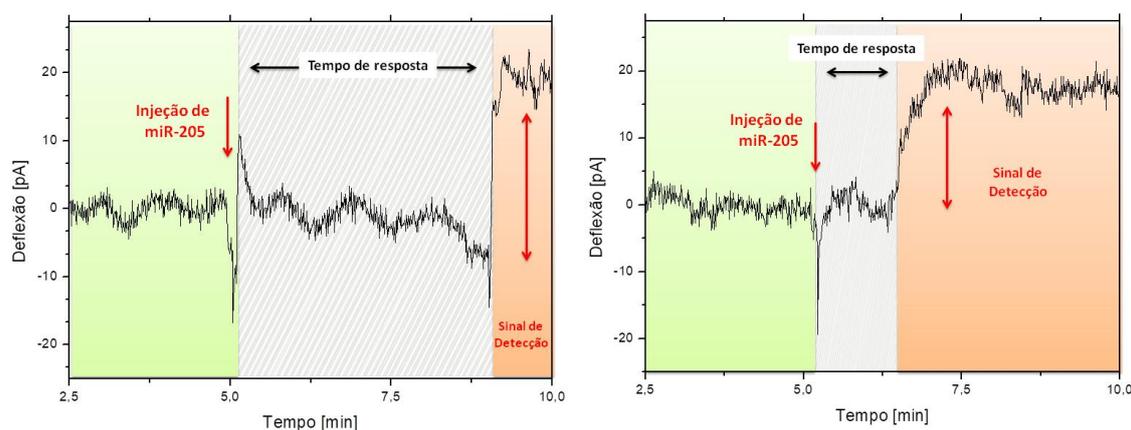
No sistema de detecção do sensor nanomecânico de *cantilever*, o ideal é que todas as fitas do microRNA-alvo se mantenham de forma simples, uma única fita, para que interajam com sua fita complementar imobilizada no *cantilever*. Os microRNAs 203 e 205, possuem Temperatura de Melting (T_m) próximo à 60°C. Dessa forma, a fim de que as fitas do microRNA-alvo estejam livres e em sua forma simples as soluções utilizadas no sistema de interação foram aquecidas previamente à 70°C. Para manter as condições ideais de hibridização, foi construído o sistema de controle de temperatura descrito acima, a fim de que a mesma fosse mantida na faixa de 36 à 37°C, propiciando o reconhecimento e a formação do duplex (ligação dupla) entre as fitas imobilizadas e as sequências alvo disponíveis no sistema. Portanto, a construção desse sistema foi

imprescindível para manter a obtenção dos dados de sensoamento o mais fidedigno possível.

5.2.5.2. Medidas de detecção dos miRNAs alvo: miR-203 e miR-205

As análises de detecção dos marcadores miR-203 e miR-205 foram realizadas com a utilização do sistema de aquecimento desenvolvido. Os ensaios foram realizados em duplicata, com a injeção dos marcadores nas seguintes concentrações: 100, 120, 140 e 160nM. Em cada análise foram comparados e mensurados o sinal de detecção (nm) e o tempo de resposta (min).

Inicialmente foram realizados ensaios de interação em um modo de operação do software do AFM chamado de *DFL*, que fornecia os dados em nA e pA, como realizado no estudo das etapas de funcionalização do sistema (item 5.2.4.2.). Na Figura 35, temos as duas medidas preliminares de interação com a injeção de 100nM do marcador miR-205. Os sinais de detecção em ambas as medidas chegaram à 20pA, em tempos de resposta distintos: na primeira medida a deflexão se deu após 4min, já na segunda medida após 1,3min, com tempo médio de resposta de 2,65min.

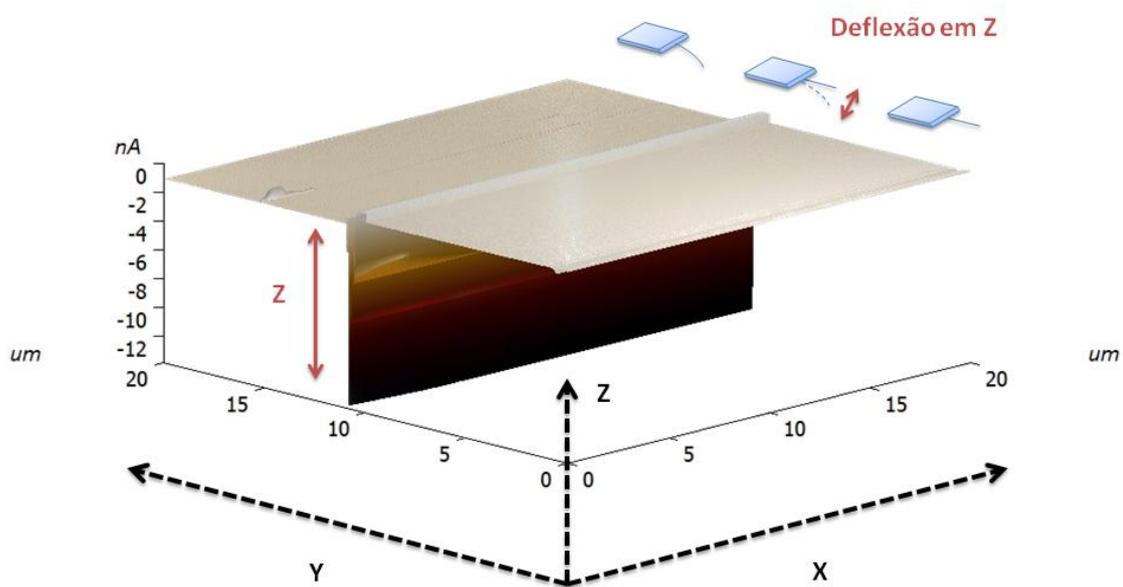


Fonte: Do autor, 2017.

