

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA

FILHO – UNESP

INSTITUTO BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Laboratório de Biologia Celular

BIOSENSOR PARA IDENTIFICAÇÃO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Doutoranda: Ana Livia de Carvalho Bovolato

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dra. Elenice Deffune

Coorientadora: Marli Leite Moraes

Coorientador no exterior: Alexandre Brolo

Colaborador: Sidney Ribeiro

BOTUCATU

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA  
FILHO – UNESP

INSTITUTO BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Laboratório de Biologia Celular

BIOSENSOR PARA IDENTIFICAÇÃO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Tese apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu,  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,  
Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em  
Biotecnologia.

Doutoranda: Ana Livia de Carvalho Bovolato

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Elenice Deffune

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Marli Leite Moraes

Coorientador no exterior: Prof. Dr. Alexandre Brolo

Colaborador: Prof. Dr. Sidney Ribeiro

BOTUCATU

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Bovolato, Ana Livia de Carvalho.

Biossensor para identificação da doença de alzheimer /  
Ana Livia de Carvalho Bovolato. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de  
Botucatu

Orientador: Elenice Deffune  
Coorientador: Marli Moraes Leite  
Coorientador: Alexandre Brolo  
Capes: 31302025

1. Biomarcadores. 2. Biossensores. 3. Doença de  
Alzheimer. 4. Análise espectral.

Palavras-chave: Biomarcadores; Biossensores; Doença de  
Alzheimer; SERS.

**Ana Livia de Carvalho Bovolato**

## Biossensor Para Identificação Da Doença De Alzheimer

Tese apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutorado

Orientador: Prof(a). Dr(a) Elenice Deffune

Comissão examinadora

---

Prof(a). Dr(a) Elenice Deffune

Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

---

Prof(a). Dr(a) João Pessoa Araújo Junior

Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

---

Prof(a). Dr(a) Glenda Gisela Ibáñez Redín

Instituto de Física de São Carlos - USP

---

Prof(a). Dr(a) Hernane Barud

Universidade de Araraquara

---

Prof(a). Dr(a) Arthur Oscar Shelp

Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Botucatu, 07 de Outubro de 2021.

### **Dedicatória**

Dedico esse trabalho ao meu avô que sempre me pediu para estudar muito e descobrir um remédio para curar as dores dos velhinhos. Não é um remédio, mas espero que esse trabalho ajude de alguma maneira.

A minha família por todo apoio, ajuda, confiança e incentivo.

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, meus Orixás e guias espirituais por terem me guiado, dado força, confiança, acalmar meu coração nos tempos difíceis e por ter colocado pessoas maravilhosas no meu caminho durante essa jornada.

A todos os vózinhas e vózinhas que aceitaram participar e tornar possível essa pesquisa. Foi graças a vocês que tive forças para terminar.

Aos meus pais, por acreditarem em mim, me incentivarem, darem apoio e pela educação que me deram. Sem essa não estaria aqui e não seria quem eu sou. E toda a minha família que renunciaram a vários momentos importantes para me incentivarem e apoiarem.

A Dra. Elenice, Dra. Marli, Dr Shelp, Dr Sidney e suas respectivas equipes que apoiaram e ajudaram na realização desse projeto.

Ao Dr Brolo e seu grupo por terem me recebido no Canadá e me ajudado a realizar esse projeto.

Ao Dr Matheus e Lenize, que me ajudarem tantas vezes a pensar e reavaliar meu trabalho. E graças aos mesmos e o Dr Shelp o trabalho pode ser iniciado.

Ao Prof João Pessoa por todo apoio, orientação e conselhos. Terminei!

A Pâmela, Gabi, Georgia, Fer e demais amigos que me ajudaram, deram apoio e não esqueceram de mim mesmo com a distância e em meio a pandemia. Aos meus amigos do Canadá, Christopher, Sapan, MiHai, Alê e Deisy que foram de fundamental importância para mim nesses tempos tão complicados em que vivemos. A Gi e Pedro, amigos inestimáveis e mentores que foram essenciais para a realização desse projeto e me ajudaram muito a manter meu bem-estar psicológico.

Ao pessoal do Comitê de Ética e pós-graduação, por toda paciência, colaboração e simpatia.

### **Epígrafe:**

“Saber Viver

Não sei... Se a vida é curta ou longa demais pra nós,  
Mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocamos o  
coração das pessoas.

Muitas vezes basta ser:

Colo que acolhe, Braço que envolve, Palavra que conforta, Silêncio  
que respeita, Alegria que contagia, Lágrima que corre, Olhar que  
acaricia, Desejo que sacia, Amor que promove.

E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida.

É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais, mas  
que seja intensa,

Verdadeira, pura... Enquanto durar”

Cora Coralina

Bovolato, A. C. Biossensor para identificação rápida da doença de Alzheimer. Botucatu, 2021.87p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

---

A doença de Alzheimer (DA) é a uma doença neurodegenerativa complexa, responsável pela maioria dos casos de comprometimento cognitivo progressivo em pacientes idosos. O processo degenerativo pode iniciar 20 anos antes da manifestação clínica da doença. O diagnóstico precoce e preciso da DA continua laborioso e quase sempre interfaceado com o diagnóstico de exclusão. Neste projeto é proposto o desenvolvimento de um biossensor para a detecção da doença de Alzheimer baseado na detecção de autoanticorpos anti-ATP-sintase subunidade Beta e anti-FRMD8 presentes em amostra periféricas, soro, e em LCR (líquido cefalorraquidiano) de pacientes com a doença de Alzheimer. Para tal foi construído dois sistemas baseados em imunoenaios: 1) imobilizou-se ATP-Sintase subunidade Beta em lâmina de ouro modificadas com 11-MUA e Quitosana e 2) imobilizou-se o peptídeo FRMD8 associado ao lipossomo de DPPG em superfície de ouro modificada com 11-MUA e PEI. Em ambos os casos se quantificou os respectivos anticorpos comerciais diluídos nas proporções não diluído, 0,01mg/mL (puro), 1:10 (0,001mg/mL), 1:100 (0,0001mg/mL), 1:1000 (10ng/mL) e 1:10000 (1ng/mL), com o intuito de gerar uma curva de calibração. Para realizar as medidas foi feita a técnica de SERS (Espectroscopia Raman Aprimorada por Superfície) usando sondas SERS de nanopartículas de ouro modificadas com Anti-IgG porção Fc. Como análise comparativa, ambos os resultados foram comparados com amostras de indivíduos não portadores de DA (como controle Alzheimer, CA) e com anti-HIV p17 como controle experimental (CE). Os sensores foram hábeis de gerar curvas de calibração na qual o biossensor baseado em FRMD8 foi capaz de detectar até 1ng/mL e o biossensor baseado em ATP-Sintase foi capaz de detectar até 10ng/mL. Na validação, apenas o biossensor baseado em ATP Sintase se demonstrou eficaz na semi-quantificação e diferenciação entre controles e amostras e através de análise de PCA foi estabelecer e criar um Score SERS e correlacionar com o Score MEEM. Um ponto extremamente importante a se destacar nesse trabalho é que não há biomarcador “perfeito” para a DA devido ao seu múltiplo interfaceamento, sendo, a melhor alternativa, uma análise de múltiplos marcadores.

*Palavras-chave:* doença de Alzheimer, biossensores, biomarcadores, SERS.

Bovolato, A. C. Biosensor for rapid identification of Alzheimer's disease. Botucatu, 2021. 87p. Thesis (Doctorate) - Botucatu Biosciences Institute, UNESP Paulista State University "Julio de Mesquita Filho".

---

Alzheimer's disease (AD) is a complex neurodegenerative disease, responsible for most cases of progressive cognitive impairment in elderly patients. The degenerative process can start 20 years before the clinical manifestation of the disease. The early and accurate diagnosis of AD remains laborious and is almost always intertwined with diagnoses of exclusion. This project proposes the development of a biosensor for the detection of Alzheimer's disease based on the detection of anti-ATP-synthase Beta and anti-FRMD8 autoantibodies present in peripheral samples, serum, and in CSF (cerebrospinal fluid) from patients with Alzheimer's disease. For this purpose, two systems based on immunoassays were constructed: 1) ATP-Synthase Beta subunit was immobilized on gold plate modified with 11-MUA and Chitosan and 2) FRMD8 peptide associated with DPPG liposome was immobilized on a modified gold surface with 11-MUA and PEI. In both cases, the respective commercial antibodies were quantified in the proportions undiluted, 0.01mg/mL (pure), 1:10 (0.001mg/mL), 1:100 (0.0001mg/mL), 1:1000 (1ng/mL) and 1:10000 (1ng/mL), to generate a calibration curve. The SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy) technique was performed using SERS probes of gold nanoparticles modified with Anti-IgG Fc portion. As a comparative analysis, both results were compared with samples from individuals without AD (as control Alzheimer, CA) and with anti-HIV p17 as experimental control (EC). The sensors were able to generate calibration curves in which the FRMD8-based biosensor was able to detect up to 1ng/mL and the ATP-Synthase-based biosensor was able to detect up to 10ng/mL. In the validation test, only the ATP Synthase-based biosensor proved to be effective in semi-qualification and differentiation between controls and samples, and, through PCA analysis, it was established and created SERS Score and correlated with the MEEM Score. An extremely important point to be highlighted in this work is that there is no "perfect" biomarker for AD due to its multiple interfacing, the best alternative being an analysis of multiple markers.

Keywords: Alzheimer's disease, biosensors, biomarkers, SERS.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Estimativa de custos de tratamento em relação à evolução da demência. **Legenda:** Desenvolvimento de custo total em milhões de Euros por ano. **Fonte:** Adaptado de “Cost of care for persons with dementia”; Health Econ Rev, 2020. -----20

**Figura 2.** Comparação entre o crescimento da mortalidade de diversas doenças nos EUA. **Fonte:** Adaptado de “2021 Alzheimer's disease facts and figures.”; Alzheimer's Association (2021). -----22

**Figura 3.** Número de casos estimados em 2021 e projeção para 2060. **Legenda:** **A:** o número de casos estimados em 2021 nos EUA; **B:** projeção do número de casos de DA nos EUA. **Fonte:** Adaptado de “2021 Alzheimer's disease facts and figures.”; Alzheimer's Association (2021). -----23

**Figura 4.** Estimativa da incidência anual de demência específica para a idade. **Legenda:** Análise derivada da meta-regressão de Poisson de efeitos mistos, para regiões do mundo para as quais a síntese meta-analítica era viável. **Fonte:** World Health Organization and Alzheimer's Disease International (WHO). Dementia: a public health priority (2012). -----24

**Figura 5.** Prevalência da doença de Alzheimer, 2005-2050: projeções baseadas em três modelos dos efeitos dos avanços significativos do tratamento introduzidos em 2010. **Legenda:** Gráfico de barras comparando a prevalência de casos leves, moderados / graves e totais de doença de Alzheimer nos Estados Unidos, 2000-2050, com base em quatro projeções: nenhum avanço terapêutico (A), início tardio da doença (B), doença retardada progressão (C), e início tardio da doença e progressão tardia da doença (D). **Fonte:** Adaptado: “The Public Health Impact of Alzheimer's Disease, 2000–2050: Potential Implication of Treatment Advances.” Annu. Rev. Public Health 2002. -----25

**Figura 6.** Esquema e histologia da fisiopatologia da DA. **Legenda:** A) esquema demonstrando a formação da Placas Amiloides e Emaranhados Neurofibrilares (38). B) corte histológico de cérebro humano por coloração HE, a seta evidencia um neurônio com emaranhados neurofibrilares oriundos de agregação da proteína Tau (37). C) corte histológico de cérebro humano por coloração de prata, evidenciando a formação de placas amilóides (36). **Fonte:** Figura A adaptada de: “Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents.” Eur J Med Chem. 2017. Figura B extraída de: Neurofibrillary tangles. [acesso em 09 de maio de 2021]. Disponível em: <https://www.chegg.com/flashcards/nmsk-b-path-069f0110-e3bb-40e7-9521-0c1743eb9a53/deck>. Figura C extraída de: “Cases of dementia in the UK and a toxic chemical may be linked.” Utah People's Post [periodico na internet]. May 2021. [acesso em 09 maio 2021]. Disponível em: <https://www.utahpeoplespost.com/2016/01/dementia-uk-toxic-chemical-linked/>. -----27

**Figura 7:** Modelo hipotético da trajetória clínica da doença de Alzheimer (AD). **Fonte:** Extraído e adaptado: “Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging. Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease” (2011)<sup>31</sup>. -----28

**Figura 8.** Sequência de eventos na fisiopatologia da doença de Alzheimer. **Fonte:** Adaptado de: “Aspectos da fisiopatologia da doença de Alzheimer esporádica.”, Revista Brasileira Neurologia (2012). -----29

**Figura 9:** Representação esquemática da circulação de autoanticorpos proveniente da doença de Alzheimer. **Legenda:** A morte celular em regiões de patologia leva à liberação de proteínas e seus fragmentos como detritos associados à doença. Essas moléculas se espalham para a circulação, e o sistema imunológico

responde provocando a produção de autoanticorpos. Fonte: Adaptado de “Utility of Autoantibodies as Biomarkers for Diagnosis and Staging of Neurodegenerative Diseases”, Int Rev Neurobiol (2015). -----34

**Figura 10:** Esquema de ATP sintase de mitocôndria de mamíferos. **Legenda:** Desenho da ATP sintase mitocondrial que é estruturada e funcionalmente organizada em dois setores principais: uma porção Fo embutida na membrana e um F1 catalítico solúvel voltado para a matriz. Fo funciona como um canal de prótons com um movimento rotativo que aciona o F1 acoplado para sintetizar ou hidrolisar ATP, dependendo da direção de rotação. F1 compreende três heterodímeros  $\alpha\beta$ , enquanto o setor Fo contém um anel C de subunidades transmembrana e uma cópia da subunidade A. Os dois setores são conectados por meio de um eixo de rotor central composto pelas subunidades  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$  e um estator periférico que compreende vários peptídeos. **Fonte:** Adaptado de “Systematic review of plasma-membrane ecto-ATP synthase: A new player in health and disease”, Exp Mol Pathol (2018). -----35

**Figura 11:** Modelos comparativos esquemáticos e atômicos de ATP Sintase F<sub>1</sub>F<sub>o</sub> de bactérias, cloroplastos e mitocôndrias. **Legenda:** As subunidades são codificadas por cores para mostrar domínios homólogos entre as espécies:  $\alpha$  (vermelho);  $\beta$  (amarelo),  $\delta$  (cinza nas bactérias e cloroplastos, marrom nas mitocôndrias); OSCP (cinza nas mitocôndrias); b / b' (roxo escuro); anel c (roxo claro); F<sub>6</sub> (rosa);  $\gamma$  (azul);  $\epsilon$  (verde); e d (azul claro). **Fonte:** Adaptado de “ATP synthase: Evolution, energetics, and membrane interactions”, J Gen Physiol (2020). -----36

**Figura 12:** FRMD8 estabiliza o complexo sheddase iRhom2 / ADAM17 na superfície da célula. **Legenda:** Representação esquemática do papel de FRMD8 na via iRhom2 / ADAM17: em condições de tipo selvagem, ADAM17 e iRhom2 são estabilizados por FRMD8 e, portanto, protegidos da degradação através da via endolisômica. **Fonte:** Adaptado de “FRMD8 promotes inflammatory and growth factor signalling by stabilising the iRhom/ADAM17 sheddase complex”, Elife (2018). -----39

**Figura 13:** Esquema de um biossensor. **Legenda:** Os biossensores são constituídos por um elemento de reconhecimento biológico e um método de transdução de sinal, e têm permitido a quantificação de vários analitos. Fonte: Adaptado de “Optical Biosensors for Therapeutic Drug Monitoring”, Biosensors (2019).40

**Figura 14:** Esquema correlacionando ligações elásticas e níveis de energia vibracional. **Legenda:** A) Oscilador harmônico, constituído por duas esferas de massa  $m_1$  e  $m_2$  ligadas por uma mola sem limite de elasticidade (obedece à lei de Hooke para qualquer deformação). B) Esquema da distribuição dos níveis de energia vibracionais em função do número quântico  $v$  e valor da separação energética entre níveis consecutivos. **Fonte:** Extraído de “Espectroscopia Vibracional”, Revista Ciência Elementar (2018). ----43

**Figura 15:** Esquema demonstrando os movimentos que as moléculas podem fazer ao serem excitadas. **Legenda:** Graus de liberdade de uma molécula triatômica. O movimento vibracional conjectura que a ligação entre os átomos funciona como uma mola. -----43

**Figura 16:** Diagrama comparativo de espectroscopia de IR e Raman. **Legenda:** A) Diagrama de nível de energia mostrando os estados envolvidos nos espectros Raman em relação a IR <sup>121</sup>. B) Três tipos de processos de espalhamento que podem ocorrer quando a luz interage com uma molécula <sup>122</sup>. -----45

**Figura 17:** Diagrama de nível de energia mostrando os estados envolvidos nos espectros Raman, Rayleigh e Fluorescência. **Fonte:** Applications of Raman spectroscopy in cancer diagnosis. Cancer Metastasis Rev (2018). -----46

**Figura 18:** Esquema de processamento das amostras de sangue. **Fonte:** Arquivo pessoal. -----55

<b>Figura 19:</b> Ilustração de como ocorre a coleta de LCR. <b>Fonte:</b> Adaptado do site: <a href="http://crmliquor.com/exame-de-liquor/">http://crmliquor.com/exame-de-liquor/</a> <sup>148</sup> . -----	56
<b>Figura 20:</b> Teste de MEEM. <b>Fonte:</b> Extraído do site da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, <a href="https://www.saude.sc.gov.br">https://www.saude.sc.gov.br</a> . -----	57
<b>Figura 21:</b> Esquema demonstrando as etapas de modificação da superfície da lâmina de ouro. <b>Fonte:</b> Arquivo pessoal. -----	62
<b>Figura 22:</b> Esquema demonstrando a síntese da nanopartícula de ouro (AuNP). <b>Fonte:</b> Arquivo pessoal.	64
<b>Figura 23:</b> Esquema demonstrando a modificação das nanopartículas. <b>Fonte:</b> Arquivo pessoal. -----	65
<b>Figura 24:</b> Esquema demonstrando o ensaio sanduíche. <b>Fonte:</b> Arquivo pessoal. -----	67
<b>Figura 25:</b> Esquema demonstrando o ensaio com as amostras reais. <b>Fonte:</b> Arquivo pessoal. -----	68
<b>Figura 26:</b> Esquema demonstrando a medida do imunoensaio. <b>Fonte:</b> Arquivo pessoal. -----	69
<b>Figura 27:</b> Fluxograma do tratamento dos dados. <b>Fonte:</b> Arquivo pessoal. -----	71
<b>Figura 28:</b> Em A pode-se ver a lâmina de ouro não modificada com um risco em evidência para demonstrar que o microscópio estava em foco. Em B pode-se observar a deposição de matéria no sistema 11-MUA/Quitosana/ATP Sintase subunidade beta. Em C observa-se a deposição de matéria no sistema 11-MUA/PEI/FRMD8. <b>Fonte:</b> Arquivo pessoal. -----	72
<b>Figura 29:</b> Espectros de PM-IRRAS para o sistema 11-MUA/Quitosana/ATP. <b>Legenda:</b> A) Espectro para a camada de 11-MUA; B) Espectro para a camada Quitosana e C) Espectro para a camada ATP Subunidade beta. <b>Fonte:</b> Arquivo pessoal. -----	74
<b>Figura 30:</b> Espectros de PM-IRRAS para o sistema 11-MUA/PEI/DPPG+FRMD8. <b>Legenda:</b> A) Espectro para a camada de 11-MUA; B) Espectro para a camada PEI e C) Espectro para a camada DPPG+FRMD8. <b>Fonte:</b> Arquivo pessoal. -----	75
<b>Figura 31:</b> Imagens de TEM das nanopartículas. <b>Legenda:</b> A e B) Apresentam imagens das AuNP não modificadas. C e D) apresentam imagens das AuNP modificadas. <b>Fonte:</b> Arquivo Pessoal. -----	76
<b>Figura 32:</b> Medidas de DLS para a AuNP e sua funcionalização com NBA/PEG e NBA/PEG/EDC+NHS/Anticorpo. <b>Fonte:</b> Arquivo Pessoal. -----	77
<b>Figura 33:</b> Espectros das etapas de modificação das NP por UV-Vis. <b>Fonte:</b> Arquivo pessoal. -----	78
<b>Figura 34:</b> Possíveis espectros obtidos. <b>Legenda:</b> A) Espectro de regiões da lâmina nos quais não houve deposição de matéria; B) Espectro com pico na região do NBA de baixa intensidade; C) Espectro característico de NBA; D) Espectro com alto grau de autofluorescência, típico de região modificada porem, na qual, não houve interação da nanopartícula ou houve porem com baixo grau de intensidade, nesse caso a intensidade da autofluorescência “oculta” o pico de interesse. <b>Fonte:</b> Arquivo pessoal. -----	79
<b>Figura 35:</b> Isolamento do pico de interesse, NBA (592nm). <b>Legenda:</b> A) Espectro sem sofre tratamento de dados; B) Espectro com a região de interesse isolada e apresentando o desvio padrão (sombra). <b>Fonte:</b> Arquivo pessoal. -----	80

**Figura 36:** Mapas representativos da técnica de PCA, proteína FRMD8. **Legenda:** **A)** Mapa antes do PCA, anticorpo com concentração de 1/10 (0,01mg/mL); **B)** Mapa antes do PCA, anticorpo com concentração de 1/1000 (0,0001mg/mL); **C)** Mapa A depois do PCA, anticorpo com concentração de 1/10 (0,01mg/mL); **D)** Mapa B depois do PCA, anticorpo com concentração de 1/1000 (0,0001mg/mL). **Fonte:** Arquivo pessoal.80

**Figura 37:** Curva de Calibração para a proteína FRMD8. **Legenda:** A esquerda a curva de calibração baseada na intensidade dos picos e a direita a curva de calibração baseada nas áreas sob os picos. **Fonte:** Arquivo pessoal. -----81

**Figura 38:** Curva de Calibração para a proteína ATP Sintase. **Legenda:** A esquerda a curva de calibração baseada na intensidade dos picos e a direita a curva de calibração baseada nas áreas sob os picos. **Fonte:** Arquivo pessoal. -----81

**Figura 39:** Validação do biossensor para o autoanticorpo Anti-FRMD8. **Legenda:** Gráfico da Positividade das amostras de LCR baseado na intensidade dos picos. **Fonte:** Arquivo pessoal.-----82

**Figura 40:** Validação do biossensor para o autoanticorpo Anti-FRMD8. **Legenda:** Gráfico da Positividade das amostras de Soro baseado na intensidade dos picos. **Fonte:** Arquivo pessoal.-----82

**Figura 41:** Validação do biossensor para o autoanticorpo Anti-ATP Sintase subunidade Beta. **Legenda:** Gráfico da Positividade das amostras de Soro baseado na intensidade dos picos. **Fonte:** Arquivo pessoal.--  
----- 83

**Figura 42:** Validação do biossensor para o autoanticorpo Anti-ATP Sintase subunidade Beta. **Legenda:** Gráfico da Positividade das amostras de Soro baseado na intensidade dos picos. **Fonte:** Arquivo pessoal. -  
-----84

**Figura 43:** Análise de PCA para o biossensor Anti-ATP Sintase subunidade Beta. **Legenda:** Através da técnica de PCA foi possível estabelecer dois grupos de DA. **Fonte:** Arquivo pessoal.-----85

## LISTA DE TABELA

**Tabela 1:** Autoanticorpos associados a DA e seus potenciais papéis. **Fonte:** Adaptado “Biomarkers for the Early Detection and Progression of Alzheimer's Disease. Neurotherapeutics”, Neurotherapeutics (2017).30

**Tabela 2 :** Autoanticorpos encontrados associados à DA. **Fonte:** Adaptado “Autoantibodies in Alzheimer's disease potential biomarkers, pathogenic roles, and therapeutic implications.” J Biomed Res (2016). ----33

**Tabela 3:** Critérios de inclusão para os grupos de estudo. **Fonte:** Arquivo pessoal. -----54

**Tabela 4:** de PM-IRRAS para o sistema 11-MUA/Quitosana/ATP. **Fonte:** Arquivo pessoal. -----74

**Tabela 5:** Espectros de PM-IRRAS para o sistema 11-MUA/PEI/FRMD8. **Fonte:** Arquivo pessoal. -----75

**Tabela 6:** Resultados obtidos das medidas de DLS e Potencial Zeta para a AuNP e AuNP funcionalizada com NBA/PEG e NBA/PEG/EDC+NHS/Anticorpo. **Fonte:** Arquivo pessoal. -----77

**Tabela 7:** Correlação entre os Scores do MEEM e os Scores de SERS. (Saudável:25-30, Leve: 24-20, Moderado: 10-20, Grave:<9) **Fonte:** Arquivo Pessoal. -----85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11-MUA: Ácido 11-mercaptoundecanóico

ADP: Adenosina Difosfato

AgNPs: Nanopartícula de Prata

AREG: Anfiregulina

ATP: Adenosina Trifosfato

ATP-Sintase: Adenosina Trifosfato Sintase/ Adenosina Trifosfato Sintase Subunidade Beta

