

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR
DESCARTÁVEL ACOPLADO A UM SISTEMA
MICROFLUÍDICO PARA DETERMINAÇÃO DE
UM BIOMARCADOR TUMORAL**

Camila Rizzardi Peverari*

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de MESTRE
EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA
ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria

***Bolsista CAPES**

SÃO CARLOS-SP

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P514d Peverari, Camila Rizzardi
Desenvolvimento de um imunossensor descartável
acoplado a um sistema microfluídico para determinação
de um biomarcador tumoral / Camila Rizzardi
Peverari. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
77 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2016.

1. Câncer de mama. 2. Imunossensor eletroquímico
descartável. 3. Biomarcador tumoral. I. Título.



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Camila Rizzardi Peverari, realizada em 19/02/2016:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'F. Cruz de Moraes', written over a horizontal line.

Prof. Dr. Fernando Cruz de Moraes
UFSCar

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Thiago Regis Longo Cesar da Paixão', written over a horizontal line.

Prof. Dr. Thiago Regis Longo Cesar da Paixão
USP

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Fernando Campanhã Vicentini', written over a horizontal line.

Prof. Dr. Fernando Campanhã Vicentini
UFSCar

Dedico esta dissertação de mestrado aos meus pais, Cleber e Nelma.

Amo muito vocês!

*O único transformador, o único alquimista que muda tudo em ouro, é o amor.
O único antídoto contra a morte, a idade, a vida vulgar, é o amor.*

Anais Nin

Agradecimentos

À Deus, pela proteção, força e sabedoria que sempre me presenteia em todos os momentos da minha vida. Por Ele ter me colocado em um bom lugar;

Aos meus pais, Cleber e Nelma, por todo amor, incentivo, compreensão e toda renúncia que fazem para o meu bem estar e continuaram fazendo para que meu mestrado fosse realizado com sucesso. Por serem meus exemplos de doação, de amor, de dedicação, de trabalho e de estudo;

À minha irmã Beatriz, por todo suporte, ombro amigo, sorrisos sinceros e cuidado que sempre tem comigo e, ao meu cunhado Gustavo, pelo apoio e torcida;

Às minhas maiores perdas, próximas e durante o período de mestrado, Vô Nelson, Vó Alzira, Vô Miro e Vó Menta, por cada palavra de carinho, de apoio, de superação e exemplo de ternura e luta que rodearam a minha vida;

À tia Gê, tio Valdemir, tio Berlei, tia Ivone, tio Nilson e tia Marilza e aos meus queridos primos Lê, Guto, Fran, Laiz e Fer, por torcerem por mim;

Ao Gi, pelo incentivo, parceria, amor e por acreditar em mim;

Ao Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria pela oportunidade de realizar o mestrado no LaBiE, pela orientação, apoio, pelas discussões científicas pacíficas e cheias de ideias, pela amizade e pelo profissional que ele é;

À Dr^a Carolina Venturini Uliana, pela contribuição e presença fundamental neste trabalho, por todo ensinamento, carinho e disposição com que me auxiliou;

À Vitoria Honorato Franco de Menezes, minha primeira colaboradora de iniciação científica, pela confiança e amizade;

À Dr^a Marcela Stefanini Tsuboy, Ms. Patricia Regina Manzine Morales e Prof^a Dr^a Márcia Cominetti, do Laboratório de Biologia do

Envelhecimento, que me auxiliaram no preparo das amostras de lisados de células de câncer de mama. Obrigada por toda ajuda e disposição;

Aos meus queridos amigos que, mesmo longe sempre estiveram presentes no meu dia-a-dia e no meu coração, com palavras de incentivo e risadas acolhedoras: Dani, Flavinha, Karen, Murillo, Nati, Tali, Thaís Manfrinato, Thayla e Wes;

Aos professores os quais tenho grande estima, Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria Pires e Prof. Dr. Homero Marques Gomes da minha graduação na UNESP em Presidente Prudente e ao Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho e Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega durante a pós-graduação da UFSCar;

Aos meus maiores ganhos durante essa caminhada de mestrado, os amigos que colaboraram com discussões científicas, ações e palavras de carinho: Ademar, Alcebíades, Alex, Alexandrino, André, Andreza, Arthur, Avaré, Barbara, Bruna, Camila Erbereli, Camila Proença, Cássio, Cláudia, Cyber, Diego, Flavión, Fred, Geiser, Ginnara, Gisela, Greg, Guerreiro, Jorge, Laís, tia Lu, Marcão, Mayron, Naira, Natália, Nelson, Pati Deroco, Pati Tempesta, Popô, Sebastian, Tássia, Tayane, Thaís, Thaísa e Tiago;

À Galera do Recreio: Anderson, Elson e Marina, meus primeiros amigos na chegada à UFSCar, por tudo o que rimos e sofremos juntos;

Ao Cleiton e ao Renato, pelo companheirismo e alegria que me cercam;

Ao Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz e ao Dr. Gustavo Garbelini por comporem a minha banca de seminário de mestrado e auxiliarem grandemente no meu trabalho. Aos professores Prof. Dr. Thiago Regis Longo Cesar da Paixão, Prof. Dr. Fernando Cruz de Moraes e Prof. Dr. Fernando Campanhã Vicentini, que participaram da minha banca de defesa de mestrado, leram meu trabalho com carinho e apontaram valiosas contribuições;

Ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da UFSCar;

A todos os funcionários do Departamento de Química, especialmente as secretárias da pós-graduação Ariane, Cris, Denise e Lu e as meninas da limpeza;

Aos órgãos de fomento CNPq, FAPESP e principalmente à CAPES, pela bolsa concedida.

Lista de Abreviaturas e Símbolos

EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
MES	Ácido 2- <i>N</i> -morfolinoetanossulfônico
BCA	Ácido bicinconínico (do inglês, <i>bicinchoninic acid</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
HEPES	Ácido ((<i>N</i> -(2-hidroxietyl)piperazina- <i>N'</i> -(2-etanosulfônico))
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i>)
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês <i>bovine serum albumin</i>)
A	<i>Ampère</i>
A	Área eletroativa
Ant-ER α	Anticorpo policlonal ER α
CA15-3	Antígeno para câncer 15-3
CA125	Antígeno para câncer 125
PSA	Antígeno prostático específico (do inglês <i>prostatic specific antigen</i>)
CTC	Células de tumor circulantes (do inglês <i>Circulating Tumor Cells</i>)
cm	Centímetro
TNM	Classificação que leva em conta a avaliação do tumor primário (T), linfonodos (N) e metástase à distância (M) do câncer de mama (do inglês, <i>tumor</i> (T), <i>lymph nodes</i> (N) e <i>metastasis</i> (M))
D	Coefficiente de difusão

<i>I</i>	Corrente
I_p	Corrente de pico
RSD	Desvio-padrão relativo (do inglês <i>relative standard deviation</i>)
dsDNA-ERE	Dupla fita de DNA ligada a um elemento de resposta estrogênica
EN2	Do inglês, <i>Engrailed-2</i>
EIA	<i>Enzyme Immunoassay</i>
ERE	Elemento de resposta estrogênica
HER-2	Fator de crescimento epidérmico humano receptor 2 (do inglês, <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>)
GSH	Glutathiona
HQ	Hidroquinona
LBA	<i>Ligand-Binding Assay</i>
L	Litro
μ	micro (10^{-6})
mg	Miligrama
mm	Milímetro
min	Minuto
n	nano (10^{-9})
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
AuNP	Nanopartículas de ouro
AuNP-GSH	Nanopartículas de ouro decoradas com glutathiona
ER-	Negatividade para receptor de estrógeno
<i>n</i>	Número de elétrons
PM	Partículas magnéticas

Ant-ER α -PM-HRP	Partícula magnética decorada com anticorpo policlonal de receptor de estrógeno alfa e a enzima <i>horseradish peroxidase</i>
(ER α)Ant-ER α -PM-HRP	Partícula magnética decorada com anticorpo policlonal de receptor de estrógeno alfa e enzima <i>horseradish peroxidase</i> , já capturado o antígeno ER α pelo anticorpo
HRP	Peroxidase de raiz forte (do inglês, <i>horseradish peroxidase</i>)
PDDA	Poli(cloreto de dialildimetilamônio) (do inglês, <i>poly(diallyldimethylammonium chloride)</i>)
PEEK	Poliéter éter cetona (do inglês, <i>polyether ether ketone</i>)
%	Porcentagem
ER+	Positividade para receptor de estrógeno
<i>E</i>	Potencial
pH	Potencial hidrogeniônico
RLA	<i>Radioligand Binding Assay</i>
RE	Receptores de estrógeno
ER α	Receptor de estrógeno alfa (do inglês, <i>estrogen receptor alpha</i>)
ER β	Receptor de estrógeno beta (do inglês, <i>estrogen receptor beta</i>)
BI-RADS®	Relatório de imagem da mama e sistema de dados (do inglês, <i>Breast Imaging-Reporting and Data System</i>)
s	Segundos

PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>Phosphate Buffer Saline</i>)
TW20	Tween-20
mol	Unidade de quantidade de matéria
V	Velocidade de varredura
V	<i>Volt</i>

Lista de Tabelas

TABELA 4. 1: Estudo da influência do diâmetro dos eletrodos descartáveis construídos. Valores de corrente anódica média e RSD para cada diâmetro, obtidos dos voltamogramas cíclicos da FIGURA 4.1.....	45
TABELA 4. 2: Valores de áreas eletroativas para os eletrodos sem e com modificação, calculados pela Equação de Randles-Sevcik.....	52
TABELA 4. 3: Valores de correntes de pico com respectivos desvios-padrão e desvios-padrão relativos para vazões de 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{L min}^{-1}$ (n=8).	58
TABELA 4. 4: Figuras de mérito para o biossensor desenvolvido.	60

Lista de Figuras

FIGURA 1. 1: Representação esquemática das etapas da carcinogênese. Adaptado da referência 8.....	3
FIGURA 1. 2: Representação esquemática da anatomia da mama feminina. Extraído e adaptado de Beyou Medical Group ¹³	5
FIGURA 1. 3: Principais funções dos domínios presentes no ER α	12
FIGURA 1. 4: Representação esquemática dos componentes de um biossensor. Figura extraída e adaptada da referência 59.....	14
FIGURA 1. 5: Representação esquemática de um imunossensor eletroquímico do tipo sanduíche. A) Os anticorpos primários são imobilizados sobre o eletrodo. B) Os antígenos presentes na amostra, ao entrarem em contato com os anticorpos primários, os reconhecem e ligam-se. C) Anticorpos secundários marcados com enzima interagem com o antígeno.	15
FIGURA 1. 6: Representação esquemática do processo de fabricação de eletrodos descartáveis por serigrafia. Extraído e adaptado da referência 98.	18
FIGURA 1. 7: Células eletroquímicas descartáveis desenvolvidas por AFONSO <i>et al.</i> Extraído e adaptado da referência 82.....	19
FIGURA 3.1: Representação esquemática das etapas de modificação das partículas magnéticas.	25
FIGURA 3. 2: Fotografia da estante utilizada para a separação magnética. A) Vista frontal e B) lateral.....	26
FIGURA 3. 3: Representação esquemática das etapas de construção dos eletrodos de trabalho pelo método de serigrafia.	28
FIGURA 3. 4: Fotografia dos eletrodos de trabalho finalizados.	28
FIGURA 3. 5: Representação esquemática das etapas de construção dos eletrodos de referência e auxiliar pelo método de serigrafia.	29
FIGURA 3. 6: Representação esquemática da montagem do dispositivo microfluídico e fotografia do dispositivo pronto com suas ranhuras.....	30
FIGURA 3. 7: Reações de acoplamento da AuNP-GSH com dsDNA-ERE via EDC/NHS sobre os eletrodos de trabalho. A amina primária exemplificada é o dsDNA-ERE. Adaptado da referência 116.	32
FIGURA 3. 8: Representação esquemática da imobilização do dsDNA-ERE sobre os eletrodos de carbono.	33
FIGURA 3. 9: Fotografia dos eletrodos de carbono imobilizados com dsDNA-ERE. Formação de <i>microwells</i>	33

FIGURA 3. 10: Representação esquemática da obtenção do bioconjugado (ER α)Ant-ER α -PM-HRP obtido por meio da captura da proteína com a partícula magnética decorada.	35
FIGURA 3. 11: Representação esquemática da captura da proteína -ER α com a partícula magnética decorada Ant-ER α -PM-HRP.	35
FIGURA 3. 12: Fotografia do sistema microfluídico utilizado.	36
FIGURA 3. 13: Representação esquemática da ligação da proteína ER α no dsDNA-ERE (cor roxa). A ligação é realizada por meio dos dedos de zinco, apresentados em cor de rosa. Extraído de Structural Biology Knowledgebase ¹²⁶	37
FIGURA 3. 14: Representação esquemática da etapa de interação entre a proteína capturada pela partícula magnética modificada ((ER α)Ant-ER α -PM-HRP) e o dsDNA-ERE no eletrodo de carbono.	37
FIGURA 3. 15: Fotografia da lavagem do biossensor com tampão PBS 0,001 mol L ⁻¹ com TW20 0,05% pH 6,5 e 0,1% BSA para retirada das partículas magnéticas decoradas que não foram ligadas. Nota-se a saída dessas partículas à direita da cela microfluídica, de coloração marrom.	38
FIGURA 3. 16: Representação esquemática da modificação da superfície dos eletrodos de carbono com PDDA, AuNP-GSH e HRP.	39
FIGURA 3. 17: Representação esquemática das reações envolvidas no ensaio de quantificação de proteína total utilizando o kit BCA.	41
FIGURA 4. 1: Voltamogramas cíclicos referentes a uma célula eletroquímica descartável testada para cada diâmetro, utilizando A) 0,7 B) 1,0 C) 1,5 D) 2,0 e E) 2,5 mm. Voltametria cíclica realizada em ácido ferrocenomonocarboxílico 1 mmol L ⁻¹ em KCl 0,5 mol L ⁻¹ , intervalo de potencial de 0 a 0,6 V. $v=50$ mV s ⁻¹	44
FIGURA 4. 2: Voltamogramas cíclicos referentes a um eletrodo da célula eletroquímica descartável, sem modificação. Solução de ácido ferrocenomonocarboxílico 1 mmol L ⁻¹ em KCl 0,5 mol L ⁻¹ , intervalo de potencial de 0 a 0,6 V.	47
FIGURA 4. 3: Relação logarítmica da corrente de pico anódico média e a velocidade de varredura de potenciais para eletrodos sem modificação, resultados obtidos da FIGURA 4.2.	48
FIGURA 4. 4: Voltamogramas cíclicos referentes a um eletrodo da célula eletroquímica descartável, modificado com PDDA e AuNP-GSH. Solução de ácido ferroceno monocarboxílico 1 mmol L ⁻¹ em KCl 0,5 mol L ⁻¹ , intervalo de potencial de 0 a 0,6 V.	49

FIGURA 4. 5: Relação logarítmica da corrente de pico anódico média e velocidade de varredura de potenciais para eletrodos modificados.....	50
FIGURA 4. 6: Relação linear entre a corrente de pico anódica média e a raiz da velocidade de varredura para eletrodos sem modificação.	51
FIGURA 4. 7: Relação linear entre a corrente de pico anódico média e a raiz quadrada da velocidade de varredura para eletrodos modificados com PDDA e AuNP-GSH.....	52
FIGURA 4. 8: Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de H_2O_2 $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e HQ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão PBS pH 6,5 para os eletrodos modificados com PDDA e AuNP-GSH na presença e ausência de HRP. Intervalo de potencial de 0,1 a $-0,45 \text{ V}$ e $v= 20 \text{ mV s}^{-1}$	54
FIGURA 4. 9: Sinais transientes de corrente dos eletrodos imobilizados com HRP. Injeção de solução de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de HQ e $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ H_2O_2 em tampão PBS pH 6,5. Vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$, alça de amostragem de $100 \mu\text{L}$ e potencial fixado em $-0,2 \text{ V}$	55
FIGURA 4. 10: Representação esquemática do mecanismo de resposta do imunossensor.....	56
FIGURA 4. 11: Sinais transientes de corrente individuais referentes ao estudo da vazão. Resultado de um único eletrodo dentre os oito que compõe a célula eletroquímica descartável. Concentração de ER α de $138,8 \text{ fg mL}^{-1}$	57
FIGURA 4. 12: Curva analítica para ER α em soro de bezerro, dada pela corrente em função do logaritmo da concentração de ER α . Realizada com concentrações de 16,6; 27,7; 55,5; 94,4; 138,8; 194,4 e $513,3 \text{ fg mL}^{-1}$ de proteína.....	59
FIGURA 4. 13: Sinais transientes de corrente individuais referentes à curva analítica.	59
FIGURA 4. 14: Determinação da concentração de ER α em amostra real de lisado de células MCF-7 por adição de padrões fortificados com 16,6; 27,7; 55,5; 111,1 e $333,3 \text{ fg mL}^{-1}$ de proteína. Concentração de ER α encontrada: $0,06 \text{ fg mL}^{-1}$	61

Resumo

DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR DESCARTÁVEL ACOPLADO A UM SISTEMA MICROFLUÍDICO PARA DETERMINAÇÃO DE UM BIOMARCADOR TUMORAL. O câncer de mama é o tipo mais comum de câncer entre as mulheres e resulta, em 70% dos casos, na superexpressão do biomarcador tumoral receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$). No presente trabalho, foi desenvolvido um imunossensor eletroquímico descartável, sensível e de baixo custo, acoplado a um sistema microfluídico, como uma alternativa para se determinar $ER\alpha$, uma vez que, não há relatos sobre a determinação desse composto usando esse método na literatura. O imunossensor foi desenvolvido pelo método de serigrafia, compondo de um eletrodo de referência, um contra-eletrodo e um arranjo de oito eletrodos de trabalho, todos descartáveis. Os eletrodos de trabalho foram modificados por *layer-by-layer* com cloreto de poli(dialildimetilamônio) (PDDA) e nanopartículas de ouro decoradas com glutathione (AuNP-GSH), a fim de sustentar, por ligação covalente, uma dupla fita de DNA contendo um elemento de resposta de estrógeno (dsDNA-ERE). Ainda, utilizam-se partículas magnéticas contendo milhares de enzimas e anticorpos, no qual as enzimas foram responsáveis pela resposta indireta do imunossensor e os anticorpos capturaram o analito na amostra. Uma vez capturado o analito, estes interagiram com o dsDNA-ERE imobilizado na superfície dos eletrodos de trabalho. Em intervalo linear de 16,6 a 513,3 fg mL⁻¹ foram obtidos limite de detecção de 10,0 fg mL⁻¹, limite de quantificação de 16,89 fg mL⁻¹ e sensibilidade de 7,7 nA mL fg [$ER\alpha$]⁻¹. Por fim, foi possível testar o imunossensor frente a uma amostra real de lisado de células MCF-7, o que evidenciou que o dispositivo é uma escolha promissora para uso no tratamento e possível diagnóstico precoce do câncer de mama.

Abstract

DEVELOPMENT OF A DISPOSABLE IMMUNOSENSOR COUPLED WITH MICROFLUIDIC SYSTEM FOR A TUMORAL BIOMARKER DETERMINATION. Breast cancer is the most common type of cancer among women and results in 70% of cases of estrogen receptor alpha (ER α) overexpression, a tumor biomarker. In the present study we developed a sensitive and low cost disposable electrochemical immunosensor, coupled with a microfluidic system, as an alternative to determine ER α , since there are no reports on the determination of this compound in the literature using this method. The immunosensor was developed by the screen printing method, comprising a reference electrode, a counter electrode and an array of eight working electrodes, all disposable. The working electrodes were modified by layer-by-layer with poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA) and gold nanoparticles decorated with glutathione (AuNP-GSH), in order to support, by covalent bond, a double-stranded DNA containing an estrogen response element (dsDNA-ERE). Also, we use magnetic particles containing thousands of antibodies and enzymes, wherein the enzymes are responsible for indirect response from the immunosensor and antibodies are used to capture the analyte in the sample. Once that the analyte is captured, it interacts with the dsDNA-ERE immobilized on the surface of the working electrode. In the linear range 16.6 to 513.3 fg mL⁻¹ were obtained detection limit of 10.0 fg mL⁻¹, quantification limit of 16.89 fg mL⁻¹ and a sensitivity of 7.7 nA mL fg [ER α]⁻¹. Finally, it was possible to test the immunosensor front of a real sample lysate cells MCF-7, which showed that the device is a promising choice for use in the treatment and possible early diagnosis of breast cancer.

Sumário

1	- INTRODUÇÃO.....	2
1.1	- Considerações gerais.....	2
1.2	- Câncer.....	2
1.3	- Câncer de mama.....	4
1.4	- Biomarcadores tumorais.....	10
1.4.1	- Biomarcadores para câncer de mama.....	10
1.5	- Biossensores.....	13
1.6	- Partícula magnética.....	16
1.7	- Eletrodos descartáveis.....	17
1.7.1	- Serigrafia.....	17
1.8	- Sistema microfluídico.....	19
2	- OBJETIVO.....	21
3	- PARTE EXPERIMENTAL.....	23
3.1	- Materiais e reagentes.....	23
3.2	- Instrumentação.....	24
3.3	- Modificação das partículas magnéticas para a formação de Ant-ER α – PM – HRP.....	25
3.4	- Construção dos eletrodos descartáveis.....	27
3.4.1	- Eletrodos de trabalho.....	27
3.4.2	- Eletrodos de referência e auxiliar.....	28
3.5	- Montagem do dispositivo microfluídico.....	29
3.6	- Síntese das nanopartículas de ouro decoradas com glutathiona.....	30
3.7	- Imobilização do dsDNA-ERE sobre os eletrodos de trabalho.....	31
3.8	- Captura da proteína ER α com a partícula magnética decorada Ant-ER α -PM-HRP.....	34
3.9	- Interação entre os eletrodos de trabalho modificados e as partículas magnéticas contendo ER α	35

3.10 – Aplicação do dispositivo microfluídico descartável na detecção de ER α	38
3.11 – Avaliação da imobilização da enzima <i>horseradish peroxidase</i> e desempenho do sistema microfluídico.....	39
3.12 - Estudo da influência da vazão.....	40
3.13 – Determinação da concentração de ER α em lisado de células MCF-7	40
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 - Estudo da influência do diâmetro dos eletrodos de trabalho	43
4.2 – Estudo da influência da velocidade de varredura de potenciais na resposta eletroquímica dos eletrodos descartáveis desenvolvidos.....	46
4.2.1 - Estudo da influência da velocidade de varredura de potenciais para eletrodos de trabalho sem modificação.....	46
4.2.2 - Estudo da influência da velocidade de varredura de potenciais para eletrodos de trabalho modificados com PDDA e AuNP-GSH.....	48
4.3 - Estudo da área eletroativa	50
4.4 - Avaliação da imobilização da enzima <i>horseradish peroxidase</i> e desempenho do sistema microfluídico.....	53
4.5 - Estudo da influência da vazão.....	56
4.6 - Curva analítica.....	58
4.7 – Determinação da concentração de ER α em lisado de células MCF-7	60
5 – CONCLUSÕES	63
6 – PERSPECTIVAS FUTURAS.....	65
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

Capítulo 1
Introdução

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações gerais

O desenvolvimento de novos dispositivos e métodos analíticos para a determinação de biomarcadores tumorais tem proporcionado ampla discussão e visibilidade atualmente na comunidade científica. Isso ocorre devido a importância dos biomarcadores no diagnóstico precoce, direcionamento de tratamento e monitoramento do câncer. Um método rápido, sensível e de baixo custo que detecte biomarcadores específicos para determinado tipo de câncer é muito importante, uma vez que, esta doença envolve elevados custos ao sistema público de saúde, em especial quando o seu diagnóstico é realizado tardiamente.

1.2 - Câncer

O câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças, e é caracterizado por mutações no material genético que levam ao crescimento descontrolado de células anormais, de modo que elas desenvolvam resistência à morte celular programada, a chamada apoptose. A doença pode ocorrer em qualquer local do organismo e também pode se espalhar, ultrapassando os limites dos tecidos de origem e estabelecendo novos tumores, processo denominado de metástase¹.

Quando o tumor não é de caráter metastático e entende-se que o seu crescimento ocorre lentamente e suas células são semelhantes àquelas que o origina, é denominado de tumor benigno (neoplasia benigna). O tumor benigno pode ser removido para curar o paciente. O tumor maligno (neoplasia maligna) é assim designado quando tem a capacidade de formar metástases, o que pode ocorrer quando o tumor benigno não foi tratado².