Figura 35. Medidas do sistema de detecção com utilização de microalavancas imobilizadas com as fitas complementares ao marcador miR-205 (cDNA), utilizando sistema de aquecimento.

Tais dados expõem claramente o sinal de deflexão, entretanto, atualmente a literatura científica não apresenta análises de dados de deflexão no modo estático em pA, mas são tratados em nanômetros (nm) (MISHRA; HEGNER, 2014; MERTENSA et al., 2011; ARROYO-HERNÁNDEZ; TAMAYO; COSTA-KRÄMER, 2009; LECHUGA et al., 2006; HUBER et al., 2006; ZHANG et al., 2006). Desse modo, foi realizado um estudo do software acoplado ao AFM *Nova-Px 2.0* para que os ensaios de interação com os microRNAs-alvo pudessem ser mensurados em escala nanométrica, proveniente de uma transdução de energia mecânica decorrente da deflexão do *cantilever*.

Desse modo, foram realizados ensaios com outro modo de operação do software do AFM chamado de *SensZ*, o qual avalia a movimentação do *cantilever* no eixo Z durante a medida, que corresponde à deflexão (Figura 36).

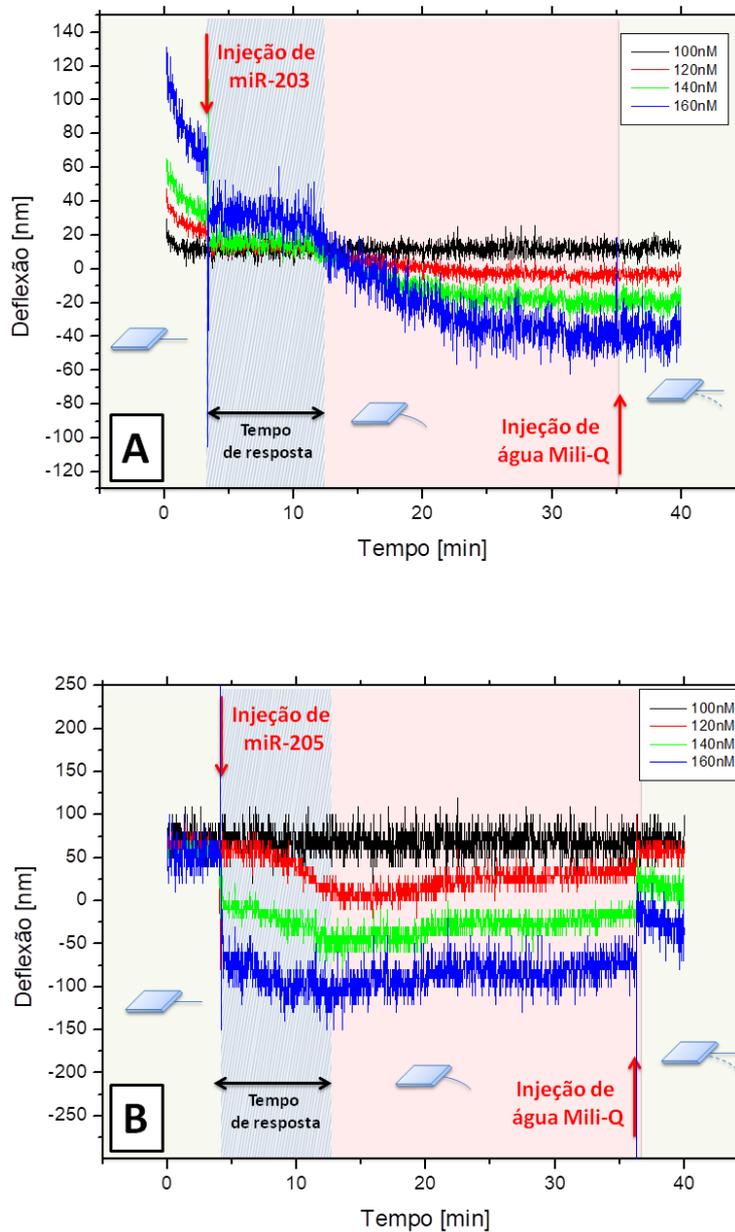


Fonte: Do autor, 2018.

Figura 36. Esquema representativo dos ensaios realizados no modo de operação *SensZ*, no qual movimentação do *cantilever* no eixo Z, que corresponde à deflexão.

Portanto, as análises de detecção dos marcadores miR-203 e miR-205 foram realizadas em duplicata, com a injeção dos marcadores nas seguintes concentrações: 100, 120, 140 e 160nM. Na Figura 36 estão representadas graficamente a detecção do

alvo miR-203 (Figura 37 - A) e miR-205 (Figura 37 - B), para cada ensaio de interação nas diferentes concentrações testadas.