AuNP: Nanopartícula de Ouro

$\beta$ A: Beta Amiloide

BACE: Gene da Beta-secretase

BSA: Albumina de Soro Bovino

CA: pacientes sem diagnóstico de Alzheimer, grupo controle

CCL ou MCI: Comprometimento Cognitivo Leve

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

DA: pacientes portadores da doença de Alzheimer

DLS: *Dynamic Light Scattering*, Espalhamento Dinâmico de Luz

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DPPG: 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosforilglicerol

EDC: Etil dimetilaminopropilcarbodiimida

EDTA: Acido etilenodiaminotetracético

EGF: Fator de Crescimento Epidérmico

EUA ou US: Estados Unidos da América

Fc: região do fragmento cristalizável ou região Fc de um anticorpo

FMB: Faculdade de Medicina de Botucatu

HC: Hospital das Clínicas

HE: Hemocentro

HIV-p17: Vírus da Imunodeficiência Humana – proteína p17

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IgG: Imunoglobulina da classe G

IgM: Imunoglobulina da classe M

IR: Infravermelho

ISO: *International Organization for Standardization*

LCR: Líquido Cefalorraquidiano

LEC: Laboratório de Engenharia Celular

MEEM: Exame do Estado Mental

NP: nanopartícula

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PBST: solução salina tamponada com fosfato e Tween

PCA: Análise do Componente Principal

PDI: Índice De Polidispersão

PEG: Polietileno Glicol

PEI: Polietilenimina

Pm-Irras: Espectroscopia De Absorção De Reflexão De Infravermelho Modulado Polarizado

PPA: Proteína Precursora Amilóide

PVPI: Iodopovidona

"proteólise intramembrana regulada" (RIP

RM: Ressonância Magnética

RNV: Variável Normal Robusta

SERS: Espectroscopia Raman Aprimorada por Superfície

SERRS: Espectroscopia Raman Ressonante Aprimorada por Superfície

SNC: Sistema Nervoso Central

Sulfo-NHS ou NHS: Sulfo-N-hidroxisuccinimida

TACE: ADAM 17 ou Enzima Conversora Do Fator De Necrose Tumoral-Alfa

TCLE: Termo De Consentimento Livre E Esclarecido

TEM: Microscopia Eletrônica de Transmissão

TGF- $\alpha$ : Fator De Crescimento Transformador Alfa

TNF- $\alpha$ : Fator De Necrose Tumoral Alfa

UV-Vis: Espectroscopia de Ultravioleta-Visível

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Adversidade Econômica e Social	19
1.2 Epidemiologia	21
1.3 Etiologia	25
1.4 Biomarcadores Da Doença De Alzheimer	28
1.4.1 Autoanticorpos	32
1.4.2 ATP-sintase	35
1.4.3 FRMD-8	37
1.5 Ferramenta proposta para diagnóstico: Biossensores	40
1.5.1 Biossensores ópticos	41
1.5.2 Espectroscopia Vibracional e Efeito Raman	42
1.5.2.1 Espectroscopia Raman de Superfície Melhorada (SERS)	45
1.5.3 Biossensores usando ensaios sanduíche SERS ( <i>Surface Enhanced Raman Spectroscopy</i> )	47
2 JUSTIFICATIVA	50
3 OBJETIVO	50
3.1. Objetivo Geral	50
3.2. Objetivos Específicos	50
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	52
4.1 Comitê de Ética	52
4.2 Cálculo da amostra	52
4.3 Grupos de estudo	53
4.3.1 Critérios de inclusão e exclusão dos participantes	53
4.4 Obtenção das amostras	54
4.4.1 Amostras de Sangue	54
4.4.2 Amostras de Líquido cefalorraquidiano ou Líquor (LCR)	55
4.5 Prova Conceito	56
4.5.1 MEEM	56
4.5.2 Realização da Ressonância Magnética	58
4.6 Reagentes	59
4.7 Biomarcadores	59

4.7.1 ATP Sintase subunidade Beta e Anticorpo Anti-ATP Sintase Subunidade Beta-----	59
4.7.2 FRMD8 e Anticorpo Anti-FRMD8-----	60
4.8 Produção dos Sensores-----	61
4.8.1 Lâmina de Ouro com Superfície Modificada-----	61
4.8.1.1 Modificação-----	61
4.8.1.2 Caracterização-----	62
4.8.2 Nanopartículas de Ouro com Superfície Modificada-----	63
4.8.2.1 Síntese-----	63
4.8.2.2 Modificação-----	64
4.8.2.3 Caracterização-----	65
4.8.3 Imunoensaio -----	67
4.8.4 Imunoensaio com amostras reais – Biossensor-----	67
4.9 Medidas SERS-----	68
4.10 Análise de Dados-----	69
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	72
5.1 Lâmina de Ouro com Superfície Modificada-----	72
5.2 Nanopartículas de Ouro com Superfície Modificada-----	75
5.3 Imunoensaio – medidas SERS-----	78
5.4 Imunoensaio com amostras reais – Biossensor-----	81
6 CONCLUSÃO -----	87
7 REFERÊNCIAS-----	89

## **1. INTRODUÇÃO**

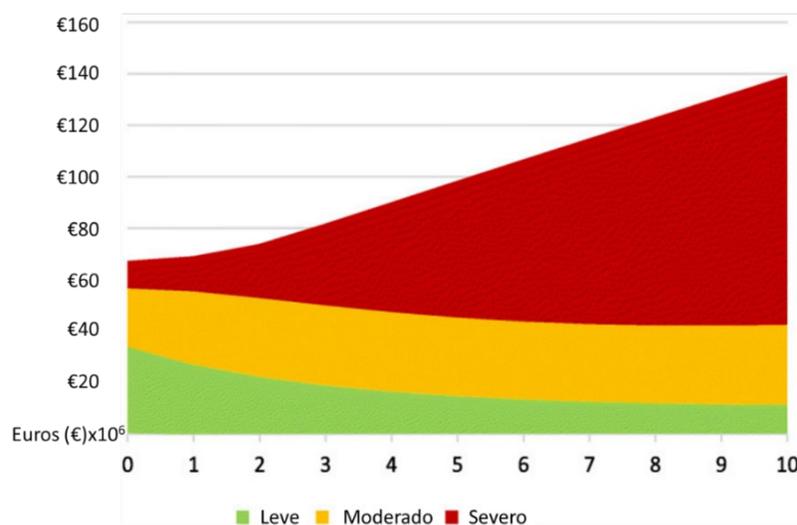
A demência é um termo genérico usado para descrever um nível de deficiência neurocognitiva que pode afetar as atividades da vida diária de uma pessoa (1–5). Múltiplas etiologias -podem levar à demência, incluindo a doença de Alzheimer (DA), doença vascular, presença de corpos de Lewy, doença Fronto temporal e lesão cerebral (1). A DA é a mais importante entre as doenças neurodegenerativas crônicas da atualidade, tendo em vista a incapacitação neurológica que ela provoca e a estimativa de aumento de incidência para as próximas décadas, justificado principalmente pelo aumento da longevidade no mundo todo, o que torna a DA um grande desafio para a saúde pública (1–3). Geralmente é caracterizada por perda progressiva de memória e funcionamento cognitivo; comprometimento funcional no desempenho das atividades diárias como comer, cozinhar, tomar banho e pagar contas; e manifestação de sintomas neuropsicológicos, como depressão, ansiedade, agitação, apatia, delírio e psicose (2).

### **1.1 Adversidade Econômica e Social**

O cuidado de pessoas com DA apresenta desafios especiais, conforme a progressão da doença. Os indivíduos requerem níveis crescentes de cuidados e apoio, incluindo tratamento médico, medicamentos específicos, equipamento médico, modificações de segurança doméstica, serviços de segurança, cuidados pessoais, creches para adultos e, por fim, serviços residenciais em tempo integral (2,3). Atualmente, não há uma cura e tratamentos eficazes para controlar a progressão da doença, portanto, impondo uma carga financeira elevada aos pacientes e suas famílias, ao sistema de prestação de cuidados de saúde e sociedade como um todo (3).

Na literatura, observamos evidências crescentes de que o custo do tratamento da demência aumentará rapidamente nos próximos anos. De acordo com estimativas recentes da Associação

Norte Americana de Alzheimer, o total de gastos médicos diretos associados com demências nos Estados Unidos aumentará de \$ 355 bilhões (2021) para mais de \$ 1 trilhão (2050), devido a aumentos projetados na população idosa (3). Estudos Europeus, baseados em dados clínicos dos centros de serviço de demência mostram, segundo a figura 1 (4), os custos estimados do tratamento, levando em consideração o desenvolvimento de limitações funcionais devido à demência, resultando no aumento do custo social por paciente, sendo mais de 800 Euros por mês, destes custos, 74% ocorreram por custos indiretos (3–7). Em um período de cinco anos, esses custos aumentarão 7,1 vezes e em 10 anos aumentarão 16,2 vezes (4).



**Figura 1.** Estimativa de custos de tratamento em relação à evolução da demência. **Legenda:** Desenvolvimento de custo total em milhões de Euros por ano. **Fonte:** Adaptado de “Cost of care for persons with dementia”; Health Econ Rev, 2020 (4).

Além disso, o estudo demonstra que a maior parte do aumento de custo procede do aumento acentuado de pessoas com demência severa e que o custo da mesma prevalece sobre o custo nos períodos posteriores (4). Vários estudos econômicos relacionados ao Alzheimer argumentam que o custo do tratamento da demência não aumenta de maneira linear de acordo com os estágios de demência leve a grave, mas descrevem uma relação parabólica, ou seja, o custo do tratamento de pessoas com demência leve e grave é mais alto do que para pessoas no estágio moderado (4–13). Esses achados destacam que o estágio da demência é um dos principais direcionadores de custos

(5–7). De modo geral, estudos correlacionam o aumento dos serviços de assistência à gravidade da demência como sendo uma das principais causas do aumento dos custos (6–11), e que o ambiente de cuidado e a perspectiva de custo combinados com a natureza progressiva da demência são direcionadores relevantes para o custo do cuidado (4,6,10,12).

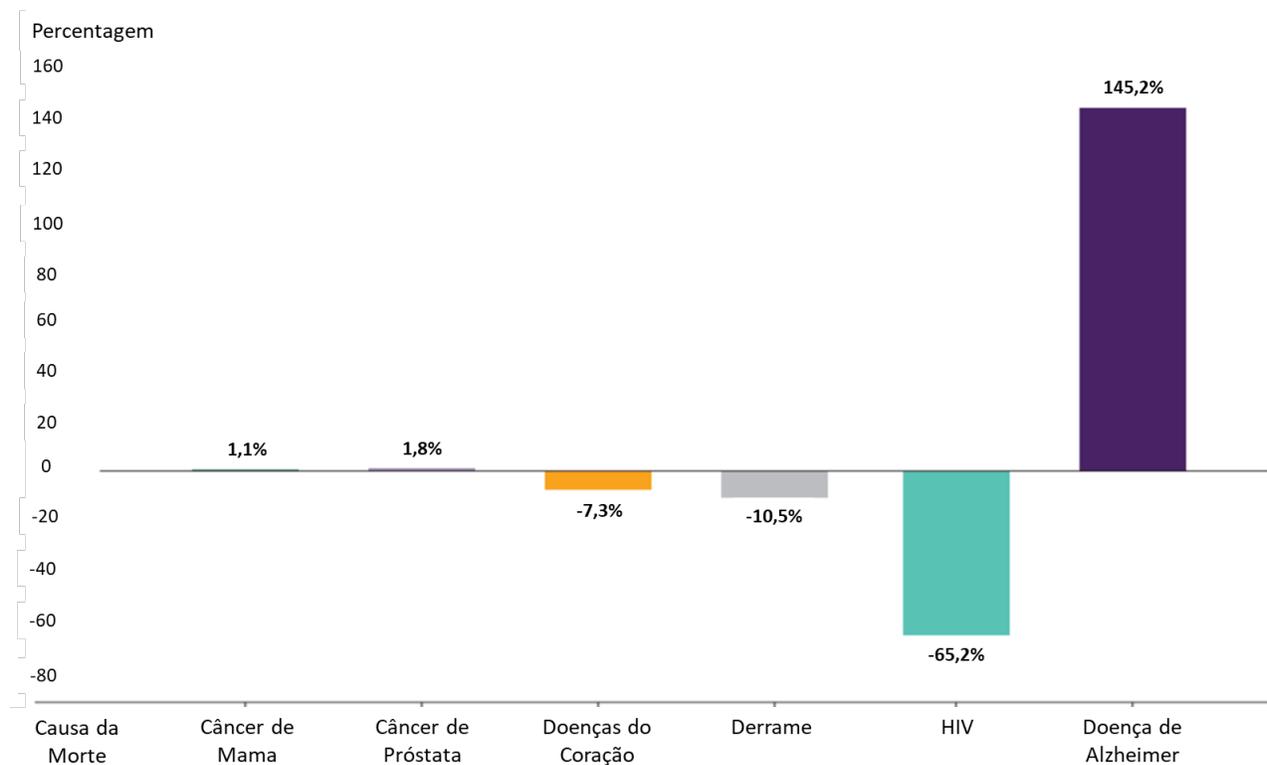
Diante dos estudos encontrados na literatura, podemos prever que o custo do sistema de saúde aumentará enormemente nas próximas décadas, especialmente porque nenhuma cura para a demência é esperada no futuro próximo (3-14). Enfatizando os três fatores de custo: nível de gravidade, custo de cuidados informais e progressão da demência - o custo do atendimento ambulatorial da demência poderia ser estimado a fim de fornecer uma boa base para o planejamento da prestação de cuidados (13). A importância da doença neurodegenerativa vai, portanto, além da sua elevada prevalência. Um a cada 3 indivíduos norte-americanos com mais de 65 anos é acometido morrem de DA ou algum tipo de demência. Estima-se que a cada minuto uma suspeita de DA seja feita nos Estados Unidos (14).

## **1.2 Epidemiologia**

A base de evidências sobre a prevalência da demência está se expandindo rapidamente. É necessária uma reavaliação da prevalência, da mortalidade (figura2) (14) e dos números globais, dadas as implicações significativas para políticas e planejamentos sociais e públicos (3). Em países de alta renda é uma prioridade de saúde e assistência social. Os governos do Reino Unido, França, Noruega, EUA e Coréia do Sul desenvolveram recentemente planos ou estratégias específicas (15).

Dados estimados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram uma projeção alarmante de um número extraordinário de 100 milhões de portadores de DA no planeta, em 2050 (14). Segundo o relatório da Sociedade Internacional de Alzheimer o número de casos estimados

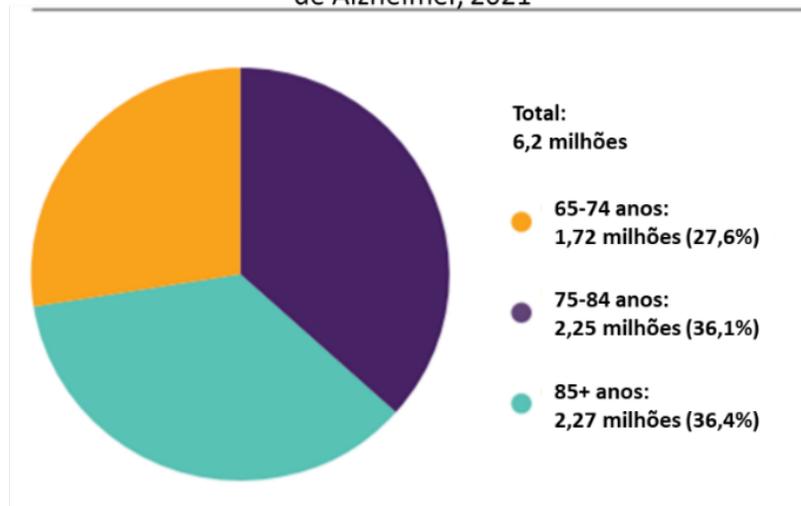
em 2021 e de 6,2 milhões (figura 3 A) e a previsão para 2060 e de 13,8 milhões apenas nos EUA (figura 3 B) (14).



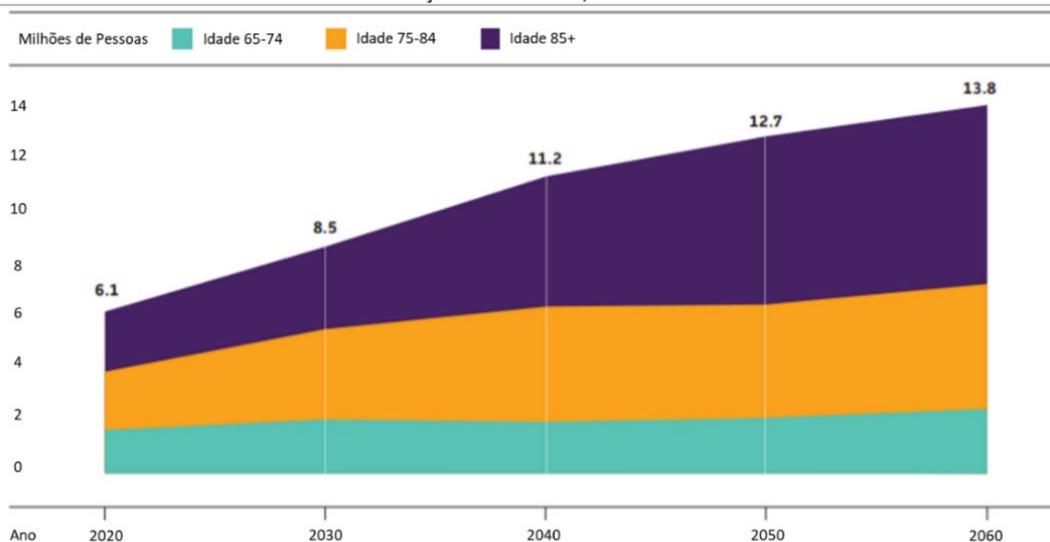
**Figura 2.** Comparação entre o crescimento da mortalidade de diversas doenças nos EUA. **Fonte:** Adaptado de “2021 Alzheimer's disease facts and figures.”; Alzheimer's Association (2021) (14).

O envelhecimento da população está tendo um impacto profundo no surgimento da epidemia de demência e está impulsionando as respostas do governo (14). Embora os casos com o início de sintomas em jovem, seja cada vez mais reconhecidos, a demência é tipicamente uma condição que afeta mais pessoas de idade avançada. A prevalência de demência específica para a idade varia entre as regiões do mundo, porém, pode convergir, uma vez que apresentam a mesma tendência, figura 4 (14). Como pode observar-se existe um elevado grau de diferença entre o número de casos em países de baixa e média renda para países com alta renda. Esse fenômeno pode ser explicado por dois fatores principais: 1) a diferença na expectativa de vida; 2) na falta de notificação dos casos (16–19).

**A** Número e Idade de Idosos com 65 anos ou mais com Doença de Alzheimer, 2021\*



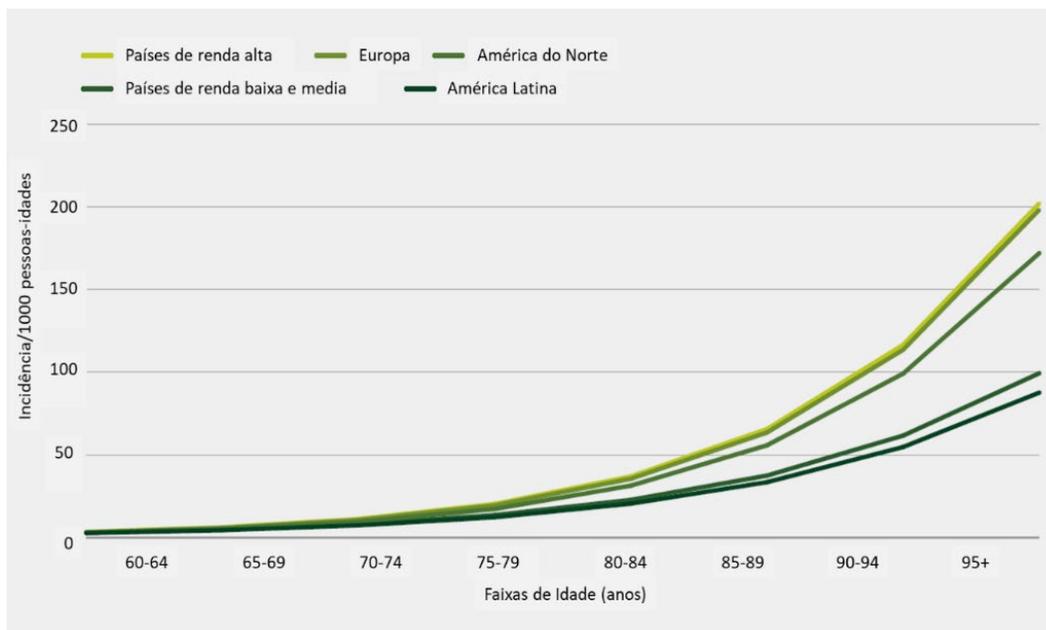
**B** Projeção do Número de Idosos com 65 anos ou mais (total e por idade) no EUA com Doença de Alzheimer, 2020 à 2060



**Figura 3.** Número de casos estimados em 2021 e projeção para 2060. **Legenda:** **A:** o número de casos estimados em 2021 nos EUA; **B:** projeção do número de casos de DA nos EUA. **Fonte:** Adaptado de “2021 Alzheimer’s disease facts and figures.”; Alzheimer’s Association (2021) (14)

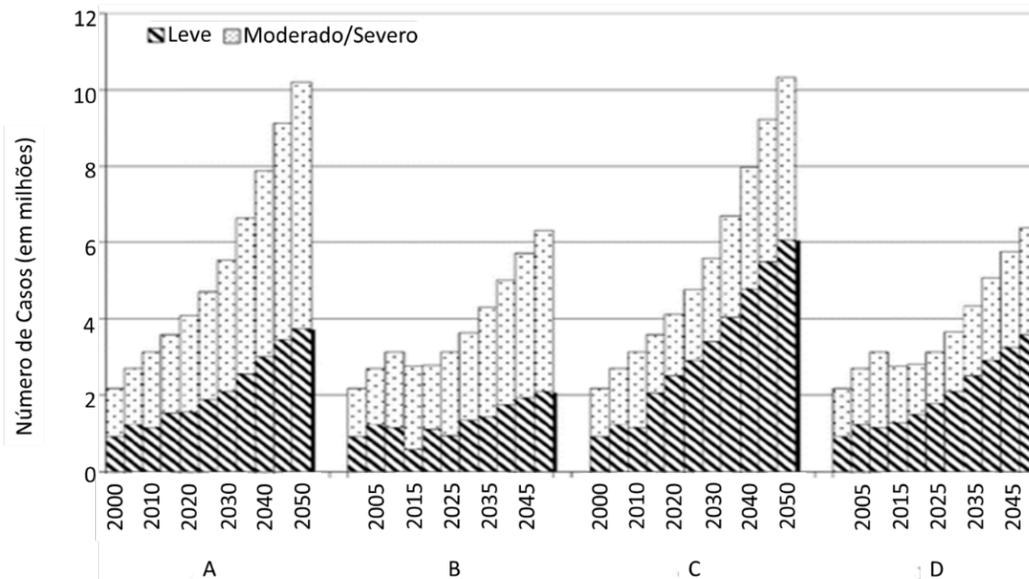
Esse segundo fator foi atestado através do Relatório Mundial de Alzheimer, elaborado pela Universidade McGill em Montreal, Canadá; 75% dos casos estimados de pessoas com demência não são diagnosticadas em todo o mundo. E esse índice chega a 90% nos países de renda média e baixa (16). Já no Brasil, segundo o censo do IBGE de 2021, hoje há aproximadamente 29 milhões

de pessoas acima dos 60 anos (20), e estima-se que quase 2 milhões desses idosos têm demências, sendo que de 40 a 60% são do tipo Alzheimer(21). No entanto, os dados são subestimados, devido erro no diagnóstico ou falta de recurso médico para realizar o diagnóstico (21).



**Figura 4.** Estimativa da incidência anual de demência específica para a idade. **Legenda:** Análise derivada da meta-regressão de Poisson de efeitos mistos, para regiões do mundo para as quais a síntese meta-analítica era viável. **Fonte:** World Health Organization and Alzheimer’s Disease International (WHO). Dementia: a public health priority. (2012) (14)

Segundo o estudo de Sloane PD, Zimmerman S, *et al;*(15) apresentado pela figura 5 (15), número de pessoas com demência pode ser modificado substancialmente por intervenções preventivas (redução da incidência), melhorias no tratamento e cuidados (prolongando a sobrevida) e intervenções modificadoras da doença (prevenção ou desaceleração da progressão). As projeções indicam que as terapias que retardam o início da doença reduzirão acentuadamente a prevalência geral da doença, enquanto as terapias para tratar a doença existentes irão alterar a proporção de casos que são leves em oposição a moderados / graves. O impacto de tais mudanças na saúde pública provavelmente envolveria a quantidade e o tipo de serviços de saúde necessários. Todos os países precisam encomendar pesquisas nacionalmente representativas que são repetidas regularmente para monitorar tendências.



**Figura 5.** Prevalência da doença de Alzheimer, 2005-2050: projeções baseadas em três modelos dos efeitos dos avanços significativos do tratamento introduzidos em 2010. **Legenda:** Gráfico de barras comparando a prevalência de casos leves, moderados / graves e totais de doença de Alzheimer nos Estados Unidos, 2000-2050, com base em quatro projeções: nenhum avanço terapêutico (A), início tardio da doença (B), doença retardada progressão (C), e início tardio da doença e progressão tardia da doença (D). **Fonte:** Adaptado: “The Public Health Impact of Alzheimer’s Disease, 2000–2050: Potential Implication of Treatment Advances.” Annu. Rev. Public Health 2002 (15).