Apesar de não haver causas concretas que levem à doença, acredita-se que fatores externos como tabagismo^{3,4}, alcoolismo⁵ e má alimentação⁶ podem estar relacionados aos mais diversos tipos de câncer. Fatores internos

como baixa imunidade e herança genética também podem predispor ou promover o câncer, no qual células normais se transformam em células cancerígenas, processo denominado de carcinogênese¹.

A carcinogênese ocorre em três etapas conforme pode ser ilustrado na FIGURA 1.1: iniciação, promoção e progressão. A iniciação tem origem genética, podendo ser herdada ou adquirida por meio dos agentes cancerígenos (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas, N-nitrosaminas, determinados vírus, entre outros⁷), que modificam os genes do indivíduo. Na segunda etapa, a promoção, as células modificadas geneticamente sofrem ação dos agentes cancerígenos chamados de oncopromotores. Esses agentes tornam o processo de divisão celular de característica maligna, porque são capazes de formar novos vasos sanguíneos, o que desencadeará metástases. Por fim, a etapa de progressão é composta pela multiplicação descontrolada e irreversível das células já alteradas⁸.

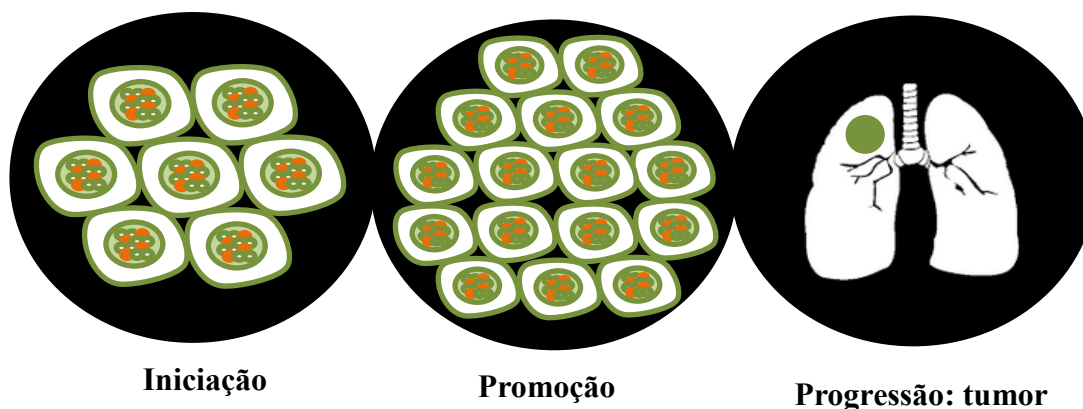


FIGURA 1. 1: Representação esquemática das etapas da carcinogênese. Adaptado da referência 8.

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, o INCA, acredita-se que em 2030 haverá 21,4 milhões de novos casos de câncer no mundo, sendo 13,2 milhões de mortes⁹. Para o ano de 2015, foram estimados 1.658.370 novos casos de câncer nos Estados Unidos, totalizando 589.430 mortes segundo o National Cancer Institute. O país gastou, em 2010, US\$125 bilhões de dólares e,

avalia-se um gasto de US\$156 bilhões de dólares em 2020 com o câncer de um modo geral¹⁰.

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, o INCA, em 2014 foram relatados 576.580 casos de câncer no Brasil, sendo 299.730 casos só na região Sudeste. Dentre estes casos de câncer, 182 mil foram referentes à pele (não melanoma), seguidos pela próstata (69 mil), mama feminina (57 mil) e, posteriormente, cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo de útero (15 mil). Para o ano de 2016, são previstos 596 mil novos casos de câncer no Brasil, totalizando 295.200 casos em homens e 300.800 em mulheres¹¹.

O segundo tipo de câncer mais presente no mundo, sendo o que mais acomete as mulheres, é o câncer de mama⁹. Devido à sua grande expressividade tanto no Brasil quanto no mundo, nesta dissertação de mestrado foi dada ênfase a esta neoplasia.

1.3 – Câncer de mama

O câncer de mama (neoplasia maligna de mama) tem origem no revestimento interno dos dutos de leite ou lóbulos que podem ser alimentados com leite (FIGURA 1.2). Por essa razão, dependendo do local, ele é conhecido como câncer de mama ductual ou câncer de mama lobular¹².

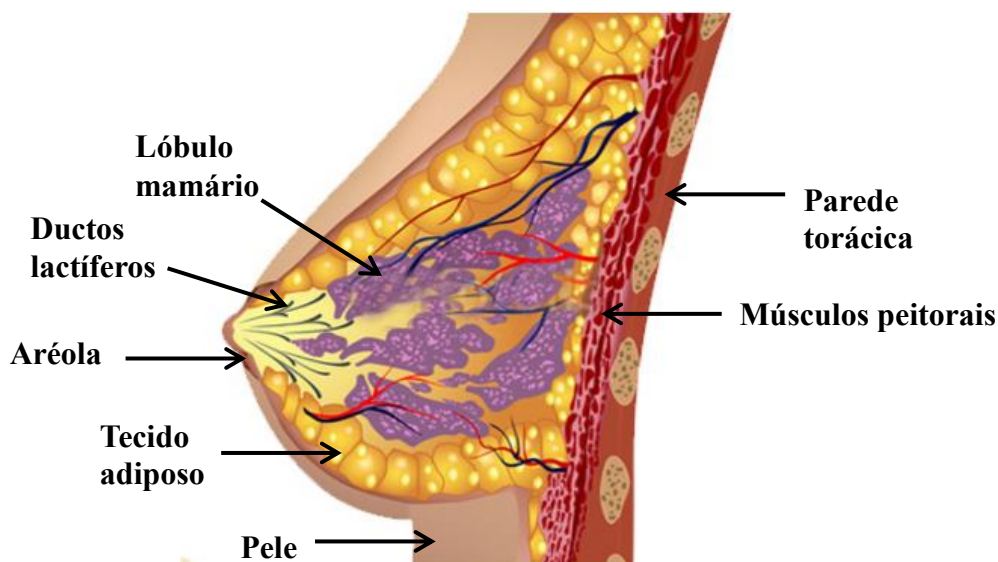


FIGURA 1. 2: Representação esquemática da anatomia da mama feminina. Extraído e adaptado de Beyou Medical Group¹³.

Os tipos mais presentes de câncer de mama são *in situ* ou invasivos, sendo eles: câncer de mama ductal *in situ*, câncer de mama ductal invasivo, câncer de mama lobular *in situ* e câncer de mama lobular invasivo. Ainda, existem outros tipos de câncer de mama menos frequentes, como o câncer de mama inflamatório, o câncer de mama misto ductal/lobular invasivo e o câncer de mama em homens^{14,15}. Os do tipo invasivos são mais frequentes e caracterizados pela presença acentuada de receptores de estrógeno, ou seja, possuem positividade frente a esses receptores (ER+) e são propensos à metástase. Os do tipo *in situ* não tendem a invadir outros órgãos, porém podem se agravar e se transformar em invasivos¹⁶.

O câncer de mama em homens acomete aproximadamente 1% de todos os casos de câncer de mama. Das 14.388 mortes decorrentes da doença em 2013 no Brasil, 181 eram homens¹⁷. Esse grupo é caracterizado por apresentar neoplasia avançada no momento do diagnóstico e também pela alta incidência do tipo *in situ*¹⁴.

A partir do conhecimento do tipo de câncer de mama, este pode ser caracterizado de acordo com a presença de receptores hormonais (receptores de estrógeno e progesterona), além do grau de expressão da proteína HER-2

(*Human Epidermal growth factor Receptor 2*). Essas informações têm implicações no prognóstico e na terapia da doença e são independentes do estágio do câncer¹⁸.

Por meio da técnica de imuno-histoquímica, que localiza os antígenos em tecidos biológicos a partir da interação antígeno-anticorpo¹⁹, pode-se observar a presença de receptores de estrógeno (RE) no tecido mamário, o que indica que o câncer é ER+. O câncer ER+ exibe prognóstico mais otimista do que o câncer que não apresenta RE (ER-)²⁰ e requer terapias endócrinas (hormonioterapia) para seu tratamento, os quais são mais utilizados inibidores de aromatase e Tamoxifen, um anti-estrógeno¹⁸. Quanto à proteína HER-2, seu prognóstico é mais pessimista. Ela é superexpressada em 25 a 30% dos cânceres de mama invasivos, 50% dos cânceres de mama inflamatórios e em 60 a 70% dos cânceres de mama ductuais *in situ*, além de estar relacionado com a ausência dos RE²¹⁻²³. Quando se notam aumentos nas expressões de HER-2, que pode ser avaliada por imuno-histoquímica no tecido mamário da paciente, recomenda-se hormonioterapia e quimioterapia²⁴. FEHM *et al.* estudaram os níveis de HER-2 em soro, células de tumor circulantes (CTC, do inglês *Circulating Tumor Cells*) e tecido metastático, apresentando 71% de concordância entre os níveis da proteína no soro e nas CTCs²⁵.

Os fatores de risco para o câncer de mama em mulheres, além dos fatores internos e externos já citados para o câncer em geral, consistem na exposição prolongada aos hormônios femininos (menarca precoce e menopausa tardia), uso de terapia de reposição hormonal²⁶, histórico familiar, principalmente de mãe e irmãs que tiveram câncer de mama, ausência de filhos (nuliparidade) e a primeira gestação após os 35 anos de idade²⁷. A amamentação é um fator de proteção contra o câncer de mama, uma vez, que os hormônios relacionados à doença têm seus níveis diminuídos nesse período²⁸.

Os principais sintomas e sinais relacionados à neoplasia de mama são: aparecimento de fluidos desconhecidos, endurecimento da mama, erosão da

pele, presença de sulcos e buracos na mama, vermelhidão ou ardor, presença de nódulo interno, aspecto de pele de laranja, assimetria, afundamento do mamilo, aparecimento de protuberâncias na mama e de veias crescentes^{29,30}.

Quando a mulher percebe tais sintomas e sinais, ela é encaminhada para exames como mamografia, biópsia por punção ou retirada de tecido mamário para análise, tomografia, ressonância magnética e exames de sangue. Quando a paciente tem menos de 35 anos, recorre-se à ultrassonografia^{31,32}. Tais exames são necessários para avaliar a presença da doença e, em caso positivo, o estágio em que se encontra. Os exames de sangue são recomendados para detecção de biomarcadores tumorais, que são substâncias, processos ou estruturas que preveem a influência ou a incidência de doenças³³. As biópsias requeridas para informações específicas das condições da mama podem ser obtidas removendo-se uma amostra de célula, tecido ou a própria protuberância que houver no seio. Os diferentes tipos de biópsias a que se pode recorrer são: punção aspirativa por agulha fina³⁴, biópsia por agulha grossa³⁵, biópsia assistida a vácuo (mamotomia)³⁶ e biópsia cirúrgica³⁷.

Por meio de exames de ultrassonografia, ressonância magnética e mamografia, os médicos emitem no laudo uma avaliação BI-RADS®, que consiste de uma classificação padronizada em todo o mundo sobre as condições da mama da paciente. Suas categorias de classificação vão de 0 a 6, na qual 0 indica que novos exames deverão ser realizados, pois o atual foi inconclusivo. A categoria 1 indica que o médico não encontrou nada irregular na paciente e, na categoria 2, é evidenciado algo que o especialista considera benigno. Na classificação 3, o médico tem quase certeza que a alteração na mama da paciente é benigna, por isso, apenas a cada seis meses ela deve repetir o exame. Nesta classificação, a chance do paciente ter câncer de mama é de aproximadamente 2%. Na categoria 4, é recomendado biópsia para avaliar o material mamário e indicar a terapia necessária. A biópsia também é indispensável quando o índice BI-RADS® é 5 e o médico tem 95% de certeza de que a paciente está acometida

de um tumor maligno. Quando a paciente está na categoria 6, o diagnóstico de câncer de mama já existe^{38,39}.

Uma vez diagnosticado, o câncer de mama pode existir em cinco estágios, que indicam o grau de desenvolvimento da doença no organismo da paciente. Tais estágios podem apresentar-se em sub-estágios, que levam em consideração o status do tumor primário (T), o acometimento de linfonodos (N) e a presença de metástases à distância (M), chamado de classificação TNM⁴⁰. A partir do conhecimento do estágio do câncer, pode-se encontrar o tratamento adequado.

O estágio inicial consiste em um carcinoma *in situ* (estágio 0), no qual o lobular é caracterizado por um crescimento anormal dos tecidos nos lóbulos da mama, observado por microscopias. Ele não progride, mas aumenta o risco de tornar-se um carcinoma invasivo, diferentemente do que acontece nos dutos, uma vez que estes podem se tornar invasivos mais rapidamente. No caso do carcinoma lobular *in situ*, tratamentos locais e sistêmicos não são indicados, ao invés disso, opta-se pela mamografia anual e exames clínicos da mama a cada seis meses, além de uso de moduladores de receptores de estrógeno, como o Tamoxifen, quando o câncer é ER+. Quando o carcinoma é ductual *in situ*, é aconselhada cirurgia conservadora da mama e radioterapia. Tal cirurgia retira apenas os fragmentos doentes da mama, permanecendo os saudáveis. Ao contrário do carcinoma lobular *in situ*, não é recomendado Tamoxifen⁴¹.

Os estágios I e II remetem-se a carcinomas invasivos em períodos iniciais e o tratamento indicado é a mastectomia (retirada total da mama), para pacientes com alto risco, ou a cirurgia conservadora da mama seguida de radioterapia, que diminui a recidiva local (retorno do tumor) e melhora as taxas de sobrevivência. Por preferências pessoais ou contraindicações à radiação, a paciente pode optar pela mastectomia. A partir desses estágios, os linfonodos axilares (gânglios da axila que são áreas de drenagem por onde as células malignas podem circular, além da mama) também são avaliados, geralmente por

biópsias e, dependendo do resultado, podem direcionar o tratamento. A quimioterapia é requerida quando o câncer é ER- e terapias endócrinas fazem-se necessárias quando o câncer é ER+. Quando a mulher está em período pré-menopausal, pode-se cogitar a ooforectomia (retirada dos ovários) a fim de cessar a produção de hormônios e suavizar o estado do câncer⁴¹.

O estágio III engloba o tumor localmente avançado, caracterizado por tamanho maior do que 5 cm, grande envolvimento dos gânglios axilares, parede torácica ou pele, câncer de mama inflamatório e tumores considerados inoperáveis, porém, não metastáticos. Neste estágio, pode ser recomendada quimioterapia antes da cirurgia conservadora, o que melhora a aparência da mama, mas pode aumentar a recidiva. Porém, a recidiva não aumenta enquanto a cirurgia faz parte do tratamento. A mastectomia é uma opção quando o paciente não responde à quimioterapia e as terapias endócrinas podem ser sugeridas após a cirurgia ou, quando a paciente é idosa e não cabe a intervenção cirúrgica⁴¹.

Quando o câncer chega à metástase, ele atinge o estágio IV. A radioterapia juntamente com hormonioterapia e quimioterapia podem aliviar a dor de complicações ósseas. A mastectomia também pode ser indicada a fim de evitar a recidiva, que pode ocorrer entre 5 e 10 anos⁴¹.

É importante salientar que são previstos para 2016, 57.960 novos casos de câncer de mama no Brasil, sendo o mais comum entre as mulheres da região Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste, com exceção do câncer de pele não melanoma. Na região Norte, o câncer de mama é o segundo mais frequente¹¹.

Atualmente, os exames clínicos e o autoexame da mama são os que mais auxiliam no diagnóstico precoce do câncer de mama, visto que a mulher pode detectar, em alguns casos, certa anomalia mamária. A mamografia bienal é indicada para as mulheres entre 50 e 69 anos e o exame clínico das mamas é anual para mulheres a partir dos 40 anos. Tais medidas são estratégias atuais para o diagnóstico do câncer de mama em mulheres com risco padrão. Para as

mulheres consideradas de grupo de alto risco, recomenda-se que os exames citados sejam iniciados a partir dos 35 anos⁹. Uma vez que o câncer é um problema de saúde pública e, como muitas vezes não apresenta sintomas evidentes, o diagnóstico precoce é sempre a melhor chance de cura. Esse diagnóstico precoce pode ser mais efetivo quando são observados biomarcadores tumorais em fluidos corporais.

1.4 - Biomarcadores tumorais

Os biomarcadores tumorais são substâncias que aparecem ou estão em concentrações irregulares (aumentadas ou diminuídas) no sangue, urina, tumor ou demais fluidos corporais. Eles podem ser carboidratos, proteínas, hormônios, entre outros e auxiliam na detecção, diagnóstico e prognóstico do câncer de um modo geral¹². Como exemplos de biomarcadores, tem-se o PSA (antígeno prostático específico, do inglês *Prostatic Specific Antigen*) e o EN2 (do inglês *Engrailed-2*) para câncer de próstata^{42,43}.

1.4.1 - Biomarcadores para câncer de mama

Os biomarcadores para câncer de mama são uma ótima alternativa para determinar a presença da malignidade de um tumor, detecção precoce, prognóstico, ou avaliar a resposta do câncer frente a tratamentos como radioterapia e quimioterapia, além de monitorar a progressão da doença¹⁸. Infelizmente, as biópsias as quais são submetidas as pacientes acometidas com esse tipo de câncer são invasivas e apresentam riscos de infecção, desenvolvimento de cicatrizes depois do procedimento e, às vezes, a quantidade de material que é retirada não é suficiente para o diagnóstico, sendo necessário refazê-la. Por outro lado, as tomografias e ressonância magnética apresentam custos bastante elevados e, em geral, estes exames possuem acesso limitado, em especial, no sistema público de saúde devido ao número reduzido de equipamentos disponíveis.

Existe uma gama de biomarcadores para o câncer de mama, como por exemplo, o CA15-3 (antígeno para câncer 15-3), CA125 (antígeno para câncer 125), HER-2 (fator de crescimento epidérmico humano 2, do inglês *Human Epidermal growth factor Receptor 2*), receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP), entre outros^{12,44}. Uma vez que a presença de receptores de estrógeno caracteriza o tipo de câncer de mama que mais acomete a população, a determinação desse biomarcador é fundamental¹².

1.4.1.1 – Receptores de estrógeno

Os receptores de estrógeno são provavelmente os biomarcadores mais úteis para o direcionamento da terapia do câncer de mama, sendo encontrado em até 60% das pacientes até 50 anos e 80% em pacientes com mais de 50 anos¹². Pertencem à superfamília de receptores nucleares, se estabelecem no núcleo celular e reconhecem o estrógeno e outras moléculas de sinalização que atravessam a célula e chegam até o núcleo, uma vez que, são lipossolúveis. Tais receptores podem existir na estrutura alfa (ER α) e beta (ER β).

O ER α é uma proteína composta por 595 aminoácidos, de massa molecular 66 kDa. Esse biomarcador pode ser encontrado nos tecidos cancerígenos e também na corrente sanguínea, por meio das CTC⁴⁴. Eles estão presentes em até 70% das mulheres com câncer de mama e auxiliam principalmente na decisão do tratamento da paciente¹². Como o ER α é expressado em grande quantidade na maioria dos casos desse câncer, ele pode auxiliar no diagnóstico precoce da doença. O ER α também pode ser encontrado na linhagem de células de câncer de mama MCF-7, derivada de uma efusão pleural de um paciente com câncer de mama metastático^{45,46}.

A relação hormonal do câncer de mama foi observada pela primeira vez por BEATSON⁴⁷ em 1896. Ele realizou uma ooforectomia bilateral (cirurgia de retirada dos dois ovários) em três pacientes com câncer de mama avançado e notou a regressão da doença, evidenciando que esse tipo de câncer tinha ligações

hormonais, e são produzidos nesse órgão. Atualmente, sabe-se que o ER α atua na proliferação das células cancerígenas⁴⁸.

Dentro das células, acontece o seguinte mecanismo: quando o hormônio estrógeno penetra na célula, este reconhece o RE em seu domínio E (FIGURA 1.3), carboxi-terminal, formando um dímero. O dímero liga-se ao DNA presente no núcleo da célula na área de domínio C da proteína, por meio de átomos de zinco em sua estrutura, região denominada de “dedos de zinco”. Com esses fenômenos ocorrendo, tem-se a resposta estrogênica na célula^{49,50}.

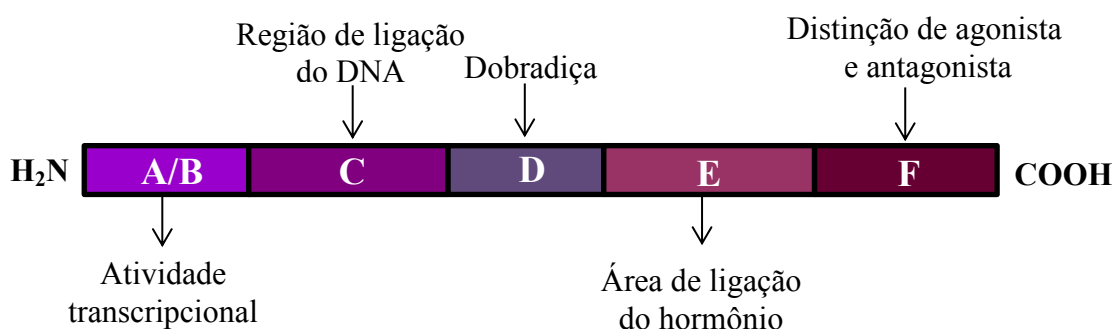


FIGURA 1. 3: Principais funções dos domínios presentes no ER α .

O domínio A/B é amino-terminal, no qual encontra-se a função de ativação da transcrição gênica. A região D funciona como dobradiça e está envolvida na dimerização do receptor. O domínio F é carboxi-terminal e é responsável por distinguir a ação de estrógenos agonistas ou antagonistas de moléculas que se ligam aos receptores. O medicamento Tamoxifen, muito utilizado no tratamento do câncer de mama do tipo ER+, atua como antagonista, impedindo que haja comunicação entre os receptores e o DNA, evitando a proliferação das células cancerosas⁵¹.

O valor de referência para ER α no soro humano não é definido. Em extratos celulares, alguns estudos relatam 10 fmol mg⁻¹ para a proteína no citosol por meio da técnica de LBA (*Ligand-Binding Assay*)⁵² e 0,1 fmol μ g⁻¹ de DNA para a proteína no núcleo por meio da técnica de EIA (*Enzyme Imunnoassay*) e RLA (*Radioligand Binding Assay*)⁵³. A falta de uma técnica e metodologia específica para a quantificação de ER α em diferentes matrizes dificulta o

estabelecimento de um valor de referência para a proteína. Ainda, é importante considerar que, durante a vida da mulher, há períodos de grande variação de concentração dos RE e dos hormônios sexuais de modo geral, o que reitera a necessidade de sua determinação.

As técnicas mais utilizadas para a determinação de biomarcadores são as técnicas imuno-histoquímica, ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), Western-Blot, LBA, EIA e RLA. Porém, algumas destas necessitam de biópsia prévia, às vezes grande quantidade de amostras, apresentam custo elevado, longo tempo de análise, além de apresentarem também grandes quantidades de falsos-negativos e falsos-positivos em seus resultados⁵²⁻⁵⁶. O intervalo linear para o kit ELISA vendido comercialmente por uma das marcas mais conhecidas no mercado⁵⁷ é de 600 a 10.000 ng poço⁻¹ para ER α (12 a 200 ng μL^{-1}), cuja sensibilidade é pouco maior do que 600 ng poço⁻¹, ou 12 ng μL^{-1} , portanto, tem sensibilidade limitada quando a maioria dos biomarcadores encontram-se presentes em amostras reais na ordem de picograma ou femtograma por mililitro.

Atualmente, os biossensores são alternativas às técnicas citadas na determinação de biomarcadores, nos quais muitas vezes apresentam menores limites de detecção, menores custos por análise e maiores sensibilidades⁵⁸.

1.5 - Biossensores

O biossensor é um dispositivo composto por uma espécie biológica que reage com uma molécula alvo gerando uma resposta que pode ser medida. Ele é composto por bioreceptores que podem ser enzimas, proteínas, células, entre outras substâncias biológicas, immobilizados junto a um transdutor adequado e que irão reconhecer o analito presente na amostra (figura 1.4). O transdutor é responsável por converter o sinal biológico em um parâmetro físico⁵⁹.