Fonte: Do autor, 2018.

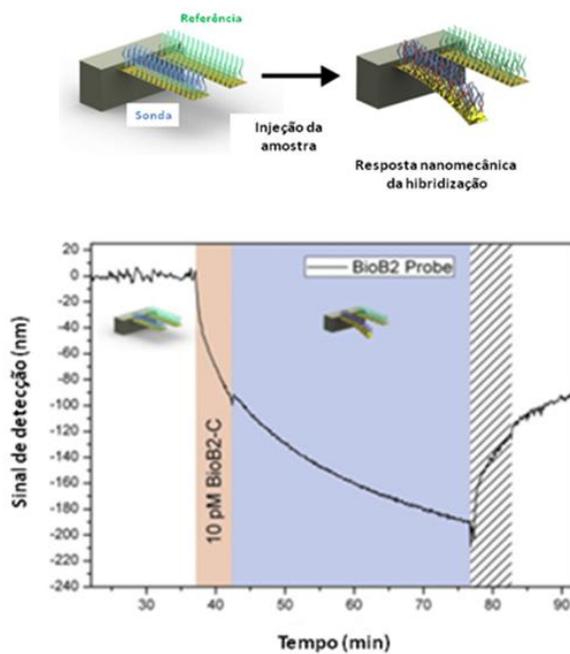
Figura 37. Análises de detecção do sensor nanomecânico de *cantilever* exposto aos microRNAs alvo miR-203 (A) e miR-205 (B), em ambas as concentrações testadas (100, 120, 140 e 160 nM). O plano de fundo verde claro antes da injeção do alvo indica o período de estabilidade do *cantilever*, plano de fundo rosado indica o período de contato do cantilever com o alvo e o plano de fundo verde claro após a injeção de água Mili-Q indica a etapa de lavagem do sistema, que possibilita uma diminuição da deflexão do *cantilever*. A medida controle está encoberta pela análise de 100nM em A e B.

Inicialmente, em ambas as análises as curvas apresentam um padrão que indicam a estabilidade do *cantilever*. Após a injeção do microRNA-alvo, tal padrão é modificado em diferentes magnitudes, correspondendo a deflexão do *cantilever* para cada concentração avaliada. Em seguida, com o processo de lavagem indicado pela injeção de água-Mili-Q, o *cantilever* tende a retornar posição padrão inicial, a qual se encontrava antes da interação com o microRNA-alvo. Tal fenômeno ocorre em decorrência da ruptura das ligações moleculares entre as fitas de cDNA imobilizadas e as sequências de microRNA-alvo disponíveis no sistema.

De acordo com a Figura 37 – A, após a injeção do miR-203 ocorreu uma perturbação no sistema, após 8,6 min as curvas passaram a se comportar de forma diversa, sem a influência de alguma perturbação externa, o que evidencia que *cantilever* passou a defletir possivelmente devido ao fato de estar disponível no sistema as moléculas de miR-203, alvo da camada sensora construída.

Já de acordo com a Figura 37 – B, após a injeção do miR-205 assim como o sistema anterior ocorreu uma perturbação no sistema, após 9,3 min as curvas passaram a se comportar de forma diversa, sem a influência de alguma perturbação externa, o que evidencia que *cantilever* passou a defletir possivelmente devido ao fato de estar disponível no sistema as moléculas de miR-205, alvo da camada sensora construída para esse sistema.

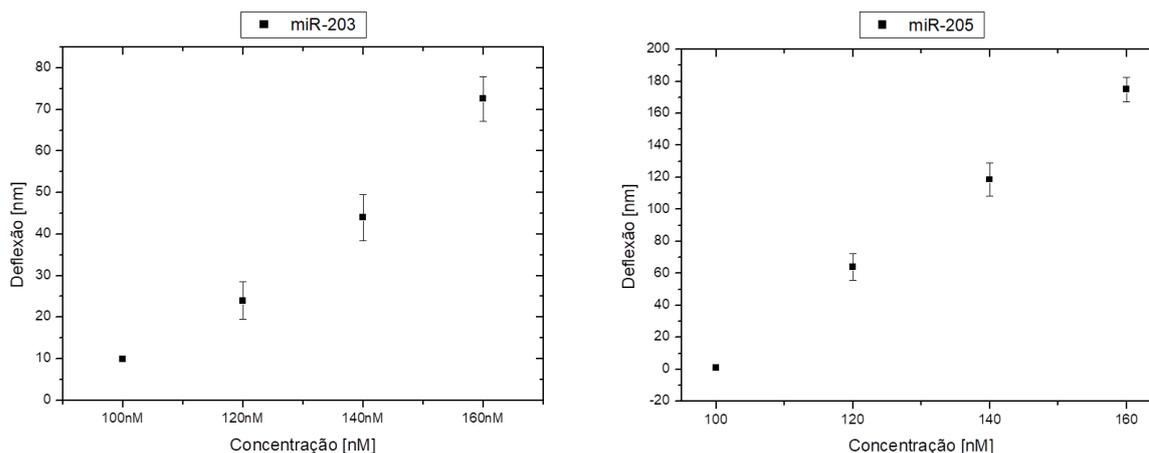
Em comparação com o trabalho de MISHRA & HEGNER (2014), é possível notar que o comportamento das curvas antes da injeção do analito de interesse e após o processo de lavagem são semelhantes. MISHRA & HEGNER também desenvolveram um sensor nanomecânico de *cantilever* para a detecção de uma sequência de oligonucleotídeos alvo (BioB2-C), e segundo a Figura 38, é possível observar a diferença do padrão da curva nos diferentes períodos de injeção. Outros trabalhos como o de MERTENSA et al., (2011), HUBER et al. (2006) e ZHANG et al. (2006) também evidenciam tais diferenças que correspondem à mudança da curvatura do *cantilever*, ou seja, a deflexão *cantilever*, em função da hibridização entre as fitas imobilizadas e as sequências alvo de oligonucleotídeos.