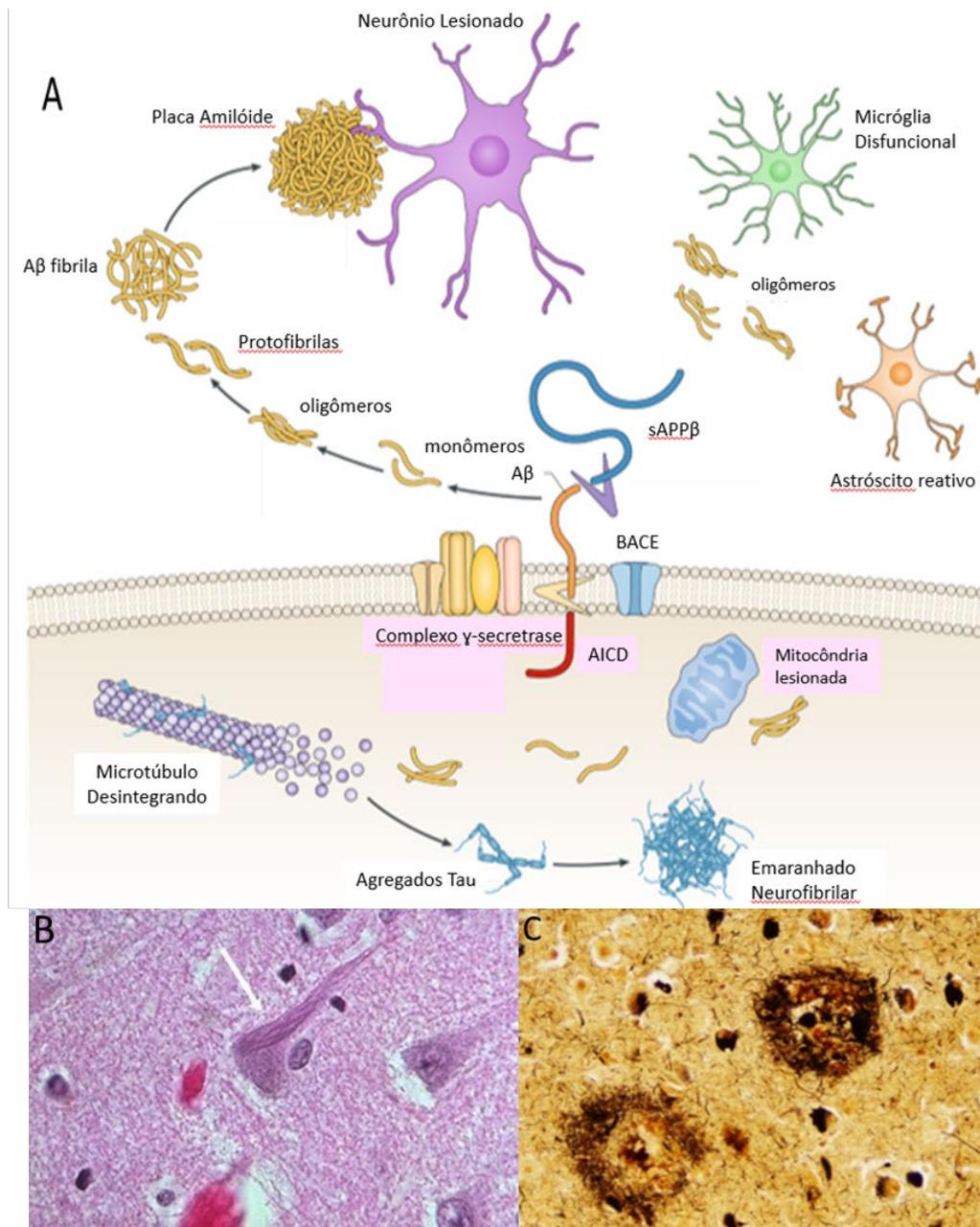
O envelhecimento da população parece destinado a desempenhar o maior papel, e os formuladores de políticas prudentes devem planejar a futura prestação de serviços com base nas atuais projeções de prevalência. As prioridades adicionais devem incluir o investimento em programas de promoção da saúde cerebral e prevenção da demência, e o monitoramento do curso futuro da epidemia para mapear a eficácia dessas medidas.

### 1.3 Etiologia

A etiologia da DA é complexa e está vinculada a múltiplos fatores sendo estes tanto genéticos como ambientais (22-37). Dentre esses fatores determinantes e potencializadores pode ser citado: o estilo de vida (25,27,28,31), nível educacional (25,27,31), gênero (24,25,37), distúrbios psicológicos (25,28,29), complicações vasculares (25,28,31,36), erros metabólicos (25,29,31), alteração dos níveis de colesterol (38), desbalanço no sistema imune (25,32,33), com

crescente caráter autoimune (33–36) e erros no metabolismo de mitocôndrias (26). A interação desses elementos e o pouco conhecimento da intrínseca rede de relações existentes entre eles, além de tornar o diagnóstico mais complexo e demorado, também interfere na efetividade e especificidade da abordagem terapêutica (24,25,27,29,31,36). Com isso, o comprometimento da capacidade cognitiva dos portadores de DA progride de forma inexorável. O desenvolvimento contínuo de novas tecnologias para o diagnóstico mais rápido e preciso se faz necessário para colaborar com a atenção comportamental e terapêutica precoce, de maneira a proporcionar maior probabilidade de controle da doença.

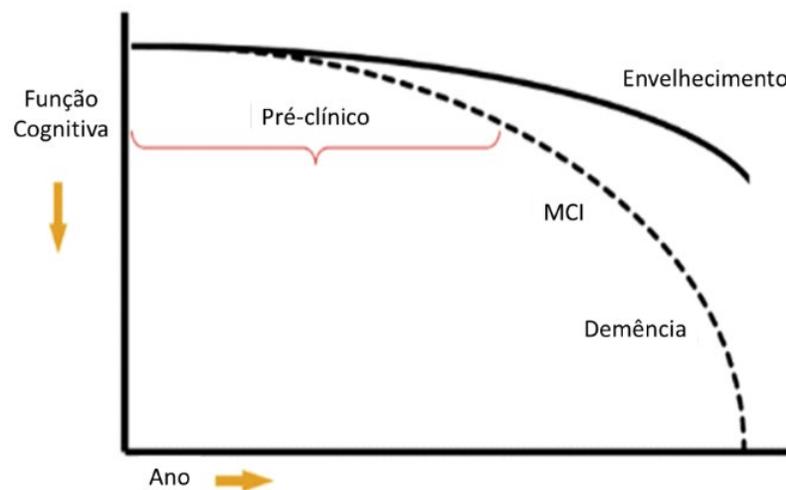
Embora tenha sido estudada por mais de um século, as bases moleculares para a sua patogênese ainda estão longe de ser claramente compreendida. Consequentemente, apesar de várias pesquisas, ainda não está disponível nenhuma cura ou prevenção que seja realmente efetiva. O processo degenerativo pode iniciar de 20 a 30 anos antes do início clínico da DA (12) e é a doença neurodegenerativa mais comum, sendo responsável por 60% a 70% de todos os casos de comprometimento cognitivo progressivo em pacientes idosos (39,40). Esta doença cerebral deletéria é caracterizada por duas notáveis patologias conhecidas como placas senis e emaranhados neurofibrilares, que correspondem a agregados extracelulares de *peptídeo  $\beta$  amilóides* ( $A\beta$ ) (41,42) e inclusões intracelulares da proteína *tau hiperfosforilada*, figura 6 (42–45).



**Figura 6.** Esquema e histologia da fisiopatologia da DA. **Legenda:** **A)** esquema demonstrando a formação da Placas Amiloides e Emaranhados Neurofibrilares (45). **B)** corte histológico de cérebro humano por coloração HE, a seta evidencia um neurônio com emaranhados neurofibrilares oriundos de agregação da proteína Tau (44). **C)** corte histológico de cérebro humano por coloração de prata, evidenciando a formação de placas amilóides (43). **Fonte:** Figura A adaptada de: “Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents.” Eur J Med Chem. 2017. Figura B extraída de: Neurofibrillary tangles. [acesso em 09 de maio de 2021]. Disponível em: <https://www.chegg.com/flashcards/nmsk-b-path-069f0110-e3bb-40e7-9521-0c1743eb9a53/deck>. Figura C extraída de: “Cases of dementia in the UK and a toxic chemical may be linked.” Utah People's Post [periodico na internet]. May 2021. [acesso em 09 maio 2021]. Disponível em: <https://www.utahpeoplespost.com/2016/01/dementia-uk-toxic-chemical-linked/>

A fase inicial da DA ou fase pré-clínica tem sido caracterizada, bem como o termo Comprometimento Cognitivo Leve (CCL ou *mild cognitive impairment*, MCI) (29), como

mostrado na figura 7 (29). O estágio CCL é utilizado para definir um estágio intermediário da DA, isto é, pacientes que apresentam um comprometimento em um ou mais domínios cognitivos, geralmente memória, ou um declínio cognitivo leve maior que esperado para a idade do indivíduo (29). Os pacientes caracterizados com CCL têm um risco de 5 a 10 vezes maior de desenvolver a doença clínica de Alzheimer dentro de 3 a 5 anos (29).



**Figura 7:** Modelo hipotético da trajetória clínica da doença de Alzheimer (AD). Fonte: Extraído e adaptado: “Toward defining the preclinical stages of Alzheimer’s disease: Recommendations from the National Institute on Aging. Alzheimer’s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease” (2011)(29).

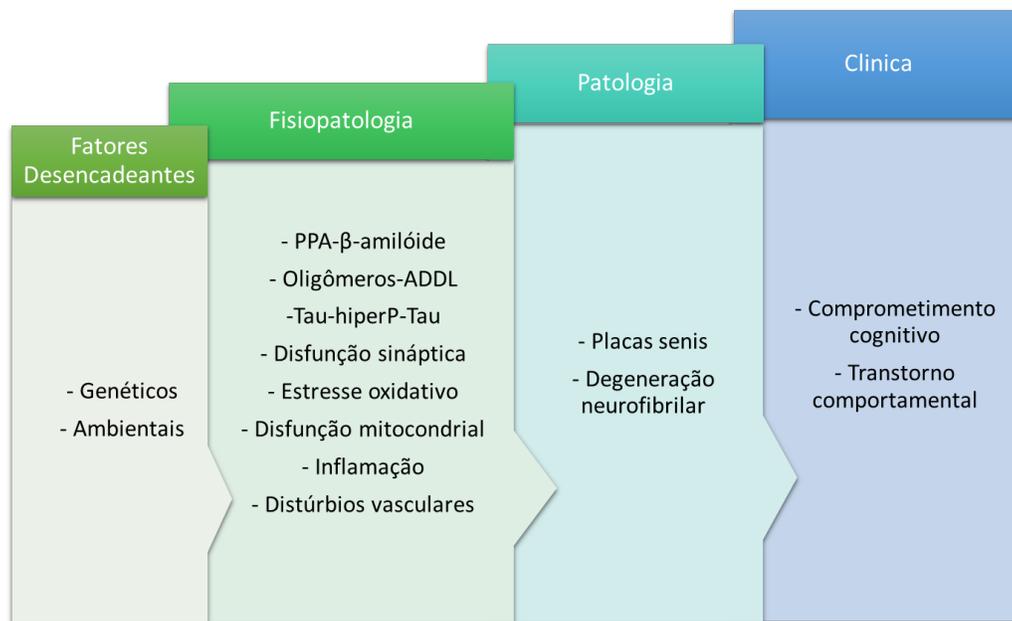
Estudos recentes têm mostrado que existem alguns indicadores biológicos além do *peptídeo  $\beta$  amilóides* e da proteína *tau hiperfosforilada*, também denominados biomarcadores da doença de Alzheimer, que permitem distinguir pacientes com comprometimento cognitivo leve que irão progredir para a DA daqueles que não irão progredir (23,46). A descoberta desses biomarcadores possibilita o desenvolvimento de novas ferramentas e métodos para diagnosticar a doença de Alzheimer no estágio do CCL bem como no pré-clínico (29).

#### 1.4 Biomarcadores Da Doença De Alzheimer

Um biomarcador eficiente para o diagnóstico de uma doença como o Alzheimer deve identificar a doença em um estágio precoce, isto é, antes que os sintomas cognitivos sejam

encontrados em testes neuropsicológicos e antes de haver uma degeneração clara em estudos de imagem cerebral (47,48).

Na última década, juntamente com descobertas das principais características patogênicas da doença de Alzheimer, houve resultados consistentes em relação aos biomarcadores presentes no líquido cefalorraquidiano (LCR) e encontrados no sangue ou plasma (40-56). Esses biomarcadores geralmente provêm da degeneração de neurônios e sinapses, distúrbios no metabolismo da proteína precursora de amilóide (PPA) e sua posterior deposição em placas senis, estresse oxidativo e hiperfosforilação da proteína tau com posterior formação de emaranhados neurofibrilares (47,58–60), figura 8 (61).



**Figura 8.** Sequência de eventos na fisiopatologia da doença de Alzheimer. **Fonte:** Adaptado de: “Aspectos da fisiopatologia da doença de Alzheimer esporádica.”, Revista Brasileira Neurologia (2012) (61).

A maioria dos biomarcadores reportados na literatura mostraram níveis aceitáveis de especificidade e sensibilidade, alguns desses até mesmo na fase pré-clínica da doença de Alzheimer (61–64) possibilitando uma nova abordagem para o diagnóstico da doença, tabela 1 (65).

**Tabela 1:** Biomarcadores associados à DA.

Função Biológica	Alvo Proteico
Transmissão Sináptica	Dopamina Serotonina Glutamato Hidroxitriptamina Receptores Adrenérgicos Receptores N-metil-D-aspartato glutâmico Receptores Acetilcolínico nicotínico Anfifisina-1 Proopiomelanocortina
Inflamação	Proteína ácida fibrilar da glia S100 $\beta$ Galactina-1 MAPKAPK5
Barreira Hemato-encefálica	Rabaptina 5 Receptor Angiotensina-2 tipo 1
Metabolismo	Lipoproteínas Oxidativas de baixa densidade Fosforilcolina Gangliosídeos GM1 e GQ1b Aldolase ATP sintase $\beta$ Proteína Ribossomal Mitocondrial L34 Pentatricopeptídeo no Domínio 2
Expressão genica	FERM contido no Domínio 8 C9orf9 Centaurina- $\alpha$ 2 Subfamília C homóloga DNA J Anquirina e KH contidas no Domínio 1

**Fonte:** Adaptado “Biomarkers for the Early Detection and Progression of Alzheimer's Disease. Neurotherapeutics”, Neurotherapeutics (2017)(65).

Os biomarcadores encontrados no líquido cefalorraquidiano são considerados mais precisos, uma vez que estão em contato direto com o microambiente cerebral, onde mudanças bioquímicas são refletidas diretamente (64,66,67). Ou seja, os biomarcadores aparecem primeiro no LCR, logo se apresentam em uma concentração maior inicialmente para depois começarem a aparecerem no sangue (64,66). As proteínas totais tau (T-tau), isoformas do  $\beta$ A, em particular o peptídeo com 42 aminoácidos, e diferentes epítomos fosfo-tau (F-tau) encontrados na LCR são biomarcadores bem caracterizados da DA e podem servir como marcadores que contribuem para o diagnóstico da doença (24-58). No entanto, a punção lombar necessária para coletar amostras do

LCR é considerada uma prática invasiva e tem uma percepção pública negativa (69), limitando assim a utilidade desses marcadores como meios de diagnóstico, principalmente na fase pré-clínica assintomática.

Atualmente, tendo em vista a dificuldade da coleta de LCR, tem se proposto a pesquisa de marcadores nos demais fluidos corpóreos (33,66,69,70). Alguns exemplos de biomarcadores periféricos são peptídeos do  $\beta$ A presente no plasma (47), formas maduras da proteína precursora do amiloide (PPA) (62) e as enzimas alfa-secretase (ADAM10) (62) e beta-secretase (BACE) (63), encontradas em plaquetas. O peptídeo  $\beta$ A pode ser encontrado de duas formas contendo 40 ou 42 aminoácidos dependendo do C-terminal. Estes estudos mostram que altos níveis de  $\beta$ A42 apontam um fator de risco para desenvolver a doença de Alzheimer (64,66,69). Porém, este biomarcador aparece em outras doenças cerebrais como Parkinson, Mal de Lewy, doenças Angiogênicas (71–75) relacionadas ao cérebro e até mesmo a Síndrome de Down (76–78), o que o caracteriza como não sensível e específico para o diagnóstico precoce, embora possa ser usado, em casos específicos, para prever o risco da DA (24,54). O diagnóstico confirmatório de DA em estágios iniciais pode facilitar a intervenção terapêutica precoce e o tratamento da doença, que nesse caso, se encontraria em um estágio que inicial, ou seja, tratável. Biomarcadores sensíveis e específicos também são valiosos para fins de prognóstico e para monitorar a progressão da doença e a resposta à terapia. Dessa forma, esses biomarcadores podem ser utilizados de maneira mais simplificada em biossensores de detecção rápida da doença. Em comparação com os biomarcadores que requerem imagens do cérebro e coleta do líquido cefalorraquidiano (LCR), os biomarcadores baseados no sangue como os autoanticorpos (70,79) são particularmente desejáveis porque é menos invasivo os métodos de coleta, pode ser coletados em maior volume e são mais acessíveis. Por meio da

pesquisa de tais biomarcadores derivados do sangue, alguns autoanticorpos surgiram como biomarcadores potencialmente eficazes para a DA (65,80–82).

### **1.4.1 Autoanticorpos**

Os autoanticorpos são produzidos em condições fisiológicas ou fisiopatológicas. Fisiologicamente, os humanos produzem autoanticorpos naturais que reconhecem autoantígenos para facilitar o reconhecimento e eliminação de células mortas e em vias apoptóticas (67,83). Esses são frequentemente isotipos IgM e são produzidos espontaneamente durante o desenvolvimento das células B facilitam a fagocitose de células apoptóticas e inibindo as vias inflamatórias (67,83). Portanto, os autoanticorpos naturais têm um papel fundamental em atenuar a inflamação e manter a tolerância imunológica (83).

A produção de autoanticorpos de alta afinidade, predominantemente da classe IgG, é promovida por inflamações e infecções que desencadeiam a maturação da afinidade do anticorpo em direção a autoantígenos. A quebra da tolerância imunológica é um mecanismo importante que leva à produção de autoanticorpos patogênicos e doenças autoimunes (65). Ao se ligarem a autoantígenos com alta afinidade, os autoanticorpos patogênicos iniciam e mantêm a cascata inflamatória responsável pelas lesões teciduais. Além disso, enquanto o perfil desses autoanticorpos naturais difere de um indivíduo para outro, eles são notavelmente estáveis ao longo do tempo dentro de um único indivíduo (84,85).

Como uma faca de dois gumes, os autoanticorpos podem exercer efeitos prejudiciais e protetores (85). Em condições patológicas, os autoanticorpos interferem na função celular e desencadeiam uma resposta inflamatória severa, causando danos ao tecido e doenças autoimunes (65,85). Em condições fisiológicas, os autoanticorpos conferem tolerância imunológica, atenuam a inflamação e facilitam a eliminação de proteínas tóxicas (65,84). No entanto, as funções exatas

de muitos autoanticorpos são atualmente desconhecidas (85). Alguns autoanticorpos estão especificamente associados ao estado da doença e, portanto, podem servir como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico para a doença de Alzheimer, tabela 2 (51).

**Tabela 2:** Autoanticorpos associados a DA e seus potenciais papéis.

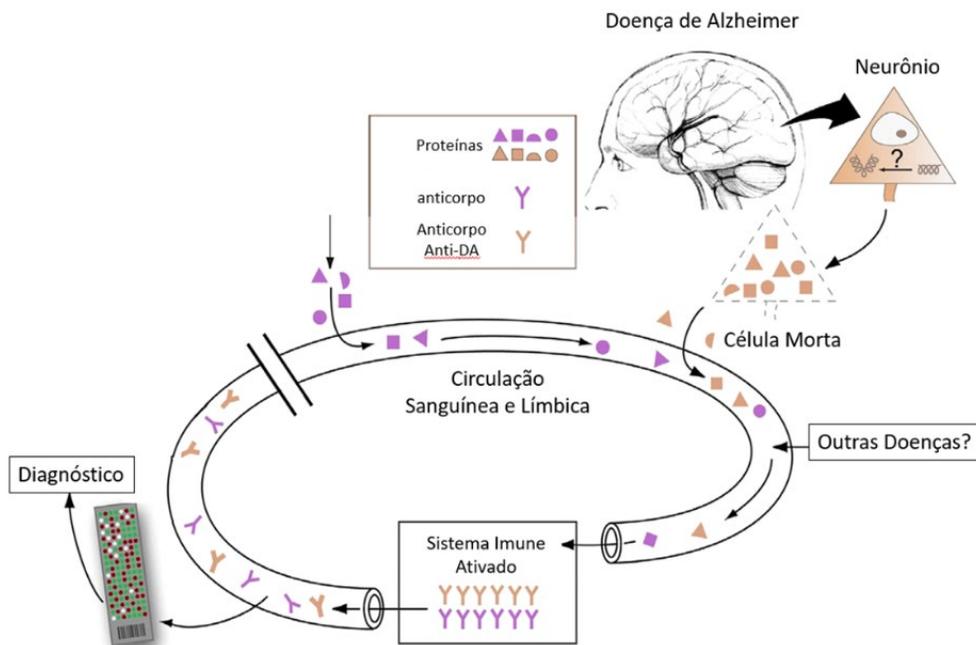
Alvos dos Autoanticorpos	Biomarcadores	Patogenico/Protetivo	Imunoterapia
Mais comumente Relacionado a Patologia de DA			
A $\beta$	Sim	Protetivo	Sim
Tau	Possível	Protetivo	Sim
Receptores e Neurotransmissores			
Glutamato	Possível	Desconhecido	Não
DA	Inconsistente	Desconhecido	Não
5-HT	Possível	Desconhecido	Não
NMDAR	Não específico	Desconhecido	Não
Marcadores da Glia			
S100b	Não específico	Desconhecido	Não
GFAP	Não específico	Desconhecido	Não
Micróglia	Não específico	Desconhecido	Não
Lipídeos			
OxLDL	Possível	Desconhecido	Não
Fosfolipídios	Possível	Desconhecido	Não
Ganglioside GM1	Inconsistente	Desconhecido	Não
Ceramida	Desconhecido	Patogênico	Não
Relacionado a Vascular			
Rabaptina 5	Não específico	Desconhecido	Não
RAGE	Inconsistente	Desconhecido	Não
ATIR	Possível	Desconhecido	Não
Enzimas			
Aldose	Não específico	Desconhecido	Não
ATP sintase	Possível	Patogênico	Não

**Fonte:** Adaptado “Autoantibodies in Alzheimer’s disease: potential biomarkers, pathogenic roles, and therapeutic implications.” J Biomed Res (2016) (51).

Sendo assim, a aparição de autoanticorpos é um parâmetro fundamental para o diagnóstico de várias doenças autoimunes (65,67,83–85). Esses correspondem a estados fisiopatológicos nos quais uma resposta imune ocorre contra componentes do próprio indivíduo levando à produção de anticorpos contra autoantígenos específicos (70,79). Outro aspecto relevante é que os autoanticorpos podem anteceder a evolução de uma doença autoimune por meses ou anos (33-

36,47,511,53,54,67,70,80–83,86,87). O que leva claramente a implicações clínicas importantes como indicadores precoces de doenças. Compreensivelmente, uma das formas de rastreamento de uma possível doença autoimune é a pesquisa de autoanticorpos contra autoantígenos celulares(11).

Os autoanticorpos contra alvos específicos envolvidos na atividade sináptica, incluindo neurotransmissores e receptores, estão associados ao declínio cognitivo, sugerindo seu uso como sinais de mau funcionamento cerebral(81,87). A presença de autoanticorpos também está associada à disfunção metabólica e ao estresse oxidativo(88). Autoanticorpos contra proteínas envolvidas no metabolismo, como a adenosina trifosfato sintase  $\beta$  (ATP-sintase), tem sido mais elevada nos soros(31,35,36,47,53,54,82) e LCR(31,35,47,53,58,68,82,88) de pacientes com DA do que em indivíduos saudáveis. A presença de autoanticorpos anti-neuronais foi detectada no soro de pacientes com a doença de Alzheimer e podem ser correlacionados com estágios específicos da fisiopatologia da DA(33,38,51,80–82), como pode ser exemplificado na figura 9 (82).