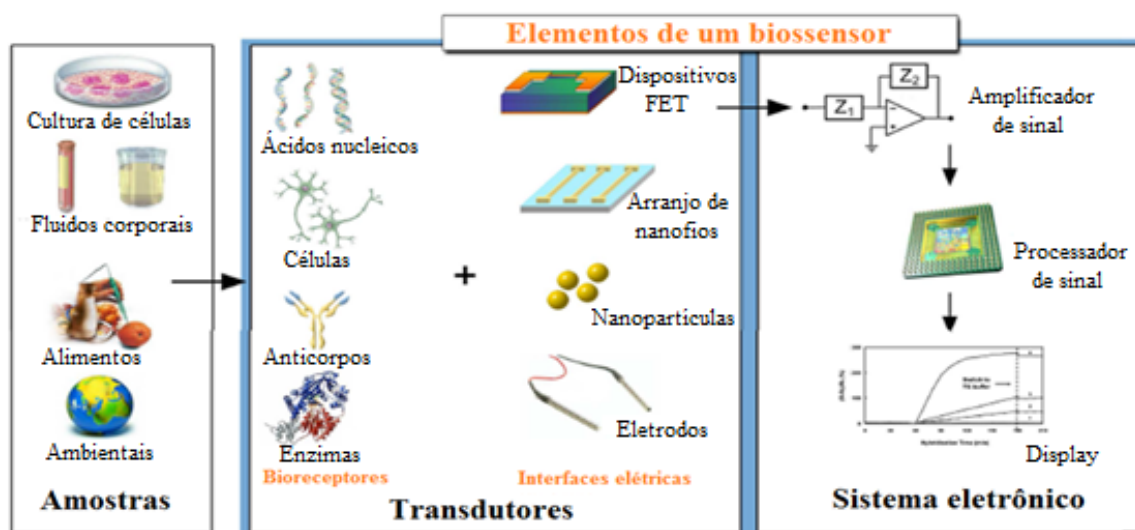


FIGURA 1. 4: Representação esquemática dos componentes de um biossensor. Figura extraída e adaptada da referência 59.

Os biossensores podem ser classificados quanto ao mecanismo de reconhecimento do analito, podendo ser eletroquímico, piezelétrico, térmico ou óptico. Quando o biossensor é eletroquímico, ou seja, quando o transdutor é um eletrodo, este ainda pode ser classificado como voltamétrico, potenciométrico, amperométrico, condutométrico ou impedimétrico, dependendo do tipo de técnica eletroquímica utilizada^{60,61}.

Existem também os biossensores de afinidade, que são classificados de acordo com a interação entre o analito e a camada de reconhecimento biológica⁶². O genossensor, por exemplo, é um tipo de biossensor de afinidade que utiliza o DNA (ácido desoxirribonucleico) ou RNA (ácido ribonucleico) como elemento de reconhecimento^{63,64}. Quando o bioreceptor é um antígeno ou anticorpo e utiliza dessa interação para identificar o analito na amostra, ele é chamado de imunossensor^{65,66}.

O imunossensor eletroquímico do tipo sanduíche, ilustrado na figura 1.5, caracteriza-se por ter dois anticorpos ligados ao antígeno: um anticorpo primário imobilizado na superfície do eletrodo e um anticorpo secundário marcado com uma enzima ou uma espécie redox que é adicionado após a adição do antígeno. A enzima ou espécie redox é necessária para reagir

com o substrato levando ao produto que gera uma resposta indireta⁶². Portanto, a resposta é baseada na reação da enzima ou da espécie redox que foi utilizada, frente a seu substrato e, a quantidade de antígeno é proporcional à quantidade de enzima, que reflete no sinal analítico obtido.

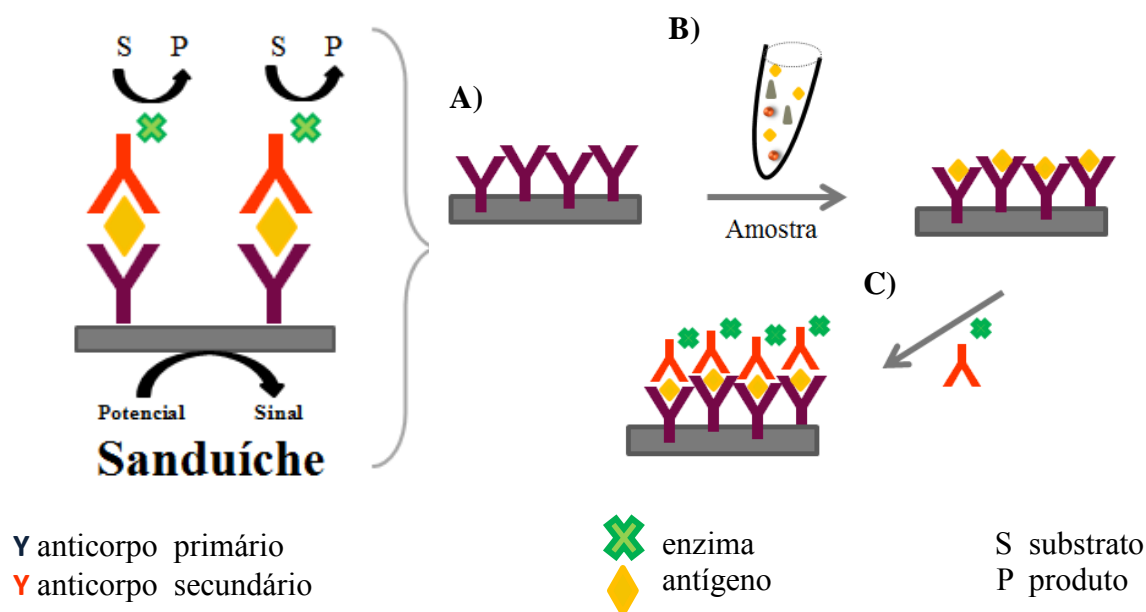


FIGURA 1. 5: Representação esquemática de um imunossensor eletroquímico do tipo sanduíche. A) Os anticorpos primários são imobilizados sobre o eletrodo. B) Os antígenos presentes na amostra, ao entrarem em contato com os anticorpos primários, os reconhecem e ligam-se. C) Anticorpos secundários marcados com enzima interagem com o antígeno.

Na literatura, não é relatado nenhum tipo de imunossensor ou, genericamente, um biossensor eletroquímico para a determinação de ER α . O que se encontram são biossensores eletroquímicos que utilizam o ER α para modificar eletrodos, com o objetivo de determinar estrógeno devido ao reconhecimento dessas espécies entre si^{67,68}. Desse modo, existe a necessidade de se desenvolver um biossensor eletroquímico para ER α e, posteriormente, quantificá-lo em soro humano, para que se tenha um valor de referência.

Biossensores não-eletroquímicos desenvolvidos para a determinação de ER α , podem ser encontrados nos trabalhos de ZHANG *et al.*, cujos autores estudaram as interações entre os RE humanos e os elementos de

resposta estrogênica (ERE) utilizando nanofios de silicone, cujo limite de detecção foi de 10 fmol L^{-1} , alcançado por meio de medidas elétricas⁶⁹. DE *et al.* desenvolveram biossensores baseados em transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET), obtendo limite de detecção da ordem de nmol L^{-1} ⁷⁰. Um método óptico usando fibra de cristal oca para a detecção da proteína ER α foi descrito por PADMANABHAN *et al.*, no qual o biomarcador pôde ser detectado em pequenos volumes, como 50 nL ⁷¹.

1.6 - Partícula magnética

O uso de partículas magnéticas em biossensores têm se tornado cada vez mais significativo. Essas partículas de óxido de ferro (magnetita), sendo elas nanométricas ou micrométricas⁷², garantem pré-concentração, diminuição de interferentes, grande área superficial, captura seletiva do analito de interesse e amplificação de sinal analítico^{73,74}. A separação magnética com ímã permite etapas de lavagem satisfatórias, além de que, muitas espécies podem ser imobilizadas sobre as partículas magnéticas, como anticorpos, enzimas, grupos funcionais, entre outros, devido a grande área superficial e funcionalização destas⁷⁵⁻⁷⁸.

Nos imunossensores eletroquímicos do tipo sanduíche, a relação existente entre o anticorpo secundário e a enzima marcadora é de 1:1. Com o uso das partículas magnéticas, pode-se chegar a relação de milhares de anticorpos secundários e milhares de enzimas para somente um antígeno, o que garante a amplificação do sinal analítico, conforme nota-se nos trabalhos de OTIENO *et al.*⁷⁹ e MALHOTRA *et al.*⁵⁵

CARINELLI *et al.*, desenvolveram um biossensor eletroquímico utilizando partículas magnéticas para a determinação de CD4, obtendo limite de detecção de $44 \text{ células } \mu\text{L}^{-1}$, visando diagnosticar e monitorar a AIDS⁸⁰. BRANDÃO *et al.* apresentam em um estudo de revisão, a detecção multiplexada de patógenos presentes em alimentos, como a *Salmonella enterica*, também

fazendo uso de partículas magnéticas que foram modificadas com diferentes arranjos de espécies biológicas⁸¹.

1.7 - Eletrodos descartáveis

A utilização de eletrodos descartáveis para o desenvolvimento de biossensores vem crescendo continuamente ao longo das últimas décadas devido à facilidade de uso, baixo custo, excelente reprodutibilidade, precisão, confiabilidade e a não necessidade de renovação da superfície eletródica^{82,83}.

Dentre as principais técnicas para obtenção de eletrodos descartáveis, tem-se o método de *silkscreen* ou serigrafia (*screen-printing*)⁸⁴, impressão por jato de tinta⁸⁵⁻⁸⁹, eletrodos de ouro chamados CDtrodos⁹⁰⁻⁹², placas de circuito impresso recobertas com cobre⁹³⁻⁹⁵ e o método chamado de transferência por estampagem (*stamped transfer electrodes - STEs*)⁹⁶.

Os eletrodos descartáveis podem ser confeccionados nos laboratórios de pesquisa de modos simples, práticos e seguros. Durante a construção, a modificação dos eletrodos de trabalho já pode ser iniciada, como por exemplo, utilizando tintas de diferentes composições e propriedades químicas quando empregadas técnicas de impressão por jato de tinta, serigrafia e transferência por estampagem⁹⁷.

1.7.1 - Serigrafia

A técnica de serigrafia, de um modo geral, consiste na impressão de uma tinta que toma a forma de um molde vazado sobre determinado substrato. Este molde é chamado de matriz serigráfica e é composto de uma trama de fios de nylon ou poliéster, fixada em uma moldura (FIGURA 1.6)⁹⁸.

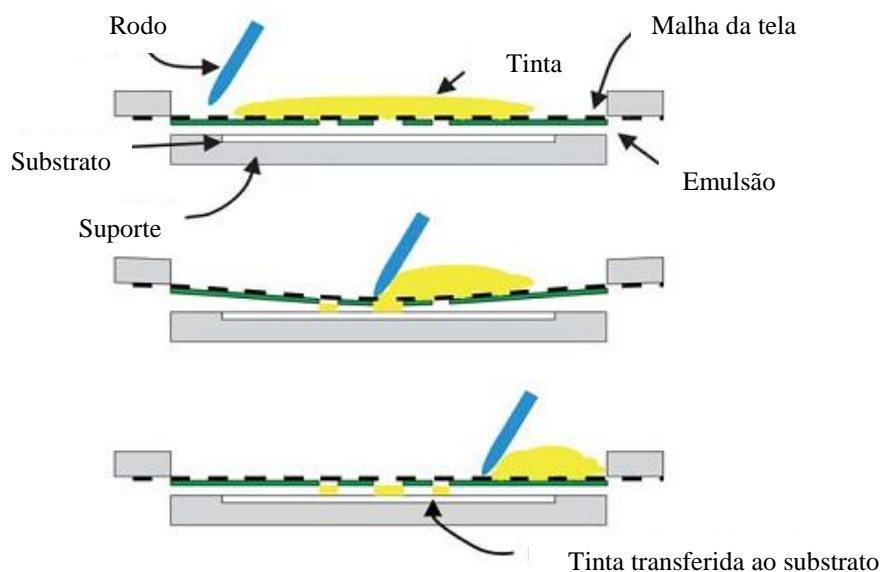


FIGURA 1. 6: Representação esquemática do processo de fabricação de eletrodos descartáveis por serigrafia. Extraído e adaptado da referência 98.

O processo de deposição da tinta sobre o substrato pode ser feito manualmente, porém, é mais comum a utilização de equipamentos automáticos ou semiautomáticos^{99,100}, que levam a desenhos com maior precisão e menor número de defeitos. No entanto, tais equipamentos possuem custo de dezenas de milhares de dólares, requerem o uso de matriz serigráfica desenvolvida em aço inox, o que exige maiores gastos comparados com as desenvolvidas em trama de material polimérico e faz-se necessário técnicos treinados para o manuseio de tais equipamentos. Por conta disso, não houve grande popularização da construção de eletrodos impressos pelos grupos de pesquisa no meio científico. Assim, grande parte dos trabalhos publicados que utilizam eletrodos impressos são adquiridos comercialmente^{73,101-103}, com exceção de alguns grupos que possuem o equipamento apropriado^{99,100,104,105}.

AFONSO *et al.* desenvolveram células eletroquímicas pelo método serigráfico, possibilitando a construção de diferentes formatos de eletrodos, ilustrado na FIGURA 1.7⁸².



FIGURA 1. 7: Células eletroquímicas descartáveis desenvolvidas por AFONSO *et al.* Extraído e adaptado da referência 82.

1.8 - Sistema microfluídico

Associar o uso de eletrodos descartáveis com um sistema microfluídico, que é caracterizado pela utilização de volumes com dimensões micrométricas, traz as vantagens da microfluídica. As principais vantagens são os usos de pequenos volumes de reagentes, amostra e resíduos, fácil utilização, fácil automação, miniaturização, portabilidade, rapidez, boa reprodutibilidade e a não necessidade pessoal especializado para a operação^{79,106-108}.

WHITESIDES reportou as várias contribuições da microfluídica em quatro campos: análise molecular, biodefesa, biologia molecular e microeletrônica, na qual a última dá enfoque aos sistemas compostos por elastômeros devido a facilidade de fabricação e transparência¹⁰⁹.

FAKULNE e FRITSCH desenvolveram imunoenaios eletroquímicos baseados em microcanais de cerâmica que direcionavam a solução de trabalho a eletrodos fabricados por *screen-printed*¹¹⁰.

O sistema microfluídico utilizado durante o mestrado foi composto basicamente por uma bomba de seringa, necessária para propulsionar a solução transportadora e as amostras, um injetor manual contendo alça de amostragem e a célula eletroquímica descartável.

Capítulo 2

Objetivo

2 - OBJETIVO

O objetivo deste projeto foi desenvolver um imunossensor descartável acoplado a um sistema microfluídico para determinação do biomarcador tumoral receptor de estrógeno alfa em soro.

Capítulo 3

Parte Experimental

3 - PARTE EXPERIMENTAL

Para a construção do imunossensor para ER α foram necessárias as seguintes etapas, dadas em ordem cronológica: obtenção das partículas magnéticas decoradas, construção dos eletrodos de trabalho, eletrodo auxiliar e eletrodo de referência, imobilização do dsDNA-ERE sobre os eletrodos de trabalho, captura do biomarcador, interação entre as partículas magnéticas decoradas com proteína e o dsDNA-ERE e, por fim, a detecção eletroquímica. Tais procedimentos foram adaptados de MALHOTRA *et al.*⁵⁵, OTIENO *et al.*⁷⁹ e CHIKKAVEERIAIAH *et al.*¹¹¹.

3.1 – Materiais e reagentes

As soluções foram preparadas utilizando água ultrapura obtida em um sistema Milli-Q® (Millipore, 18,2 M Ω .cm a 25°C, Bedford, Estados Unidos). As partículas magnéticas (PM), compostas por óxido de ferro (magnetita) de aproximadamente 1,5 μ m de diâmetro, foram adquiridas da Polysciences, Inc (Warrington, Estados Unidos), o anticorpo policlonal de receptor de estrógeno alfa (Ant-ER α) da Imuny (Campinas, Brasil) e o receptor de estrógeno alfa (ER α) da Abcam. O 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), foi obtido da Acros Organics, a tinta condutora de grafite da ElectroDag (código 423SS) e tinta condutora de pasta de Ag/AgCl da Gwent (código C2130905D3). Gás nitrogênio foi obtido da empresa Oximatão (São Carlos, Brasil).

O plástico adesivo dupla-face de 0,4 mm de espessura foi obtido da Book Express (São Paulo, Brasil) e as folhas de poliéster da USA Folien (código 7083), adquiridas no mercado local.

O ensaio para determinação do conteúdo total de proteína utilizando ácido bicinonínico (BCA) foi realizado com kit BCA da Thermo Scientific da Thermo Fisher Scientific, o reagente CellLytic da Sigma-Aldrich e meio de cultura RPMI da Vitrocell (Campinas, Brasil).

Para filtração foram utilizadas membranas de filtração molecular de 50 kDa da Merck Millipore (Massachusetts, Estados Unidos).

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico (pureza $\geq 99\%$) provenientes da Sigma-Aldrich (Missouri, Estados Unidos).

3.2 – Instrumentação

As medidas de pH das soluções foram realizadas utilizando-se um pHmetro Digimed modelo DM20, equipado com um eletrodo combinado de vidro Sensoglass SC08. O equipamento de banho ultrassônico utilizado para solubilização das soluções de albumina de soro bovino foi da marca Kondortech. Utilizou-se estufa Ethiktechnology e todas as pesagens foram feitas utilizando-se uma balança analítica BEL Engineering (modelo Mark 210A com precisão de $\pm 0,1$ mg).

Bomba de seringa (New Era), injetor manual (Rheodyne) e tubos e conexões de poliéter éter cetona, PEEK, (IDEX Health & Science, Estados Unidos) foram utilizados para compor o sistema microfluídico.

Para a realização dos experimentos voltamétricos e amperométricos, utilizou-se um multipotenciostato DropSens modelo ustat8000 (Espanha) acoplado a um computador portátil gerenciado pelo software DropView 8400.

Para a leitura de absorvância necessária no ensaio do kit BCA, utilizou-se leitora de placas Labtech, modelo LT-4000MS. As placas usadas foram de culturas de células, de 85,4 x 127,6 mm de dimensão e compostas por 96 poços de 6,4 mm de diâmetro.

Para a construção dos eletrodos descartáveis, utilizou-se impressora de recorte (Silhouette CAMEO), cujos desenhos foram feitos por meio do software Silhouette Studio V3.

3.3 - Modificação das partículas magnéticas para a formação de Ant-ER α – PM – HRP

A modificação das partículas magnéticas foi realizada com o intuito de ancorar Ant-ER α e enzima *horseradish peroxidase* (HRP) sobre a superfície das mesmas. Para tanto, foi utilizado o protocolo número 86010/86011 fornecido pela Polysciences para ativação das micropartículas superparamagnéticas carboxiladas com cerca de 1,5 μm de diâmetro¹¹².

Na FIGURA 3.1, é possível observar as três sequências de etapas que resumem a modificação das partículas magnéticas: adição do Ant-ER α , adição da HRP e bloqueio da superfície das partículas, realizado com albumina de soro bovino (BSA) e glicina. Tal bloqueio é fundamental para evitar que reações inespecíficas ocorram com as partículas magnéticas, garantindo assim que somente os anticorpos e as enzimas estejam presentes, aumentando a sensibilidade do sistema⁵⁵.

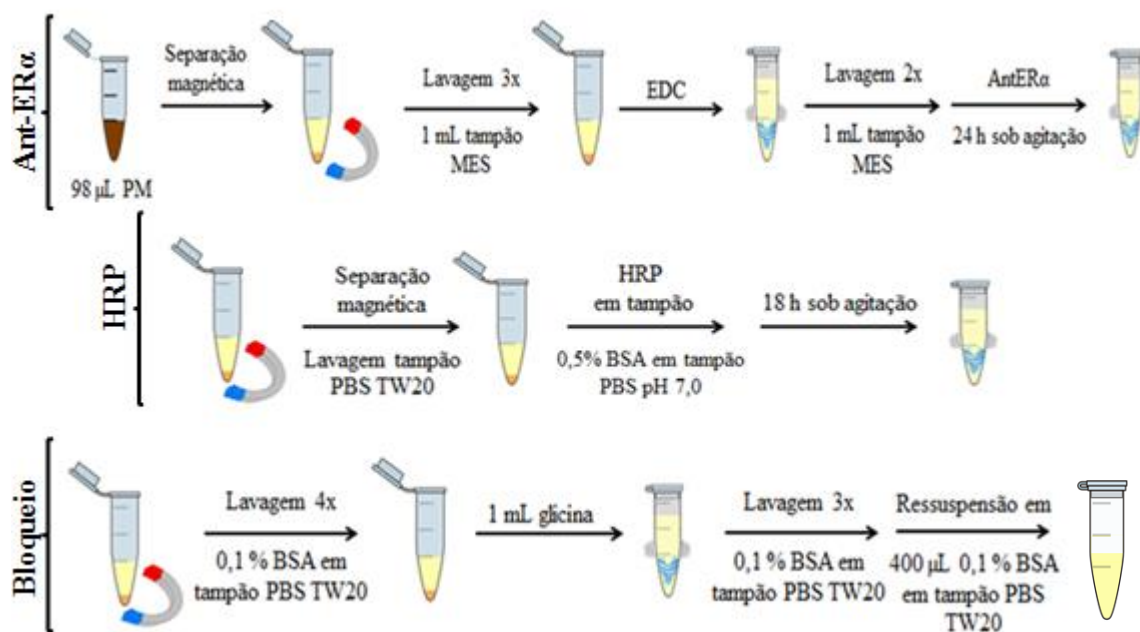


FIGURA 3.1: Representação esquemática das etapas de modificação das partículas magnéticas.

Inicialmente, 98 μL das PM foram colocadas em microtubos e lavadas três vezes com 1 mL de tampão MES (2-*N*-morfolinoetanossulfônico monohidratado) 0,05 mol L⁻¹ em pH 5,2. Para as lavagens, foi utilizada estante magnética a fim de separar o sólido da dispersão e, cuidadosamente, a fase líquida era retirada com o auxílio de uma pipeta automática após 5 minutos e descartada para, posteriormente, ser adicionada outra alíquota. A separação magnética utilizando estante magnética pode ser visualizada na FIGURA 3.2. Nesta etapa, a concentração das partículas magnéticas era de 2,0 mg mL⁻¹.

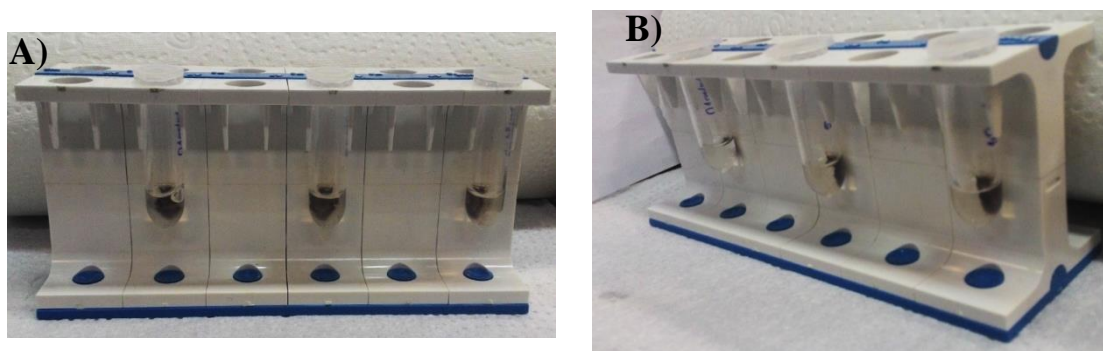


FIGURA 3. 2: Fotografia da estante utilizada para a separação magnética. A) Vista frontal e B) lateral.

Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução de EDC 3,2 mg mL⁻¹ em tampão MES, preparada imediatamente antes de ser utilizada e agitou-se em vórtex durante 5 minutos. Por 30 minutos, a dispersão ficou em um agitador rotatório. O EDC é fundamental nesta etapa para ativar os grupos carboxila presentes nas partículas magnéticas e estabilizar a reação posterior, de amidização, que ocorre entre as amins dos anticorpos policlonais que serão adicionados^{113,114}. Passado o tempo, foi feita nova lavagem com tampão MES conforme indicado anteriormente, por duas vezes. Feito isso, adicionou-se 1 mL de solução Ant-ER α 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em tampão PBS 0,001 mol L⁻¹ em pH 7,0 sendo mantido por 24 horas em temperatura ambiente no agitador rotatório. Realizou-se a separação magnética e lavou-se com 600 μL de tampão PBS com 0,05% de Tween-20 (TW20). Posteriormente, foi adicionado 1 mL de solução 1,2 mg mL⁻¹ de HRP em tampão PBS pH 7,0 com 0,5 % de BSA e mantido durante 18 horas

em temperatura ambiente no agitador rotatório. Após 18 horas, foi feita a separação magnética e lavagem com 1 mL de 0,1 % de BSA em tampão PBS-TW20 pH 7,0 por quatro vezes. Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução aquosa de glicina 1 mol L⁻¹ em pH 8,0. Agitou-se durante 30 minutos em agitador rotatório à temperatura ambiente e lavou-se três vezes com 1 mL de 0,1 % de BSA em tampão PBS-TW20 pH 7,0. Depois da lavagem, foi realizada a ressuspensão do bioconjugado com 400 µL da solução 0,1 % de BSA em tampão PBS-TW20 pH 7,0. As partículas magnéticas decoradas foram armazenadas a 4°C até o momento de uso e apresentaram-se estáveis por até três semanas.

3.4 – Construção dos eletrodos descartáveis

Para a construção dos eletrodos descartáveis, foi utilizado o método de serigrafia ou *screen-printing*. A técnica foi utilizada para a confecção dos eletrodos de trabalho, eletrodos auxiliares e eletrodos de referência.

3.4.1 – Eletrodos de trabalho

Uma folha de vinil adesivo foi recortada no formato desejado para oito eletrodos, utilizando impressora de recorte. Previamente, os desenhos foram feitos por meio do software Silhouette Studio V3. O vinil adesivo recortado foi transferido para uma folha de poliéster com o auxílio de um adesivo transferidor, que depois foi removido. Então, aplicou-se tinta condutora de grafite sobre o adesivo recortado e espalhou-se com o auxílio de um pequeno rodo. Os eletrodos permaneceram em estufa durante 30 minutos a 90°C, para a cura da tinta de grafite⁸². Em seguida, o adesivo foi retirado e aplicado uma máscara, a fim de delimitar a área de trabalho e contato dos eletrodos. A máscara, também de vinil adesivo, foi recortada com a mesma impressora de recorte, sendo o desenho modificado no software. A FIGURA 3.3 apresenta as

etapas de construção dos eletrodos de trabalho e na FIGURA 4.4 é apresentada uma fotografia dos eletrodos de trabalho finalizados até esta etapa.

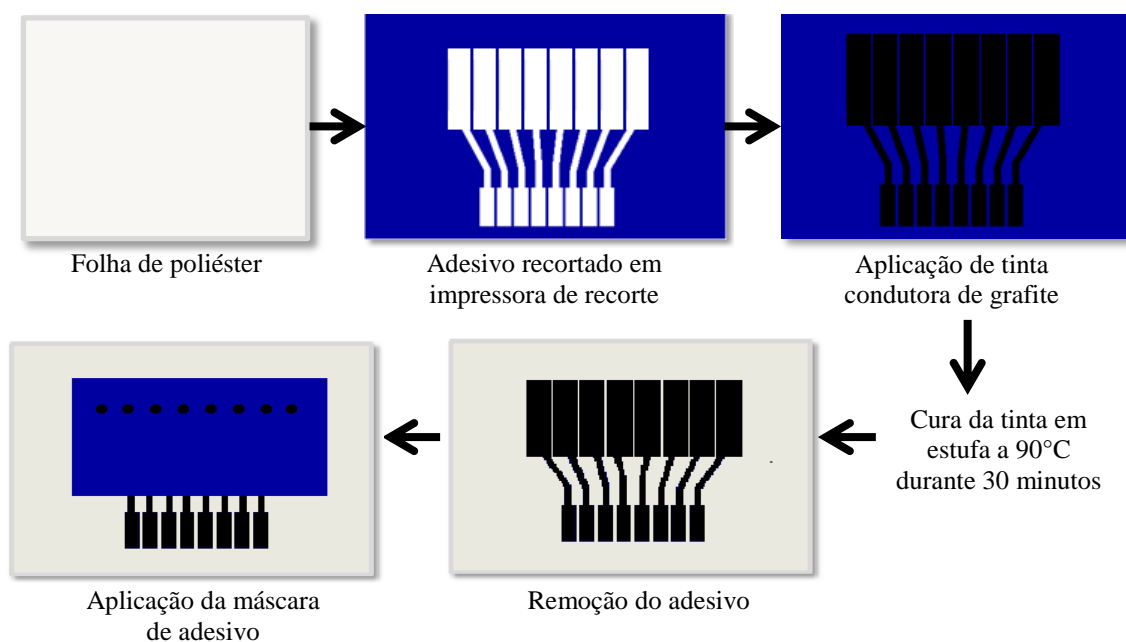


FIGURA 3. 3: Representação esquemática das etapas de construção dos eletrodos de trabalho pelo método de serigrafia.

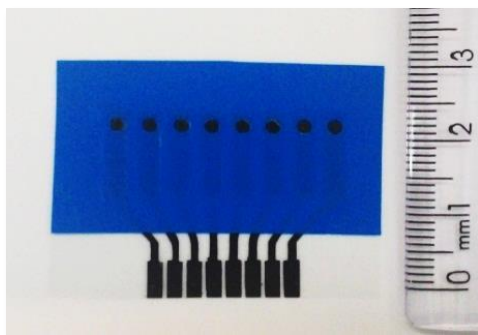


FIGURA 3. 4: Fotografia dos eletrodos de trabalho finalizados.

3.4.2 – Eletrodos de referência e auxiliar

O eletrodo auxiliar e o eletrodo de referência foram construídos utilizando a mesma tinta condutora de grafite empregada nos eletrodos de trabalho, sendo que no eletrodo de referência foi aplicada uma tinta de Ag/AgCl sobre a superfície da tinta de grafite após a sua cura. Para a obtenção dos eletrodos de referência e auxiliar, novos formatos foram desenhados no software Silhouette Studio V3 e recortados na impressora de recorte. O adesivo foi colocado sobre a folha de poliéster, aplicada tinta condutora de grafite e, após a

cura, foi adicionada tinta de pasta de Ag/AgCl sobre o eletrodo de referência com o auxílio de um pincel. Em seguida, o sistema foi mantido em estufa a 60°C por 30 minutos e, após a cura da tinta de pasta de Ag/AgCl, o adesivo foi removido⁸². Na FIGURA 3.5 são apresentadas as etapas de construção dos eletrodos de referência e auxiliar.

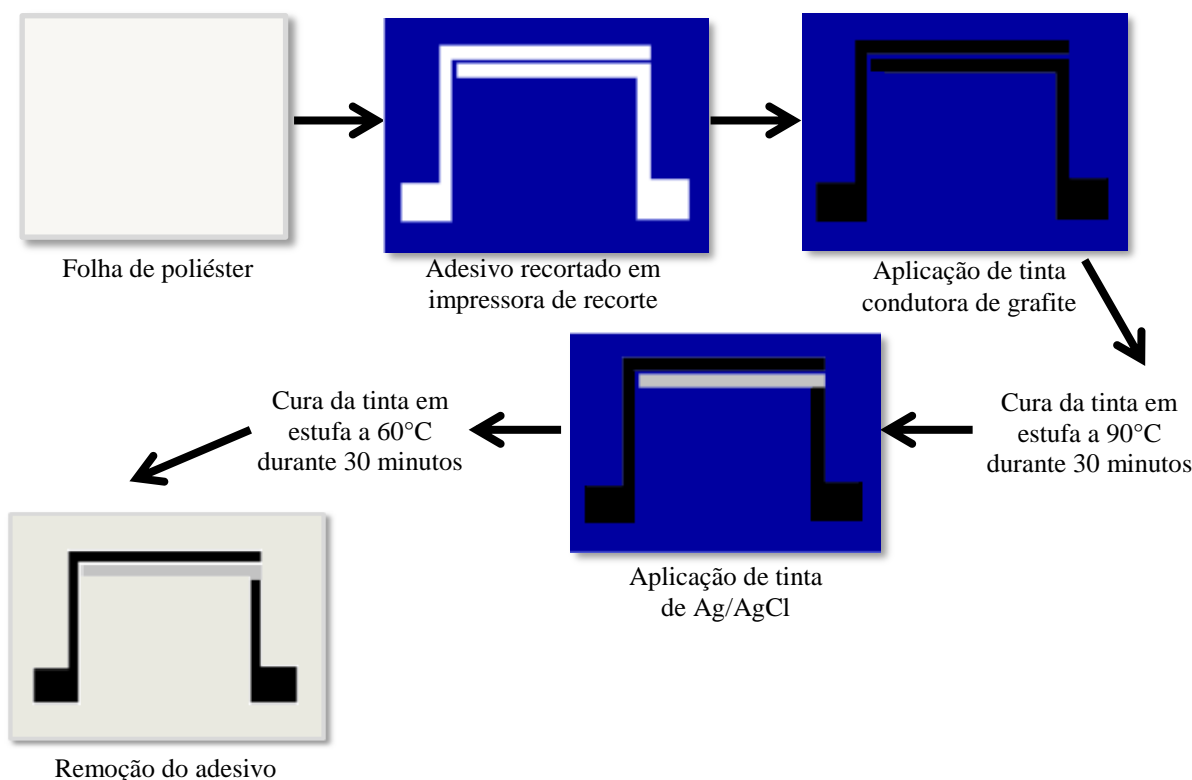


FIGURA 3. 5: Representação esquemática das etapas de construção dos eletrodos de referência e auxiliar pelo método de serigrafia.

3.5 – Montagem do dispositivo microfluídico

Sobre o arranjo de oito eletrodos de trabalho (*array*) foi colado um adesivo plástico dupla-face (7,9 cm de comprimento x 2,9 cm de largura x 0,4 mm de espessura), previamente recortado em impressora de recorte compondo canal microfluídico e, sobre este, o eletrodo auxiliar e eletrodo de referência. Desse modo, o canal microfluídico obtido continha um volume interno de 90 μ L (4,4 cm de comprimento x 0,3 cm de largura x 0,4 mm de espessura). O custo estimado do material utilizado para construção do dispositivo microfluídico sem modificação dos eletrodos foi de aproximadamente R\$0,60 por dispositivo. Vale

ressaltar que as células eletroquímicas impressas comerciais custam em torno de US\$11,00. Na FIGURA 3.6 são apresentadas as etapas para a montagem do dispositivo microfluídico e suas ranhuras.

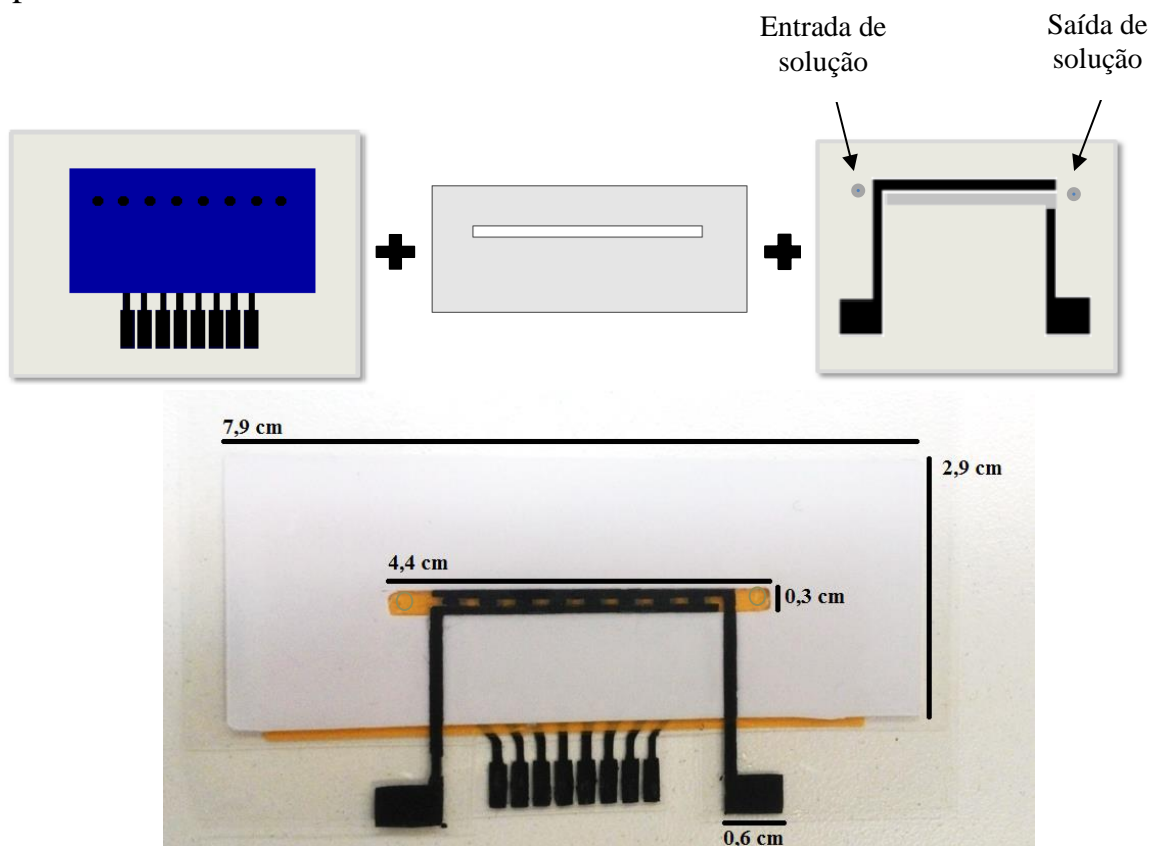


FIGURA 3. 6: Representação esquemática da montagem do dispositivo microfluídico e fotografia do dispositivo pronto com suas ranhuras.

3.6 - Síntese das nanopartículas de ouro decoradas com glutathiona

Para a síntese das nanopartículas de ouro decoradas com glutathiona¹¹⁵, foram pesados 0,079 g de ácido cloroáurico com espátula de plástico e 0,0308 g de l-glutathiona reduzida e adicionados a um béquer, com 2,0 mL de ácido acético e 12,0 mL de metanol, resultando em uma solução de cor amarelo claro. Uma solução 0,5 mol L⁻¹ de borohidreto de sódio foi preparada e adicionados 6 mL desta à anterior sob rápida agitação, durante 2 horas. A solução resultante foi filtrada em membrana de filtração molecular de 50 kDa (previamente lavada com hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹) e centrifugada a 3500

rpm. O precipitado foi lavado quatro vezes com água ultrapura durante a centrifugação e dissolvido em tampão HEPES ((*N*-(2-hidroxietil)piperazina-*N'*-(2-ácido etanosulfônico)) 20 mmol L⁻¹ pH 8,0. O volume final de AuNP-GSH foi de 15,0 mL. A dispersão foi estocada a 4°C até sua utilização e pode permanecer nessa condição durante aproximadamente três meses.

3.7 - Imobilização do dsDNA-ERE sobre os eletrodos de trabalho

Antes de montar o dispositivo, os eletrodos de trabalho foram limpos com água ultrapura e secos em fluxo leve de gás nitrogênio. Para a etapa de modificação, sobre os eletrodos de tinta de grafite foram adicionados 5 µL de 2,0 mg mL⁻¹ de poli(cloreto de dialildimetilamônio) (PDDA), contendo 0,05 mol L⁻¹ de cloreto de sódio em água ultrapura e deixado durante 20 minutos. Na sequência, após lavagem com água ultrapura e secagem em fluxo de gás nitrogênio, foram adicionadas 5 µL de 2,37x10⁻⁷ mol L⁻¹ da dispersão de nanopartículas de ouro decoradas com glutathiona (AuNP-GSH, cuja síntese está detalhada na sessão 3.6) e deixados por 20 minutos. A etapa de adição de PDDA, um polycation, juntamente com as AuNP-GSH, aniônicas, caracterizam o método de *layer-by-layer* de modificação dos eletrodos. Decorridos 20 minutos da adição das AuNP-GSH, os eletrodos foram lavados com água ultrapura, secos em fluxo de gás nitrogênio e acrescentados 5 µL de solução contendo 0,4 mol L⁻¹ de EDC e 0,1 mol L⁻¹ de *N*-hidroxisuccinimida (NHS), onde permaneceram por 10 minutos. Conforme já comentado, o EDC ativa os grupos carboxila, neste caso presentes na glutathiona, para posterior amidização com o grupo amina presente na dupla fita de DNA contendo ERE que será acrescentada. O NHS, além de auxiliar na solubilização do EDC em água, gera um reagente intermediário mais estável, levando à formação de uma amida¹¹⁶⁻¹¹⁹ (FIGURA 3.7). Assim, posteriormente, os eletrodos foram lavados com água ultrapura após a adição de EDC/NHS e adicionados 5 µL de 1 µmol L⁻¹ de dsDNA-ERE (dupla fita de DNA aminada composta pela sequência de um

elemento responsivo de estrogênio, sintetizado pela Sigma-Aldrich. A sequência é: 5'-H₂N-GTCCAAAGTCAGGTCACAGTGACCTGATCAAAGT-3'). O dsDNA-ERE foi mantido sobre os eletrodos durante 16 horas, a 20°C. Passado o tempo indicado, os eletrodos foram lavados com tampão PBS pH 7,4 com 0,05% de TW20. Em seguida, foram lavados com tampão PBS pH 7,4. Para evitar reações inespecíficas, foram acrescentados 5 µL de BSA 2%, que permaneceu sobre os eletrodos de trabalho por 1 hora. Para a lavagem, utilizou-se tampão PBS pH 7,4 com 0,05% de TW20 e em seguida, tampão PBS pH 7,4. A FIGURA 3.8 ilustra as etapas de modificação dos eletrodos de trabalho com dsDNA-ERE.

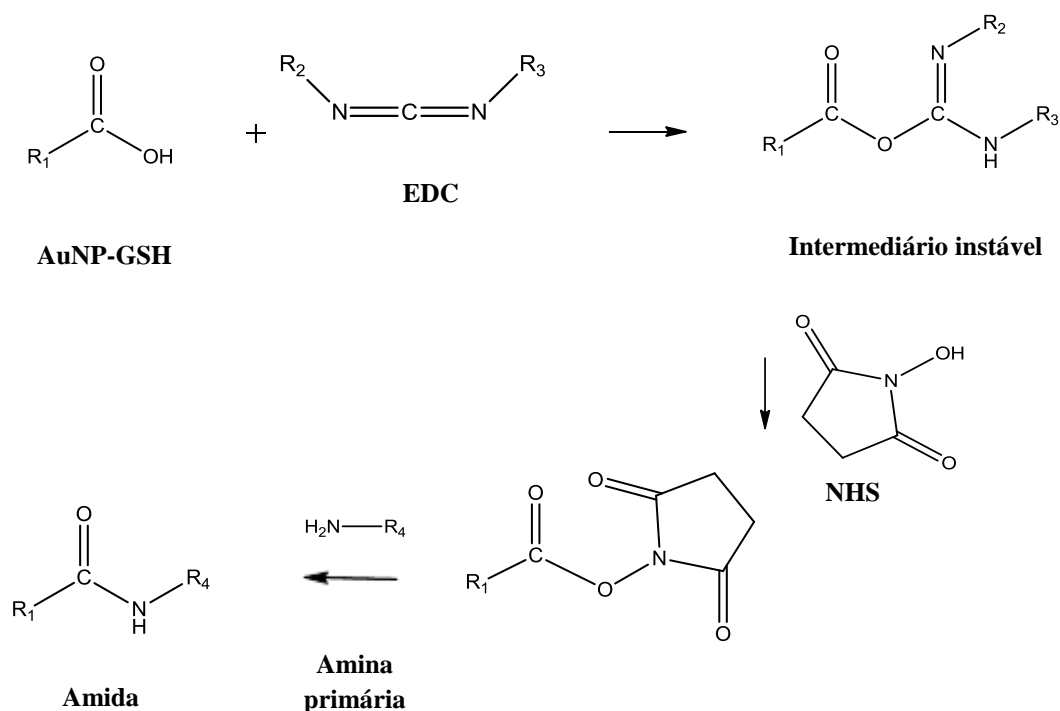


FIGURA 3. 7: Reações de acoplamento da AuNP-GSH com dsDNA-ERE via EDC/NHS sobre os eletrodos de trabalho. A amina primária exemplificada é o dsDNA-ERE. Adaptado da referência 116.

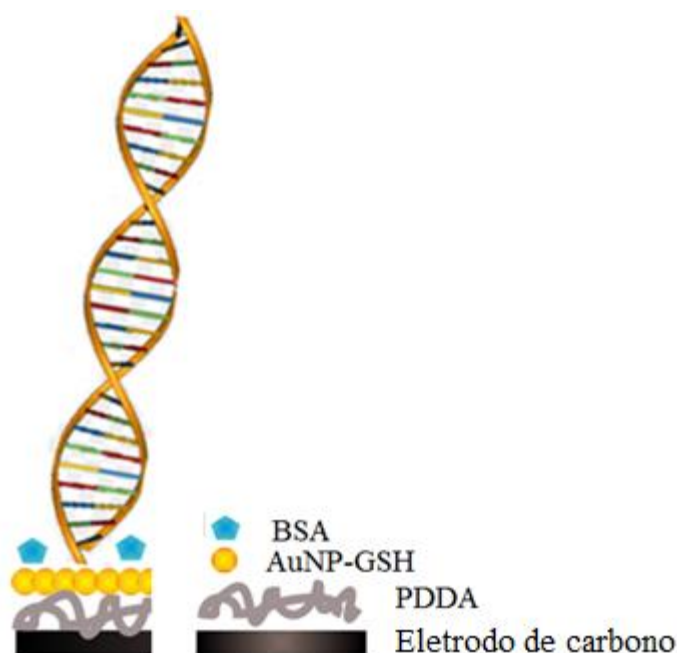


FIGURA 3. 8: Representação esquemática da imobilização do dsDNA-ERE sobre os eletrodos de carbono.

A máscara de adesivo colocada sobre os eletrodos de trabalho na etapa da construção, tem como objetivo definir a área geométrica exposta do eletrodo, bem como auxiliar no processo de imobilização devido a hidrofobicidade do vinil, formando os *microwells*¹²⁰. Os *microwells* são representados pelos pequenos poços com volumes da ordem de microlitros, que são formados devido à diferença no relevo entre a máscara de adesivo e os eletrodos de carbono e a hidrofobicidade do vinil. Pode-se notar na FIGURA 3.9 as gotas formadas sobre cada eletrodo de trabalho devido à imobilização.

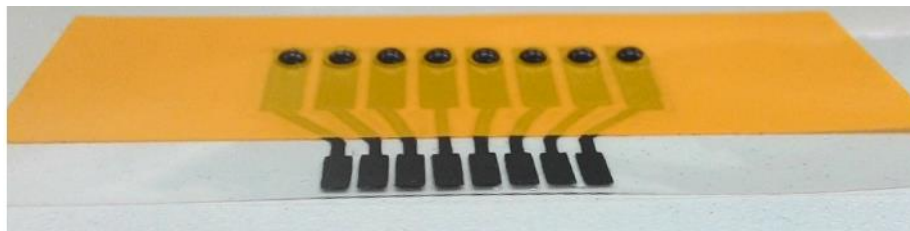


FIGURA 3. 9: Fotografia dos eletrodos de carbono imobilizados com dsDNA-ERE. Formação de *microwells*.

As etapas de construção do sistema microfluídico com os oito eletrodos de trabalho, um eletrodo auxiliar e um eletrodo de referência, mais as modificações até o dsDNA-ERE, envolvem um custo estimado em materiais de aproximadamente R\$1,75 por unidade.

3.8 – Captura da proteína ER α com a partícula magnética decorada Ant-ER α -PM-HRP

Inicialmente, foram adicionados 20 μL de Ant-ER α -PM-HRP em um microtubo juntamente com 320 μL de tampão PBS 0,001 mol L⁻¹ pH 7,4 e 20 μL do ER α , diluído em soro de bezerro. A concentração final de ER α utilizada em cada microtubo depende do objetivo do experimento, o qual, para a curva analítica, usou-se 16,6; 27,7; 55,5; 94,4; 138,8; 194,4 e 531,3 fg mL⁻¹, além do branco, composto apenas por soro de bezerro. Durante 30 minutos, foi realizada a incubação do conjugado com a proteína em agitador rotatório a 37°C e, posteriormente, foi realizada a separação magnética com três lavagens em solução de 2,0 % de BSA em PBS 0,001 mol L⁻¹ pH 7,4. Por fim, o bioconjugado formado pela analito ligados as PM ((ER α)Ant-ER α -PM-HRP) foi ressuspenso em 125 μL de 2,0 % de BSA em PBS 0,001 mol L⁻¹ pH 7,4.