Fonte: MISHRA & HEGNER, 2014 (Adaptado).

Figura 38. Sensor nanomecânico de *cantilever* para a detecção de uma sequência de oligonucleotídeos alvo (BioB2-C) desenvolvido por MISHRA & HEGNER, 2014.

Ainda, a partir das análises realizadas em duplicata, foram construídos gráficos através do sinal de deflexão do sensor em função de cada concentração testada para ambos os microRNA-alvo (Figura 39).



Fonte: Do autor, 2018.

Figura 39. Gráfico de detecção dos microRNAs-alvo miR-203 e miR-205 construído através da deflexão em função de cada concentração testada.

De acordo com a Figura 39 os valores de detecção do miR-203 variaram dentre as concentrações testadas de 10 à 70nm, aproximadamente. Já os valores de detecção do miR-205 variaram dentre as concentrações testadas de 10 à 170nm, aproximadamente. MISHRA & HEGNER (2014), também construíram um gráfico comparativo dos valores de deflexão em função das diferentes concentrações testadas do alvo BioB2-C. Os valores de deflexão apresentados por MISHRA & HEGNER (2014), variou de 50 à 150 nm aproximadamente. Já o de HUBER et al. (2006) variou de 0 à 60 nm, evidenciando a particularidade e os diferentes graus de curvatura, ou seja, as diferentes deflexões do *cantilever* apresentadas em cada sistema. Tais diferenças são decorrentes de fatores como: o modo de construção da camada sensora através dos processos de funcionalização e imobilização, a concentração da solução do analito de interesse a ser detectado, e as características próprias do *cantilever*, como a constante de mola, que influencia diretamente na vibração do *cantilever* e varia dentre dos diferentes modelos utilizados (MERTENSA et al., 2011).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos por Microscopia de Fluorescência e Microscopia de Força Atômica foi possível averiguar a eficácia as técnicas de funcionalização e imobilização empregadas. Além disso, foi possível obter dados consistentes tanto da padronização do sensor quanto da detecção de ambos os alvos avaliados, miR-203 e miR-205, em diferentes concentrações de 120 à 160 nM com o auxílio do sistema de aquecimento desenvolvido. Desse modo, esse trabalho expõe o potencial de aplicação do sensor construído para detecção de marcadores de metástases ocultas do CECP.

7. PERSPECTIVAS

O próximo passo desse trabalho é averiguar o limite mínimo e máximo de detecção do sensor variando ainda mais a concentração dos alvos miR-203 e miR-205. O caráter inovador deste trabalho está contido no desenvolvimento de uma nova metodologia de detecção de metástase, que, à priori, se utiliza de amostras sintéticas dos marcadores de metástase do CECP, mas no futuro poderá ser aplicada a amostras reais de pacientes acometidos por tal patologia. Além disso, tal sistema pode ser aplicado para detecção de marcadores de miRNAs de outras patologias, como as doenças neurológicas e neurodegenerativas como Esclerose Múltipla foco de estudo do Grupo de Pesquisa em Nanoneurobiofísica.

8. REFERÊNCIAS

Agentes Cancerígenos - INCA. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=320>. Acesso em: 14 fev. 2018.

ALEKHIN, A. P. et al. Synthesis of biocompatible surfaces by nanotechnology methods. **Nanotechnologies in Russia**, v. 5, n. 9–10, p. 696–708, 1 out. 2010.

ALI, J. et al. Genetic etiology of oral cancer. **Oral Oncology**, v. 70, p. 23–28, 1 jul. 2017.

ARREDONDO-VALDEZ, A. R.; WENCE-CHAVEZ, L.; ROSALES-REYNOSO, M. A. [Use of micro RNAs in the diagnosis and prognosis of colorectal cancer (CCR)]. **Gaceta Medica De Mexico**, v. 152, n. 3, p. 386–396, jun. 2016.

ARROYO-HERNÁNDEZ, M.; TAMAYO, J.; COSTA-KRÄMER, J. L. Stress and DNA assembly differences on cantilevers gold coated by resistive and e-beam evaporation techniques. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 25, n. 18, p. 10633–10638, 15 set. 2009.

BERTAZZO, S. et al. Bioactivation of alumina by surface modification: a possibility for improving the applicability of alumina in bone and oral repair. **Clinical Oral Implants Research**, v. 20, n. 3, p. 288–293, mar. 2009.

BERTAZZO, S.; REZWAN, K. Control of α -Alumina Surface Charge with Carboxylic Acids. **Langmuir**, v. 26, n. 5, p. 3364–3371, 2 mar. 2010.