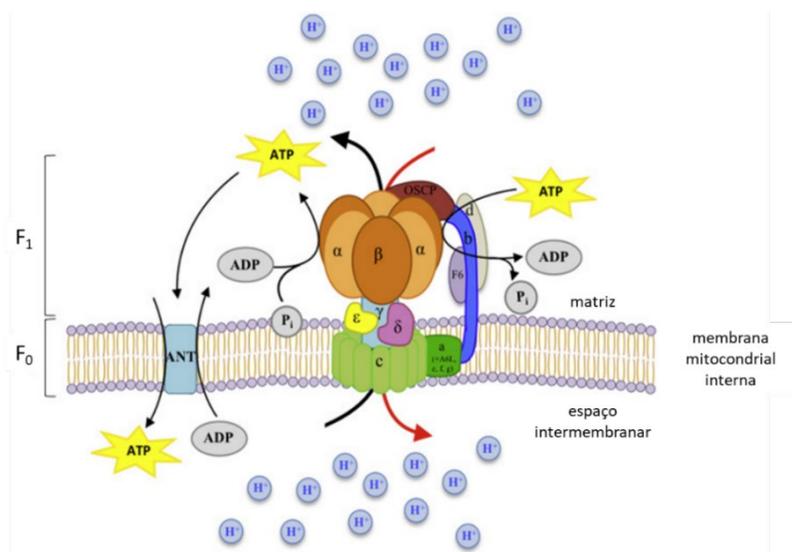


**Figura 9:** Representação esquemática da circulação de autoanticorpos proveniente da doença de Alzheimer. **Legenda:** A morte celular em regiões de patologia leva à liberação de proteínas e seus fragmentos como detritos associados à doença. Essas moléculas se espalham para a circulação, e o sistema imunológico responde provocando a produção de autoanticorpos. Fonte: Adaptado de “Utility of Autoantibodies as Biomarkers for Diagnosis and Staging of Neurodegenerative Diseases”, Int Rev Neurobiol (2015)(82).

O papel dessas proteínas antigênicas e o papel da autoimunidade na fisiopatologia da ainda não foram totalmente esclarecidos, mas há evidências suficientes para sugerir que estudos adicionais possam levar ao esclarecimento de um painel autoimune com maior especificidade e sensibilidade para diferenciar entre DA, envelhecimento normal e outras doenças que levam a demência.

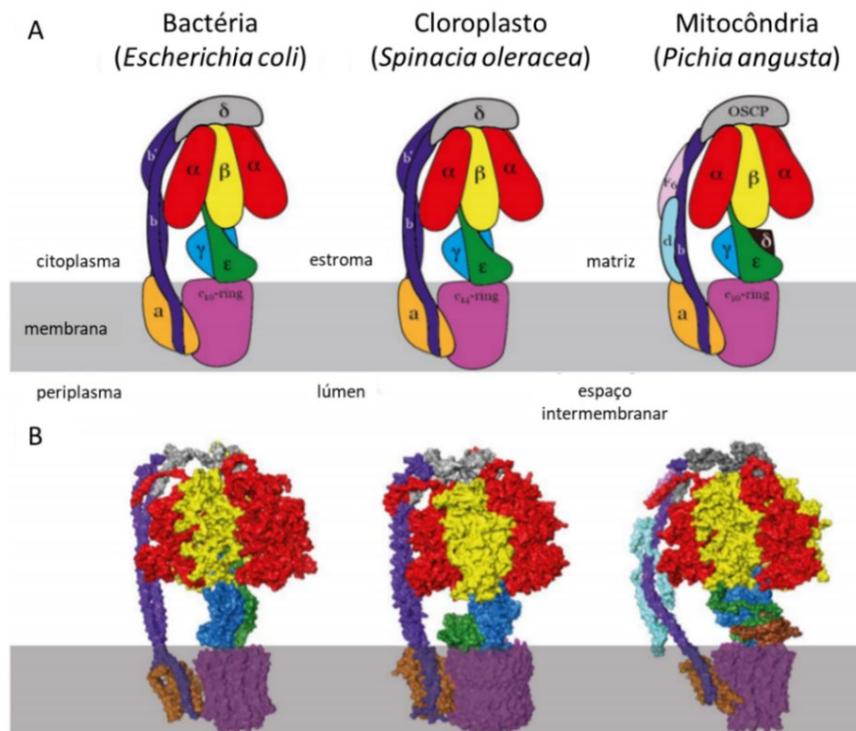
### 1.4.2 ATP-sintase

Os organismos vivos são capazes de produzir energia a partir de diferentes nutrientes. A síntese de Adenosina Trifosfato (ATP), a 'moeda de energia universal' da vida, é a reação química mais prevalente em sistemas biológicos e é responsável por alimentar quase todos os processos celulares, desde a propagação do impulso nervoso até a síntese de DNA. A energia é gerada na forma de ATP devido a fosforilação oxidativa de moléculas precursoras, o que ocorre efetivamente por ação da enzima ATP-sintase, figura 10(89).



**Figura 10:** Esquema de ATP sintase de mitocôndria de mamíferos. **Legenda:** Desenho da ATP sintase mitocondrial que é estruturada e funcionalmente organizada em dois setores principais: uma porção F<sub>0</sub> embutida na membrana e um F<sub>1</sub> catalítico solúvel voltado para a matriz. F<sub>0</sub> funciona como um canal de prótons com um movimento rotativo que aciona o F<sub>1</sub> acoplado para sintetizar ou hidrolisar ATP, dependendo da direção de rotação. F<sub>1</sub> compreende três heterodímeros αβ, enquanto o setor F<sub>0</sub> contém um anel C de subunidades transmembrana e uma cópia da subunidade A. Os dois setores são conectados por meio de um eixo de rotor central composto pelas subunidades γ, δ e ε e um estator periférico que compreende vários peptídeos. **Fonte:** Adaptado de “Systematic review of plasma-membrane ecto-ATP synthase: A new player in health and disease”, Exp Mol Pathol (2018)(89).

Essas enzimas são macromoléculas complexas, multiproteicas, presentes nas membranas de bactérias, mitocôndrias e cloroplastos, sendo sua atividade diferente, quanto aos mecanismos de regulação e bases moleculares, dependendo de sua origem(89–91), figura 11(92). Além disso, a ATP-sintase atua durante restrições dietéticas com metabólitos chaves que medeiam a longevidade, configurando uma estratégia para o diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças relacionadas a idade em mamíferos(93).



**Figura 11:** Modelos comparativos esquemáticos e atômicos de ATP Sintase F1Fo de bactérias, cloroplastos e mitocôndrias. **Legenda:** As subunidades são codificadas por cores para mostrar domínios homólogos entre as espécies:  $\alpha$  (vermelho);  $\beta$  (amarelo),  $\delta$  (cinza nas bactérias e cloroplastos, marrom nas mitocôndrias); OSCP (cinza nas mitocôndrias); b / b' (roxo escuro); anel c (roxo claro); F6 (rosa);  $\gamma$  (azul);  $\epsilon$  (verde); e d (azul claro). **Fonte:** Adaptado de “ATP synthase: Evolution, energetics, and membrane interactions”, J Gen Physiol (2020)(92).

Os autoanticorpos contra a ATP sintase são capazes de induzir a inibição da síntese de ATP, alterando, assim, a homeostase mitocondrial e promovendo a morte celular por apoptose(94–96). Essas descobertas sugerem que os autoanticorpos específicos da ATP sintase podem exercer um papel patogênico através de um mecanismo que traz em prática o comprometimento da

homeostase do ATP extracelular e a alteração da função mitocondrial desencadeando a morte celular pelo apoptose(94–96).

Usando a abordagem proteômica, ATP sintase também foi identificada como um novo autoantígeno na DA(40,47,51–53). Tornou-se então evidente que um componente autoimune poderia desempenhar um papel no início da doença de Alzheimer (DA) e/ou progressão como a ecto-F1-ATPase: a geração de ADP devido à hidrólise de ATP(53); assim como a subunidade  $\beta$  da ATP sintase(54). Autoanticorpos para ATP sintase foram frequentemente encontrados no soro de pacientes com DA, mas não em indivíduos saudáveis de mesma idade e em pacientes com doença de Parkinson ou aterosclerose(52,53). Essas alterações como a presença destas enzimas ou autoanticorpo no líquido e soro tem relação com o surgimento de patologias humanas neurodegenerativas, sendo assim, esses autoanticorpos anti-ATP sintase podem ser usados como biomarcadores específico da DA(40,47,51–53,86,94–97).

### **1.4.3 FRMD-8**

As células do corpo humano comunicam-se umas com as outras por muitas razões diferentes, incluindo para ajudar os órgãos a desenvolverem-se corretamente e para produzir uma resposta saudável a lesões e infecções(98). Proteínas sinalizadoras, como fatores de crescimento e citocinas, formam a principal linguagem dessa comunicação. Inicialmente, muitos fatores de crescimento e citocinas permanecem fixados à superfície da célula que os produziu como algumas metaloproteinases(98,99).

Os ADAMs (desintegrina e metaloproteinase) são uma família de proteínas transmembrana e secretadas com papéis importantes na regulação por meio de seus efeitos na adesão, migração, proteólise e sinalização celular(100,101). As metaloproteinases ADAM funcionais estão envolvidas na "liberação de ectodomínio" de diversos fatores de crescimento, citocinas, receptores

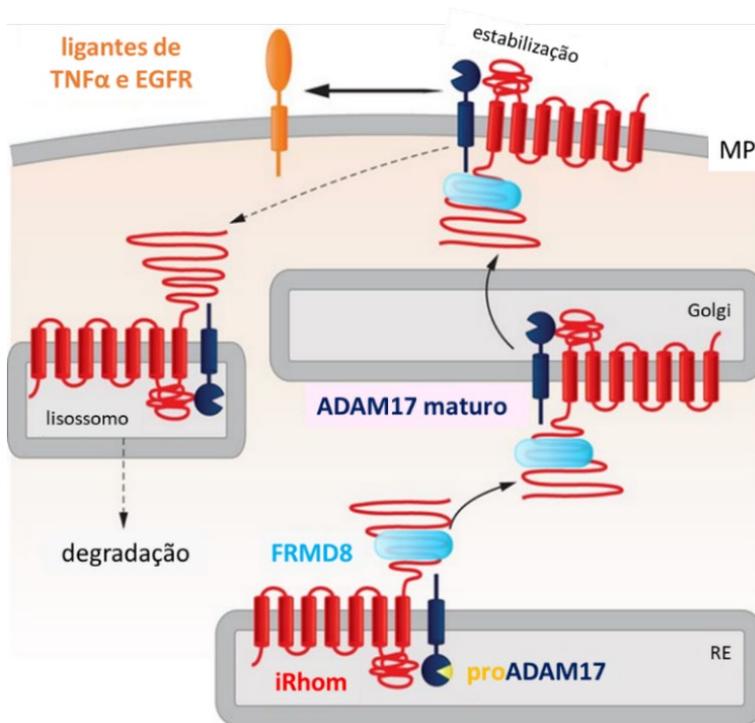
e moléculas de adesão(100,101). Um membro importante da família, ADAM-10, é essencial para a "proteólise intramembrana regulada" (RIP), que gera domínios intracelulares clivados que se translocam para o núcleo e regulam a transcrição do gene(102,103).

Outros ADAMs não catalíticos funcionam no SNC por meio de efeitos nos mecanismos de orientação. A família ADAM é, portanto, fundamental para muitos processos de controle no desenvolvimento e homeostase e, sem surpresa, também está ligada a estados patológicos quando suas funções são desreguladas, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, asma, doença de Alzheimer(100–102).

Outra metaloprotease importante da família é a ADAM17 (também chamada de TACE – enzima conversora do fator de necrose tumoral-alfa) medeia a liberação de muitas moléculas de sinalização importantes como fator de necrose tumoral alfa ( $TNF\alpha$ )(99,104), fator de crescimento epidérmico (EGF), anfiregulina (AREG), fator de crescimento transformador alfa ( $TGF\alpha$ ), EGF de ligação à heparina (HB-EGF), epígeno e epiregulina(105,106).

Esse processo deve ser controlado cuidadosamente porque a liberação de muitos fatores de crescimento ou citocinas (ou liberá-los em momentos inadequados) pode levar ao câncer e doenças inflamatórias(99,104–106). Para isso, as proteínas chamadas iRhoms do tipo romboide têm uma relação regulatória específica e extensa com ADAM17, na medida em que iRhoms podem ser consideradas como subunidades regulatórias da protease(98,107–109). E para regular a atividade dessa existe uma proteína chamada FRMD8 que se liga a iRhoms(107–109). O significado funcional desta interação é demonstrado pela perda de FRMD8 causando um fenótipo semelhante à deficiência de iRhom nas células: perda de ADAM17 e eliminação severa dos substratos de ADAM17 da superfície celular, indicando que sua função é estabilizar o complexo

iRhom/ADAM17(108,109), figura 12(108). No geral, a proteína FRMD8 é um componente essencial da maquinaria de sinalização inflamatória(108,109).



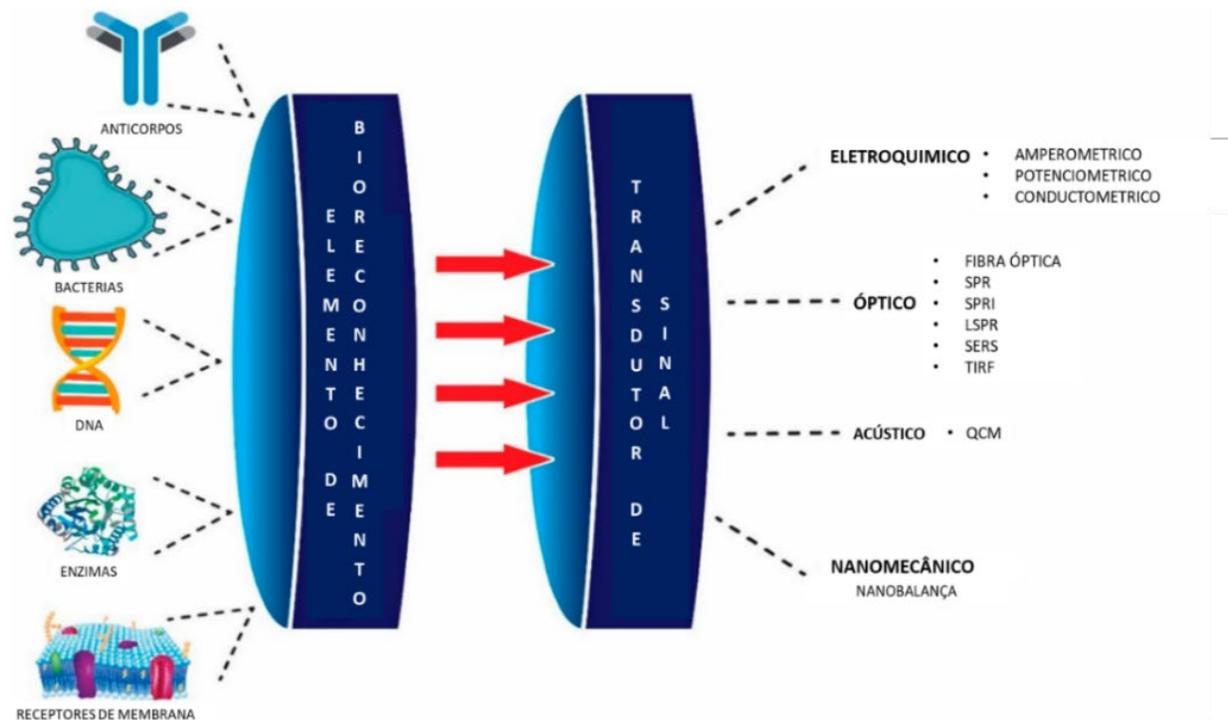
**Figura 12:** FRMD8 estabiliza o complexo sheddase iRhom2 / ADAM17 na superfície da célula. **Legenda:** Representação esquemática do papel de FRMD8 na via iRhom2 / ADAM17: em condições de tipo selvagem, ADAM17 e iRhom2 são estabilizados por FRMD8 e, portanto, protegidos da degradação através da via endolisossômica. **Fonte:** Adaptado de “FRMD8 promotes inflammatory and growth factor signalling by stabilising the iRhom/ADAM17 sheddase complex”, Elife (2018)(108).

Assim, tanto a ADAM10(100–103) como ADAM17(100–103,110,111), aparecem na literatura como potenciais marcadores de diversas doenças(100–102) assim como o Alzheimer(100–103,110,111) e outras desordens cerebrais como a Síndrome de Down(102).

Pelo fato de a FRMD8 estar intrinsecamente conectada a ADAM17 atuando como proteína estabilizadora e controladora secundária da cascata inflamatória, espera-se que o desregulação de uma gere o desbalanço da outra. Apesar de não se conhecer a origem da desregulação e quem inicia esse desbalanço, a FRMD8(35,51,112) e os autoanticorpos(35,112) contra a mesma, são reportados na literatura como potenciais biomarcadores do Alzheimer.

## 1.5 Ferramenta proposta para diagnóstico: Biossensores

Biossensores são ferramentas biotecnológicas utilizadas no diagnóstico clínico, devido à sua especificidade, sensibilidade, versatilidade e superioridade da nova metodologia(113–115). O dispositivo compreende um elemento biológico acoplado a um transdutor de sinal, o qual detecta a ligação das espécies complementares(114–116), figura 13(116).



**Figura 13:** Esquema de um biossensor. **Legenda:** Os biossensores são constituídos por um elemento de reconhecimento biológico e um método de transdução de sinal, e têm permitido a quantificação de vários analitos. Fonte: Adaptado de “Optical Biosensors for Therapeutic Drug Monitoring”, Biosensors (2019)(116).

Imunossensores e biossensores para o diagnóstico da doença de Alzheimer têm sido descritos na literatura(117–126). A maioria dos trabalhos usaram a detecção da  $\beta$ A40 e 42(124,126) que é eficiente como biomarcador no estágio pré-clínico se a amostra for retirada do LCR. Pesquisadores brasileiros reportaram o desenvolvimento de biossensores através da detecção da enzima ADAM10(80) e da glutathiona(81). Porém biomarcadores metabólicos e genéticos da doença de Alzheimer são mais eficientes para ser diagnosticada em amostra do LCR.

Uma alternativa para o diagnóstico da doença de Alzheimer é a detecção de autoanticorpos presentes em pacientes com DA(47,53,66,81,124,126), apesar da função protetiva ou destrutiva dessas moléculas em termos de patologia ainda não está clara(51,63,65), sua aplicação como biomarcadores é de grande interesse porque muitos deles estão presentes tanto no sangue como no LCR(47,53,66,86,92,94-97,113,114,124–127).

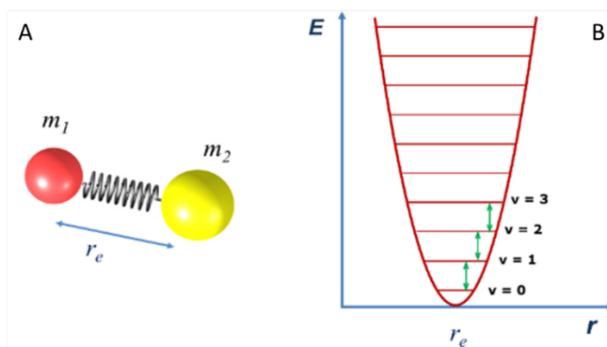
### **1.5.1 Biossensores ópticos**

Métodos analíticos para avaliação quantitativa e qualitativa de compostos biológicos têm sido intensamente abordados em diversas aplicações, tais como controle ecossistêmico, biotecnologia, diagnósticos clínicos e estudos farmacológicos(116,130–133). O diagnóstico e monitoramento terapêutico de doenças é uma ferramenta fundamental na medicina e na vida dos pacientes(113–116). Para fazer um diagnóstico ou monitoramento, podem-se utilizar diversos fluidos biológicos, como sangue, plasma, soro e urina, entre outros(116). A ajuda de tecnologias especializadas permite a identificação e quantificação do grau da doença(117–120,125). As técnicas mais funcionais para a rápida identificação ou quantificação empregam os biossensores, dispositivos que consistem em um elemento de reconhecimento biológico acoplado a um transdutor de sinal(116). Entre os biossensores estão os do tipo biossensor óptico, que têm sido utilizados para a semiquantificação de diferentes moléculas de interesse clínico(116,134). Entre as vantagens desses biossensores estão o seu tamanho reduzido, a velocidade de resposta, a facilidade de integração, boa biocompatibilidade e alta seletividade e sensibilidade(132). Biossensores ópticos são baseados nas mudanças das propriedades físico-químicas da matéria que por sua vez influenciam nas propriedades ópticas específicas das substâncias tornando mensurável essa resposta(134,135). Entre as propriedades ópticas que podem ser mensuradas estão: absorção, índice de refração, fluorescência, fosforescência, refletividade e comprimento de onda(134,135).

Nesse presente projeto optou-se por análises espectroscópicas utilizando o comprimento de onda como propriedade óptica a ser quantificada, devido à grande variedade de técnicas que podem ser empregadas para tal. Pela versatilidade, rapidez e caráter não destrutivo, pode-se destacar três técnicas espectroscópicas: a espectroscopia de infravermelho, a espectroscopia Raman e a espectroscopia de fotoluminescência(134,135). A espectroscopia de fotoluminescência está fundamentada na emissão de radiação, a espectroscopia de infravermelho esta baseadas na absorção da radiação e a espectroscopia Raman no fenômeno de espalhamento de luz pela matéria(135). As espectroscopias de infravermelho e Raman são duas das técnicas complementares mais amplamente utilizadas nas ciências físicas e naturais hoje(134–136). Essas técnicas são usadas no intuito de identificar e caracterizar o arranjo molecular e análises de reações(134,135,137). Desta maneira, a espectroscopia Raman representa, juntamente com a espectroscopia de absorção no infravermelho, uma das ferramentas mais úteis para a obtenção de informações sobre a estrutura e propriedades das moléculas a partir de suas transições vibracionais(133–135).

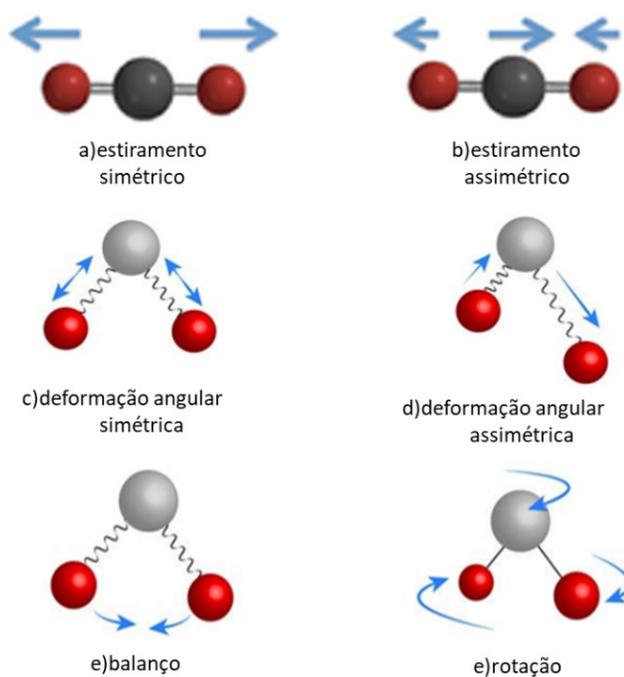
### **1.5.2 Espectroscopia Vibracional e Efeito Raman**

Para compreender a espectroscopia vibracional e os tipos de espalhamentos, é fundamental ter em mente que as moléculas consistem em átomos com uma certa massa que podem ser considerados como estando conectados por ligações elásticas, figura 14(138).



**Figura 14:** Esquema correlacionando ligações elásticas e níveis de energia vibracional. **Legenda:** A) Representação esquemática de um oscilador harmônico composto por dois corpos de massa  $m_1$  e  $m_2$  ligadas por uma mola sem limite de elasticidade (lei de Hooke). B) Esquema teórico dos níveis de energia vibracionais em função do número quântico ( $v$ ) e valor energético entre níveis. **Fonte:** Extraído de “Espectroscopia Vibracional”, Revista Ciência Elementar (2018)(138).

Como resultado, as moléculas podem realizar movimentos periódicos e ter graus de liberdade vibracionais. Esses movimentos podem ser por estiramento, deformação, translação ou rotação(139,140) como demonstrado na figura 15(139).



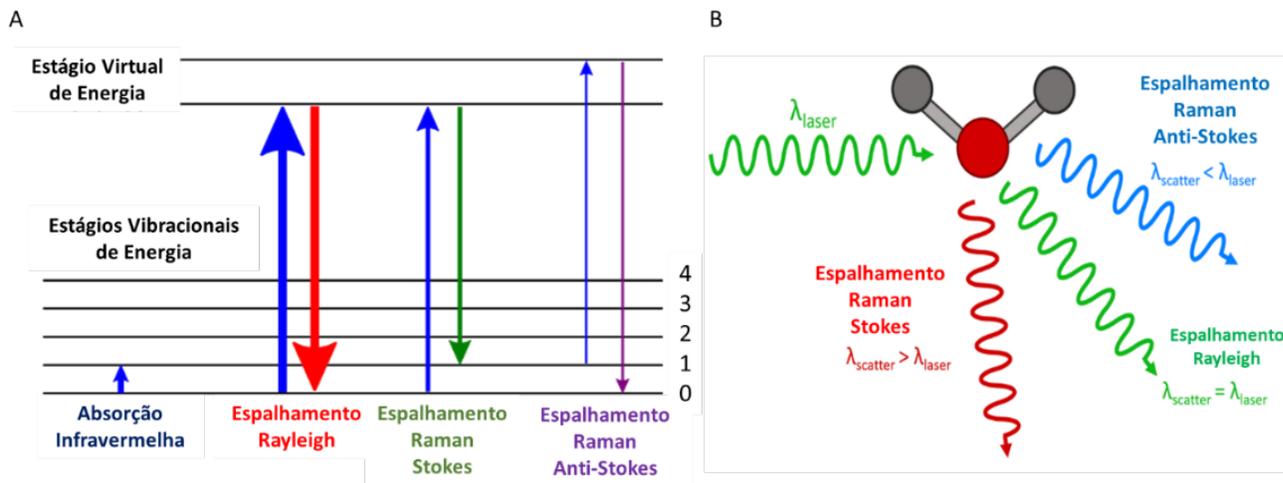
**Figura 15:** Esquema demonstrando os movimentos que as moléculas podem fazer ao serem excitadas. **Legenda:** Graus de liberdade de uma molécula triatômica. O movimento vibracional conjectura que a ligação entre os átomos funciona como uma mola(139).