Uma vez que partiu-se de 360 μL de solução total em cada microtubo (320 μL de tampão, 20 μL da proteína e 20 μL das partículas magnéticas decoradas) e, após as separações magnéticas seguidas de lavagens sucessivas, esse volume foi ressuspenso em 125 μL , tem-se uma pré-concentração cuja concentração final foi de aproximadamente três vezes maior do que a inicial. O volume de 125 μL é necessário uma vez que a alça de amostragem utilizada foi de 100 μL , garantindo-se assim o preenchimento completo da alça.

A FIGURA 3.10 ilustra as etapas experimentais descritas e a FIGURA 3.11 representa as partículas magnéticas decoradas quando o analito capturado.

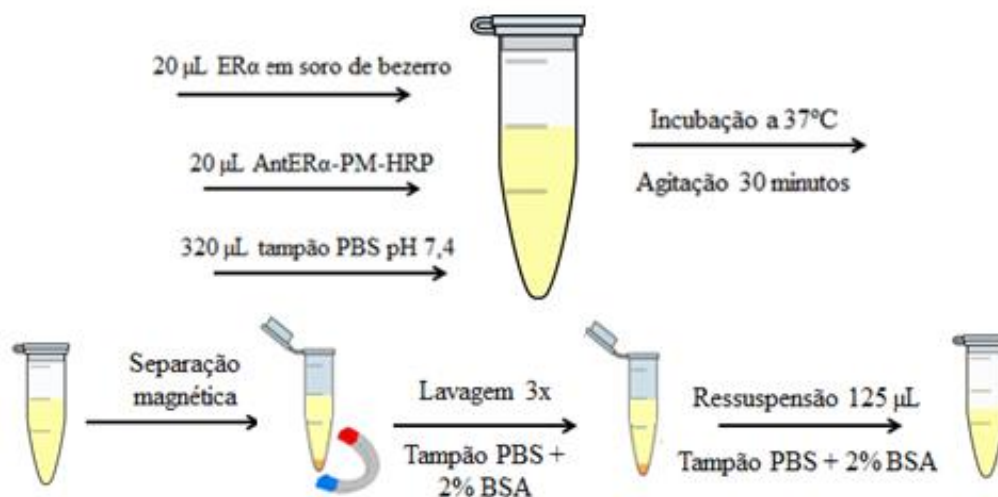


FIGURA 3. 10: Representação esquemática da obtenção do bioconjugado (ERα)Ant-ERα-PM-HRP obtido por meio da captura da proteína com a partícula magnética decorada.

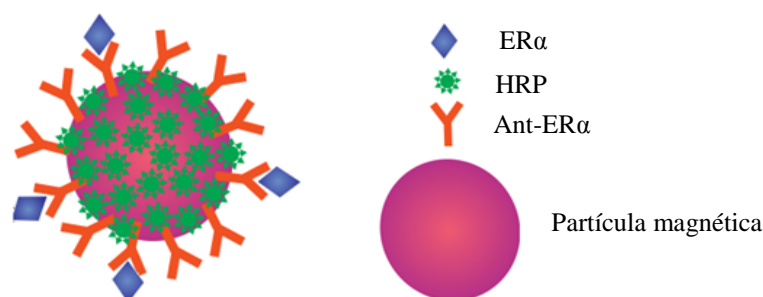


FIGURA 3. 11: Representação esquemática da captura da proteína ERα com a partícula magnética decorada Ant-ERα-PM-HRP.

3.9 – Interação entre os eletrodos de trabalho modificados e as partículas magnéticas contendo ERα

Estabelecida a conexão entre a bomba de seringa e o injetor utilizados para compor o sistema microfluídico (FIGURA 3.12), foi colado o conector PEEK com adesivo dupla-face na entrada da célula eletroquímica de oito eletrodos. A seringa foi preenchida com a solução carreadora (tampão PBS 0,001 mol L⁻¹ com TW20 0,05% pH 6,5 e 0,1% BSA), a vazão foi ajustada para 100 µL min⁻¹ e a alça de amostragem utilizada foi de 100 µL. Após notar o fluxo normal da solução carreadora dentro da célula microfluídica, foram injetados 100 µL da dispersão contendo o bioconjugado (ERα)Ant-ERα-PM-HRP e, ao preencher toda a célula de fluxo com a dispersão injetada, o fluxo foi pausado na

bomba de seringa e mantido 30 minutos, sendo este o tempo de incubação. Esse período é necessário para que haja a interação entre o dsDNA-ERE que está sobre os eletrodos e o analito presente no bioconjugado.

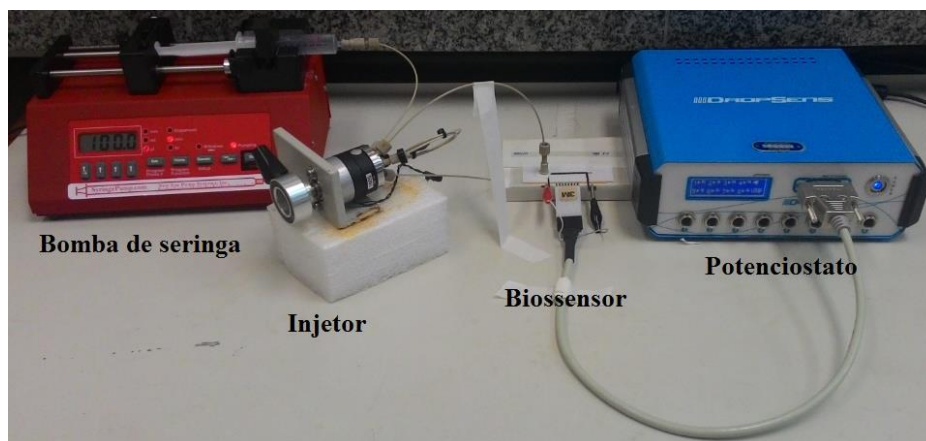


FIGURA 3. 12: Fotografia do sistema microfluídico utilizado.

Genericamente, o ERE que compõe o dsDNA-ERE possui dois palíndromos separados por três nucleotídeos quaisquer, como a seguinte sequência 5'- AGGTCAnnnTGACCT-3', sendo que n é qualquer nucleotídeo, G é guanina, T é timina, A é adenina e C é citosina. No presente trabalho, os três nucleotídeos utilizados são citosina, adenina e guanina, cuja função é apenas de separar os palíndromos e garantir a distância necessária entre eles^{121,122}.

Quando o ER α reconhece o ERE no dsDNA, eles se ligam com grande afinidade¹²³ por meio de “dedos de zinco”, formando homodímeros⁴⁹. O ER α contém quatro “dedos de zinco” em sua estrutura (FIGURA 3.13) e estes são formados por um íon Zn²⁺ coordenado em um arranjo tetraédrico por quatro resíduos de cisteína altamente conservados cada¹²⁴. O primeiro “dedo de zinco” reconhece a primeira sequência de hexanucleotídeos AGGTCA, enquanto o segundo é responsável pela homodimerização entre ER e DNA¹²⁵. Na FIGURA 3.14 está apresentado o imunossensor completo, com a modificação do eletrodo de trabalho e interação com a partícula magnética decorada e contendo o analito ER α .

Portanto, o reconhecimento do dsDNA-ERE com o ER α na célula microfluídica do dispositivo desenvolvido, mimetiza o que ocorre dentro das células de uma pessoa portadora de câncer de mama.



FIGURA 3. 14: Representação esquemática da ligação da proteína ER α no dsDNA-ERE (cor roxa). A ligação é realizada por meio dos dedos de zinco, apresentados em cor de rosa. Extraído de Structural Biology Knowledgebase¹²⁶.

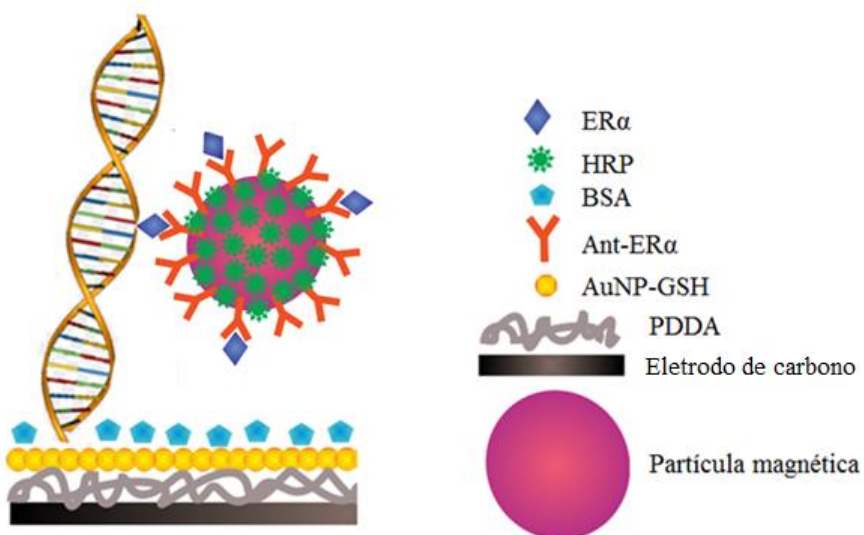


FIGURA 3. 13: Representação esquemática da etapa de interação entre a proteína capturada pela partícula magnética modificada ((ER α)Ant-ER α -PM-HRP) e o dsDNA-ERE no eletrodo de carbono.

3.10– Aplicação do dispositivo microfluídico descartável na detecção de ER α

Após a etapa de interação entre os eletrodos de trabalho modificados e o bioconjugado, formado pelas partículas magnéticas contendo ER α , a bomba de seringa foi ligada para que a solução carreadora lavasse a célula de fluxo, eliminando as partículas magnéticas decoradas que não se ligaram ao dsDNA-ERE nos eletrodos (FIGURA 3.15). Depois da lavagem, a bomba de seringa foi pausada e os eletrodos foram conectados ao multipotenciostato, no qual foi selecionada a técnica de amperometria e fixado o potencial em -0,2 V por um tempo arbitrário de 2000 segundos. Com a bomba de seringa religada e o software iniciado, esperou-se a estabilização das correntes para então injetar, com o auxílio de uma microseringa, 100 μ L da solução de medida, composta por 1,0 mmol L⁻¹ de HQ e 0,1 mmol L⁻¹ de H₂O₂ em tampão PBS pH 6,5. Após isto, a válvula de injeção foi colocada na posição *inject* e a resposta transiente de corrente foi obtida.

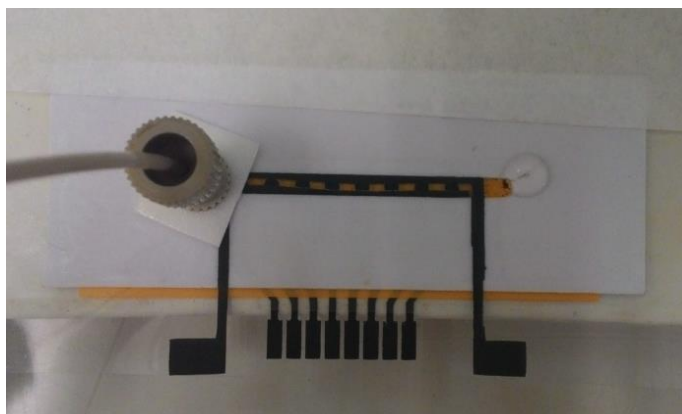


FIGURA 3. 15: Fotografia da lavagem do biossensor com tampão PBS 0,001 mol L⁻¹ com TW20 0,05% pH 6,5 e 0,1% BSA para retirada das partículas magnéticas decoradas que não foram ligadas. Nota-se a saída dessas partículas à direita da cela microfluídica, de coloração marrom.

3.11 – Avaliação da imobilização da enzima *horseradish peroxidase* e desempenho do sistema microfluídico

Para avaliar a potencialidade do dispositivo proposto como biossensor, testou-se a imobilização da enzima HRP sobre a etapa de *layer-by-layer*, a qual usou-se AuNP-GSH sobre uma camada adsorvida de PDDA, conforme descrito anteriormente. Após a lavagem das nanopartículas com água, que permaneceram por 20 minutos sobre os eletrodos e secagem da camada com fluxo leve de gás nitrogênio, 5 μL de solução contendo 0,4 mol L⁻¹ de EDC e 0,1 mol L⁻¹ de NHS foram adicionados sobre os eletrodos e mantido por 10 minutos para promover a ligação covalente da enzima com o grupo carboxila da glutationa presente nas AuNP. Para imobilizar a enzima, foram utilizados 5 μL de HRP 3 mg mL⁻¹ em tampão PBS pH 6,5, durante uma hora (FIGURA 3.16).

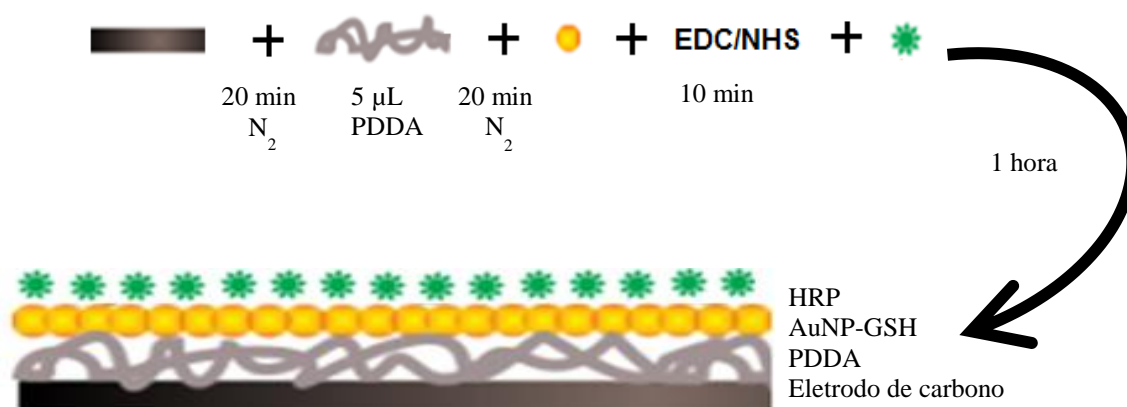


FIGURA 3. 16: Representação esquemática da modificação da superfície dos eletrodos de carbono com PDDA, AuNP-GSH e HRP.

Os eletrodos modificados com PDDA, AuNP-GSH e HRP foram submetidos a medidas de voltametria cíclica e amperometria. A solução presente na seringa, contendo HQ 1,0 mmol L⁻¹ e H₂O₂ 0,1 mmol L⁻¹ em tampão PBS pH 6,5, foi carregada até a célula microfluídica por ação da bomba e pausada para iniciar a voltametria cíclica. A voltametria cíclica comparou os eletrodos com e sem HRP imobilizada, sendo feita a varredura de potencial em um intervalo de 0,1 a -0,45 V com velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹. A amperometria foi realizada apenas para os eletrodos imobilizados com HRP, em potencial de -0,2

V, vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$ e alça de amostragem de $100 \mu\text{L}$. Para a medida, a seringa foi preenchida com a solução carreadora (solução tampão PBS $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ com TW20 0,05% pH 6,5 e 0,1% BSA) e, após inicialização do software e estabilização das correntes dos oito eletrodos, foram injetados com uma microseringa $100 \mu\text{L}$ de solução contendo uma mistura de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de HQ e $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ H_2O_2 em tampão PBS pH 6,5 no sistema em fluxo.

3.12- Estudo da influência da vazão

O estudo da influência da vazão foi realizado com o biossensor desenvolvido após as etapas de captura e interação do dsDNA-ERE dos eletrodos de trabalho com o bioconjugado $(\text{ER}\alpha)\text{Ant-ER}\alpha\text{-PM-HRP}$. Foram estudadas as vazões de 50, 100, 150 e $200 \mu\text{L min}^{-1}$ em uma mesma célula eletroquímica, injetando-se a solução de mistura composta por H_2O_2 $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e HQ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão PBS pH 6,5 e solução carreadora de tampão PBS $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ com TW20 0,05% pH 6,5 e 0,1% BSA. Para tanto, utilizou-se a técnica de amperometria com potencial fixado em $-0,2 \text{ V}$.

3.13 – Determinação da concentração de $\text{ER}\alpha$ em lisado de células MCF-7

As células MCF-7 foram fornecidas pelo Laboratório de Biologia do Envelhecimento do Departamento de Gerontologia da UFSCar em São Carlos. Estas foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro de bezerro fetal, penicilina (100 UI mL^{-1}) e estreptomicina (100 mg mL^{-1}). As células foram mantidas em estufa a 37°C , 5% CO_2 e 95% de umidade relativa. 1.000.000 células foram semeadas em frascos de cultura de 25 cm^2 e, após 24 h, as células foram tripsinizadas para a obtenção do lisado de proteínas, de acordo com as instruções do reagente CellLytic. A quantificação das proteínas totais foi realizada utilizando o ensaio de BCA, pelo qual foram obtidos $3,76 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de proteínas totais em lisados MCF-7.

O procedimento para a quantificação de proteínas totais utilizando o kit BCA foi fornecido pelo fabricante. Seu princípio básico é a obtenção de um complexo solúvel entre duas moléculas de BCA e um íon Cu^+ , que estará presente nas proteínas, resultando na coloração roxa da solução. A coloração possibilita a quantificação de proteína total pela leitura da absorbância da amostra em comprimento de onda de 562 nm, na qual utilizou-se uma leitora de placas.

Duas reações são necessárias para que se obtenha a coloração roxa, conforme explicitadas na FIGURA 3.17.

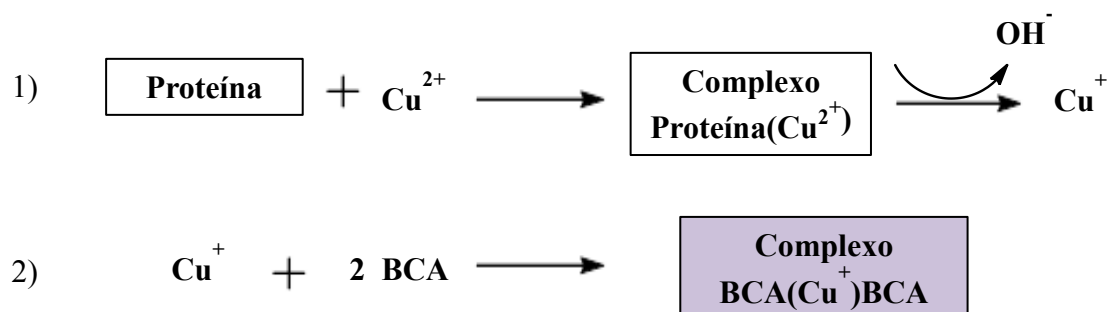


FIGURA 3. 17: Representação esquemática das reações envolvidas no ensaio de quantificação de proteína total utilizando o kit BCA.

A quantidade de Cu^{2+} , proveniente de uma solução aquosa de sulfato de cobre, que é reduzida em meio alcalino, é proporcional à quantidade de proteína. Tal ensaio foi primeiramente estudado por SMITH *et al.*¹²⁷.

Para se determinar a concentração da proteína ER α em uma amostra de lisado MCF-7, utilizou-se o método de adição de padrão, no qual foram fortificadas cinco soluções de lisado diluídos 1:100 em tampão PBS pH 7,4, com o biomarcador nas concentrações de 16,6; 27,7; 55,5; 111,1 e 333,3 fg mL⁻¹, além da amostra sem fortificação.

Capítulo 4
Resultados e Discussão

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Estudo da influência do diâmetro dos eletrodos de trabalho

Para esse estudo, três células eletroquímicas descartáveis compostas por oito eletrodos de mesma dimensão cada foram confeccionadas, totalizando 24 eletrodos ($n=24$), e testadas para cada diâmetro em um mesmo dia. Os diâmetros testados foram de 0,7; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mm. Nas medidas eletroquímicas, foi utilizada solução de ácido ferrocenomonocarboxílico 1 mmol L^{-1} em cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em cela eletroquímica convencional, com eletrodo auxiliar de platina e eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$) convencionais. Utilizou-se intervalo de potencial de 0 a 0,6 V e velocidade de varredura de potenciais de 50 mV s^{-1} .

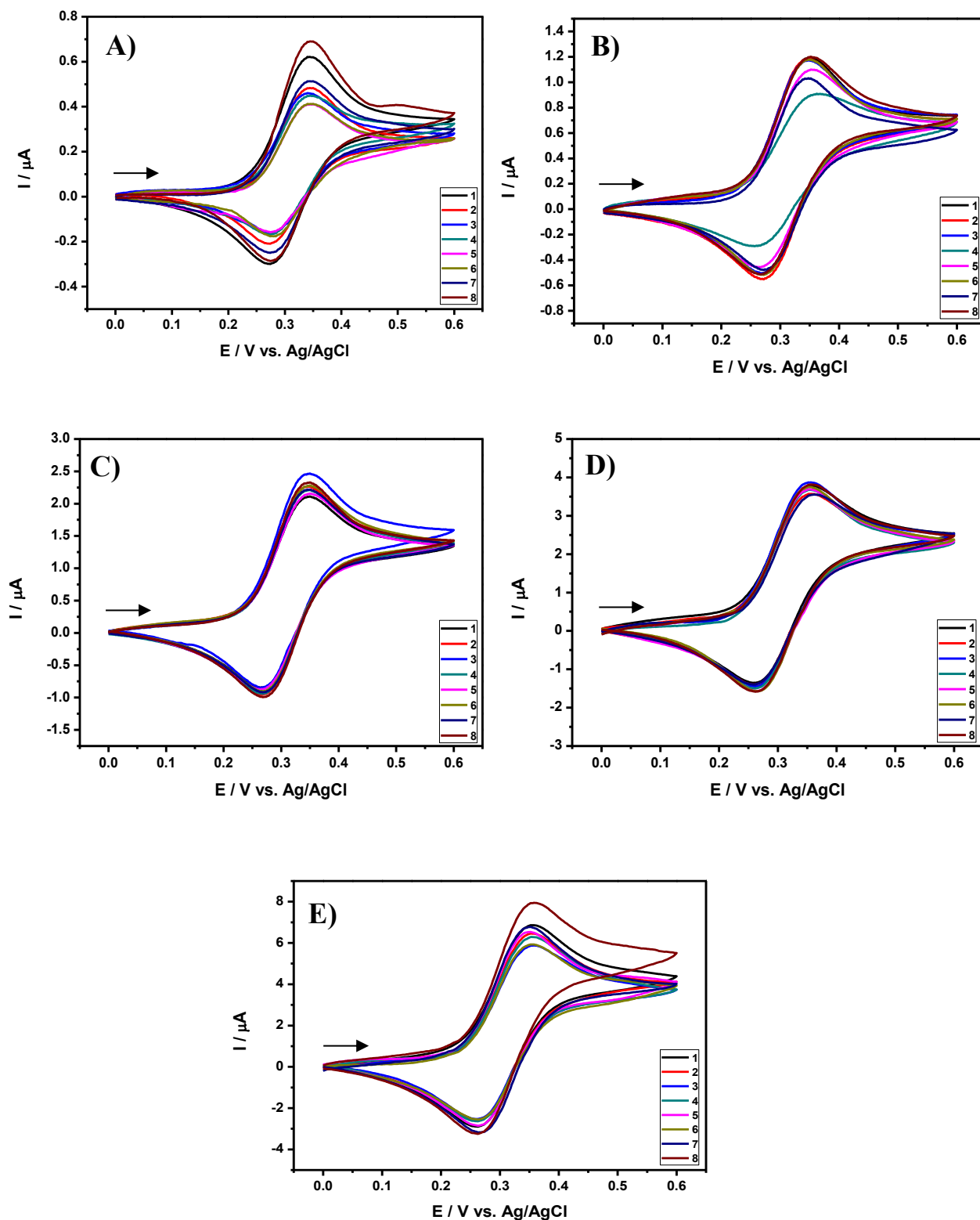


FIGURA 4. 1: Voltamogramas cíclicos referentes a uma célula eletroquímica descartável testada para cada diâmetro, utilizando A) 0,7 B) 1,0 C) 1,5 D) 2,0 e E) 2,5 mm. Voltametria cíclica realizada em ácido ferrocenomonocarboxílico 1 mmol L^{-1} em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$, intervalo de potencial de 0 a 0,6 V. $v=50 \text{ mV s}^{-1}$.