BHUSHAN, B. et al. Morphology and adhesion of biomolecules on silicon based surfaces. **Acta Biomaterialia**, v. 1, n. 3, p. 327–341, 1 maio 2005.

BINNIG, G.; ROHRER, H. Scanning tunneling microscopy. **Surface Science**, v. 152–153, p. 17–26, 1 abr. 1985.

BONANNI, A. et al. Impedimetric genosensors for the detection of DNA hybridization. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, n. 7, p. 1195–1201, ago. 2006.

CALLEJA, M. et al. Highly sensitive polymer-based cantilever-sensors for DNA detection. **Ultramicroscopy**, Proceedings of the Sixth International Conference on Scanning Probe Microscopy, Sensors and Nanostructures. v. 105, n. 1, p. 215–222, 1 nov. 2005.

CALVO-MUÑOZ, M.-L. et al. Electrochemical study by a redox probe of the chemical post-functionalization of N-substituted polypyrrole films: Application of a new approach to immobilization of biotinylated molecules. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 578, n. 2, p. 301–313, 1 maio 2005.

CAPPELLESSO, R. et al. The prognostic role of the epithelial–mesenchymal transition markers E-cadherin and Slug in laryngeal squamous cell carcinoma. **Histopathology**, v. 67, n. 4, p. 491–500, 1 out. 2015.

CASEY, M.-C. et al. Exploring circulating micro-RNA in the neoadjuvant treatment of breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 139, n. 1, p. 12–22, 1 jul. 2016.

CHIN, D. et al. Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 57, n. 7, p. 595–602, 1 out. 2004.

CHIORCEA PAQUIM, A.-M. et al. AFM and electroanalytical studies of synthetic oligonucleotide hybridization. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 20, n. 5, p. 933–944, 15 nov. 2004.

CHO, J.-K. et al. Significance of Lymph Node Metastasis in Cancer Dissemination of Head and Neck Cancer. **Translational Oncology**, v. 8, n. 2, p. 119–125, 1 abr. 2015.

CHRISTIANSEN, A.; DETMAR, M. Lymphangiogenesis and Cancer. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 12, p. 1146–1158, dez. 2011.

COSNIER, S.; MAILLEY, P. Recent advances in DNA sensors. **Analyst**, v. 133, n. 8, p. 984–991, 21 jul. 2008.

DE CARVALHO, A. C. et al. Accuracy of microRNAs as markers for the detection of neck lymph node metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **BMC medicine**, v. 13, p. 108, 9 maio 2015.

DEDA, D. K. et al. The use of functionalized AFM tips as molecular sensors in the detection of pesticides. **Materials Research**, v. 16, n. 3, p. 683–687, jun. 2013.

DELKHAHI, S.; RAHAIE, M.; RAHIMI, F. Design and Fabrication a Gold Nanoparticle-DNA Based Nanobiosensor for Detection of microRNA Involved in Alzheimer's Disease. **Journal of Fluorescence**, v. 27, n. 2, p. 603–610, mar. 2017.

DING, X. et al. Signaling between Transforming Growth Factor β (TGF- β) and Transcription Factor SNAI2 Represses Expression of MicroRNA miR-203 to Promote Epithelial-Mesenchymal Transition and Tumor Metastasis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 15, p. 10241–10253, 12 abr. 2013.

DNA Nanostructure as Smart Carriers for Drug Delivery - Springer. Disponível em: <https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-6454-3_9>. Acesso em: 2 jul. 2017.

DOMÍNGUEZ, C. M. et al. Effect of water-DNA interactions on elastic properties of DNA self-assembled monolayers. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 536, 3 abr. 2017.

DUNDAS, C. M.; DEMONTE, D.; PARK, S. Streptavidin–biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 21, p. 9343–9353, 1 nov. 2013.

DUPONT-FILLIARD, A. et al. Investigation by QCM of the Specific and Nonspecific Avidin Interaction onto a Biotinylated Polypyrrole Film. **Electroanalysis**, v. 16, n. 8, p. 667–673, 1 abr. 2004.

FERRO, M. et al. Biomarkers in localized prostate cancer. **Future Oncology (London, England)**, v. 12, n. 3, p. 399–411, fev. 2016.

FRITZ, J. Cantilever biosensors. **The Analyst**, v. 133, n. 7, p. 855–863, jul. 2008a.

FRITZ, J. Cantilever biosensors. **The Analyst**, v. 133, n. 7, p. 855–863, jul. 2008b.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.

HANSEN, K. M. et al. Cantilever-Based Optical Deflection Assay for Discrimination of DNA Single-Nucleotide Mismatches. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 7, p. 1567–1571, 1 abr. 2001.

Head and Neck Cancers - National Cancer Institute. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet>>. Acesso em: 2 jul. 2017.

HUBER, F. et al. **Label free analysis of transcription factors using microcantilever arrays - ScienceDirect.** Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566305002423?via%3Dihub>>. Acesso em: 4 jul. 2017.

HURST, D. R.; EDMONDS, M. D.; WELCH, D. R. Metastamir: The Field of Metastasis-Regulatory microRNA Is Spreading. **Cancer Research**, v. 69, n. 19, p. 7495–7498, 1 out. 2009.