Sendo assim, as moléculas podem ser identificadas por seus espectros por causa da relação com os níveis de energia associados com movimentos dos átomos(137). Esses espectros dependem

das massas dos átomos, de seu arranjo geométrico e da força de suas ligações químicas(138–140). Quando uma molécula é exposta a um campo eletromagnético, os elétrons e núcleos são forçados a se mover em direções opostas em um momento de dipolo(139,140). Essa polarização associada a frequência das vibrações e intensidade fornecem espectros específicos(137) que podem ser mensurados pelas técnicas de espectroscopia vibracional (Infravermelho (IR) e Raman) que investigam as transições entre os níveis vibracionais de uma molécula em virtude da interação com o campo elétrico oscilante da radiação eletromagnética incidente, que pode ser originada por uma fonte policromática (Infravermelho) ou monocromática (Raman)(141). Todo sistema composto por átomos ligados entre si apresentam níveis vibracionais, desde os compostos mais simples como as moléculas diatómicas aos sistemas biológicos mais complexos e materiais diversos(141). Tal fato, torna possível o uso das técnicas de espectroscopia vibracional para a caracterização de sistemas(138–141).

A espectroscopia de IR tem como base o processo de absorção de fótons da radiação eletromagnética incidente por uma molécula, levando-a a um estado vibracional excitado(134,135,137,138,142). Por sua vez, a espectroscopia Raman é caracterizada pela dispersão inelástica de um fóton mediada por momento dipolar induzido pelo campo eletromagnético(135,141,142), figura 16(142,143).

Devido ao seu caráter não destrutivo, a espectroscopia Raman representa, em conjunto com espectroscopia de infravermelha, uma das ferramentas mais úteis para a obtenção de informações sobre a estrutura e propriedades das moléculas(134,135,138,141,143). No entanto, a aplicação da espectroscopia Raman convencional é limitada pela fraca intensidade da luz espalhada Raman e o aparecimento de fluorescência(134,135,141,143).



**Figura 16:** Diagrama comparativo de espectroscopia de IR e Raman. **Legenda:** **A)** Diagrama de nível de energia mostrando os estados envolvidos nos espectros Raman em relação a IR(143). **B)** Três tipos de processos de espalhamento que podem ocorrer quando a luz interage com uma molécula(142).

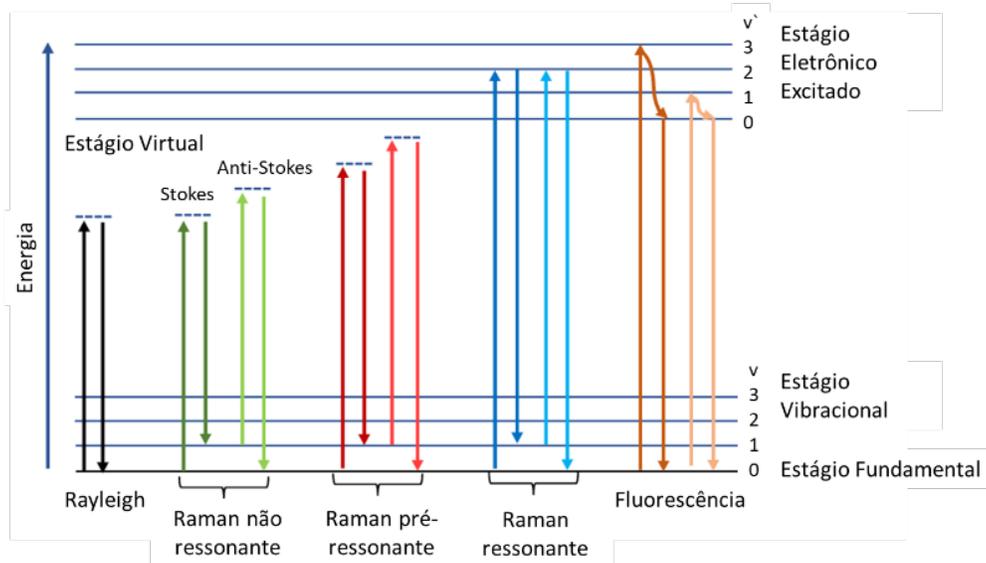
Uma maneira de superar essas desvantagens é o uso de Espectroscopia de Raman Aprimorada por superfície (SERS). O efeito SERS consiste no enorme aumento do sinal Raman ( $10^6$ ) das moléculas adsorvidas em superfícies metálicas(144,145). Desta forma, com SERS, uma sensibilidade aumentada é obtida e concentrações muito mais baixas podem ser estudadas(145). O efeito de intensificação pode influenciar a polarizabilidade molecular ou o campo elétrico experimentado pela molécula(57,132,145–148). Apesar das dificuldades e limitações da SERS como: reprodutibilidade quantitativa pobre e o efeito de fotólise de superfície, a técnica tornou-se uma ferramenta analítica cada vez mais popular, que tem sido aplicada em vários campos, como biomedicina, biofísica e bioquímica, ciência de superfície, aplicações analíticas e ambientais(146–150).

### 1.5.2.1 Espectroscopia Raman Aprimorada por Superfície (SERS)

Em outras palavras, SERS é uma técnica de espectroscopia vibracional ultrasensível que capta e analisa a vibração de moléculas como nanopartículas, potencializando o sinal de espalhamento da espectroscopia de Raman convencional. O fenômeno ocorre através da detecção

de analitos ligados a um substrato metálico, gerando espectros dos mesmos(151). Nos últimos anos tem-se estudado novas formas de melhoria do sinal Raman(151–155). Uma técnica descrita na literatura(51,152,154,155) e nesse trabalho, associa nanopartículas metálicas com moléculas orgânicas específicas que possuem bandas características. Essa nanoestrutura modificada é denominada de sonda SERS(155–158), na qual, a nanopartícula metálica é revestida com moléculas orgânicas como corantes, os quais tem bandas de absorção no mesmo ou mais próximo do comprimento de onda do laser Raman incidente(150). Tal técnica tem o intuito de gerar o fenômeno chamado de SERS ressonante (SERRS), figura 17(150).

O aprimoramento de sondas SERS é tido como uma evolução para as análises de espectroscópicas de amostras biológicas por trazer vantagens como: o aumento da sensibilidade em amostras de quantidade limitada; rápida análise, que impede o *photobleaching*, ou seja, a transferência de energia do estado excitado dos marcadores (corantes); aumento da intensidade do sinal que pode minimizar a autofluorescência de tecidos e células, permitindo que as sondas SERS possam ser usadas para geração de imagens não invasiva em pacientes vivos(155).



**Figura 17:** Diagrama de nível de energia mostrando os estados envolvidos nos espectros Raman, Rayleigh e Fluorescência. **Fonte:** Applications of Raman spectroscopy in cancer diagnosis. Cancer Metastasis Rev (2018)(150)

Uma sonda SERS pode ser constituída por uma nanoestrutura metálica, como nanopartícula de prata (AgNPs) ou nanopartícula de ouro (AuNPs), uma molécula orgânica com uma banda bem característica, como *Nile Blue A* (NBA) e uma molécula biológica, como um anticorpo conjugado(155). Nesse caso, as nanopartículas geram um intenso sinal espectroscópico devido as superfícies metálicas(155,157,158). A alteração da constituição química, tamanho e estrutura do núcleo de metal causam mudanças nas propriedades das sondas SERS(155,157,158). Além disso, essas moléculas orgânicas devem ser acopladas as nanoestruturas para gerar a impressão digital do SERS(155,157,158).

A imobilização sobre a superfície metálica é descrita como modificação superficial por camadas automontados(150). Existem diversos tipos de substratos que podem ser utilizados, sendo que, nesse trabalho optou-se por usar o ouro, uma vez que, apresenta características como: a fácil manipulação para a formação de filmes ou colóides; o fato de o ouro ser inerte auxiliando na conservação da sua estrutura e composição em temperaturas abaixo da temperatura de fusão, não reage com O<sub>2</sub> atmosférico - estas propriedades facilitam a manipulação; tem alta afinidade com grupos tióis, baixa toxicidade, sendo compatível com células(159,160). As aplicações usando as sondas SERS e a modificação de superfícies são as mais diversas, tais como na nanofabricação, biossensores e imunossensores(159,160).

### **1.5.3 Biossensores usando ensaios sanduíche SERS**

A primeira descrição de ensaio SERS relacionado a DA foi por Porter e colaboradores(160) usando nanopartículas de ouro para detectar IgG com alta precisão. Esse trabalho foi pioneiro usando o ensaio sanduíche, no qual, o analito de interesse foi identificado indiretamente entre uma superfície modificada e as nanopartículas recobertas com a molécula marcadora (sondas SERS) que irá gerar o sinal de interesse.

Imunoensaios utilizando a técnica de SERS são conhecidos por ser uma análise que pode ser usada para diagnóstico de doenças, pois combina a facilidade, à versatilidade de síntese, produzindo sistemas com alta sensibilidade(150,159,160). Alguns requisitos fundamentais para um imunoensaio SERS para aplicações em diagnósticos são uma resposta reprodutível e uniforme, período de vida estável e a simplicidade de fabricação(153–155).

Atualmente a literatura apresenta três categorias de imunoensaios com base na fisiopatologia da DA: 1) relacionados à deposição fibrilar de A $\beta$ , 2) papel da tau na formação de emaranhados neurofibrilares e 3) perfil de biomarcadores de múltiplos domínios(161,162). Dentre esses se desses trabalhos se destacam Zengin e colaboradores(163) que relatam um ensaio para a detecção da proteína tau utilizando uma combinação de anticorpos monoclonais anti-tau, nanopartículas magnéticas. As partículas de sílica magnéticas foram revestidas com poli (metacrilato de 2-hidroxietilo) e em seguida com anticorpos anti-tau. Neste trabalho os autores, mostraram que o limite de detecção abaixo de 25 fM. No entanto, é usado o líquido como biofluido. Outro trabalho que se destaca usando SERS é de Carlomagno e colaboradores(123) que descrevem um protocolo de análise usando SERS. Na busca por um perfil de biomarcadores que podem ser tratados como variáveis contínuas em relação ao dano cerebral, os pesquisadores, desenvolveram um biossensor baseado em SERS para análise de soro humano. Nesse estudo, na tentativa de evitar uso de anticorpos e um marcador único, foi analisado o soro, como um todo, através de várias diluições usando nanopartículas de ouro e prata e diversos tempos de incubação com o intuito de estabelecer um perfil espectroscópico para a DA(123). A impressão digital de DA através de SERS na tentativa de criar um biomarcador completo apresentou resultados interessantes, porém devido ao baixo número amostral não foi totalmente conclusivo(123). Outro trabalho interessante é de Jinghua Yu e colaboradores(164), no qual, é feita uma detecção multiplexada de biomarcadores

centrais da doença de Alzheimer. Nesse trabalho os pesquisadores construíram um biossensor múltiplo para detecção simultânea do peptídeo A $\beta$  (1-42) e proteína Tau usando diferentes conjugados de aptâmero poliA codificado por corante Raman (PAapt-AuNPs). Os resultados revelam que a estratégia apresenta bom desempenho analítico, porém não apresenta boa sensibilidade, além disso, utilizou amostras artificiais de líquido cefalorraquidiano (LCR)(164).

De uma maneira simplificada, todos os trabalhos realizados associando SERS, biomarcadores e DA(123,163–166) estão relacionados com o uso de líquido, que é um biofluido de difícil coleta, ou com os biomarcadores mais tradicionais que são peptídeo A $\beta$  e proteína Tau(123,163–166). Esses marcadores têm um papel específico no desenvolvimento DA, porém não são únicos e exclusivos do Alzheimer, podendo trazer vieses aos resultados.

## **2 JUSTIFICATIVA**

Atualmente, o diagnóstico definitivo de DA depende da confirmação da patologia cerebral por autópsia. Como o número de pessoas que desenvolvem DA deve aumentar drasticamente nas próximas décadas, há uma necessidade urgente de desenvolver testes de diagnóstico aplicáveis a pessoas vivas. O papel dessas proteínas antigênicas e o papel da autoimunidade na fisiopatologia da DA ainda não foram totalmente esclarecidos, mas há evidências suficientes para sugerir que estudos adicionais possam levar ao estabelecimento de um painel autoimune com maior especificidade e sensibilidade para diferenciar entre doença de Alzheimer, envelhecimento normal e outras doenças que levam à demência.

## **3 OBJETIVO**

### **3.1. Objetivo Geral**

Neste sentido o presente projeto tem como principal objetivo desenvolver biossensores com biomarcadores para o auxílio diagnóstico da doença de Alzheimer com maior especificidade dentre as doenças neurodegenerativas.

### **3.2. Objetivos Específicos**

- Compor banco de amostras criopreservadas de líquido e frações do sangue de pacientes portadores de doença de Alzheimer;
- Produzir, caracterizar e validar biossensor para identificação de autoanticorpo anti-ATP-sintase;
- Produzir, caracterizar e validar biossensor para identificação de autoanticorpo anti-FRMD8;
- Avaliar o desempenho do biossensor com as amostras de pacientes com diagnóstico confirmado de Doença de Alzheimer e pacientes saudáveis para Alzheimer;

- Definir qual será a melhor amostra ou amostras biológicas (soro ou líquido) para o diagnóstico de Alzheimer na plataforma do sensor;

## **4 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

Para o sucesso deste projeto foram estabelecidas várias parcerias intrainstitucionais: Departamento de Neurologia, Psicologia e Psiquiatria, o Hemocentro e a Equipe de Radiodiagnóstico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu; Instituto de Química de Araraquara (UNESP); interinstitucionais como o Instituto de Ciência e Tecnologia da UNIFESP campus São José dos Campos e internacional como o Departamento de Química da Universidade de Victoria, Canadá.

### **4.1 Comitê de Ética**

Todos os participantes envolvidos neste estudo foram amplamente informados sobre riscos e potenciais benefícios da participação neste estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) pré-aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista – UNESP e Plataforma Brasil, registrado sob o número de protocolo CEP 2.879.236. Este estudo foi conduzido de acordo com os princípios da Declaração de Helsinki, ISO14155 e diretrizes para Boas Práticas Clínicas.

### **4.2 Cálculo da amostra**

O tamanho da amostra por grupo para todos os testes foi estimado de forma monocaudal e o número (n) de repetições por grupo foi estimado em 10 participantes por grupo, levando-se em consideração um desvio padrão de 5%, para se detectar diferenças ao nível de 20% com nível de significância de 0,05, ponderando-se o poder do teste em 90% (<http://www.lee.dante.br/pesquisa/amostragem/amostra.html>). Deve-se levar em consideração para este estudo que, por tratar-se de um estudo envolvendo seres humanos pertencentes a um

grupo vulnerável e que, por tratar-se de um novo teste de detecção, deve arrolar o menor número possível de participantes, em concordância com o que foi orientado pelo CEP local.

### **4.3 Grupos de estudo**

Os pacientes incluídos: 10 indivíduos não portadores de Alzheimer (grupo controle = CA), sem comprometimento do Sistema Nervoso Central (SNC), que foram examinados pela equipe de Neurologia e tiveram a necessidade da coleta de líquido e indicação de Ressonância Magnética (RM), mas obtiveram resultado negativo para doenças infectocontagiosas do SNC (meningite), tumores malignos e que concordaram em participar deste estudo. Igualmente incluídos 10 portadores da doença de Alzheimer (DA) já diagnosticados no ambulatório de Neurologia específico para o acompanhamento de DA e que seriam submetidos ao exame do líquido e de RM, que devem fornecer amostras sabidamente positivas para a doença e obtiveram resultado negativo para doenças infectocontagiosas do SNC (meningite), tumores malignos e que concordaram em participar deste estudo.

Nenhum paciente, independente do grupo de pesquisa, foi submetido a coleta de líquido ou RM sem a real necessidade clínica.

#### **4.3.1 Critérios de inclusão e exclusão dos participantes**

Os critérios de inclusão para ambos os grupos a serem estudados estão descritos na tabela 3. O contato com os pacientes e seus familiares foram realizados no ambulatório de Neurologia clínica. Após consulta médica e psicológica, tendo em vista a caracterização do paciente como integrante do grupo CA ou DA, foi apresentado ao mesmo e à família o escopo do projeto para anuência e assinatura do TCLE. O paciente recebe o pedido de coleta de líquido, sangue e exames de neuroimagem (RM).

Para pacientes do Grupo Controle, foi reiteradamente confirmada a exclusão da hipótese diagnóstica de Alzheimer, e as demais comorbidades foram listadas para melhor entendimento dos resultados a serem obtidos. Não foram admitidos no grupo controle pacientes com alteração cognitiva, bem como não foram incluídos no grupo DA pacientes que não preencherem os critérios estabelecidos.

**Tabela 3** – Critérios de inclusão para os grupos de estudo

Indicadores	Grupo Controle (CA)	Grupo Doença de Alzheimer (DA)
Idade (em anos)	50-80	50-80
Sexo	Ambos	Ambos
Alteração cognitiva pela interpretação do mini exame do estado mental(167) (MEEM) realizado por psicólogo	Ausente	Presente
Ressonância Magnética (RM) com volumetria hipocampal	Sem alterações correlacionadas com a DA	Com alterações correlacionadas com a DA
Biomarcadores específicos (proteína TAU e peptídeo $\beta$ -amilóide)	Negativos	Positivos
Doenças Infectocontagiosas, Tumores, Outras doenças neurológicas	Negativos	Negativos

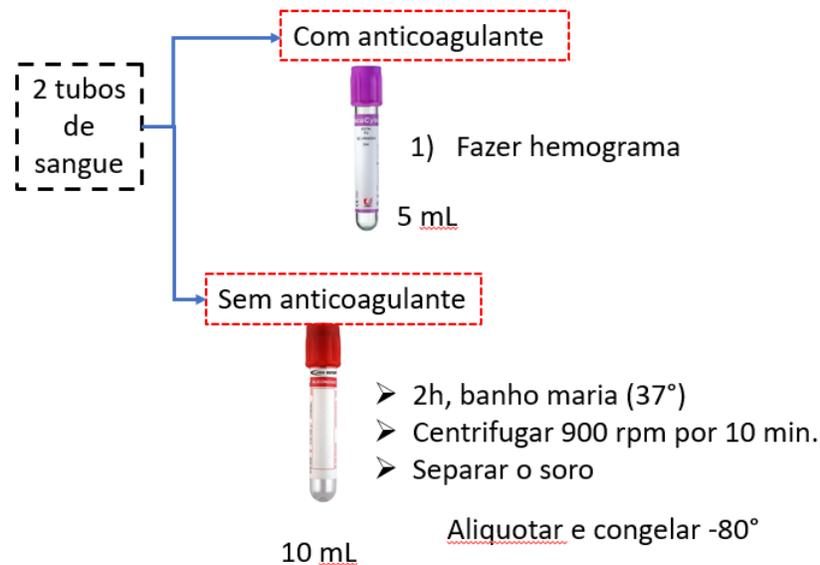
Fonte: Arquivo pessoal

## 4.4 Obtenção das amostras

### 4.4.1 Amostras de Sangue

Inicialmente foram coletadas as amostras de sangue periférico, em veia cubital, em frasco de 5 ml contendo anticoagulante (ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA) para realizar hemograma e um frasco sem anticoagulante para obtenção de soro (10 ml), figura 20. O frasco

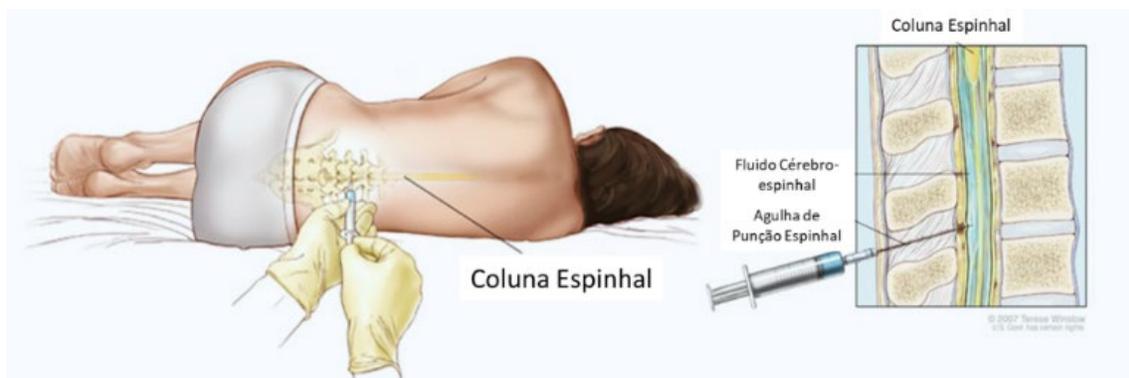
sem anticoagulante foi transportado até o Laboratório de Engenharia Celular (LEC) e colocado no banho-maria à 37°C por 2 horas com o intuito de retração do coágulo. Após sofreu centrifugação de 900 rpm por 10 minutos. O sobrenadante, soro, foi separado, alíquota e congelado à -80°C para preservação e posterior uso, figura 18.



**Figura 18:** Esquema de processamento das amostras de sangue. **Fonte:** Arquivo pessoal.

#### 4.4.2 Amostras de Líquido cefalorraquidiano ou Líquor (LCR)

Esta coleta foi efetuada por médico neurologista devidamente autorizado. Após a coleta de sangue o paciente foi acomodado na maca em decúbito dorsal direito, solicitando-se que o mesmo flexionasse os joelhos até o peito. Inicialmente foi realizado um botão de lidocaína 2% sem vasoconstritor, subcutâneo. Após a formação do botão anestésico foi procedida nova antisepsia do local com iodopovidona (PVPI), colocação de campos estéreis, troca de luvas para luvas estéreis e com a agulha de punção lombar, foi posicionada de forma angular até ultrapassar os planos de tecidos subjacentes para atingir o espaço medular, figura 19(167). Este LCR foi coletado e acondicionado em tubo estéril, volume de 2 ml. As amostras foram levadas para o LEC, alíquotadas e congeladas à -80°C para preservação e posterior uso.



**Figura 19:** Ilustração de como ocorre a coleta de LCR. **Fonte:** Adaptado do site: <https://www.tuasaude.com/puncao-lombar/>(167).

## 4.5 Prova Conceito

A prova de conceito é um modelo que pode ser usado na prática como padrão de comparação que possa comprovar a hipótese estabelecida. Com esse entendimento, foi definido como prova conceito para esse trabalho o Exame do Estado Mental (EEM ou MEEM)(168) (figura 20)(169), RM e a pesquisa de biomarcadores.

### 4.5.1 MEEM

O MEEM ou teste de Folstein(170), figura 20(169), é uma avaliação mundialmente utilizada para verificar possíveis quadros de demência de maneira rápida, objetiva e simples. No entanto, o diagnóstico não deve basear-se apenas nessa metodologia. Todavia, seus resultados podem orientar condutas mais especializadas ou colocar sob inspeção mais rígida um paciente com quadro clínico muito sugestivo.

De modo geral, o MEEM divide-se em duas etapas. A primeira procura avaliar a orientação, memória e atenção. Soma, no total, 21 pontos. A segunda analisa habilidades específicas como nomeação e compreensão. Seu resultado máximo é 9 pontos. As duas fases somam 30 pontos(171,172).