Nos voltamogramas da FIGURA 4.1 é visível a baixa repetibilidade dos perfis voltamétricos para os eletrodos com diâmetros de 0,7 e 1,0 mm. Isso ocorre devido à baixa precisão da impressora de recorte para dimensões muito pequenas. Em contrapartida, diâmetros muito grandes não são interessantes, já que a miniaturização é objetivada. Desse modo, a fim de avaliar o melhor diâmetro para a construção do dispositivo, foi calculada a média das correntes de picos anódicos e os respectivos desvios-padrão e desvios-padrão relativos (RSD) para cada dimensão, apresentados na TABELA 4.1.

TABELA 4. 1: Estudo da influência do diâmetro dos eletrodos descartáveis construídos. Valores de corrente anódica média e RSD para cada diâmetro, obtidos dos voltamogramas cíclicos da FIGURA 4.1.

Diâmetro/mm	I/μA	RSD/%
0,7	0,65 \pm 0,10	15,92
1,0	0,89 \pm 0,06	7,13
1,5	1,57 \pm 0,03	1,84
2,0	2,86 \pm 0,02	0,98
2,5	4,77 \pm 0,09	2,07

Por meio da TABELA 4.1, é possível observar que os eletrodos de trabalho com 2,0 mm de diâmetro foram ideais para compor o sistema proposto, uma vez que, apresentaram maiores médias de correntes de pico anódicas em relação aos desvios-padrões, assim como menores valores de RSD.

Para avaliar se a corrente de pico anódico entre as três células eletroquímicas pertencentes a um mesmo diâmetro eram estatisticamente iguais, aplicou-se análise de variância (ANOVA) um nível de confiança de 95%. Por esse método, constatou-se que, para os diâmetros de 1,5; 2,0 e 2,5 mm, todas as células eletroquímicas que compunham cada dimensão apresentaram valores de corrente de pico anódico estatisticamente iguais ($F_{crítico}$ maior do que o F encontrado). Tal fato evidencia a boa reprodutibilidade dos eletrodos de

trabalho, sugerindo que o processo de fabricação é satisfatório. Para os diâmetros de 0,7 e 1,0 mm, apenas um par de células eletroquímicas apresentaram-se equivalentes estatisticamente, portanto não foram satisfatórios para compor o sistema proposto. Desse modo, confirmou-se que o diâmetro de 2,0 mm foi ideal para a construção dos eletrodos de trabalho.

4.2 – Estudo da influência da velocidade de varredura de potenciais na resposta eletroquímica dos eletrodos descartáveis desenvolvidos

O estudo da velocidade de varredura de potenciais foi realizado nas mesmas condições do estudo do diâmetro anterior, porém, foram variadas as velocidades de varredura para 10, 25, 50, 75, 100, 150 e 200 mV s⁻¹ e o diâmetro das máscaras de vinil adesivo mantidos em 2,0 mm.

4.2.1 - Estudo da influência da velocidade de varredura de potenciais para eletrodos de trabalho sem modificação

Por meio da técnica de voltametria cíclica realizada em solução de ácido ferrocenomonocarboxílico 1 mmol L⁻¹ em cloreto de potássio 0,5 mol L⁻¹ e cela eletroquímica composta por eletrodo auxiliar de platina, eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) e um conjunto de oito eletrodos de trabalho de grafite conectados ao multipotenciostato, foi possível realizar o estudo da velocidade de varredura. Este estudo possibilita caracterizar os processos envolvidos na superfície dos eletrodos, assim como a área eletroativa dos mesmos.

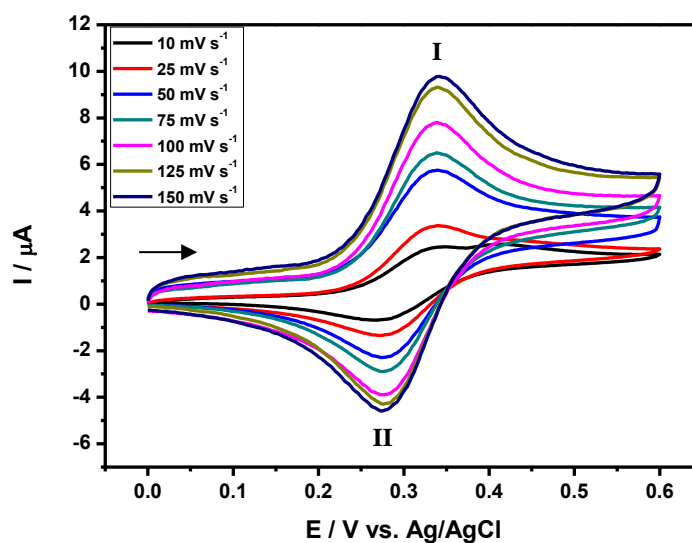


FIGURA 4. 2: Voltamogramas cíclicos referentes a um eletrodo da célula eletroquímica descartável, sem modificação. Solução de ácido ferrocenomonocarboxílico 1 mmol L^{-1} em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$, intervalo de potencial de 0 a 0,6 V.

Na resposta eletroquímica obtida na FIGURA 4.2, o pico I refere-se à oxidação do ácido ferrocenomonocarboxílico e o pico II refere-se à redução deste, envolvendo um elétron.

A diferença entre os potenciais de oxidação e redução, pouco superior a 59 mV sem considerar a queda ôhmica, indicam a reversibilidade do processo redox, envolvendo a variação de um elétron¹²⁸. Como pode ser observado na FIGURA 4.2, os potenciais de oxidação e redução permanecem inalterados com as velocidades de varredura de potenciais aplicadas.

Para avaliar os processos que ocorrem na superfície do eletrodo, a FIGURA 4.3 representa o gráfico do logaritmo da corrente de pico anódica em função do logaritmo da velocidade de varredura de potenciais e, conforme a literatura, um coeficiente angular próximo ou igual a 0,5 indica controle difusional¹²⁸.

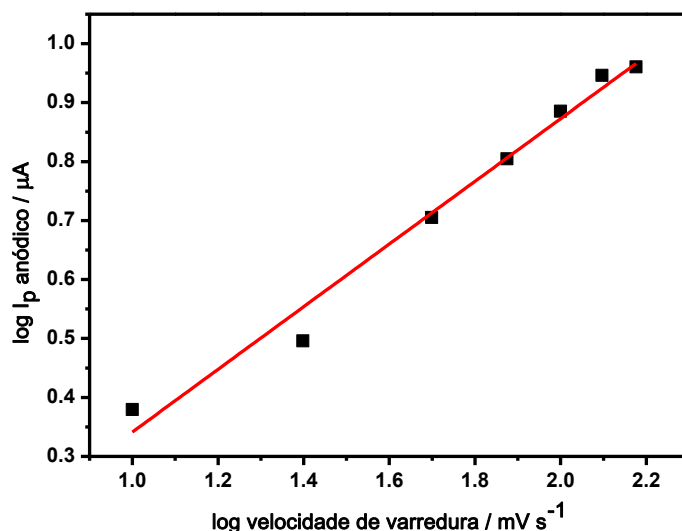


FIGURA 4. 3: Relação logarítmica da corrente de pico anódico média e a velocidade de varredura de potenciais para eletrodos sem modificação, resultados obtidos da FIGURA 4.2.

A equação da reta referente ao gráfico da FIGURA 4.3 é $y = - (0,18 \pm 0,05) + (0,53 \pm 0,03) x$, com R^2 de 0,97875. O coeficiente angular encontrado para esse estudo foi de 0,53, sugerindo que o processo eletroquímico é controlado por difusão¹²⁸.

4.2.2 - Estudo da influência da velocidade de varredura de potenciais para eletrodos de trabalho modificados com PDDA e AuNP-GSH

Para a etapa de modificação, utilizou-se o método de *layer-by-layer*, empregando PDDA e AuNP-GSH. Sobre os eletrodos de tinta de grafite limpos com água ultrapura e secos com nitrogênio, foram adicionados 5 μL de 2,0 mg mL⁻¹ de PDDA por 20 minutos. Na sequência, após lavagem com água e secagem em fluxo de N₂, foram adicionadas 5 μL de solução 2,37x10⁻⁷ mol L⁻¹ de AuNP-GSH em tampão HEPES 0,02 mol L⁻¹ pH 8,0. Os eletrodos foram lavados com água para então submetê-los ao estudo da influência da velocidade de varredura nos mesmos parâmetros já citados.

Assim como nos eletrodos sem modificação, o perfil voltamétrico indica oxidação do ácido ferrocenomonocarboxílico no pico I da FIGURA 4.4 e redução no pico II.

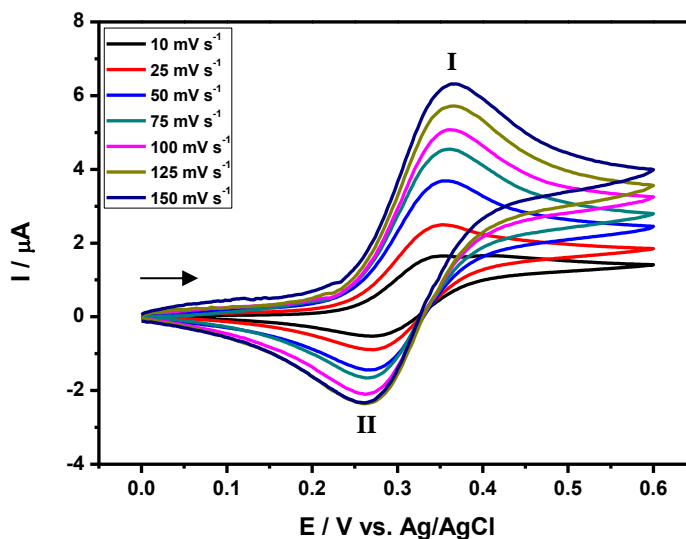


FIGURA 4. 4: Voltamogramas cíclicos referentes a um eletrodo da célula eletroquímica descartável, modificado com PDDA e AuNP-GSH. Solução de ácido ferroceno monocarboxílico 1 mmol L^{-1} em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, intervalo de potencial de 0 a 0,6 V.

De modo análogo aos eletrodos sem modificação, foi construído um gráfico da relação logarítmica de corrente de pico anódico pelo logaritmo da velocidade de varredura de potenciais, no qual o coeficiente angular da reta próximo a 0,5 evidencia processo eletródico difusional¹²⁸. A equação da reta referente ao gráfico da FIGURA 4.5 é $y = - (0,46 \pm 0,005) + (0,49 \pm 0,003) x$, com R^2 de 0,99977.

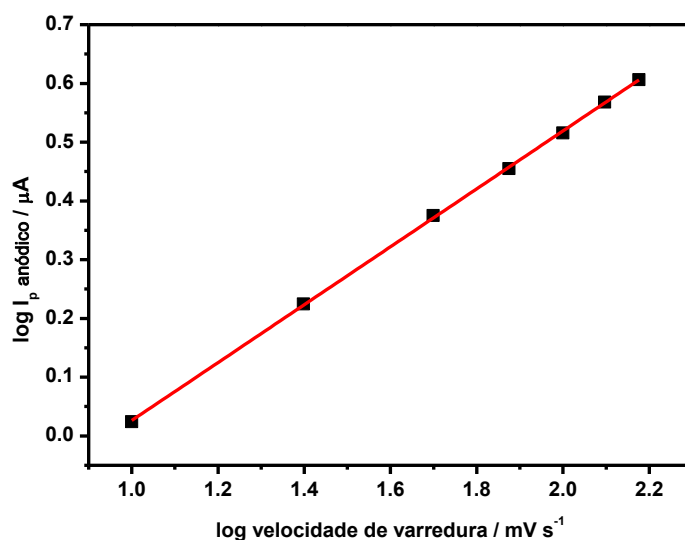


FIGURA 4. 5: Relação logarítmica da corrente de pico anódico média e velocidade de varredura de potenciais para eletrodos modificados.

Houve um pequeno deslocamento dos potenciais de pico com o aumento das velocidades de varreduras de potenciais para os eletrodos modificados em relação aos eletrodos sem modificação. Nota-se também uma diminuição das intensidades das correntes de pico anódicas e catódicas com o uso das AuNP-GSH, possivelmente porque a presença do PDDA dificulta a transferência eletrônica. Tal comportamento já foi observado por CHIKAE *et al.*¹²⁹.

4.3- Estudo da área eletroativa

A área eletroativa foi estimada a partir do gráfico da corrente de pico anódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, obtido de acordo com os estudos das velocidades de varreduras de potenciais e utilizando a Equação de Randles-Sevcik (Eq. 1)¹²⁸,

$$I_p = \pm (2,69 \times 10^5) n^{3/2} AD^{1/2} C v^{1/2} \quad \text{Eq. 1}$$

onde I_p é a corrente de pico (A), n é o número de elétrons envolvidos na reação, A é a área eletroativa (cm²), D é o coeficiente de difusão do ácido ferrocenomonocarboxílico em solução de KCl 0,5 mol L⁻¹ ($5,7 \times 10^{-6}$ cm²

$s^{-1})^{130}$, v é a velocidade de varredura de potencial ($V s^{-1}$), e C é a concentração do ácido ferrocenomonocarboxílico em solução ($mol cm^{-3}$).

Considerando que a Equação de Randles-Sevcik pode ser escrita em função da corrente de pico anódica e da raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial, tem-se a área eletroativa combinando a Equação 1 com a Equação 2, sabendo que K é o coeficiente angular da reta do gráfico apresentado na FIGURA 4.6 para eletrodos sem modificação e na FIGURA 4.7 para os eletrodos modificados com PDDA e AuNP-GSH.

$$I_p = Kv^{1/2} \quad \text{Eq. 2}$$

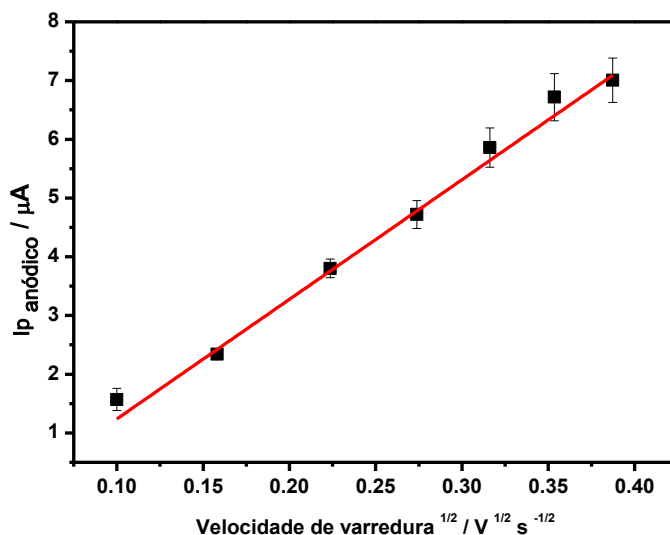


FIGURA 4. 6: Relação linear entre a corrente de pico anódica média e a raiz da velocidade de varredura para eletrodos sem modificação.

A equação da reta referente ao gráfico da FIGURA 4.6 é $y = - (0,79 \pm 0,19) + (20,36 \pm 0,97) x$, com R^2 de 0,98641.

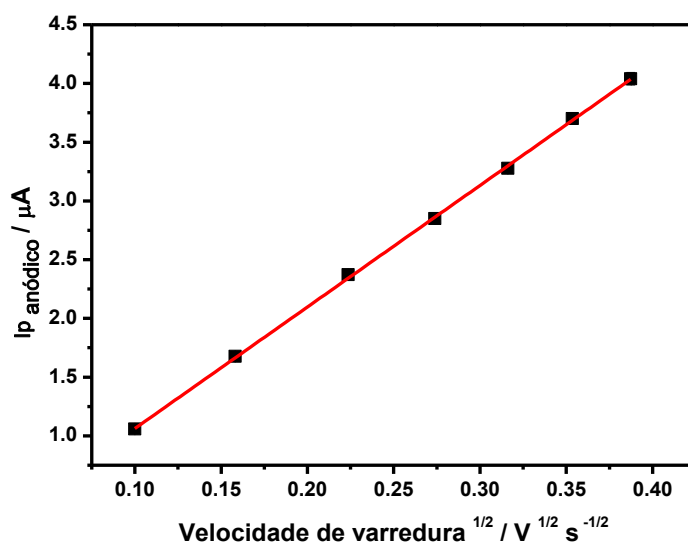


FIGURA 4. 7: Relação linear entre a corrente de pico anódico média e a raiz quadrada da velocidade de varredura para eletrodos modificados com PDDA e AuNP-GSH.

A equação da reta que descreve o gráfico da FIGURA 4.7 é $y = (0,02 \pm 0,01) + (10,34 \pm 0,06) x$, com R^2 de 0,99976.

Os valores das áreas eletroativas calculadas foram listados na TABELA 4.2 e a área geométrica dos eletrodos de trabalho de 2,0 mm de diâmetro é de $0,0314 \text{ cm}^2$.

TABELA 4. 2: Valores de áreas eletroativas para os eletrodos sem e com modificação, calculados pela Equação de Randles-Sevcik.

Eletrodos	Área eletroativa (cm^2)
Sem modificação	0,0317
Com modificação	0,0161

A área geométrica é um pouco menor do que a área eletroativa do eletrodo de carbono sem modificação porque, na realidade, o eletrodo apresenta rugosidades, sendo de morfologia irregular e não totalmente plana⁸². A diminuição da área eletroativa nos eletrodos modificados com PDDA e AuNP-

GSH em relação aos eletrodos sem modificação pode ser atribuída ao bloqueio parcial da superfície ativa do eletrodo de carbono pelo PDDA, um polímero catiônico. A diminuição da área eletroativa dos eletrodos *screen-printed* com o uso de AuNP já foi observado por CHIKAE *et al.*¹²⁹.

4.4- Avaliação da imobilização da enzima *horseradish peroxidase* e desempenho do sistema microfluídico

Após a conclusão dos estudos de caracterização dos eletrodos de trabalho, as células eletroquímicas foram testadas frente à imobilização da HRP por voltametria cíclica e amperometria, para avaliar o desempenho do dispositivo como biossensor bem como do sistema microfluídico e a repetibilidade dos sinais analíticos.

Para a voltametria cíclica, a seringa da bomba de seringa foi completada com uma solução de H_2O_2 $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e HQ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão PBS pH 6,5 e a bomba desligada após o preenchimento do sistema microfluídico. O procedimento foi realizado para as células eletroquímicas contendo os eletrodos com e sem a imobilização da HRP.

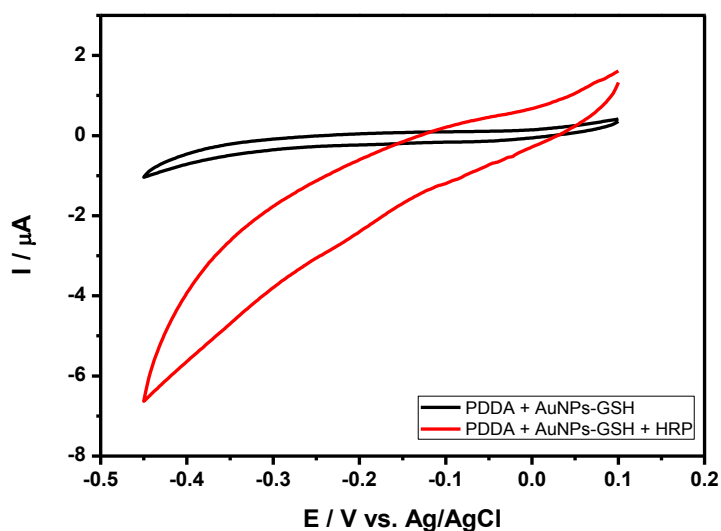


FIGURA 4. 8: Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de H_2O_2 $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e HQ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão PBS pH 6,5 para os eletrodos modificados com PDDA e AuNP-GSH na presença e ausência de HRP. Intervalo de potencial de 0,1 a $-0,45 \text{ V}$ e $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Um aumento significativo de corrente na presença da HRP foi evidenciado, com um pequeno ombro em $-0,2 \text{ V}$, como ilustra a FIGURA 4.8.

Para a amperometria, realizada em potencial de $-0,2 \text{ V}$, foi utilizada alça de amostragem de $100 \mu\text{L}$ e a vazão foi mantida em $100 \mu\text{L min}^{-1}$ na bomba de seringa que continha a solução carreadora. A bomba de seringa foi religada e, após iniciar o software e notar-se a estabilização das correntes, foi injetada a solução mista de H_2O_2 $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e HQ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão PBS pH 6,5 com uma microseringa e a válvula de injeção colocada na posição *inject*. A amperometria foi realizada apenas com os eletrodos imobilizados com HRP.

Os sinais transientes de corrente foram obtidos para os oito eletrodos, conforme ilustra a FIGURA 4.9, com RSD de aproximadamente 5% ($n=8$), indicando boa repetibilidade dos sinais analíticos entre os eletrodos. Excluindo-se o eletrodo 1, que claramente indica um resultado anômalo, o valor de RSD vai para 2,8% ($n=7$). Efetuando o teste estatístico Q , confirma-se que o

valor de corrente referente ao eletrodo 1 pode ser rejeitado, no qual o Q calculado é maior do que o Q tabelado ($0,6423 > 0,526$), com 95% de confiança.

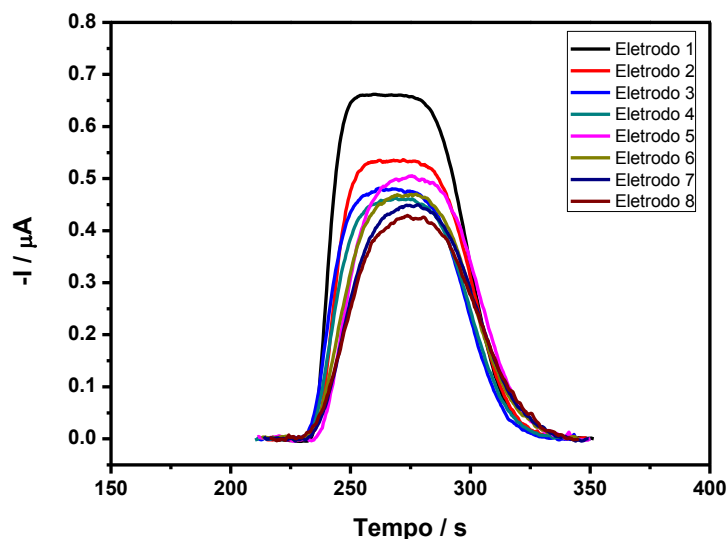


FIGURA 4. 9: Sinais transientes de corrente dos eletrodos imobilizados com HRP. Injeção de solução de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de HQ e $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ H_2O_2 em tampão PBS pH 6,5. Vazão de $100 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$, alça de amostragem de $100 \text{ } \mu\text{L}$ e potencial fixado em $-0,2 \text{ V}$.

Os sinais transientes de corrente obtido na FIGURA 4.9 ocorrem em função das reações catalisadas pela enzima HRP, portanto, sem esta, a resposta eletroquímica seria apenas em função da HQ e H_2O_2 , com sinal bastante diminuído. Na presença da HRP, inicialmente, esta é oxidada pelo H_2O_2 , que se reduz à água. Na presença de HQ, que se oxida a p-benzoquinona, a enzima é reduzida e, em potencial de $-0,2 \text{ V}$, a p-benzoquinona retorna à forma de HQ e esta é a reação responsável pelo sinal analítico observado¹³¹⁻¹³³ (FIGURA 4.10). A produção de p-benzoquinona é proporcional à quantidade de enzima.