HUSALE, S.; PERSSON, H. H. J.; SAHIN, O. DNA nanomechanics allows direct digital detection of complementary DNA and microRNA targets. **Nature**, v. 462, n. 7276, p. 1075–1078, 24 dez. 2009a.

HUSALE, S.; PERSSON, H.; SAHIN, O. **DNA nanomechanics allows direct digital detection of complementary DNA and microRNA targets.** - PubMed - NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20010806>>. Acesso em: 4 jul. 2017b.

INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2018 - Síntese de Resultados e Comentários. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>. Acesso em: 19 fev. 2018.

JAIN, K. K. Nanotechnologies. In: **The Handbook of Nanomedicine.** [s.l.] Springer New York, 2017. p. 11–71.

JOHNSON, B. N.; MUTHARASAN, R. Sample preparation-free, real-time detection of microRNA in human serum using piezoelectric cantilever biosensors at attomole level. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 23, p. 10426–10436, 4 dez. 2012.

JR, O. DE O. et al. **Nanoscience and its Applications.** [s.l.] William Andrew, 2016.

KILIC, T. et al. microRNA biosensors: Opportunities and challenges among conventional and commercially available techniques. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 99, p. 525–546, 15 jan. 2018.

KOSAKA, P. M. et al. **Tackling reproducibility in microcantilever biosensors: a statistical approach for sensitive and specific end-point detection of immunoreactions - Analyst (RSC Publishing)**. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2013/AN/C2AN36192B#!divAbstract>>. Acesso em: 4 jul. 2017.

KOZAKI, K. et al. Exploration of Tumor-Suppressive MicroRNAs Silenced by DNA Hypermethylation in Oral Cancer. **Cancer Research**, v. 68, n. 7, p. 2094–2105, 1 abr. 2008.

KUDO, Y. et al. Establishment of an oral squamous cell carcinoma cell line with high invasive and p27 degradation activities from a lymph node metastasis. **Oral Oncology**, v. 39, n. 5, p. 515–520, jul. 2003.

LANG, H. P.; HEGNER, M.; GERBER, C. Cantilever array sensors. **Materials Today**, v. 8, n. 4, p. 30–36, 1 abr. 2005.

LAPSHIN, R. V. et al. Vacuum ultraviolet smoothing of nanometer-scale asperities of Poly(methyl methacrylate) surface. **Journal of Surface Investigation. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques**, v. 4, n. 1, p. 1–11, 1 fev. 2010.

LECHUGA, L. M. et al. A highly sensitive microsystem based on nanomechanical biosensors for genomics applications. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Eurosensors XIX. v. 118, n. 1, p. 2–10, 25 out. 2006.

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, 1 jan. 2005.

LENA, A. M. et al. miR-203 represses “stemness” by repressing $\Delta Np63$. **Cell Death & Differentiation**, v. 15, n. 7, p. 1187–1195, 16 maio 2008.

LIU, Z. et al. Imaging DNA molecules on mica surface by atomic force microscopy in air and in liquid. **Microscopy Research and Technique**, v. 66, n. 4, p. 179–185, 1 mar. 2005.

LONDON, G. et al. Towards dynamic control of wettability by using functionalized altitudinal molecular motors on solid surfaces. **Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)**, v. 19, n. 32, p. 10690–10697, 5 ago. 2013.

LU, Z. et al. Covalently linked DNA/protein multilayered film for controlled DNA release. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 314, n. 1, p. 80–88, 1 out. 2007.

MA, Q. et al. Serum microRNA-205 as a novel biomarker for cervical cancer patients. **Cancer Cell International**, v. 14, p. 81, 22 ago. 2014.

MACDONALD, H.; JERRIS, R. C.; BENNETT, J. **PCR Fundamentals: Focus on Multiplex PCR Assay and the Advantages over Singleplex Assays**. [s.l.: s.n.].

MALECKA, K. et al. Ion-channel genosensor for the detection of specific DNA sequences derived from Plum Pox Virus in plant extracts. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 14, n. 10, p. 18611–18624, 9 out. 2014.

MANDELKERN, M. et al. The dimensions of DNA in solution. **Journal of Molecular Biology**, v. 152, n. 1, p. 153–161, 15 out. 1981.

MARCHBANK, A. et al. The CUSP $\Delta Np63\alpha$ isoform of human p63 is downregulated by solar-simulated ultraviolet radiation. **Journal of Dermatological Science**, v. 32, n. 1, p. 71–74, 1 jun. 2003.

MCCREERY, R. L.; BERGREN, A. J. Surface Functionalization in the Nanoscale Domain. In: **Nanofabrication**. [s.l.] Springer, Vienna, 2012. p. 163–190.

MCKENNA, D. J. et al. MicroRNA 203 Expression in Keratinocytes Is Dependent on Regulation of p53 Levels by E6. **Journal of Virology**, v. 84, n. 20, p. 10644–10652, 15 out. 2010.

MERTENS et al. **Access : Label-free detection of DNA hybridization based on hydration-induced tension in nucleic acid films: Nature Nanotechnology**. Disponível em: <<https://www.nature.com/nnano/journal/v3/n5/full/nnano.2008.91.html>>. Acesso em: 2 jul. 2017.

MERTENS, J. et al. Label-free detection of DNA hybridization based on hydration-induced tension in nucleic acid films. **Nature Nanotechnology**, v. 3, n. 5, p. 301–307, maio 2008.