**MINI EXAME DO ESTADO MENTAL (MEEM)  
PARA DOENÇA DE ALZHEIMER**



Nome do Paciente: \_\_\_\_\_ Data da avaliação: \_\_\_\_\_

Escolaridade: ( ) 0 a 4 anos de estudo ( ) 5 ou mais anos de estudo

*\*Ex.: levou 10 anos para concluir a 4ª série, considera-se escolaridade de 4 anos*

<b>ORIENTAÇÃO</b>		
• Qual é o (ano) (estação) (dias/semana) (dia/mês) e (mês)	5	
• Onde estamos (país) (estado) (cidade) (rua ou local <sup>1</sup> ) (número ou andar <sup>2</sup> )	5	
<b>REGISTRO</b>		
• Dizer 3 palavra: PENTE RUA AZUL (pedir para prestar atenção, pois terá que repetir mais tarde. Pergunte pelas três palavras após tê-las nomeado. Repetir até 5 vezes, para que evoque corretamente e anotar número de vezes: _____)	3	
<b>ATENÇÃO E CÁLCULO</b>		
• Subtrair 100-7 (5 tentativas: 93 - 86 - 79 - 72 - 65) *Alternativo <sup>3</sup> : série de 7 dígitos (5 8 2 6 9 4 1)	5	
<b>EVOCAÇÃO</b>		
• Perguntar pelas 3 palavras (PENTE RUA AZUL)	3	
<b>LINGUAGEM</b>		
• Identificar lápis e relógio de pulso (sem estar no pulso)	2	
• Repetir: "Nem aqui, nem ali, nem lá"	1	
• Seguir o comando de três estágios: "Pegue o papel com a mão direita, dobre ao meio e ponha no chão". (Falar essa frase de forma inteira e apenas uma vez).	3	
• Ler ("só com os olhos") e executar: FECHÉ OS OLHOS	1	
• Escrever uma frase (um pensamento, ideia completa)	1	
• Copiar o desenho:	1	
<b>TOTAL:</b>	<b>30</b>	
<p><sup>1</sup>Rua é usado para visitas domiciliares. Local para consultas no hospital ou instituição.  <sup>2</sup>Número é usado para visitas domiciliares. Andar para consultas no hospital ou outra instituição.  <sup>3</sup>Alternativo é usado quando o entrevistado erra JÁ na primeira tentativa, OU acerta na primeira e erra na segunda. SEMPRE que o alternativo for utilizado, o escore do item será aquele obtido com ele. Não importa se a pessoa refere ou não saber fazer cálculos - de qualquer forma se inicia o teste pedindo que faça subtração inicial. A ordem de evocação tem que ser exatamente a da apresentação!            Obs.: na forma alternativa a pontuação máxima também é de 5 pontos. A ordem de evocação tem que ser exatamente a da apresentação.</p>		

Assinatura e carimbo do médico: \_\_\_\_\_

DIAF/SUV/SES/SC - Set 2018

**Figura 20:** Teste de MEEM. **Fonte:** Extraído do site da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, <https://www.saude.sc.gov.br>.(169)

Conforme o grau de pontuação do paciente pode-se estabelecer scores do grau cognitivo. Sendo assim, maior a pontuação, maior o desempenho cognitivo. Uma crítica a tal metodologia é a necessária adaptação do resultado ao grau de escolaridade do indivíduo. Uma pessoa com nível educacional mais elevado deverá, necessariamente, obter scores mais elevados. Desse modo, é indispensável moldar os scores aos anos de escolaridade do paciente. Considera-se como saudável para DA o paciente que alcança mais de 25 pontos(169,172,173). Suspeita-se de perda cognitiva leve quando o escore está entre 21 e 24 pontos, moderada, entre 10 e 20 e grave menor ou igual a 9(169,172,173). Após, agrega-se a escolaridade. Para indivíduos altamente alfabetizados desconfia-se de uma possível demência se a pontuação for menor que 24. Para pessoas com ensino fundamental a suspeita deve ser aguçada se o resultado for menor que 18. E para analfabetos, inferior a 14(173). Portanto, é indispensável um ajuste que torne os números mais fidedignos e sustente uma investigação mais detalhada. Para avaliar a progressão da doença o teste é feito em todas as consultas do paciente. Apesar do MEEM tratar-se de um teste com certas limitações, em âmbito ambulatorial pode ser um útil aliado no *screening* de quadros demenciais.

#### **4.5.2 Realização da Ressonância Magnética**

Todos os participantes desta pesquisa tiveram como critério de inclusão a realização de um exame de RM de crânio. As imagens foram adquiridas por um aparelho MAGNETOM® Verio 3T Siemens do setor de Radiodiagnóstico do HC da FMB - UNESP. Todas as análises de imagem foram realizadas com supervisão restrita de um radiologista especializado da equipe de Radiodiagnóstico do HC da FMB.

## 4.6 Reagentes

Em todos os experimentos foram utilizados água miliQ (Banstead Nanopure, resistividade 18.2  $\Omega$ -cm). Foram também utilizados os reagentes: Ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA,  $\geq$  99%, Sigma Aldrich), cloreto de ouro trihidratado ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq$  99,9%, Sigma Aldrich), citrato de sódio dihidratado ( $\geq$  99%, FG), *Nile Blue A* (NBA, 95%, Sigma Aldrich), Etil dimetilaminopropilcarbodiimida e sulfo-N-hidroxisuccinimida (EDC e sulfo-NHS, ambos da ProteoChem, USA), HS-PEG-COOH e HS-PEG-CH<sub>3</sub> (Peso Molecular = 3000 e 5000 Da, ambos da Rapp Polymere Tuebingen, Germany), anticorpo monoclonal IgG HIV p17 (Santa Cruz Biotechnology, USA), anticorpo policlonal IgG anti-humano (específico para Fc) (Sigma Aldrich), albumina de soro bovino (BSA,  $\geq$  96 %, Sigma Aldrich).

## 4.7 Biomarcadores

### 4.7.1 ATP Sintase subunidade Beta e Anticorpo Anti-ATP Sintase Subunidade Beta

O peptídeo recombinante humano ATP sintase subunidade beta (AQTSPSPKAG AATGRIVAVI GAVVDVQFDE GLPPILNALE VQGRETRLVL EVAQHLGEST VRTIAMDGTE GLVRGQKVLD SGAPIKIPVG PETLGRIMNV IGEPIDERGP IKTKQFAPIH AEAPFEMEMS VEQEILVTGI KVVDLLAPYA KGGKIGLFGG AGVGKTVLIM ELINNVAKAH GGYSVFAGVG ERTREGNDLY HEMIESGVIN LKDATSKVAL VYGQMNEPPG ARARVALTGL TVA EYFRDQE GQDVLLFIDN IFRFTQAGSE VSALLGRIPS AVGYQPTLAT DMGTMQERIT TTKKGSITSV QAIYVPADDL TDPAPATTFA HLDATTVLSR AIAELGIYPA VDPLDSTSRI MDPNIVGSEH YDVARGVQKI LQDYKSLQDI IAILGMDELS EEDKLTVSRA RKIQRFLSQP FQVAEVFTGH MGKLVPLKET IKG FQQILAG EYDHLPEQAF YMVGPIEEAV

AKADKLAEEH SS)(174) e seu respectivo anticorpo policlonal foram comprados na MyBioSource©.

O peptídeo ATP sintase subunidade beta possui 482 aminoácidos e tem peso molecular de 54kDa. É rico em alanina, glicina, leucina e isoleucina, o que confere a essa molécula uma carga residual de -19. Através da análise da sequência de aminoácidos na plataforma ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) foi possível identificar seu grau de estabilidade. Devido ao seu tamanho e estruturação tridimensional possui um índice de instabilidade de 34,93, o que, o qualifica como uma molécula estável.

Para os experimentos o peptídeo foi diluído em PBS para uma solução de 0,01mg/ml. O anticorpo policlonal Anti-ATP sintase subunidade beta humana recombinante, foi diluído em PBS para as concentrações de puro (0,1mg/ml), 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000, com o intuito de estabelecer uma curva de calibração.

#### **4.7.2 FRMD8 e Anticorpo Anti-FRMD8**

O peptídeo recombinante humano FRMD8 (SREKHVLLGL RFQELSWDHT SPEEEEPILW LEFDGDSEGT PVNKLLKIYS KQAELMSSLI EYCIELSQAA EPAPQDSATG SPSDPSSSLA PVQRPKLRRQ GSVVSSRIQH LSTIDYVED) e seu respectivo anticorpo policlonal foram comprados na Sigma Aldrich©.

O peptídeo recombinante FRMD8 possui 120 aminoácidos e peso molecular de 31 KDa. É rico em ácido glutâmico, leucina e serina, o que confere a essa molécula uma carga residual de -9. Através da análise da sequência de aminoácidos na plataforma ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) foi possível identificar seu grau de estabilidade. Devido ao seu tamanho e estruturação tridimensional possui um índice de instabilidade de 89,03, o que, o

qualifica como uma molécula instável fazendo-se necessário para esse peptídeo o uso de lipossomo para a sua estruturação tridimensional e estabilidade.

Para os ensaios o peptídeo foi diluído em segundo recomendação do fabricante para uma solução 0,1mg/mL (diluição sugerida na literatura(35)) a partir da solução estoque 6 mg/mL. Devido ao seu grau de instabilidade molecular o FRMD8 foi incorporado em lipossomos de dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG) da Avanti polar lipids. Os lipossomos foram preparados através da mistura das soluções DPPG (1 mmol. L<sup>-1</sup>) e FRMD8 (0,001 mmol. L<sup>-1</sup>) em metanol: clorofórmio (1:9) em um tubo Falcon. O solvente foi evaporado com ar comprimido e o filme formado ao redor do tubo foi hidratado por 12 horas com água milli-Q sob agitação.

O anticorpo policlonal Anti-FRMD8 recombinante que corresponde a região entre o aminoácido 217 e 452, foi diluído em PBS para as concentrações de puro (0,01mg/ml), 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000, com o intuito de estabelecer uma curva de calibração.

## **4.8 Produção dos Sensores**

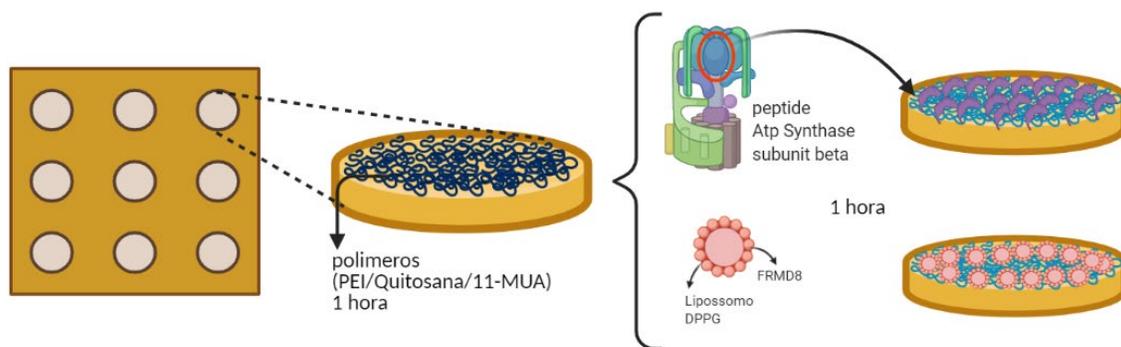
Os biossensores ópticos foram construídos baseados em 3 componentes: Lâmina de Ouro com superfície modificada, Nanopartículas de Ouro (NP) com superfície modificada e Imunoensaio Sanduiche.

### **4.8.1 Lâmina de Ouro com Superfície Modificada**

#### **4.8.1.1 Modificação**

Ambos os peptídeos foram imobilizados na superfície de lâminas de ouro de 1x1x0.04 polegadas da EMF-Dynasil© previamente limpas com solução piranha (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3:1, v/v) por 10 minutos e lavadas abundantemente com água deionizada e secas com nitrogênio. As lâminas

de ouro foram enriquecidas com solução de ácido 11-MUA a 50 mM por 48 horas, para funcionalizar com cargas negativas dos grupos  $\text{COO}^-$  do tiol. O intuito desse enriquecimento é criar na superfície pontos de ligação para aumentar a adsorção dos grupos  $\text{NH}_3^+$  dos polímeros e peptídeos. Após esse pré-tratamento as lâminas foram incubadas por 1 hora com o polímero PEI(175,176) (0,2mg/ml) para o peptídeo FRMD8 e com o polímero Quitosana(177) (0,2mg/mL) para o peptídeo ATP sintase. Os polímeros têm caráter positivo e foram utilizados para atuarem como uma cola para os peptídeos. Após a incubação com os polímeros as lâminas foram lavadas com água miliQ e secas com nitrogênio. Nesse momento, as lâminas foram incubadas com os peptídeos a 0,1mg/ml por 1 hora em temperatura ambiente. Após foram lavadas com água miliQ e secas com nitrogênio. Então foram incubadas por 30 minutos com solução de BSA a 5% para evitar interações inespecíficas, figura 21. Após foram lavadas com água miliQ e secas com nitrogênio. Nesse ponto foi montado o ensaio sanduiche (descrito no item 4.8.3).



**Figura 21:** Esquema demonstrando as etapas de modificação da superfície da lâmina de ouro. **Fonte:** Arquivo pessoal.

#### 4.8.1.2 Caracterização

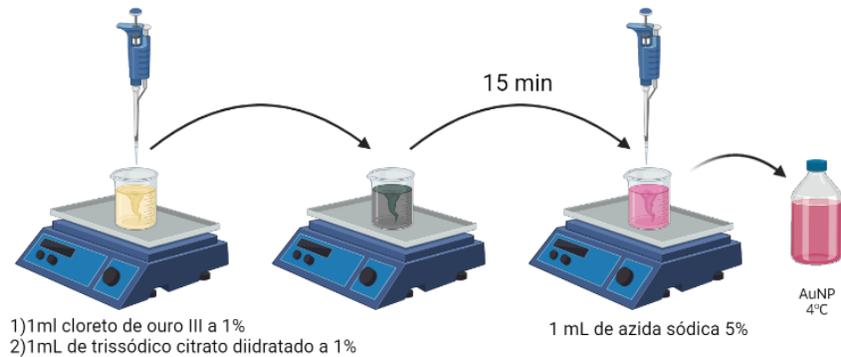
Para a caracterização da modificação da superfície das lâminas foi usada a técnica de espectroscopia de absorção de reflexão de infravermelho modulado polarizado (PM-IRRAS). Essa é uma técnica espectroscópica de infravermelho reflexivo sensível à superfície que mede os modos

vibracionais de adsorvatos em uma superfície. A luz infravermelha é refletida de uma amostra (metálica) em um ângulo rasante, em um ângulo de alta incidência, o que permite o aumento da sensibilidade da superfície. A adsorção de monocamada automontada em um substrato de ouro é o caso ideal para detectar espécies em uma superfície devido à adsorção espontânea e seus modos de estiramento C – H acentuados devido a uma monocamada bem ordenada em uma superfície. As monocamadas tioladas são facilmente adsorvidos às superfícies de ouro por meio do grupo de cabeça de ouro-tiol, deixando um grupo de cauda funcional. Além disso, as superfícies de ouro são altamente reflexivas e não oxidam no ar em comparação com outras superfícies metálicas, portanto, um sensor perfeito para medir a adsorção(178,179). Para tal, foi usado o equipamento KSV PMI 550 (KVS Instrument©, Helsinque, Finlândia) e analisado pelo software IRRAS 1.0.5. Para tal, foram feitos 600 espectros com tempo de incidência de 1 segundo, resolução espectral de  $4\text{ cm}^{-1}$  e ângulo de incidência de  $80^\circ$ .

## **4.8.2 Nanopartículas de Ouro com Superfície Modificada**

### **4.8.2.1 Síntese**

A síntese foi realizada pelo método de Turkevich(180), para isso 100 mL de água Milli-Q em ponto de ebulição com 1mL de solução de Ácido cloroáurico  $\text{HAuCl}_4$  a 1%, 1mL de citrato trissódico hidratado a 1% e 1 mL de azida sódica 5%. Após 15 minutos de incubação a solução foi retirada da fonte de calor e acondicionada em  $4^\circ\text{C}$  para posterior uso(181), figura 22.



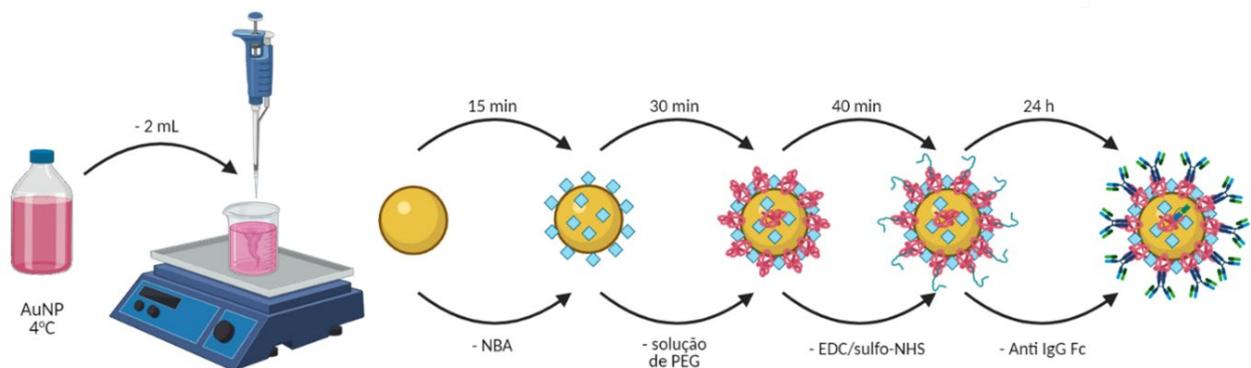
**Figura 22:** Esquema demonstrando a síntese da nanopartícula de ouro (AuNP). **Fonte:** Arquivo pessoal.

#### 4.8.2.2 Modificação

Para ambos os sistemas foi produzida uma nanopartícula de ouro de 30 nm modificada com Anti-IgG porção Fc (sigma) com o intuito de reconhecer a porção Fc dos autoanticorpos da classe IgG gerados durante a doença de Alzheimer.

As sondas SERS foram produzidas modificando as AuNPs de acordo com um método revisado descrito por Qian et al (158,182), figura 23. As nanopartículas foram primeiro revestidas com corante *Nile Blue A* (NBA), 2 mL de AuNP foram incubados por 15 minutos sob agitação constante com 300  $\mu$ L de uma solução de NBA 5  $\mu$ M que foi adicionado lentamente, gota a gota. A segunda camada de revestimento foi com PEG que atua para reduzir a ligação não específica das sondas SERS a locais diferentes do alvo e também proporcionar grupos COOH nos quais serão imobilizados os anticorpos. A sonda AuNP/NBA foi incubada por 20 minutos sob agitação constante com 320  $\mu$ L de uma solução mista de PEG composta de: 0,5 mL de uma solução 200  $\mu$ M de HS-PEG-COOH (MW: 3000 Da) e 0,25 mL de uma solução 200  $\mu$ M de metoxil PEG-Tiol (PEG-SH, MW: 5000 Da), diluído para 1 mL com água miliQ. Após incubação, a suspensão AuNP / NBA / PEG foi centrifugada duas vezes a 13000 rpm por 7 minutos e ressuspensa em 2 mL água miliQ. Para ativar os grupos COOH nas superfícies de NP, 40  $\mu$ L de uma solução de 20 mg / mL de EDC foi adicionado, seguido rapidamente por 40  $\mu$ L de uma solução de 55 mg / mL de sulfo-

NHS. Após 40 minutos de agitação, 0,5 mL de um tampão PBS contendo 1% Tween® 20 (PBST) foi adicionado à mistura para melhorar sua solubilidade, e a suspensão foi agitada durante mais 5 minutos. O excesso de reagente foi removido por duas lavagens de centrifugação (13000rpm por 7 minutos) e ressuspensão em 2mL de PBST. Neste ponto, 140µL de uma solução de Anti-IgG porção Fc à 0,5mg/mL foi adicionada à suspensão de nanopartículas, resultando em uma concentração de proteína de aproximadamente 35µg / mL. A mistura foi incubada overnight à 4°C. Após 24 horas, 0,5mL de tampão PBS com 0,1% Tween®20 e 100µg / mL de BSA foi adicionado à suspensão por 20 minutos. O objetivo da BSA era limitar quaisquer grupos de COOH ativados que não reagiram. Depois de reagir as sondas forma lavadas 2 vezes (13000 rpm por 7 minutos) e ressuspensas em 2mL de PBST. Nesse ponto, foi montado o ensaio sanduiche (descrito no item 4.8.3).



**Figura 23:** Esquema demonstrando a modificação das nanopartículas. **Fonte:** Arquivo pessoal

#### 4.8.2.3 Caracterização

Para a caracterização da AuNP com relação a sua estrutura físico-química e a modificação de sua superfície foram utilizadas as técnicas de *Dynamic Light Scattering* (DLS), Potencial-Zeta, Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e Espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-Vis).

A TEM é uma técnica de microscopia na qual um feixe de elétrons é transmitido através de uma amostra para formar uma imagem. Uma imagem é formada a partir da interação dos elétrons com a amostra à medida que o feixe é transmitido através da amostra. Essa técnica é capaz de fornecer informações de resolução nanométrica e atômica. As imagens foram adquiridas com um microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-1400 equipado com uma câmera Gatan Orius SC1000. O instrumento tem uma resolução de 0,2 nm e uma faixa de ampliação de x200 a x1.200.000.

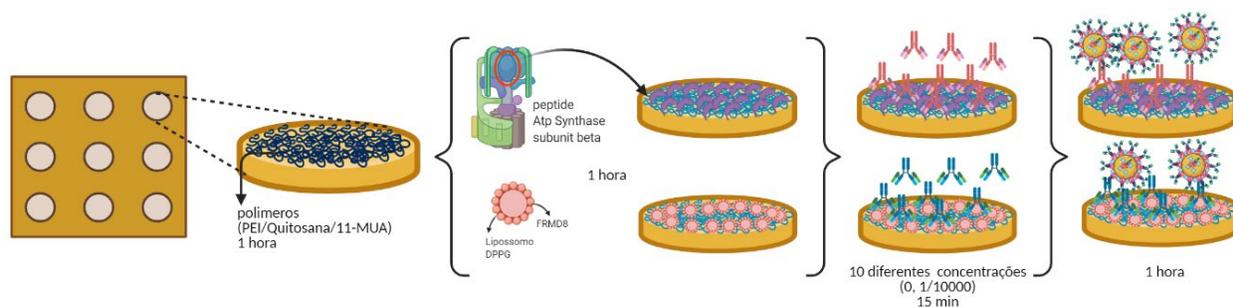
A técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering, DLS), é amplamente utilizada para a avaliação das dimensões de partículas e moléculas em suspensão na região dos submicrométricos. O movimento browniano das partículas faz com que a luz do laser seja espalhada com intensidades diferentes, dependente da concentração e tamanho, e assim obtemos a distribuição do tamanho da partícula, e dela podemos obter a variação de volume e de quantidade. Já o potencial zeta indica a estabilidade das dispersões coloidais. A magnitude do potencial zeta indica o grau de repulsão eletrostática entre partículas com carga. As medidas tanto de DLS quanto potencial Zeta foram adquiridas no equipamento Zsizer Nano ZS90 (Malvern).

A espectroscopia UV-Visível (UV-Vis) é amplamente utilizada no campo da química analítica, especialmente durante a análise quantitativa de um analito específico, como de íons de metal de transição e de compostos orgânicos conjugados. A técnica de UV-Vis é baseada na interação entre luz e matéria através da absorção da luz ultravioleta ou luz visível por compostos químicos, o que resulta na produção de espectros distintos. Quando a matéria absorve a radiação, os elétrons presentes nela sofrem excitação. Isso os faz saltar de um estado fundamental para um estado excitado. As medidas de UV-Vis foram adquiridas no equipamento Cytation5 (BioTek Instruments Inc.©, Winooski, VT, USA) e software Gen5™. Para tal, 8 espectros de absorbância

no intervalo de 300nm a 700nm, com medidas a cada 1nm, velocidade normal de leitura com intervalo de 100 milisegundos, para os principais passos de modificação das AuNP.

### 4.8.3 Imunoensaio

Após ter as nanopartículas completamente modificadas e a modificação da superfície da lâmina de ouro com 11-MUA e os polímeros PEI/Quitosana e os antígenos, as lâminas foram incubadas por 15 minutos com os respectivos anticorpos e com as diferentes diluições, lavadas com PBS 3 vezes para remoção de possíveis não ligantes. Para o controle negativo não foi usado anticorpo, as nanopartículas foram usadas diretamente nas lâminas modificadas. Para o controle experimental, foi usado o anticorpo monoclonal IgG HIV p17 em uma única concentração de 1mg/ml. Após foram incubadas por 1 hora com as nanopartículas modificadas com Anti IgG porção Fc e lavadas 3 vezes com PBS, figura 24. Nesse momento o ensaio estava completo para começar a ser avaliado usando a técnica de SERS.

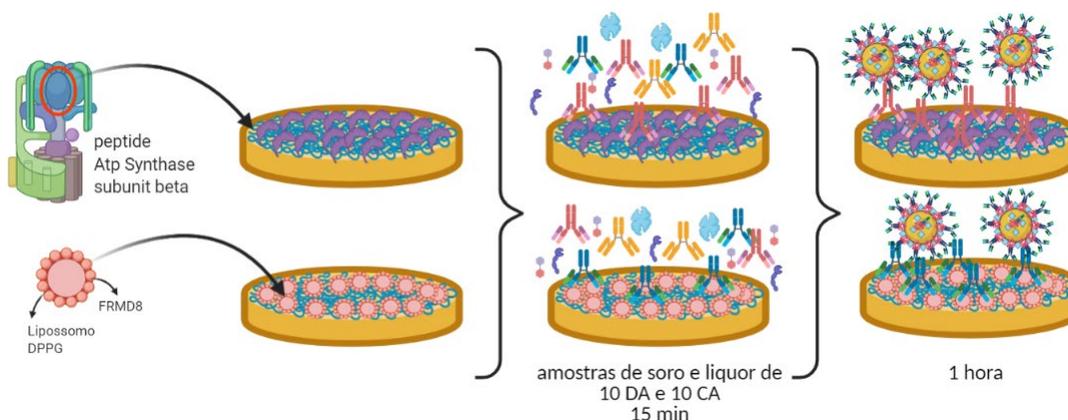


**Figura 24:** Esquema demonstrando o ensaio sandwich. **Fonte:** Arquivo pessoal

### 4.8.4 Imunoensaio com amostras reais – Biossensor

Após ter padronizado a produção e modificação das nanopartículas e das lâminas de ouro, além de ter gerado as curvas de calibração (descrito no item 4.10), as lâminas foram incubadas por 15 minutos com amostras de soro e líquido de 10 pacientes DA e 10 pacientes CA, lavadas com PBS 3 vezes para remoção de possíveis não ligantes. Para o controle experimental, foi usado o

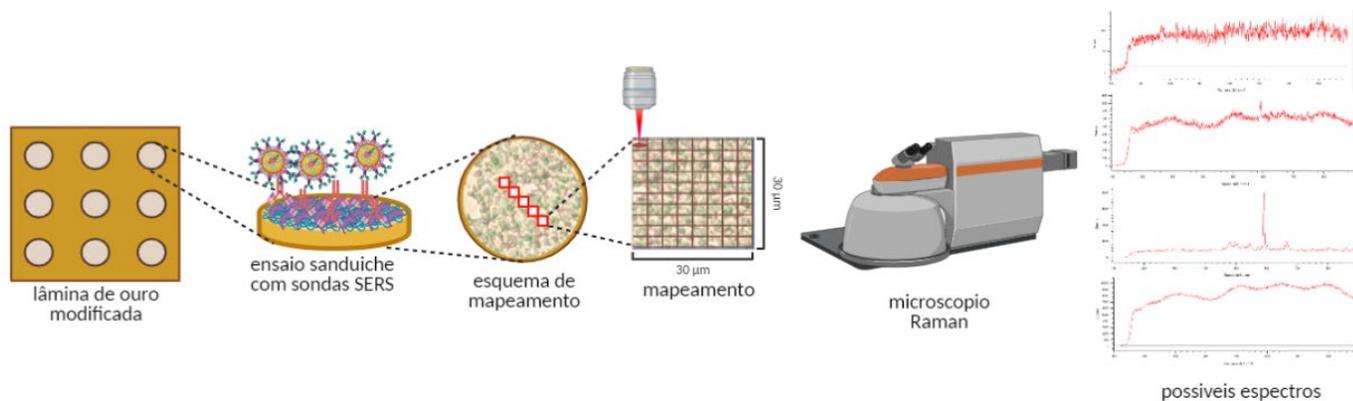
anticorpo monoclonal IgG HIV p17 em uma única concentração de 1mg/ml. Após foram incubadas por 1 hora com as nanopartículas modificadas com Anti IgG porção Fc e lavadas 3 vezes com PBS, figura 25. Nesse momento o ensaio estava completo para começar a ser avaliado usando a técnica de SERS.