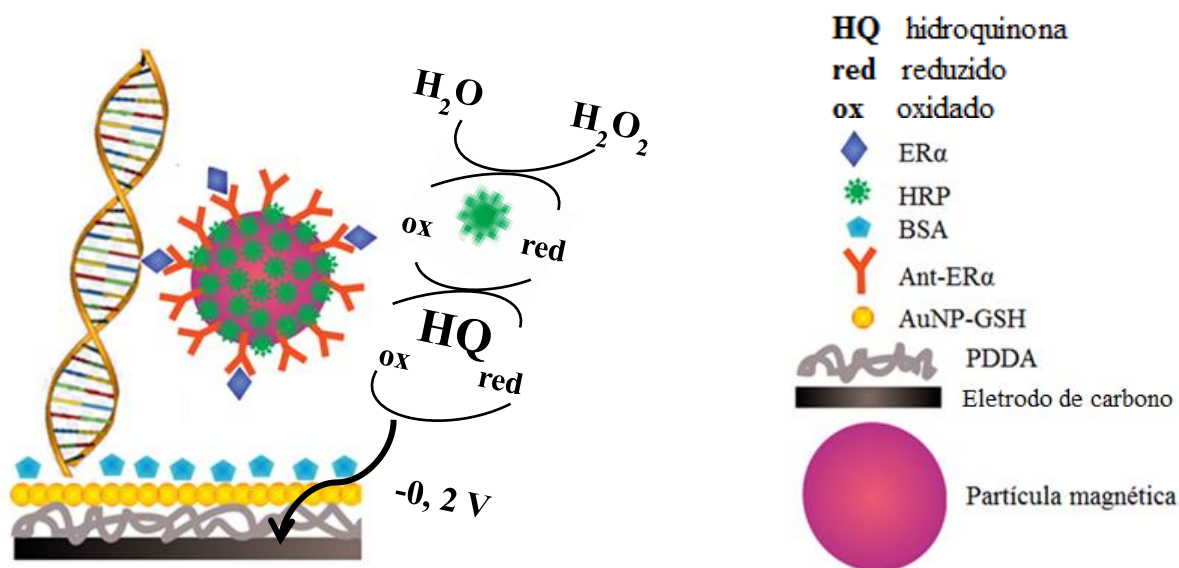


FIGURA 4. 10: Representação esquemática do mecanismo de resposta do imunossensor.

A vantagem em se trabalhar com um conjunto de oito eletrodos é a possibilidade de eliminar as respostas dos eletrodos que não funcionaram por qualquer motivo e, de modo análogo, recorrer a esse procedimento quando o sinal analítico de algum eletrodo é muito discrepante dos demais. Ainda, há a possibilidade de se trabalhar com a detecção de mais de um biomarcador simultaneamente.

4.5- Estudo da influência da vazão

O estudo da influência da vazão possibilita otimizar o volume, tanto de solução de HQ e H_2O_2 como de solução carreadora, que passa pela célula microfluídica por minuto. Tal estudo foi realizado utilizando solução de injeção mista de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de HQ e $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ H_2O_2 em tampão PBS pH 6,5, alça de amostragem de $100 \mu\text{L}$, concentração de $\text{ER}\alpha$ de $138,8 \text{ fg mL}^{-1}$ e a técnica amperométrica em potencial fixado em $-0,2 \text{ V}$. Foram estudadas as vazões de 50, 100, 150 e $200 \mu\text{L min}^{-1}$.

Conforme nota-se na FIGURA 4.11, as vazões de 100 e $200 \mu\text{L min}^{-1}$ não apresentaram mudança significativa de corrente. Para $50 \mu\text{L min}^{-1}$, o

sinal gerado e o tempo gasto na medida não são vantajosos quando comparados a 100 e 200 $\mu\text{L min}^{-1}$.

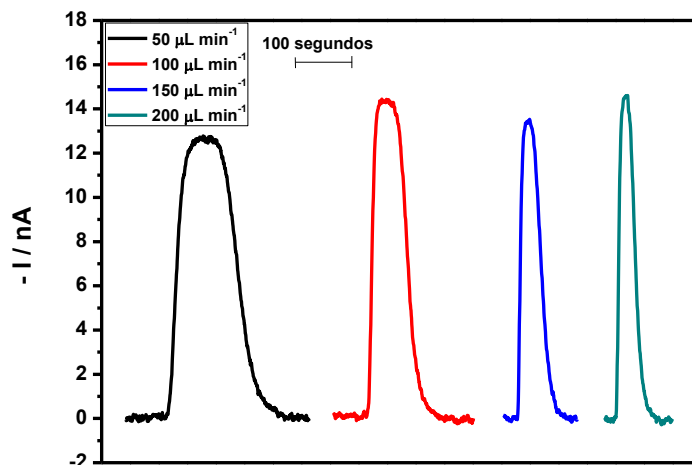


FIGURA 4. 11: Sinais transientes de corrente individuais referentes ao estudo da vazão. Resultado de um único eletrodo dentre os oito que compõe a célula eletroquímica descartável. Concentração de $\text{ER}\alpha$ de $138,8 \text{ fg mL}^{-1}$.

A vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$ foi escolhida para utilização na medida eletroquímica, uma vez que a mesma é usada para a injeção da partícula magnética decorada.

O estudo apresentado foi realizado para a mesma célula eletroquímica descartável fazendo três adições da solução de injeção para cada vazão, que era alterada na bomba de seringa. Mesmo que o intuito dessa dissertação seja desenvolver biossensores descartáveis de uso único, a possibilidade de usá-lo mais de uma vez, como no caso do estudo da vazão, evidencia a estabilidade dos eletrodos.

A TABELA 4.3 relaciona os valores de correntes de pico com os respectivos desvios-padrão e desvios-padrão relativos para cada vazão testada, com $n=8$, significando que nenhum dado de corrente foi descartado.

TABELA 4. 3: Valores de correntes de pico com respectivos desvios-padrão e desvios-padrão relativos para vazões de 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{L min}^{-1}$ (n=8).

Vazão / $\mu\text{L min}^{-1}$	I / nA	RSD entre	
		eletrodos de mesma adição / %	RSD entre adições / %
50	13,04 \pm 0,41	3,14	0,07
100	14,03 \pm 0,46	3,30	0,08
150	13,45 \pm 0,44	3,29	0,09
200	14,21 \pm 0,47	3,32	0,16

A TABELA 4.3 evidencia a alta reprodutibilidade e repetibilidade de correntes entre os eletrodos, pois os desvios-padrão e desvios-padrão relativos são bastante baixos tanto entre as adições quanto entre os eletrodos em uma mesma adição. Para compor esta tabela, foram levadas em consideração três adições sucessivas para cada vazão estudada.

4.6- Curva analítica

Neste item serão apresentados os resultados referentes ao estudo da obtenção da curva analítica utilizando os imunossensores construídos. Para tanto, foram utilizadas, na etapa de captura, as seguintes concentrações de ER α , diluídos em soro de bezerro: 0,0; 16,6; 27,7; 55,5; 94,4; 138,8; 194,4 e 513,3 fg mL $^{-1}$. Os parâmetros utilizados no sistema microfluídico foram vazão de 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ e alça de amostragem de 100 μL .

O soro de bezerro foi utilizado para diluir a proteína ER α na etapa da captura, na qual também se utilizou tampão PBS pH 7,4 e as partículas magnéticas decoradas. Tal soro corresponde a uma matriz complexa semelhante ao soro humano e é facilmente obtido comercialmente. Apesar de conter algumas substâncias indefinidas, sabe-se que fatores de crescimento, ácidos graxos, substratos energéticos, aminoácidos, vitaminas e proteínas,

principalmente albumina, estão presentes e, ainda, é muito utilizado como meio de cultura¹³⁴. A FIGURA 4.12 apresenta a curva analítica realizada em soro de bezerro e a FIGURA 4.13 os sinais transientes de correntes individuais.

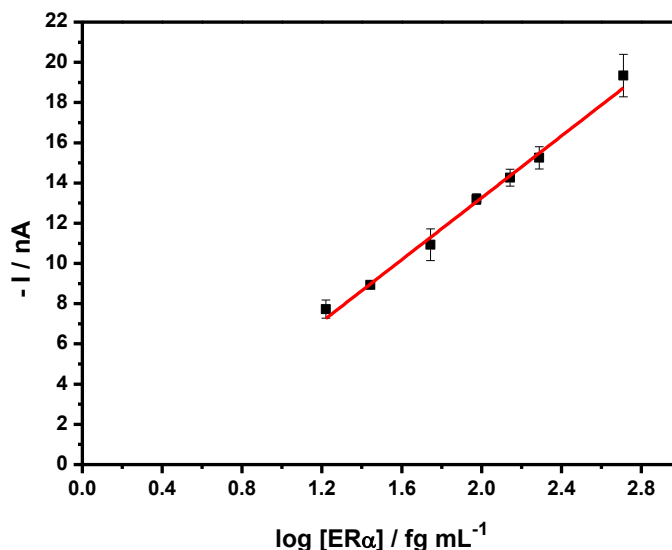


FIGURA 4. 12: Curva analítica para ERO em soro de bezerro, dada pela corrente em função do logaritmo da concentração de ERO. Realizada com concentrações de 16,6; 27,7; 55,5; 94,4; 138,8; 194,4 e 513,3 fg mL⁻¹ de proteína.

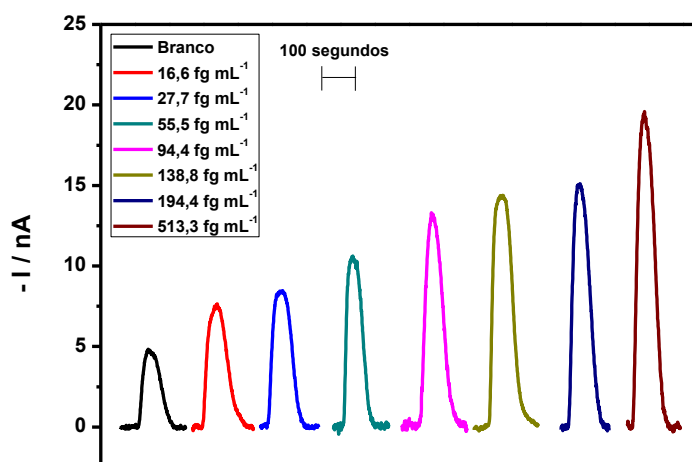


FIGURA 4. 13: Sinais transientes de corrente individuais referentes à curva analítica.

A partir da equação da reta referente à curva analítica da FIGURA 4.12, que é $y = - (2,12 \pm 0,36) + (7,70 \pm 0,22) \log x$, com R^2 de 0,9949, foram

calculadas as figuras de mérito apresentadas na TABELA 4.3. O limite de detecção foi calculado como sendo três vezes o desvio-padrão do branco (n=8) somado ao sinal do branco que, por meio da equação da reta, indica a menor concentração que pode ser detectada. O limite de quantificação foi calculado de modo análogo, no qual utilizou-se um fator de dez vezes.

TABELA 4. 4: Figuras de mérito para o biossensor desenvolvido.

Sensibilidade	Limite de Detecção	Limite de Quantificação	Intervalo Linear
7,7 nA mL fg[ER α] ⁻¹	10,0 fg mL ⁻¹	16,89 fg mL ⁻¹	16,6–513,3 fg mL ⁻¹

O intervalo linear de resposta, a sensibilidade e o limite de detecção alcançados são muito menores do que o do método ELISA, que é de 12 a 200 ng μL^{-1} para ER α , cuja sensibilidade é pouco maior do que 12 ng μL^{-1} .

4.7 – Determinação da concentração de ER α em lisado de células MCF-7

O imunossensor desenvolvido foi testado frente a uma amostra real, o lisado de células MCF-7, a fim de determinar a concentração do biomarcador nesse meio. Para isso, foi construída uma curva de adição de padrão, cujos padrões continham lisado de células MCF-7 diluídos na proporção 1:100 em tampão PBS pH 7,4 e fortificados com ER α nas concentrações de 16,6; 27,7; 55,5; 111,1 e 333,3 fg mL⁻¹, além da amostra sem fortificação (FIGURA 4.14).

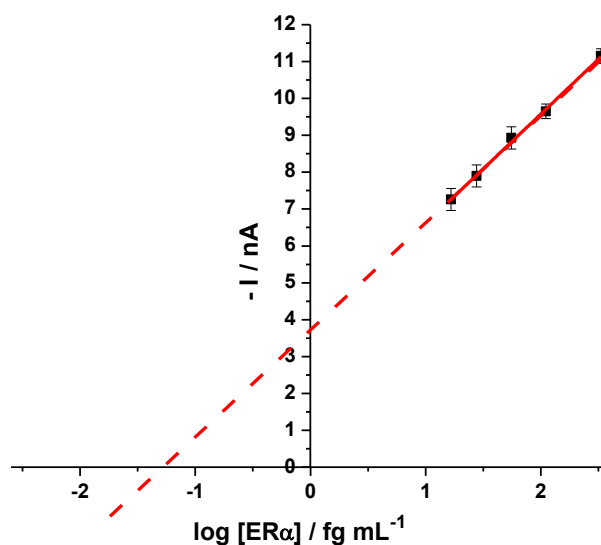


FIGURA 4. 14: Determinação da concentração de ER α em amostra real de lisado de células MCF-7 por adição de padrões fortificados com 16,6; 27,7; 55,5; 111,1 e 333,3 fg mL⁻¹ de proteína. Concentração de ER α encontrada: 0,06 fg mL⁻¹.

A equação da reta obtida para o gráfico da FIGURA 4.14 é $y = (3,63 \pm 0,13) + (2,97 \pm 0,07) \log x$, com R^2 de 0,99783. A concentração de ER α presente no lisado diluído 1:100 foi de 6 fg mL⁻¹, sendo o valor de proteínas totais da amostra de 3,76 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$.

Apesar dos níveis de RE não serem sempre os mesmos quando se tem lisados MCF-7 de diferentes procedências, a concentração encontrada condiz com o encontrado na literatura, da ordem de fg mL⁻¹ ¹³⁵. Essa concentração apresentou-se abaixo do intervalo linear alcançado pelo método, devido a diferença na matriz utilizada. Apesar das células MCF-7 serem altamente heterogêneas, a matriz ainda é menos complexa do que o soro de bezerro ¹³⁶.

Capítulo 5

Conclusões

5 – CONCLUSÕES

Com o presente trabalho de mestrado, foi possível desenvolver um método eletroquímico para a determinação do biomarcador de câncer de mama ER α , o que é novo na literatura.

O imunossensor eletroquímico descartável apresentou excelentes resultados para a determinação do biomarcador para câncer de mama ER α em soro de bezerro e em lisados de células de câncer de mama. O método desenvolvido mostrou-se simples, de fácil execução e de baixo custo, uma vez que, as células eletroquímicas impressas comerciais com um eletrodo de trabalho custam próximo de US\$11,00 a unidade sem nenhuma modificação e as células eletroquímicas descartáveis propostas com oito eletrodos de trabalho sem modificação custam R\$0,60. Além disso, as células eletroquímicas desenvolvidas apresentaram boa reprodutibilidade entre si e entre os eletrodos de um mesmo arranjo, com menos de 5% de RSD.

O limite de detecção de 10,0 fg mL⁻¹, o limite de quantificação de 16,89 fg mL⁻¹ e a sensibilidade de 7,7 nA mL fg[ER α]⁻¹ em intervalo linear de 16,6 a 513,3 fg mL⁻¹ são muito mais baixos do que aqueles encontrados nos métodos utilizados para análise de rotina deste biomarcador, como o ELISA, além do baixo custo e tempo hábil de resposta.

A capacidade de detecção de ER α em lisados de células MCF-7 sem nenhum tratamento prévio, confirma que o dispositivo microfluídico pode ser empregado com eficiência nesse tipo de amostra. Além disso, o ER α é um biomarcador que não é detectado no soro em análises de rotina sendo que o limite de detecção do método ELISA não é suficientemente baixo para detectar a proteína nos níveis em que ela é expressa nas células cancerígenas. A possibilidade de utilizar o imunossensor eletroquímico no direcionamento da terapia contra o câncer de mama e, até mesmo, de auxiliar no diagnóstico precoce da doença é uma alternativa aos métodos de rotina atualmente utilizados.

Capítulo 6

Perspectivas Futuras

6 – PERSPECTIVAS FUTURAS

Como atividades futuras, pretende-se realizar a determinação multiplexada de dois ou mais biomarcadores para câncer de mama no dispositivo proposto, utilizando o mesmo arranjo de oito eletrodos de trabalho acoplado a um sistema microfluídico. Espera-se também aplicá-lo em amostras reais de soro humano, contando com uma parceria com o Hospital do Câncer de Barretos para adquirir tais amostras de pacientes portadores e não-portadores (controle) do câncer de mama. Ainda, foram realizados testes de ELISA para avaliar a exatidão do método proposto, porém, estes não foram suficientes devido a não obtenção de uma curva padrão por duas vezes, portanto, serão feitos novos testes. Por fim, o trabalho de mestrado será transformado em um artigo científico para publicação.

Capítulo 7
Referências Bibliográficas

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. O que é o câncer? Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em 12 de janeiro de 2016.
2. SOCIEDADE BRASILEIRA DE MASTOLOGIA. Câncer de mama. Disponível em: <<http://www.sbmastologia.com.br/index.php/perguntas-frequentes/cancer-de-mama.html>>. Acesso em 12 de janeiro de 2016.
3. HECHT, S.S., "Tobacco smoke carcinogens and lung cancer". *Journal of the National Cancer Institute*. **91**(14): 1194, 1999.
4. PFEIFER, G.P.; DENISSENKO, M.F.; OLIVIER, M.; TRETYAKOVA, N.; HECHT, S.S. & HAINAUT, P., "Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers". *Oncogene*. **21**(48): 7435, 2002.
5. CHEN, W.Y.; ROSNER, B.; HANKINSON, S.E.; COLDITZ, G.A. & WILLETT, W.C., "Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk". *JAMA : the journal of the American Medical Association*. **306**(17): 1884, 2011.
6. THOMSON, C.A., "Diet and breast cancer: understanding risks and benefits". *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*. **27**(5): 636, 2012.
7. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Agentes Cancerígenos. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=320>. Acesso em: 12 de janeiro de 2016.
8. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Como é o processo de carcinogênese? Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319>. Acesso em: 12 de janeiro de 2016.
9. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativas de 2014. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/outros-destaques/estimativa-de-incidencia-de-cancer-2014/estimativa_cancer_24042014.pdf>. Acesso em: 12 de janeiro de 2016.
10. NATIONAL CANCER INSTITUTE. Cancer Statistics. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer/statistics>>. Acesso em 12 de janeiro de 2016.
11. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2016/2017. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/por-tipos.asp>>. Acesso em: 12 de janeiro de 2016.
12. KUMAR, R., "Breast cancer tumor markers". *Journal of Solid Tumors*. **2**(1): 43, 2012.

13. BEYOU MEDICAL GROUP. La anatomía de la mama. Disponível em: <<http://www.beyousalud.com/la-anatomia-de-la-mama/>>. Acesso em: 12 de janeiro de 2016.
14. HILL, T.D.; KHAMIS, H.J.; TYCZYNSKI, J.E. & BERKEL, H.J., "Comparison of male and female breast cancer incidence trends, tumor characteristics, and survival". *Annals of epidemiology*. **15**(10): 773, 2005.
15. HANBY, A.M. & HUGHES, T.A., "In situ and invasive lobular neoplasia of the breast". *Histopathology*. **52**(1): 58, 2008.
16. ZENGEL, B.; YARARBAS, U.; DURAN, A.; USLU, A.; ELIYATKIN, N.; DEMIRKIRAN, M.A.; CENGIZ, F.; SIMSEK, C.; POSTACI, H.; VARDAR, E. & DURUSOY, R., "Comparison of the clinicopathological features of invasive ductal, invasive lobular, and mixed (invasive ductal + invasive lobular) carcinoma of the breast". *Breast cancer (Tokyo, Japan)*. **22**(4): 374, 2013.
17. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Tipo-Mama. Disponível em : <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>. Acesso em: 12 de janeiro de 2016.
18. LUDWIG, J.A. & WEINSTEIN, J.N., "Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection". *Nature reviews. Cancer*. **5**(11): 845, 2005.
19. SCHACHT, V. & KERN, J.S., "Basics of immunohistochemistry". *The Journal of investigative dermatology*. **135**(3): 30, 2015.
20. PUTTI, T.C.; EL-REHIM, D.M.A.; RAKHA, E.A.; PAISH, C.E.; LEE, A.H.S.; PINDER, S.E. & ELLIS, I.O., "Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis". *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* **18**: 26, 2005.
21. VAN DE VIJVER, M.J.; PETERSE, J.L.; MOOI, W.J.; WISMAN, P.; LOMANS, J.; DALESIO, O. & NUSSE, R., "Neu-protein overexpression in breast cancer. Association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer". *The New England journal of medicine*. **319**(19): 1239, 1988.
22. LIU, E.; THOR, A.; HE, M.; BARCOS, M.; LJUNG, B.M. & BENZ, C., "The HER2 (c-erbB-2) oncogene is frequently amplified in in situ carcinomas of the breast". *Oncogene*. **7**(5): 1027, 1992.
23. ALLRED, D.C.; CLARK, G.M.; MOLINA, R.; TANDON, A.K.; SCHNITT, S.J.; GILCHRIST, K.W.; OSBORNE, C.K.; TORMEY, D.C. & MCGUIRE, W.L., "Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer". *Human pathology*. **23**(9): 974, 1992.
24. LOHRISCH, C. & PICCART, M., "HER2/neu as a predictive factor in breast cancer". *Clinical breast cancer*. **2**(2): 129, 2001.
25. FEHM, T.; BECKER, S.; DUERR-STOERZER, S.; SOTLAR, K.; MUELLER, V.; WALLWIENER, D.; LANE, N.; SOLOMAYER, E. &

- UHR, J., "Determination of HER2 status using both serum HER2 levels and circulating tumor cells in patients with recurrent breast cancer whose primary tumor was HER2 negative or of unknown HER2 status". *Breast cancer research : BCR*. **9**(5): R74, 2007.
26. RUSSO, I.H. & RUSSO, J., "Role of hormones in mammary cancer initiation and progression". *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. **3**(1): 49, 1998.
27. COLDITZ, G.A.; ROSNER, B.A. & SPEIZER, F.E., "Risk factors for breast cancer according to family history of breast cancer. For the Nurses' Health Study Research Group". *Journal of the National Cancer Institute*. **88**(6): 365, 1996.
28. HUO, D.; ADEBAMOWO, C.A.; OGUNDIRAN, T.O.; AKANG, E.E.; CAMPBELL, O.; ADENIPEKUN, A.; CUMMINGS, S.; FACKENTHAL, J.; ADEMUYIWA, F.; AHSAN, H. & OLOPADE, O.I., "Parity and breastfeeding are protective against breast cancer in Nigerian women". *British journal of cancer*. **98**(5): 992, 2008.
29. AMERICAN CANCER SOCIETY. Signs and symptoms of breast cancer. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-signs-symptoms>>. Acesso em 12 de janeiro de 2016.
30. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Tipo-Mama-Sintomas. Disponível em : <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/ma/ma/sintomas>>. Acesso em: 12 de janeiro de 2016.
31. LEE, H. & CHEN, Y.-P.P., "Image based computer aided diagnosis system for cancer detection". *Expert Systems with Applications*. **42**(12): 5356, 2015.
32. MITRA, S. & SHANKAR, B.U., "Medical image analysis for cancer management in natural computing framework". *Information Sciences*. **306**: 111, 2015.
33. STRIMBU, K. & TAVEL, J.A., "What are biomarkers?". *Current opinion in HIV and AIDS*. **5**(6): 463, 2010.
34. LIESKE, B.; RAVICHANDRAN, D. & WRIGHT, D., "Role of fine-needle aspiration cytology and core biopsy in the preoperative diagnosis of screen-detected breast carcinoma". *British journal of cancer*. **95**(1): 62, 2006.
35. LIEBENS, F.; CARLY, B.; CUSUMANO, P.; VAN BEVEREN, M.; BEIER, B.; FASTREZ, M. & ROZENBERG, S., "Breast cancer seeding associated with core needle biopsies: A systematic review". *Maturitas*. **62**(2): 113, 2009.
36. HOORNTJE, L.E.; PEETERS, P.H.M.; MALI, W.P.T.M. & BOREL RINKES, I.H.M., "Vacuum-assisted breast biopsy". *European Journal of Cancer*. **39**(12): 1676, 2003.