MERTENSA, J. et al. **Observation of spermidine-induced attractive forces in self-assembled monolayers of single stranded DNA using a microcantilever sensor: Applied Physics Letters: Vol 98, No 15**. Disponível em: <<http://aip.scitation.org/doi/full/10.1063/1.3580775>>. Acesso em: 4 jul. 2017.

MISHRA, R.; HEGNER, M. Effect of non-specific species competition from total RNA on the static mode hybridization response of nanomechanical assays of oligonucleotides. **Nanotechnology**, v. 25, n. 22, p. 225501, 6 jun. 2014.

MITCHELL, P. S. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 30, p. 10513–10518, 29 jul. 2008.

MOISEEV, L. et al. DNA conformation on surfaces measured by fluorescence self-interference. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 8, p. 2623–2628, 21 fev. 2006.

MOLDOVAN, L. et al. Analyzing the circulating microRNAs in exosomes/extracellular vesicles from serum or plasma by qRT-PCR. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1024, p. 129–145, 2013.

MUKHOPADHYAY, R. et al. Nanomechanical Sensing of DNA Sequences Using Piezoresistive Cantilevers. **Langmuir**, v. 21, n. 18, p. 8400–8408, 1 ago. 2005.

Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/99/15/9783.abstract>>. Acesso em: 3 jul. 2017.

NICASIO-COLLAZO, L. A. et al. Stress-induced DNA damage: a case study in diffuse large B-cell lymphoma. **Journal of the Royal Society, Interface**, v. 11, n. 100, p. 20140827, 6 nov. 2014.

OBAYASHI, M. et al. microRNA-203 suppresses invasion and epithelial-mesenchymal transition induction via targeting NUA1 in head and neck cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 7, p. 8223–8239, 16 fev. 2016.

- OLIVEIRA, N. et al. A Sensitive and Selective Label-Free Electrochemical DNA Biosensor for the Detection of Specific Dengue Virus Serotype 3 Sequences. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 15, n. 7, p. 15562–15577, 1 jul. 2015.
- PEREIRA, E. R. et al. The lymph node microenvironment and its role in the progression of metastatic cancer. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 38, p. 98–105, fev. 2015.
- PIVIDORI, M. I.; MERKOÇI, A.; ALEGRET, S. Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 15, n. 5, p. 291–303, 1 ago. 2000.
- PRAHM, K. P. et al. Current status on microRNAs as biomarkers for ovarian cancer. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 124, n. 5, p. 337–355, maio 2016.
- PYNE, A. et al. Single-Molecule Reconstruction of Oligonucleotide Secondary Structure by Atomic Force Microscopy. **Small**, v. 10, n. 16, p. 3257–3261, 1 ago. 2014.
- QIN, A.-Y. et al. MiR-205 in cancer: an angel or a devil? **European Journal of Cell Biology**, v. 92, n. 2, p. 54–60, fev. 2013.
- RAITERI, R. et al. Micromechanical cantilever-based biosensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 79, n. 2, p. 115–126, 15 out. 2001.
- RAMOS, D. et al. Arrays of dual nanomechanical resonators for selective biological detection. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 6, p. 2274–2279, 15 mar. 2009.
- RASHID, J. I. A.; YUSOF, N. A. The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 16, p. 19–31, nov. 2017.
- ROCCO, J. W. et al. p63 mediates survival in squamous cell carcinoma by suppression of p73-dependent apoptosis. **Cancer Cell**, v. 9, n. 1, p. 45–56, 1 jan. 2006.
- RODRIGUES, L. F. et al. Nanomechanical Cantilever-Based Sensor: An Efficient Tool to Measure the Binding Between the Herbicide Mesotrione and 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase. **Nano**, p. 1750079, Abril 2017.
- SASSOLAS, A.; LECA-BOUVIER, B. D.; BLUM, L. J. DNA biosensors and microarrays. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 1, p. 109–139, jan. 2008.
- SHEKHAWAT, G.; TARK, S.-H.; DRAVID, V. P. MOSFET-Embedded Microcantilevers for Measuring Deflection in Biomolecular Sensors. **Science**, v. 311, n. 5767, p. 1592–1595, 17 mar. 2006.
- SHU, W. et al. DNA Molecular Motor Driven Micromechanical Cantilever Arrays. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 48, p. 17054–17060, 1 dez. 2005.
- SHU, W.; LAUE, E. D.; SESHIA, A. A. Investigation of biotin–streptavidin binding interactions using microcantilever sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, Selected Papers from the Ninth World Congress On Biosensors. Toronto, Canada 10 - 12 May 2006. v. 22, n. 9, p. 2003–2009, 15 abr. 2007.

SIDRANSKY, D. Emerging molecular markers of cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v. 2, n. 3, p. 210–219, mar. 2002.

Slide kit | Servier. Disponível em: <<http://www.servier.com/slidekit/?item=42>>. Acesso em: 2 jul. 2017.

SONKOLY, E. et al. MicroRNA-203 functions as a tumor suppressor in basal cell carcinoma. **Oncogenesis**, v. 1, n. 3, p. e3, 12 mar. 2012.