**Figura 25:** Esquema demonstrando o ensaio com as amostras reais. **Fonte:** Arquivo pessoal.

#### 4.9 Medidas SERS

Os espectros foram obtidos usando o microscópio InVia Raman (Renishaw Inc., Hoffman Estates, IL, EUA) acoplado a um laser de Hélio-Neônio (633 nm). Para a quantificação do efeito SERS as medidas foram feitas seguindo os seguintes parâmetros: tempo de exposição ao laser de 3 segundos, potência do laser a 10% (17mW), foram feitos 3 mapas da superfície do biossensor com dimensões de 30 $\mu$ mX30 $\mu$ m, por amostragem e o experimento foi repetido 3 vezes, com o intuito de gerar uma curva de calibração, resultando em aproximadamente 8100 espectros para cada concentração de anticorpo, figura 26. Para as amostras reais foram feitas em duplicatas biológicas e 6 mapas por amostra. Os picos dos espectros que foram analisados correspondem a banda de maior de intensidade do NBA em 592  $\text{cm}^{-1}$ . Considerando a absorção do NBA há contribuição, de ambos, Raman ressonante e SERS. Essas situações de duplo aumento da intensidade são descritas na literatura como SERS ressonante ou SER(R)S.<sup>136,137</sup>



**Figura 26:** Esquema demonstrando a medida do imunensaio. **Fonte:** Arquivo pessoal.

#### 4.10 Análise de Dados

Os pacientes foram divididos em dois grupos: DA (pacientes em tratamento para Alzheimer, n=10) e CA (pacientes sem diagnóstico de Alzheimer, n=10), totalizando um número amostral total de 20 indivíduos. Além disso, foi utilizado com fluido biológico amostral o soro e o líquido, com intuito de estabelecer qual seria mais adequado para o biossensor.

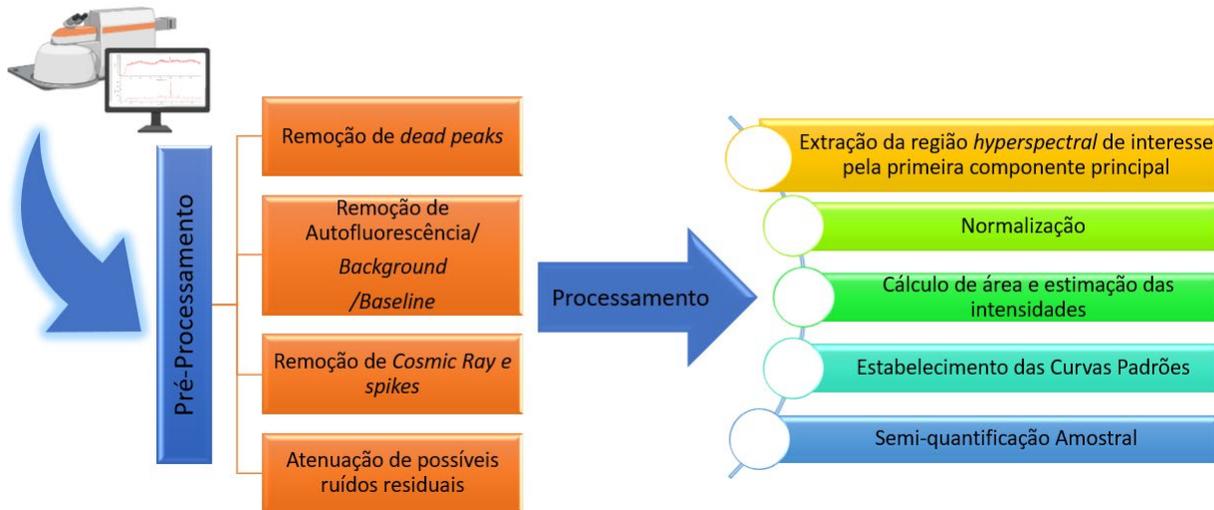
A capacidade da espectroscopia Raman de fornecer análises significativas depende muito de uma etapa de pré-processamento para remover variações espectrais insignificantes. Isso é crucial na análise de biofluido. A adoção generalizada de diagnósticos usando Raman requer um modelo robusto que pode resistir a discrepâncias de espectro de rotina devido a variações inevitáveis, como idade, dieta e histórico médico(183). Dessa maneira, devido a sensibilidade do método de leitura dos ensaios, SERS, e da natureza das amostras, que não sofreram nenhuma forma de tratamento ou diluição; foi necessário o desenvolvimento de um método para analisar a variabilidade estatística dentro de um conjunto de espectros e determinar um modelo robusto que fosse capaz de avaliar o vasto e complexo número de dados gerado nesse trabalho. Isso permitiu qualificar ou excluir seletivamente um método de pré-processamento, predeterminar a robustez e,

simultaneamente, identificar o número de componentes que formarão o melhor modelo preditivo. Para tal, foi utilizado o programa MatLab™, The MathWorks, Inc©, Estados Unidos.

A figura 27, apresenta um fluxograma mostrando todas as etapas de tratamento dos dados através do código desenvolvido. O código MatLab elaborado para esse projeto consiste em uma etapa inicial de pré-tratamento e remoção de interferentes dos dados. Inicialmente todos os possíveis *dead pixels*(184), foram removidos. Por se tratar de compostos proteicos, o *background* e o nível de autofluorescência foram elevados, sendo assim necessário a remoção dos mesmos através do estabelecimento de uma *baseline* e *threshold*(183,185). Em sequência foram removidos os *Spikes* e *Cosmic Rays*(186). Como última etapa de remoção dos ruídos, foi usado a suavização robustas do filtro Savitzky-Golay(185).

Após a “limpeza” dos espectros, selecionou-se a região de interesse de análise que corresponde ao pico referente ao *Nile Blue* (592nm) através da extração da região *hyperspectral* usando a análise componente principal (PCA)(183) que consiste de uma técnica estatística utilizada para analisar as inter-relações entre um grande número de variáveis e dados, sumarizando os mesmos através da definição dos componentes principais. Com a região de interesse isolada foi feita a normalização dos dados para garantir a consistência entre os espectros, uma vez que, entre os experimentos pequenas mudanças podem se manifestar como diferenças na amplitude dos picos, impactando negativamente os resultados. Devido a isso, foi utilizada a técnica de variável normal robusta (RNV)(187). O RNV centraliza e dimensiona os dados espectrais usando percentis em vez das médias, pois se a distribuição das medidas para uma variável for distorcida de alguma forma, o percentil é um distribuidor mais robusto de tendências dentro do conjunto de dados do que o desvio padrão(187). O benefício do RNV é a influência reduzida de outliers, no caso ruídos(187). Com os dados normalizados realizou-se o cálculo de área e estimação das

intensidades através da integração da banda de interesse. Com os valores das áreas e intensidades definidas foi calculada a média das mesmas referente a cada grupo (concentrações de anticorpos) e através de regressão linear e estabelecimento da linha de tendencia gerou-se as curvas padrões. Com as curvas geradas foi possível realizar a o teste de validação e análise com as amostras. Os espectros gerados usando as amostras de LCR e Soro sofreram o mesmo tratamento matemático e a média final gerou um ponto que foi plotado sobre as curvas permitindo, assim, estimar-se a concentração de autoanticorpos nas amostras.

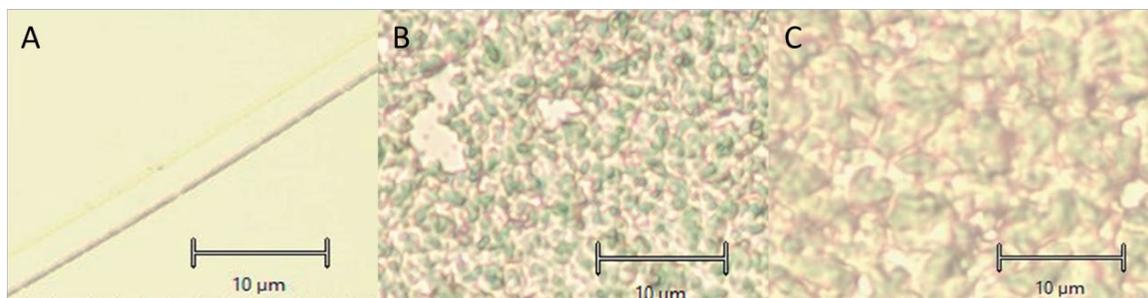


**Figura 27:** Fluxograma do tratamento dos dados. **Fonte:** Arquivo pessoal.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Lâmina de Ouro com Superfície Modificada

Para comprovar o enriquecimento das superfícies das lâminas de ouro com o sistema 11-MUA/Polímeros/Peptídeos, foram tiradas fotos por microscopia óptica com aumento de 50 X. A imagem apresentada na figura 28, mostra que em ambos os sistemas houve a modificação a nível macroscópico das superfícies através da deposição de matéria por meio das interações químicas entre as moléculas. Como pode ser observado e comparado entre as imagens, a primeira foto apresenta a imagem de uma lâmina de ouro não modificada (figura 28 A). A segunda foto apresenta a lâmina enriquecida pela técnica de *Layer-by-layer* com o sistema 11-MUA/Quitosana/ATP Sintase subunidade beta (figura 28 B) e a terceira foto apresenta a modificação usando 11-MUA/PEI/DPPG+FRMD8 (figura 28 C).



**Figura 28:** Em **A** pode-se ver a lâmina de ouro não modificada com um risco em evidência para demonstrar que o microscópio estava em foco. Em **B** pode-se observar a deposição de matéria no sistema 11-MUA/Quitosana/ATP Sintase subunidade beta. Em **C** observa-se a deposição de matéria no sistema 11-MUA/PEI/FRMD8. **Fonte:** Arquivo pessoal.

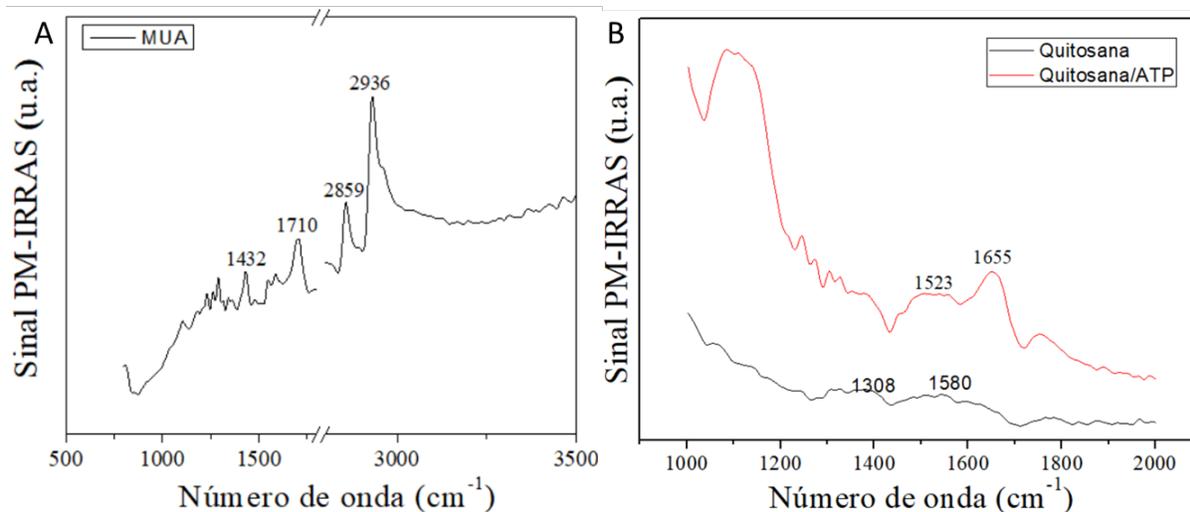
Para demonstrar a modificação da superfície camada por camada em nível molecular, foi realizada a técnica de PM-IRRAS. A figura 29 e 30 mostram os espectros adquiridos com os picos característicos de cada camada como descrito na tabela 4 e 5 para os sistemas 11-MUA/Quitosana/ATP Sintase subunidade beta e 11-MUA/PEI/DPPG+FRMD8, respectivamente.

A figura 29 A e figura 30 A, apresentam o espectro obtido após a modificação com o 11-MUA, onde são observadas as bandas características desta molécula. O espectro apresentou duas

bandas em 2936 e 2859  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas às vibrações de alongamento simétricas e assimétricas do grupo  $\text{CH}_2$ , respectivamente. Adicionalmente, é observada uma banda em 1710  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída à vibração do grupo  $\text{C}=\text{O}$  e uma banda em 1432  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída à deformação angular dos grupos  $\text{CH}_2$ (136,188). Por ser um composto rico em grupos  $\text{CH}_2$  e apresentar ligações  $\text{C}=\text{O}$ , a presença dessas bandas em uma matriz de ouro inicialmente limpa e não modificada revela a modificação da superfície por 11-MUA(188–191). Na figura 29 B, são apresentados os espectros obtidos após a deposição dos filmes de quitosana e a adsorção da proteína ATP Sintase Subunidade Beta. Em ambos os casos foi subtraído o espectro do filme de 11-MUA, com o objetivo de identificar mais claramente a contribuição das bandas relacionadas com os grupos funcionais presentes nos filmes depositados por quitosana e a proteína ATP. Essa subtração de 11-MUA se deve pelo fato de que a modificação da superfície com apenas quitosana ou a proteína para identificar as bandas, não é possível, uma vez que, não possuem terminações tiol para se ligar ao ouro.

A quitosana é um polímero rico em grupos amina e ligações C-N. Logo, a deposição da quitosana foi verificada pela presença de uma banda larga em  $\sim 1580 \text{ cm}^{-1}$  atribuída à combinação da vibração dos grupos N-H e C-N em amina II e uma banda em 1308  $\text{cm}^{-1}$  atribuída às vibrações de alongamento da ligação C-N nas aminas da quitosana (188,189).

A ATP sintase por se tratar de uma proteína é rica em grupamentos amina. Sendo assim, a adsorção da proteína ATP nos filmes de quitosana foi verificada pela presença das bandas I e II de aminas em 1655  $\text{cm}^{-1}$  e 1523  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente(191). Estas bandas estão relacionadas aos modos de vibração de estiramento e flexão dos grupos  $\text{C}=\text{O}$  e N-H presentes na ligação peptídica.



**Figura 29:** Espectros de PM-IRRAS para o sistema 11-MUA/Quitosana/ATP. **Legenda:** **A)** Espectro para a camada de 11-MUA; **B)** Espectro para a camada Quitosana em comparação com a camada ATP Subunidade beta, após correção de *baseline*. **Fonte:** Arquivo pessoal.

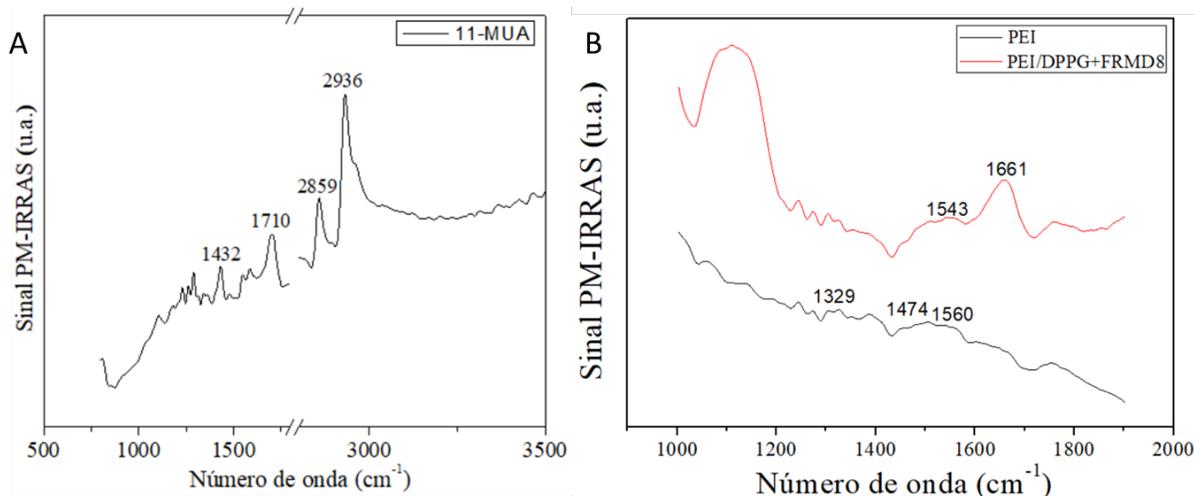
**Tabela 4:** de PM-IRRAS para o sistema 11-MUA/Quitosana/ATP

Grupo Funcional	Comprimento de Onda (cm <sup>-1</sup> )		
	11-MUA	Quitosana	ATP
C-H estiramento	2936 e 2859		
C=O estiramento	1710		
COO-estiramento simétrico	1583		
C-H deformação	1432		
<u>Aminas I e II</u> deformação		1308, 1580	1655, 1523

**Fonte:** Arquivo pessoal

Na figura 30 B, a deposição dos filmes de PEI e DPPG+FRMD8 também foram verificados. O polímero PEI é rico em ligações N-H C-H e C-N. Sendo assim, os filmes de PEI apresentaram uma banda larga entre 1400 e 1600 cm<sup>-1</sup> atribuída a combinação das vibrações de deformação angular dos grupos N-H e C-H<sup>168,169</sup>. Adicionalmente, foi observada uma banda em 1329 cm<sup>-1</sup> atribuída às vibrações de alongamento da ligação C-N. O peptídeo FRMD8 por se tratar

de um pedaço de uma proteína, apresenta grupamentos amida. Então, conforme esperado, após a adsorção dos filmes de proteína, observou-se a presença das bandas amina I e II<sup>166</sup>.



**Figura 30:** Espectros de PM-IRRAS para o sistema 11-MUA/PEI/DPPG+FRMD8. **Legenda:** **A)** Espectro para a camada de 11-MUA; **B)** Espectro para a camada PEI em comparação com a camada DPPG+FRMD8, após correção de *baseline*. **Fonte:** Arquivo pessoal.

**Tabela 5:** Espectros de PM-IRRAS para o sistema 11-MUA/PEI/FRMD8

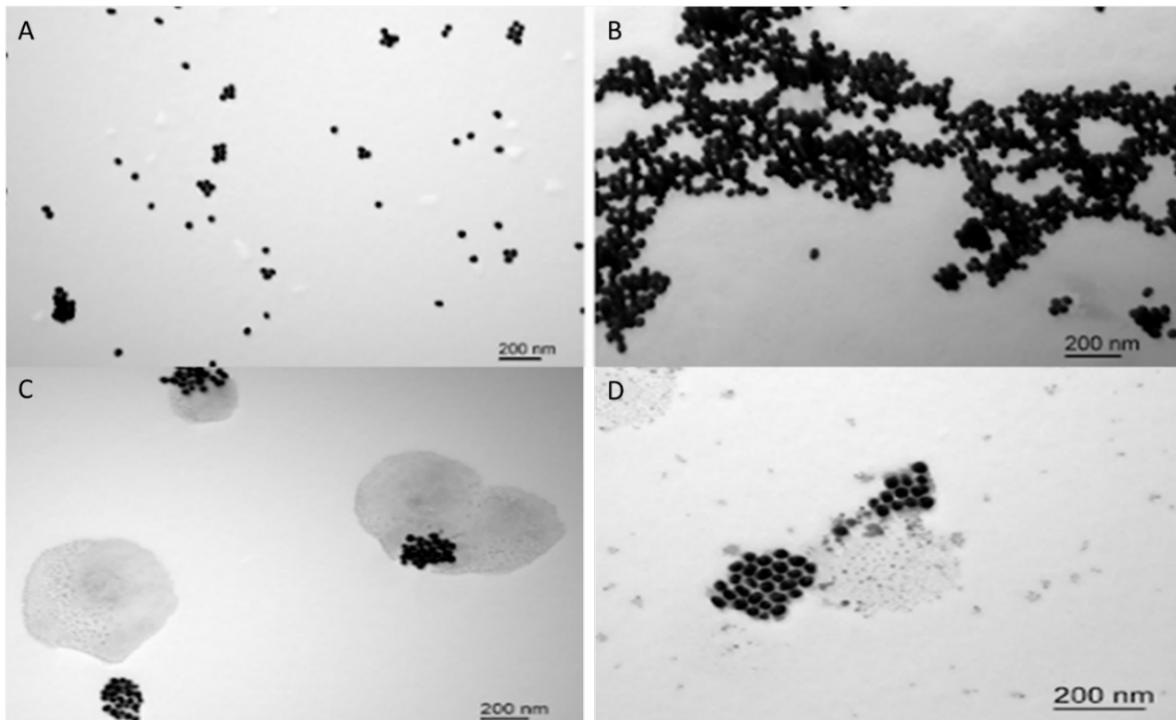
Grupo Funcional	Comprimento de Onda (cm <sup>-1</sup> )		
	11-MUA	PEI	DPPG+FRMD8
C-H estiramento	2936 e 2859		
C=O estiramento	1710		
COO- estiramento simétrico	1583		
C-H deformação	1432		
Amina II deformação		1474,1560	1543
Amina I estiramento		1329	1661

**Fonte:** Arquivo pessoal

## 5.2 Nanopartículas de Ouro com Superfície Modificada

Para avaliar a funcionalização da superfície das nanopartículas foram realizadas as técnicas de UV-Vis, TEM, DLS e Potencial Zeta antes e depois do enriquecimento com o intuito de demonstrar a modificação na superfície.

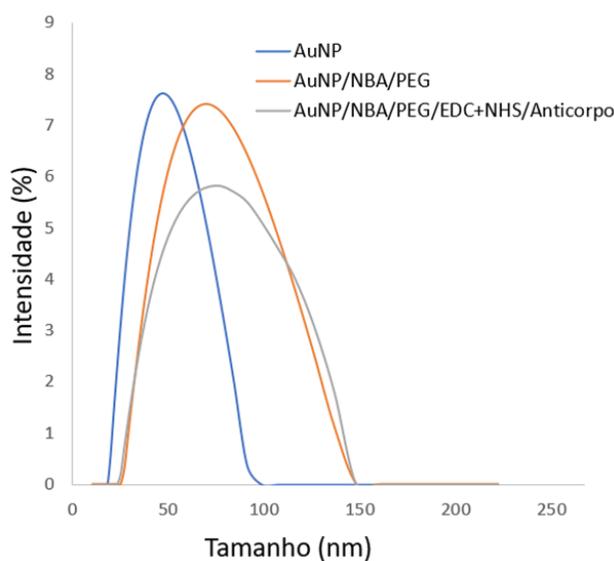
Na Microscopia Eletrônica de Transmissão, figura 31, as imagens foram feitas antes da alteração da superfície para avaliar a estrutura, tamanho relativo, qualidade e regularidade das AuNP (figura 31 A e B) e após para analisar se não ocorreu deformação ou agregação das partículas devido ao processo de transformação (figura 31 C e D). Em ambas as análises as partículas se apresentam integras, esféricas e não agregadas.



**Figura 31:** Imagens de TEM das nanopartículas. **Legenda:** A e B) Apresentam imagens das AuNP não modificadas. C e D) Apresentam imagens das AuNP modificadas. **Fonte:** Arquivo Pessoal.

A técnica de DLS e Potencial Zeta são complementares ao avaliar as dimensões das AuNP e sua estabilidade, respectivamente. As análises foram feitas antes da modificação para avaliar a qualidade da síntese e estabelecer um padrão, durante para garantir a qualidade, integridade e estabilidade das nanopartículas; e no final, com intuito de validar a modificação e garantir a qualidade. A figura 32 apresenta o gráfico de DLS e tabela 6 apresenta os valores do diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersão (PDI) que apresenta o nível de homogeneidade do

sistema e quanto menor o valor obtido, preferencialmente  $\leq 0,2$ , maior o grau de homogeneidade da amostra(192,193) e Potencial Zeta.