37. SOOT, L.; WEERASINGHE, R.; WANG, L. & NELSON, H.D., "Rates and indications for surgical breast biopsies in a community-based health system". *American journal of surgery*. **207**(4): 499, 2014.
38. OREL, S.G.; KAY, N.; REYNOLDS, C. & SULLIVAN, D.C., "BI-RADS categorization as a predictor of malignancy". *Radiology*. **211**(3): 845, 1999.
39. LIBERMAN, L. & MENELL, J.H., "Breast imaging reporting and data system (BI-RADS)". *Radiologic Clinics of North America*. **40**: 409, 2002.
40. TANEJA, P.; MAGLIC, D.; KAI, F.; ZHU, S.; KENDIG, R.D.; FRY, E.A. & INOUE, K., "Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance". *Clinical Medicine Insights. Oncology*. **4**: 15, 2010.
41. MAUGHAN, K.L.; LUTTERBIE, M.A. & HAM, P.S., "Treatment of breast cancer". *American Family Physician*. **81**(11): 1339, 2010.
42. CHIKKAVEERIAIAH, B.V.; BHIRDE, A.; MALHOTRA, R.; PATEL, V.; GUTKIND, J.S. & RUSLING, J.F., "Single-wall carbon nanotube forest arrays for immunoelectrochemical measurement of four protein biomarkers for prostate cancer". *Analytical Chemistry*. **81**: 9129, 2009.
43. KILLICK, E.; MORGAN, R.; LAUNCHBURY, F.; BANCROFT, E.; PAGE, E.; CASTRO, E.; KOTE-JARAI, Z.; APRIKIAN, A.; BLANCO, I.; CLOWES, V.; DOMCHEK, S.; DOUGLAS, F.; ECCLES, D.; EVANS, D.G.; HARRIS, M.; KIRK, J.; LAM, J.; LINDEMAN, G.; MITCHELL, G.; PACHTER, N.; SELKIRK, C.; TUCKER, K.; ZGAJNAR, J.; EELES, R. & PANDHA, H., "Role of Engrailed-2 (EN2) as a prostate cancer detection biomarker in genetically high risk men". *Scientific reports*. **3**: 2059, 2013.
44. BHATT, A.N.; MATHUR, R.; FAROOQUE, A.; VERMA, A. & DWARAKANATH, B.S., "Cancer biomarkers - current perspectives". *The Indian Journal of Medical Research*. **132**: 129, 2010.
45. LEVENSON, A.S. & JORDAN, V.C., "MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line". *Cancer Research*. **57**(15): 3071, 1997.
46. SOULE, H.D.; VAZGUEZ, J.; LONG, A.; ALBERT, S. & BRENNAN, M., "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma". *Journal of the National Cancer Institute*. **51**(5): 1409, 1973.
47. BEATSON, G., "On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases". *Lancet*: 162, 1896.
48. REID, C.S.E.; HOSPITAL, E. & AVENUE, R., "Endocrine and paracrine hormones in the promotion, progression and recurrence of breast cancer". 1037, 1996.
49. KLINGE, C.M., "Estrogen receptor interaction with estrogen response elements". *Nucleic Acids Research*. **29**(14): 2905, 2001.

50. JORDAN, V.C., "Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators as multifunctional medicines. 2. Clinical considerations and new agents". *Journal of Medicinal Chemistry*. **46**(7): 1081, 2003.
51. ALI, S. & COOMBES, R.C., "Estrogen receptor alpha in human breast cancer: Occurrence and significance". *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. **5**(3): 271, 2000.
52. LACROIX, M.; QUERTON, G.; HENNEBERT, P.; LARSIMONT, D. & LECLERCQ, G., "Estrogen receptor analysis in primary breast tumors by ligand-binding assay, immunocytochemical assay, and northern blot: a comparison". *Breast Cancer Research and Treatment*. **67**(3): 263, 2001.
53. ROMAIN, S.; BIDRON, C.L.; MARTIN, P.M. & MAGDELENAT, H., "EORTC Receptor Study Group Report Steroid Receptor Distribution in 47 892 Breast Cancers . A Collaborative Study of 7 European Laboratories". (3): 411, 1995.
54. CHIKKAVEERIAIAH, B.V.; SOLDÀ, A.; CHOUDHARY, D.; MARAN, F. & RUSLING, J.F., "Ultrasensitive nanostructured immunosensor for stem and carcinoma cell pluripotency gatekeeper protein NANOG". *Nanomedicine (London, England)*. **7**(7): 957, 2012.
55. MALHOTRA, R.; PATEL, V.; CHIKKAVEERIAIAH, B.V.; MUNGE, B.S.; CHEONG, S.C.; ZAIN, R.B.; ABRAHAM, M.T.; DEY, D.K.; GUTKIND, J.S. & RUSLING, J.F., "Ultrasensitive detection of cancer biomarkers in the clinic by use of a nanostructured microfluidic array". *Analytical chemistry*. **84**(14): 6249, 2012.
56. TURASHVILI, G.; BOUCHAL, J.; EHRMANN, J.; FRIDMAN, E.; SKARDA, J. & KOLAR, Z., "Novel immunohistochemical markers for the differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas". *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*. **151**(1): 59, 2007.
57. ABCAM. Estrogen Receptor alpha ELISA Kit (ab128499). Disponível em: <<http://www.abcam.com/estrogen-receptor-alpha-elisa-kit-ab128499.html>>. Acesso em 12 de janeiro de 2016.
58. RUSLING, J.F.; KUMAR, C.V.; GUTKIND, J.S. & PATEL, V., "Measurement of biomarker proteins for point-of-care early detection and monitoring of cancer". *Analyst*. **135**(10): 2496, 2010.
59. GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖRÖS, J. & REIMHULT, E., "Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures". *Sensors*. **8**(3): 1400, 2008.
60. FATIBELLO-FILHO, O. & CAPELATO, M., "Biossensores". *Química Nova*. **15**(1): 28, 1992.
61. LUONG, J.H.T.; MALE, K.B. & GLENNON, J.D., "Biosensor technology: Technology push versus market pull". *Biotechnology Advances*. **26**(5): 492, 2008.
62. RICCARDI, C.D.S.; COSTA, P.I.D. & YAMANATA, H., "Imunossensor amperométrico". **25**(2): 316, 2002.

63. YANG, M.; MCGOVEM, M.E. & THOMPSON, M., "Genosensor technology and the detection of interfacial nucleic acid chemistry". *Analytica Chimica Acta*. **346**(3): 259, 1997.
64. DRUMMOND, T.G.; HILL, M.G. & BARTON, J.K., "Electrochemical DNA sensors". *Nature Biotechnology*. **21**(10): 1192, 2003.
65. BURCU BAHADIR, E. & KEMAL SEZGINTÜRK, M., "Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics". *Talanta*. **132**: 162, 2015.
66. LUPPA, P.B.; SOKOLL, L.J. & CHAN, D.W., "Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry". *Clinica Chimica Acta*. **314**(1-2): 1, 2001.
67. KIM, B.K.; LI, J.; IM, J.-E.; AHN, K.-S.; PARK, T.S.; CHO, S.I.; KIM, Y.-R. & LEE, W.-Y., "Impedometric estrogen biosensor based on estrogen receptor alpha-immobilized gold electrode". *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **671**(0): 106, 2012.
68. XIA, W.; LI, Y.; WAN, Y.; CHEN, T.; WEI, J.; LIN, Y. & XU, S., "Electrochemical biosensor for estrogenic substance using lipid bilayers modified by Au nanoparticles". *Biosensors and Bioelectronics*. **25**(10): 2253, 2010.
69. ZHANG, G.-J.; HUANG, M.J.; LUO, Z.H.H.; TAY, G.K.I.; LIM, E.-J.A.; LIU, E.T. & THOMSEN, J.S., "Highly sensitive and reversible silicon nanowire biosensor to study nuclear hormone receptor protein and response element DNA interactions". *Biosensors and Bioelectronics*. **26**(2): 365, 2010.
70. DE, S.; MACARA, I.G. & LANNIGAN, D.A., "Novel biosensors for the detection of estrogen receptor ligands". *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. **96**(3-4): 235, 2005.
71. PADMANABHAN, S.; SHINOJ, V.K.; MURUKESHAN, V.M. & PADMANABHAN, P., "Highly sensitive optical detection of specific protein in breast cancer cells using microstructured fiber in extremely low sample volume". *Journal of Biomedical Optics*. **15**(1): 017005, 2012.
72. HSING, I.M.; XU, Y. & ZHAO, W., "Micro- and nano- magnetic particles for applications in biosensing". *Electroanalysis*. **19**(7-8): 755, 2007.
73. KRAUSE, C.E.; OTIENO, B.A.; LATUS, A.; FARIA, R.C.; PATEL, V.; GUTKIND, J.S. & RUSLING, J.F., "Rapid microfluidic immunoassays of cancer biomarker proteins using disposable inkjet-printed gold nanoparticle arrays". *ChemistryOpen*. **2**(4): 141, 2013.
74. HUDARI, F.F.; DA SILVA, B.F.; PIVIDORI, M.I. & ZANONI, M.V.B., "Voltammetric sensor based on magnetic particles modified composite electrode for determination of triamterene in biological sample". *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2015.
75. ROQUEA, C.; BISPO, S.; PINHEIRO, R.N.; ANTUNES, J.M.; GONÇALVES, D. & FERREIRA, H., "Antibody immobilization on magnetic particles". *Journal of Molecular Recognition*. **22**(2): 77, 2009.

76. NICHKOVA, M.; DOSEV, D.; GEE, S.J.; HAMMOCK, B.D. & KENNEDY, I.M., "Multiplexed immunoassays for proteins using magnetic luminescent nanoparticles for internal calibration". *Analytical Biochemistry*. **369**(1): 34, 2007.
77. BRANDÃO, D.; LIÉBANA, S. & PIVIDORI, M.I., "Multiplexed detection of foodborne pathogens based on magnetic particles". *New Biotechnology*. **32**(5): 511, 2015.
78. CARINELLI, S.; MARTÍ, M.; ALEGRET, S. & PIVIDORI, M.I., "Biomarker detection of global infectious diseases based on magnetic particles". *New Biotechnology*, 2015.
79. OTIENO, B.A.; KRAUSE, C.E.; LATUS, A.; CHIKKAVEERIAIAH, B.V.; FARIA, R.C. & RUSLING, J.F., "On-line protein capture on magnetic beads for ultrasensitive microfluidic immunoassays of cancer biomarkers". *Biosensors and Bioelectronics*. **53**: 268, 2014.
80. CARINELLI, S.; XUFRE BALLESTEROS, C.; MARTI, M.; ALEGRET, S. & PIVIDORI, M.I., "Electrochemical magneto-actuated biosensor for CD4 count in AIDS diagnosis and monitoring". *Biosensors and Bioelectronics*. **74**: 974, 2015.
81. BRANDAO, D.; LIEBANA, S. & PIVIDORI, M.I., "Multiplexed detection of foodborne pathogens based on magnetic particles". *New Biotechnology*. **32**(5): 511, 2015.
82. AFONSO, A.S.; ULIANA, C.V.; MARTUCCI, D.H. & FARIA, R.C., "Simple and rapid fabrication of disposable carbon-based electrochemical cells using an electronic craft cutter for sensor and biosensor applications". *Talanta*. **146**: 381, 2016.
83. NASCIMENTO, V.B.A., L., "Eletrodos fabricados por "silk-screen"". *Química Nova*. **21**(5): 614, 1998.
84. JANECZEK, K.; KOZIOŁ, G.; JAKUBOWSKA, M.; ARAŻNA, A.; MŁOŻNIAK, A. & FUTERA, K., "Assessment of electromechanical properties of screen printed polymer nanopastes". *Materials Science and Engineering: B*. **178**(8): 511, 2013.
85. OKIMOTO, H.; TAKENOBU, T.; YANAGI, K.; MIYATA, Y.; SHIMOTANI, H.; KATAURA, H. & IWASA, Y., "Tunable carbon nanotube thin-film transistors produced exclusively via inkjet printing". *Advanced Materials*. **22**(36): 3981, 2010.
86. FADDOUL, R.; REVERDY-BRUAS, N.; BLAYO, A. & KHELIFI, B., "Inkjet printing of silver nano-suspensions on ceramic substrates – Sintering temperature effect on electrical properties". *Microelectronic Engineering*. **105**: 31, 2013.
87. ZHAO, J.; YU, Y.; WENG, B.; ZHANG, W.; HARRIS, A.T.; MINETT, A.I.; YUE, Z.; HUANG, X.F. & CHEN, J., "Sensitive and selective dopamine determination in human serum with inkjet printed Nafion/MWCNT chips". *Electrochemistry Communications*. **37**: 32, 2013.

88. BEECHER, P.; SERVATI, P.; ROZHIN, A.; COLLI, A.; SCARDACI, V.; PISANA, S.; HASAN, T.; FLEWITT, A.J.; ROBERTSON, J.; HSIEH, G.W.; LI, F.M.; NATHAN, A.; FERRARI, A.C. & MILNE, W.I., "Ink-jet printing of carbon nanotube thin film transistors". *Journal of Applied Physics*. **102**(4): 1, 2007.
89. WENG, B.; SHEPHERD, R.L.; CROWLEY, K.; KILLARD, A.J. & WALLACE, G.G., "Printing conducting polymers". *Analyst*. **135**(11): 2779, 2010.
90. ANGNES, L.; RICHTER, E.M.; AUGELLI, M.A. & KUME, G.H., "Gold electrodes from recordable CDs". *Analytical Chemistry*. **72**(21): 5503, 2000.
91. LOWINSOHN, D.; RICHTER, E.M.; ANGNES, L. & BERTOTTI, M., "Disposable gold electrodes with reproducible area using recordable CDs and toner masks". *Electroanalysis*. **18**: 89, 2006.
92. RICHTER, E.M.; AUGELLI, M.A.; KUME, G.H.; MIOSHI, R.N. & ANGNES, L., "Gold electrodes from recordable CDs for mercury quantification by flow injection analysis". *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. **366**(5): 444, 2000.
93. FIGUEIREDO-FILHO, L.C.S.; JANEGITZ, B.C.; FARIA, R.C.; FATIBELLO-FILHO, O.; MARCOLINO-JUNIOR, L.H.; CAETANO, F.R. & MATTOS, I.L., "Construção e aplicação de um minissensor de bismuto utilizando materiais de baixo custo para determinações voltamétricas in loco". *Química Nova*. **35**(5): 1016, 2012.
94. NUNES, L.M.S. & FARIA, R.C., "The Influence of the Electrodeposition Conditions on the Electroanalytical Performance of the Bismuth Film Electrode for Lead Determination". *Electroanalysis*. **20**(20): 2259, 2008.
95. ASBAHR, D.; FIGUEIREDO-FILHO, L.C.S.; VICENTINI, F.C.; OLIVEIRA, G.G.; FATIBELLO-FILHO, O. & BANKS, C.E., "Differential pulse adsorptive stripping voltammetric determination of nanomolar levels of methotrexate utilizing bismuth film modified electrodes". *Sensors and Actuators, B: Chemical*. **188**: 334, 2013.
96. WINDMILLER, J.R.; BANDODKAR, A.J.; PARKHOMOVSKY, S. & WANG, J., "Stamp transfer electrodes for electrochemical sensing on non-planar and oversized surfaces". *Analyst*. **137**(7): 1570, 2012.
97. O'HALLORAN, M.P.; PRAVDA, M. & GUILBAULT, G.G., "Prussian Blue bulk modified screen-printed electrodes for H₂O₂ detection and for biosensors". *Talanta*. **55**(3): 605, 2001.
98. METTERS, J.P.; KADARA, R.O. & BANKS, C.E., "New directions in screen printed electroanalytical sensors: an overview of recent developments". *The Analyst*. **136**(6): 1067, 2011.
99. WINDMILLER, J.R. & WANG, J., "Wearable Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review". *Electroanalysis*. **25**(1): 29, 2013.
100. BANDODKAR, A.J.; HUNG, V.W.S.; JIA, W.; VALDÉS-RAMÍREZ, G.; WINDMILLER, J.R.; MARTINEZ, A.G.; RAMÍREZ, J.; CHAN, G.;

- KERMAN, K. & WANG, J., "Tattoo-based potentiometric ion-selective sensors for epidermal pH monitoring". *Analyst*. **138**(1): 123, 2013.
101. GEŹICKI, J.; KLOSKOWSKI, A. & CHRZANOWSKI, W., "Prototype of electrochemical sensor for measurements of volatile organic compounds in gases". *Sensors and Actuators B: Chemical*. **177**: 1173, 2013.
102. FANJUL-BOLADO, P.; HERNÁNDEZ-SANTOS, D.; LAMAS-ARDISANA, P.J.; MARTÍN-PERNÍA, A. & COSTA-GARCÍA, A., "Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes". *Electrochimica Acta*. **53**(10): 3635, 2008.
103. KADARA, R.O.; JENKINSON, N. & BANKS, C.E., "Characterisation of commercially available electrochemical sensing platforms". *Sensors and Actuators, B: Chemical*. **138**(2): 556, 2009.
104. O'MAHONY, A.M.; WANG, J.; MAHONY, A.M.O. & O'MAHONY, A.M., "Electrochemical detection of gunshot residue for forensic analysis: A review". *Electroanalysis*. **25**(6): 1341, 2013.
105. GUINOVART, T.; BANDODKAR, A.J.; WINDMILLER, J.R.; ANDRADE, F.J. & WANG, J., "A potentiometric tattoo sensor for monitoring ammonium in sweat". *Analyst*. **138**(22): 7031, 2013.
106. DUFFY, D.C.; MCDONALD, J.C.; SCHUELLER, O.J.A. & WHITESIDES, G.M., "Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)". *Analytical Chemistry*. **70**(23): 4974, 1998.
107. HENRY, O.Y.F., A.; BENI, V.; LABORIA, N.; SÁNCHEZ, J. L. A.; LATTA, D.; GERMAR, F. V.; DRESE, K.; KATAKIS, I.; O'SULLIVAN, C. K., "Design and testing of a packaged microfluidic cell for the multiplexed electrochemical detection of cancer markers". *Electrophoresis*. **30**: 3398, 2009.
108. BANGE, A.; HALSALL, H.B. & HEINEMAN, W.R., "Microfluidic immunosensor systems". *Biosensors and Bioelectronics*. **20**(12): 2488, 2005.
109. WHITESIDES, G.M., "The origins and the future of microfluidics". *Nature*. **442**(7101): 368, 2006.
110. FAKUNLE, E.S. & FRITSCH, I., "Low-temperature co-fired ceramic microchannels with individually addressable screen-printed gold electrodes on four walls for self-contained electrochemical immunoassays". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **398**(6): 2605, 2010.
111. CHIKKAVEERIAIAH, B.V.; MANI, V.; PATEL, V.; GUTKIND, J.S. & RUSLING, J.F., "Microfluidic electrochemical immunoarray for ultrasensitive detection of two cancer biomarker proteins in serum". *Biosensors and Bioelectronics*. **26**(11): 4477, 2011.
112. POLYSCIENCES, INC. Catalog numbers: 86011, 86010. Disponível em: <<http://www.polysciences.com/skin/frontend/default/polysciences/pdf/TDS618.pdf>>. Acesso em 12 de janeiro de 2016.

113. EL-SHAFFEY, A.; TOLIC, N.; YOUNG, M.M.; SALE, K.; SMITH, R.D. & KERY, V., "'Zero-length" cross-linking in solid state as an approach for analysis of protein-protein interactions". *Protein science : a publication of the Protein Society*. **15**(3): 429, 2006.
114. JANG, L.-S. & KENG, H.-K., "Modified fabrication process of protein chips using a short-chain self-assembled monolayer". *Biomedical Microdevices*. **10**(2): 203, 2008.
115. MANI, V.; CHIKKAVEERIAIAH, B.V.; PATEL, V.; GUTKIND, J.S. & RUSLING, J.F., "Ultrasensitive immunosensor for cancer biomarker proteins using gold nanoparticle film electrodes and multienzyme-particle amplification". *ACS Nano*. **3**: 585, 2009.
116. SAM, S.; TOUAHIR, L.; SALVADOR ANDRESA, J.; ALLONGUE, P.; CHAZALVIEL, J.N.; GOUGET-LAEMMEL, A.C.; DE VILLENEUVE, C.H.; MORAILLON, A.; OZANAM, F.; GABOUZE, N. & DJEBBAR, S., "Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces". *Langmuir*. **26**(2): 809, 2010.
117. GILLES, M.A.; HUDSON, A.Q. & BORDERS, C.L., "Stability of water-soluble carbodiimides in aqueous solution". *Analytical Biochemistry*. **184**(2): 244, 1990.
118. STAROS, J.V.; WRIGHT, R.W. & SWINGLE, D.M., "Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions". *Analytical Biochemistry*. **156**(1): 220, 1986.
119. NAKAJIMA, N. & IKADA, Y., "Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media". *Bioconjugate Chemistry*. **6**(1): 123, 1995.
120. TANG, C.K.; VAZE, A. & RUSLING, J.F., "Fabrication of immunosensor microwell arrays from gold compact discs for detection of cancer biomarker proteins". *Lab on a Chip*. **12**(2): 281, 2012.
121. KLEIN-HITPASS, L.; RYFFEL, G.U.; HEITLINGER, E. & CATO, A.C.B., "A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor". *Nucleic Acids Research*. **16**(2): 647, 1988.
122. KLEIN-HITPASS, L.; SCHORPP, M.; WAGNER, U. & RYFFEL, G.U., "An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells". *Cell*. **46**(7): 1053, 1986.
123. KARATHANASIS, S., "Estrogen Receptor Ligands Modulate Its Interaction with DNA". *Journal of Biological Chemistry*. **272**(17): 11384, 1997.
124. SCHWABE, J.W.; NEUHAUS, D. & RHODES, D., "Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor". *Nature*. **348**(6300): 458, 1990.
125. DEEGAN, B.J.; BHAT, V.; SELDEEN, K.L.; MCDONALD, C.B. & FAROOQ, A., "Genetic variations within the ERE motif modulate

- plasticity and energetics of binding of DNA to the ER nuclear receptor". *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **507**(2): 262, 2011.
126. STRUCTURAL BIOLOGY KNOWLEDGEBASE. 1IHC. Disponível em: <<http://sbkb.org/pdbid/fgviewer/1hcq>>. Acesso em 12 de janeiro de 2016.
127. SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J. & KLENK, D.C., "Measurement of protein using bicinchoninic acid". *Analytical Biochemistry*. **150**(1): 76, 1985.
128. BARD, A.J. & FAULKNER, L.R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. Vol. 38. 2002, New York: Wiley. 1505.
129. CHIKAE, M.; IDEGAMI, K.; KERMAN, K.; NAGATANI, N.; ISHIKAWA, M.; TAKAMURA, Y. & TAMIYA, E., "Direct fabrication of catalytic metal nanoparticles onto the surface of a screen-printed carbon electrode". *Electrochemistry Communications*. **8**(8): 1375, 2006.
130. BARTLETT, P.N.P., K.F.E. , "A study of the kinetics of the reaction between ferrocene monocarboxylic acid and glucose oxidase using the rotating-disc electrode ". *Journal of Electroanalytical Chemistry* **397**: 53, 1995.
131. RUAN, C., "Detection of zeptomolar concentrations of alkaline phosphatase based on a tyrosinase and horseradish peroxidase bienzyme biosensor". *Talanta*. **54**(6): 1095, 2001.
132. ZHAO, J.; LIN, F.; YI, Y.; HUANG, Y.; LI, H.; ZHANG, Y. & YAO, S., "Dual amplification strategy of highly sensitive thrombin amperometric aptasensor based on chitosan–Au nanocomposites". *Analyst*. **137**(15): 3488, 2012.
133. LACZKA, O.; MAESA, J.M.; GODINO, N.; DEL CAMPO, J.; FOUGHT-HANSEN, M.; KUTTER, J.P.; SNAKENBORG, D.; MUÑOZ-PASCUAL, F.X. & BALDRICH, E., "Improved bacteria detection by coupling magneto-immunocapture and amperometry at flow-channel microband electrodes". *Biosensors and Bioelectronics*. **26**(8): 3633, 2011.
134. TETZNER, T.A.D., "Efeitos da substituição do soro fetal bovino (sfb) e da albumina sérica bovina (bsa) pela ovalbumina (ova) na produção in vitro de embriões bovinos. Jaboticabal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária. 2007. Dissertação de Mestrado". 115 p.,
135. OSBORNE, C.K.; HOBBS, K. & TRENT, J.M., "Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories". *Breast Cancer Research and Treatment*. **9**: 111, 1987.
136. LEUNG, E.; KANNAN, N.; KRISANSSEN, G.W.; FINDLAY, M.P. & BAGULEY, B.C., "MCF-7 breast cancer cells selected for tamoxifen resistance acquire new phenotypes differing in DNA content, phospho-HER2 and PAX2 expression, and rapamycin sensitivity". *Cancer Biology and Therapy*. **9**(9): 717, 2010.