STACHOWIAK, J. C. et al. Chemomechanics of Surface Stresses Induced by DNA Hybridization. **Langmuir**, v. 22, n. 1, p. 263–268, 1 jan. 2006.

STEEL, A. B. et al. Immobilization of Nucleic Acids at Solid Surfaces: Effect of Oligonucleotide Length on Layer Assembly. **Biophysical Journal**, v. 79, n. 2, p. 975–981, 1 ago. 2000.

TEH, H. F. et al. Electrochemical biosensing of DNA with capture probe covalently immobilized onto glassy carbon surface. **Analytica Chimica Acta**, v. 551, n. 1, p. 23–29, 17 out. 2005.

The Important Roles of miR-205 in Normal Physiology, Cancers and as a Potential Therapeutic Target. Disponível em: <<https://ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/25308719/>>. Acesso em: 2 jul. 2017.

The microRNA Signatures: Aberrantly Expressed microRNAs in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. Disponível em: <<https://ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/27557665/>>. Acesso em: 2 jul. 2017.

TRAN, M. N. et al. The p63 protein isoform $\Delta Np63\alpha$ inhibits epithelial-mesenchymal transition in human bladder cancer cells: role of MIR-205. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 5, p. 3275–3288, 1 fev. 2013.

TUUKKANEN, S. et al. Trapping of 27 bp–8 kbp DNA and immobilization of thiol-modified DNA using dielectrophoresis. **Nanotechnology**, v. 18, n. 29, p. 295204, 2007.

ULIANAS, A. et al. An electrochemical DNA microbiosensor based on succinimide-modified acrylic microspheres. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 5, p. 5445–5460, 2012.

Ultraviolet Radiation Induces Phosphorylation and Ubiquitin-Mediated Degradation of $\Delta Np63\alpha$: Cell Cycle: Vol 4, No 5. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.4.5.1685>>. Acesso em: 4 jul. 2017.

VAN ROOSBROECK, K.; CALIN, G. A. MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia: miRacle or miRage for prognosis and targeted therapies? **Seminars in Oncology**, v. 43, n. 2, p. 209–214, abr. 2016.

VELUSAMY, V. et al. Comparison between DNA Immobilization Techniques on a Redox Polymer Matrix. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 2, p. 392–400, 2011.

VOSGHA, H. et al. The important roles of miR-205 in normal physiology, cancers and as a potential therapeutic target. **Current Cancer Drug Targets**, v. 14, n. 7, p. 621–637, 2014.

WAGNER, P. Immobilization strategies for biological scanning probe microscopy1Dedicated to Prof. Giorgio Semenza on the occasion of his 70th birthday.1. **FEBS Letters**, v. 430, n. 1, p. 112–115, 23 jun. 1998.

- WANG, Q. et al. Hybridization biosensor based on the covalent immobilization of probe DNA on chitosan–mutiwallled carbon nanotubes nanocomposite by using glutaraldehyde as an arm linker - ScienceDirect. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 156, n. 2, p. 599–605, ago. 2011.
- WINK, T. et al. Self-assembled Monolayers for Biosensors. **Analyst**, v. 122, n. 4, p. 43R–50R, 1 jan. 1997.
- WU, K. et al. Non-coding RNAs in cancer brain metastasis. **Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)**, v. 8, p. 187–202, 1 jan. 2016.
- XIAONING, Z.; HONGMEI, H. DNA molecules site-specific immobilization and their applications | SpringerLink. **Central European Journal of Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 977–993, out. 2014.
- XU, B. et al. An ultrasensitive DNA biosensor based on covalent immobilization of probe DNA on fern leaf-like α -Fe₂O₃ and chitosan Hybrid film using terephthalaldehyde as arm-linker. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 72, p. 175–181, 15 out. 2015.
- YI, R. et al. A skin microRNA promotes differentiation by repressing “stemness”. **Nature**, v. 452, n. 7184, p. 225–229, 13 mar. 2008.
- YIN, H. et al. Photoelectrochemical biosensing platform for microRNA detection based on in situ producing electron donor from apoferritin-encapsulated ascorbic acid. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 53, p. 175–181, 15 mar. 2014.
- YU, X. et al. Role of microRNAs in primary central nervous system lymphomas. **Cell Proliferation**, v. 49, n. 2, p. 147–153, abr. 2016.
- ZAVESKY, L. et al. New perspectives in diagnosis of gynaecological cancers: Emerging role of circulating microRNAs as novel biomarkers. **Neoplasma**, v. 62, n. 4, p. 509–520, 2015.
- ZHANG, J. et al. Rapid and label-free nanomechanical detection of biomarker transcripts in human RNA. **Nature Nanotechnology**, v. 1, n. 3, p. 214–220, dez. 2006.
- ZHANG, X. et al. Application of graphene-pyrenebutyric acid nanocomposite as probe oligonucleotide immobilization platform in a DNA biosensor. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications**, v. 33, n. 7, p. 3851–3857, out. 2013.
- ZHANG, Z. et al. Potential Biomarkers in Diagnosis of Human Gastric Cancer. **Cancer Investigation**, v. 34, n. 3, p. 115–122, 2016.
- ZHU, X. et al. miR-203 Suppresses Tumor Growth and Angiogenesis by Targeting VEGFA in Cervical Cancer. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 32, n. 1, p. 64–73, 2013.