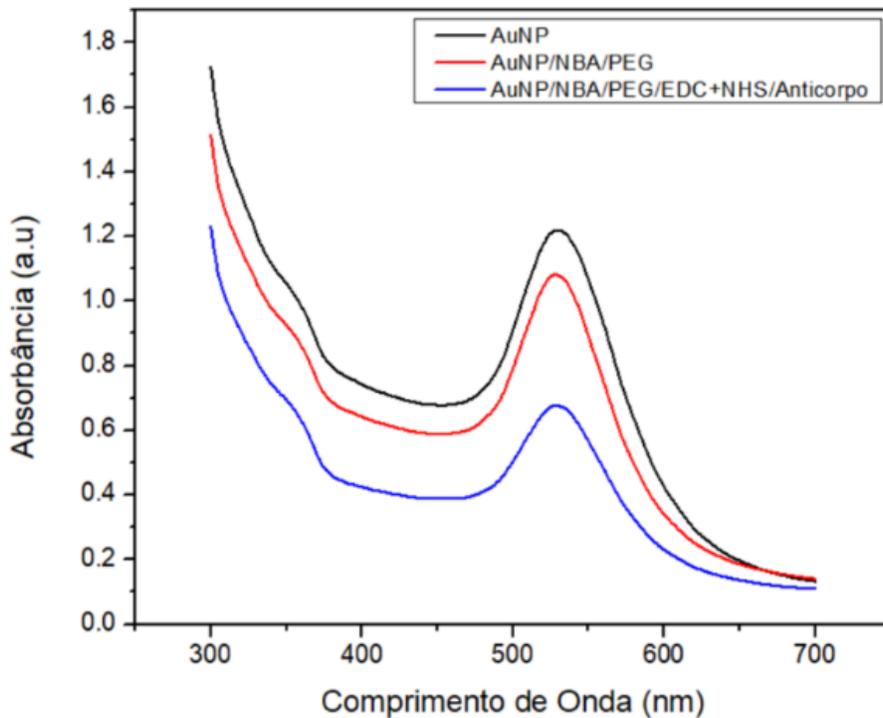
**Figura 32:** Medidas de DLS para a AuNP e sua funcionalização com NBA/PEG e NBA/PEG/EDC+NHS/Anticorpo. **Fonte:** Arquivo Pessoal.

**Tabela 6:** Resultados obtidos das medidas de DLS e Potencial Zeta para a AuNP e AuNP funcionalizada com NBA/PEG e NBA/PEG/EDC+NHS/Anticorpo.

Estágio da Modificação	Diâmetro Hidrodinâmico (nm) - DLS	Índice de Polidispersão (PDI) - DLS	Potencial Zeta (mV)
AuNP	39,87nm	0,22	-47,71 mV/±1,1
AuNP/NBA/PEG	63,35nm	0,18	-41,37mV/±1,2
AuNP/NBA/PEG/EDC+NHS/Anticorpo	71,51nm	0,17	-8,29mV/±0,29

**Fonte:** Arquivo pessoal

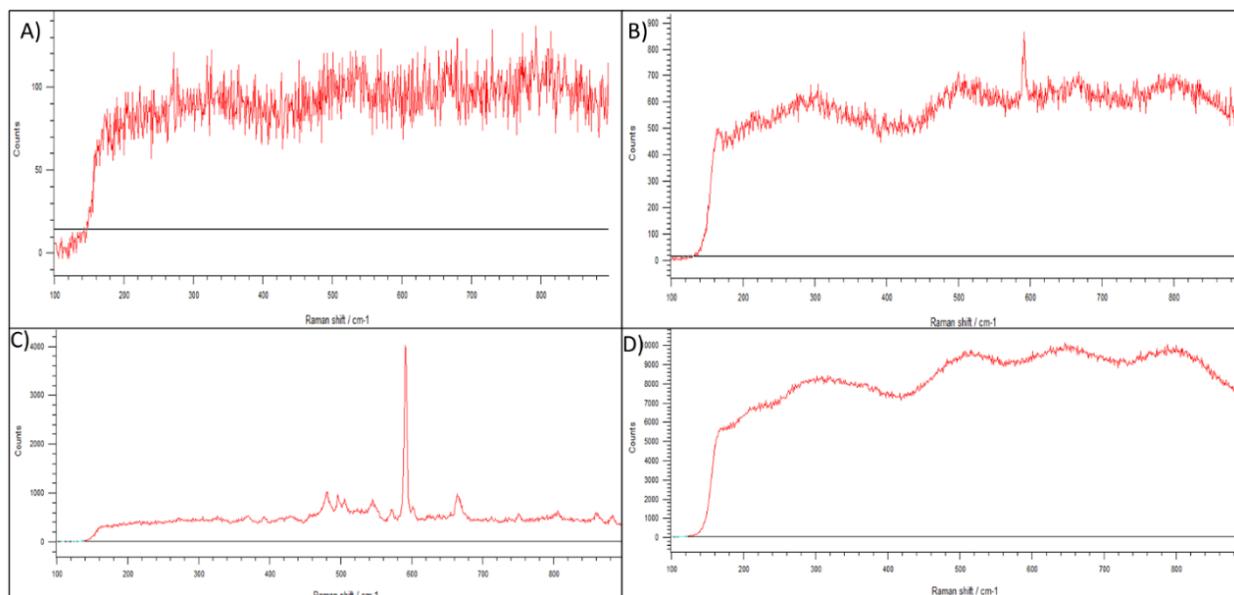
Outra técnica usada na caracterização das AuNP e sua modificação foi a espectroscopia por UV-vis. A figura 33, apresenta a comparação entre os espectros resultantes das etapas de enriquecimento da superfície das nanopartículas. Como pode-se observar, há um leve deslocamento do pico dos espectros para a direita,  $\sim 2$ nm, em relação ao espectro da AuNP. Esse movimento para a direita ocorre devido ao depósito de matéria, camadas de modificação, sobre a superfície das nanopartículas de ouro, devido ao aumento do tamanho relativo da nanopartícula.



**Figura 33:** Espectros das etapas de modificação das NP por UV-Vis. **Fonte:** Arquivo pessoal

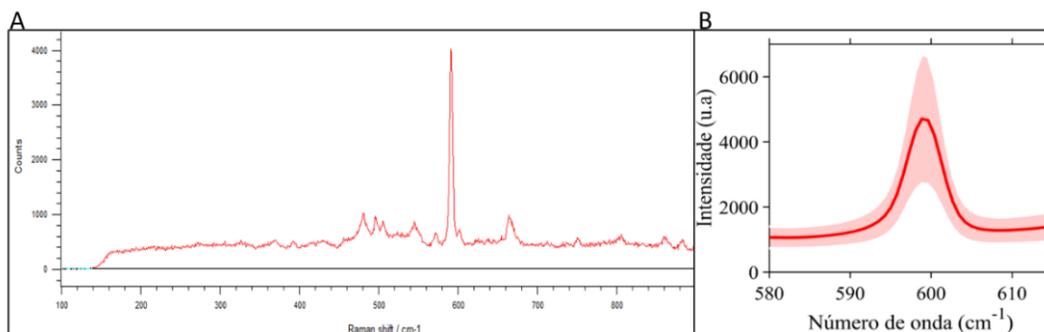
### 5.3 Imunoensaio – medidas SERS

Após todo o processo de construção dos sistemas de imunoensaios foram realizadas as medidas SERS das quais retirou-se os espectros primários. A figura 34 apresenta os tipos de espectros obtidos durante as análises. Essa variedade de espectros se deve a: deposição irregular da matéria sendo que alguns pontos não houve deposição de todas as camadas (figura 34 A); interação fraca entre os anticorpos adsorvidos nas NP com os seus alvos, provavelmente, devido ao posicionamento dimensional dessas moléculas ou deposição irregular de NBA na superfície das NP (figura 34 B); espectros com bandas bem características (figura 34 C) e intenso sinal do autofluorescência das moléculas biológicas, possivelmente encobrindo o sinal das NP (figura 34D).

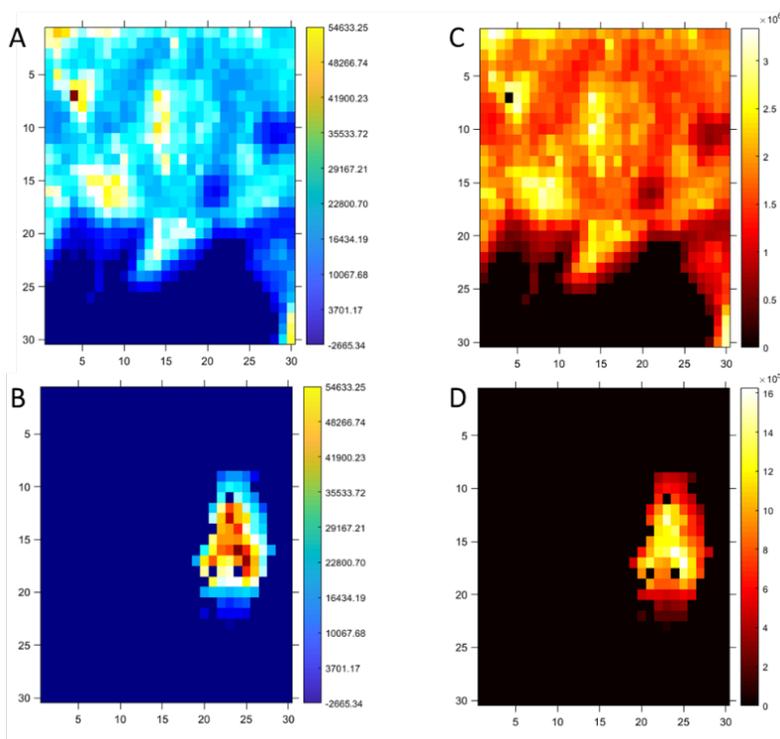


**Figura 34:** Possíveis espectros obtidos. **Legenda:** **A)** Espectro de regiões da lâmina nos quais não houve deposição de matéria; **B)** Espectro com pico na região do NBA de baixa intensidade; **C)** Espectro característico de NBA; **D)** Espectro com alto grau de autofluorescência, típico de região modificada porém, na qual, não houve interação da nanopartícula ou houve porém com baixo grau de intensidade, nesse caso a intensidade da autofluorescência “oculta” o pico de interesse. **Fonte:** Arquivo pessoal

Devido a variedade de espectros obtidos, fez-se necessário o desenvolvimento de um código que fosse capaz de realizar uma filtragem dos dados para uma análise mais fidedigna. O código elaborado foi hábil de fazer um pré-processamento, eliminando assim, a maior parte do ruído, autofluorescência e espectro que podiam ser analisados, através do estabelecimento de filtros, suavização, *baseline*, *threshold* e normalização. Após a “limpeza” dos dados a região do pico de interesse foi isolada, figura 35, e feita uma análise por PCA que estabeleceu as variáveis área, intensidade e concentração para então realizar a validação dos dados. A figura 36 apresenta 2 mapas representativos, antes da PCA (figura 36 A e B) e depois da PCA (figura 36 C e D) demonstrando como a análise permitiu uma validação dos reais valores de SERS.



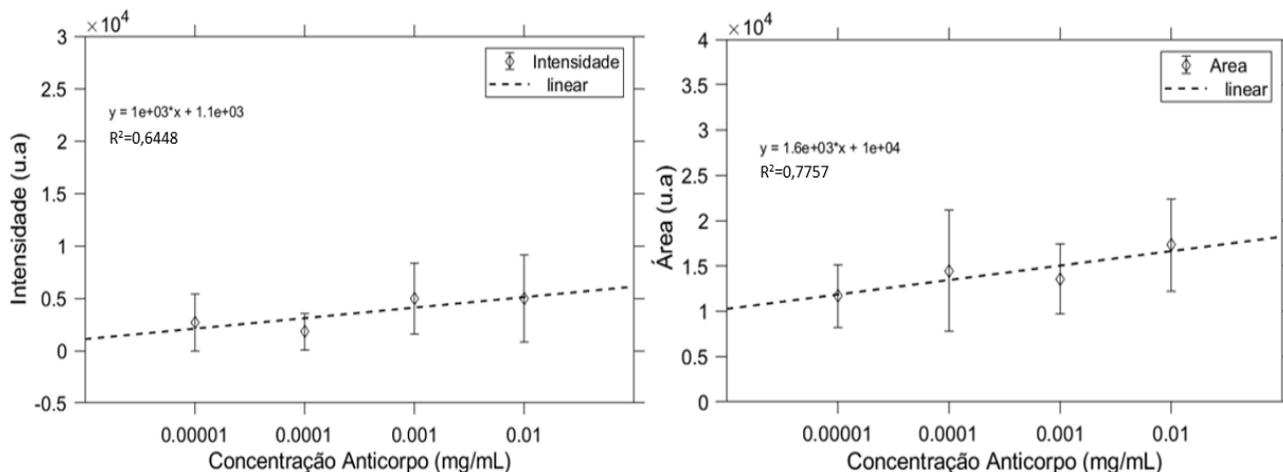
**Figura 35:** Isolamento do pico de interesse, NBA (592nm). **Legenda:** **A)** Espectro sem sofrer tratamento de dados; **B)** Espectro com a região de interesse isolada e apresentando o desvio padrão (sombra). **Fonte:** Arquivo pessoal



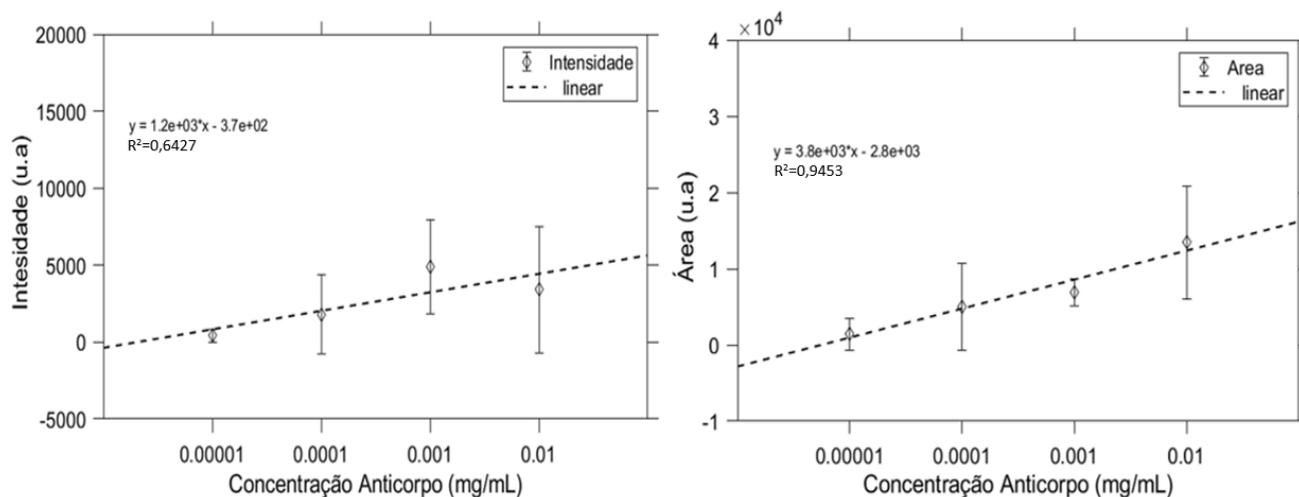
**Figura 36:** Mapas representativos da técnica de PCA, proteína FRMD8. **Legenda:** **A)** Mapa antes do PCA, anticorpo com concentração de 1/10 (0,01mg/mL); **B)** Mapa antes do PCA, anticorpo com concentração de 1/1000 (0,0001mg/mL); **C)** Mapa A depois do PCA, anticorpo com concentração de 1/10 (0,01mg/mL); **D)** Mapa B depois do PCA, anticorpo com concentração de 1/1000 (0,0001mg/mL). **Fonte:** Arquivo pessoal

Após todo o processo de tratamento dos dados foi possível estabelecer uma curva padrão baseado tanto na intensidade quando na área para cada uma das proteínas estudadas. Para a proteína FRMD8 (figura 37), o limite de detecção abaixo da diluição 1:10000 que representa uma concentração de 1ng/mL. Já para a proteína ATP Sintase (figura 38) o limite de detecção foi de 1:1000 que representa uma concentração de 10ng/mL. Em ambos os casos, a diluição 1:10000 que corresponderia a 1picograma não foi plotada, pois a sua quantificação foi praticamente zero. Sendo

assim, caracterizado o limite de detecção. Pela análise da intensidade os desvios padrões se apresentaram mais regulares e houve uma melhor quantidade de resíduos, sendo assim, esse parâmetro foi selecionado para gerar as figuras 39,40,41 e 42.



**Figura 37:** Curva de Calibração para a proteína FRMD8. **Legenda:** A esquerda a curva de calibração baseada na intensidade dos picos e a direita a curva de calibração baseada nas áreas sob os picos. **Fonte:** Arquivo pessoal

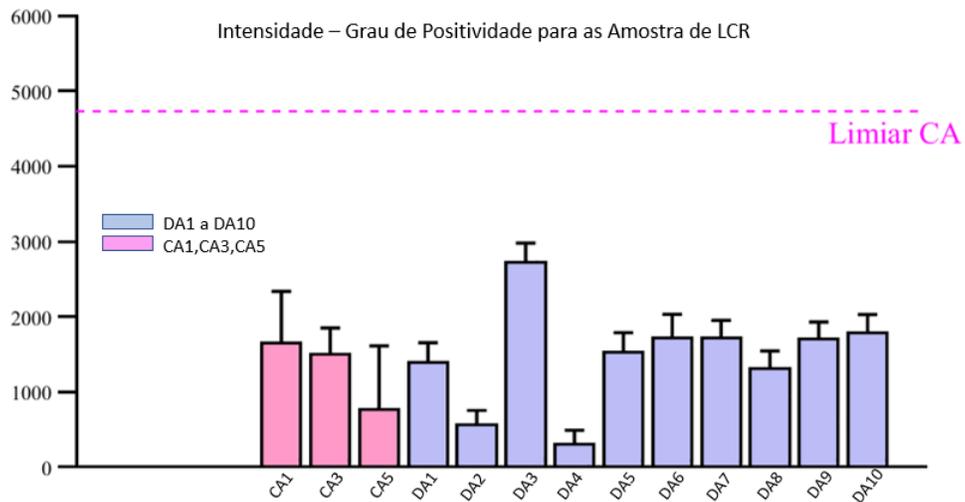


**Figura 38:** Curva de Calibração para a proteína ATP Sintase. **Legenda:** A esquerda a curva de calibração baseada na intensidade dos picos e a direita a curva de calibração baseada nas áreas sob os picos. **Fonte:** Arquivo pessoal

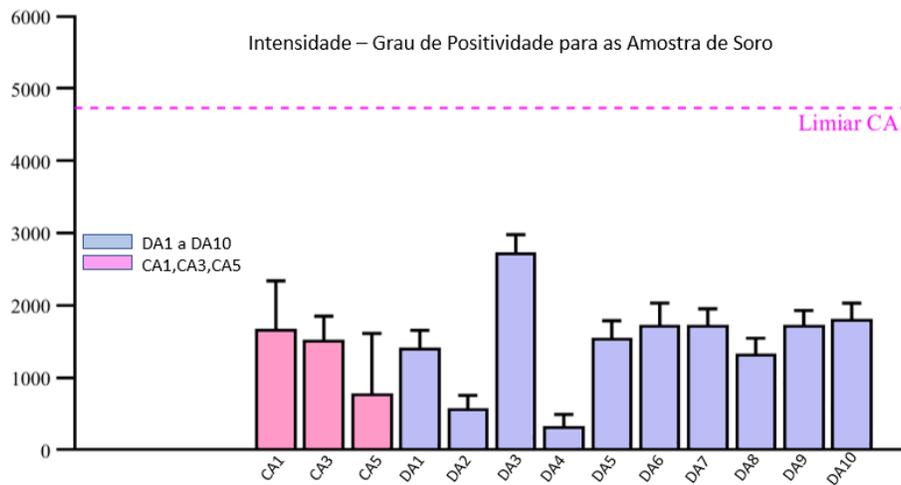
### 5.4 Imunoensaio com amostras reais – Biossensor

O biossensor para o peptídeo FRMD8, apesar de apresentar curvas de calibração com bom desempenho e melhores resultados que o peptídeo ATP Sintase, não obteve bom rendimento na

sua validação com as amostras reais. Como pode-se observar nas figuras 39 e 40, as medias das intensidades, tanto para as amostras de LCR quanto para Soro, respectivamente, estão abaixo do limiar de positividade o que sugere que as amostras são negativas. Como há relatos na literatura da presença de autoanticorpos contra FRMD8 em pacientes com Alzheimer(35,112), porém são poucos os estudos, pode-se considerar esse biomarcador como inconsistente para avaliar essa doença.

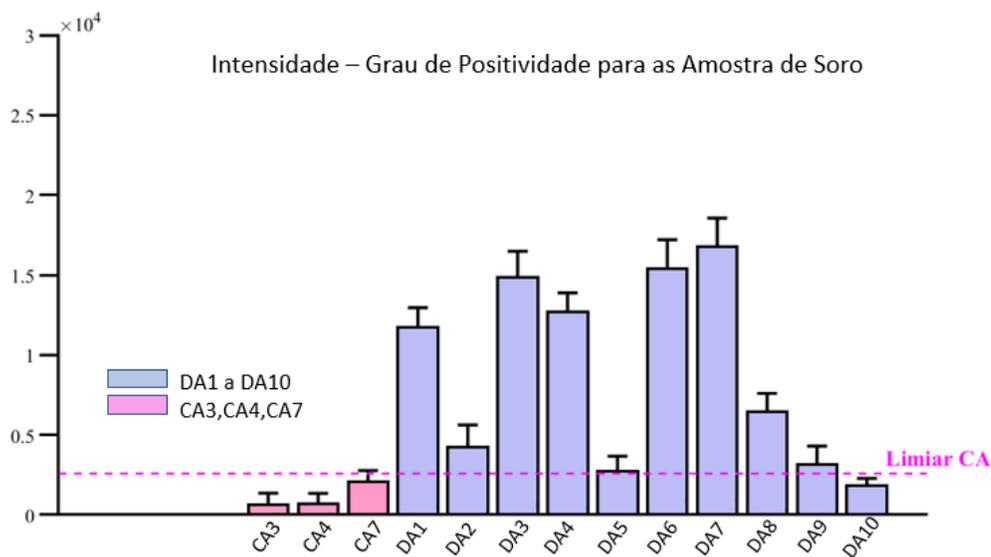


**Figura 39:** Validação do biossensor para o autoanticorpo Anti-FRMD8. **Legenda:** Gráfico da Positividade das amostras de LCR baseado na intensidade dos picos. **Fonte:** Arquivo pessoal

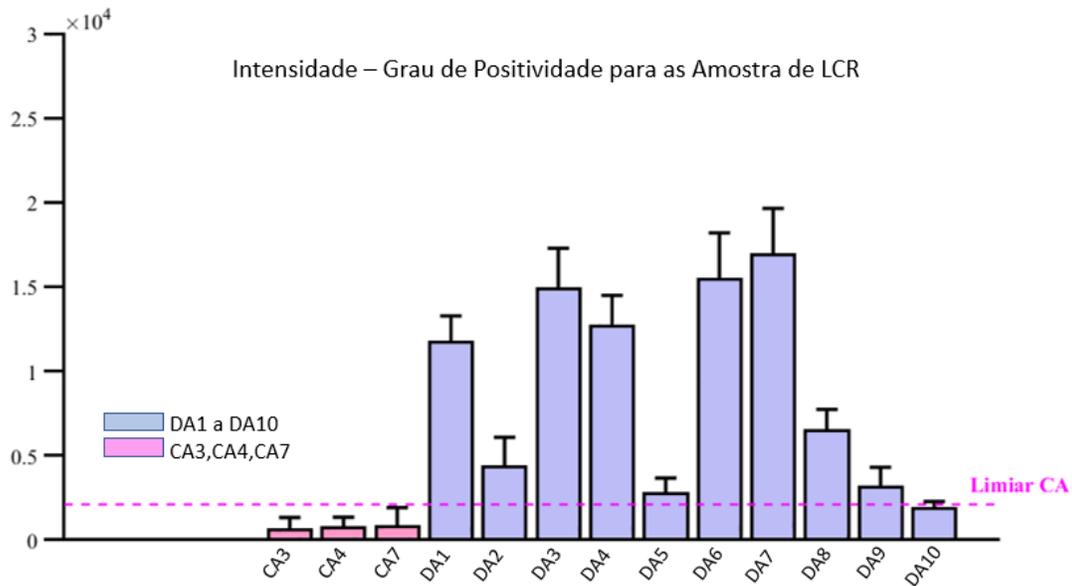


**Figura 40:** Validação do biossensor para o autoanticorpo Anti-FRMD8. **Legenda:** Gráfico da Positividade das amostras de Soro baseado na intensidade dos picos. **Fonte:** Arquivo pessoal

Apesar dos resultados não promissores para o biossensor baseado em FRMD8, o desfecho para o biossensor baseado no peptídeo ATP Sintase foi muito próspero e congruente. Com o estabelecimento das curvas de calibração para o peptídeo ATP-Sintase Subunidade beta, foi possível realizar a validação do biossensor com as amostras dos pacientes através da semi-quantificação e avaliação de positividade das amostras de soro e LCR para DA e CA. A figura 41 e 42 apresentam as intensidades dos graus de positividade das amostras em relação aos controles para as amostras de Soro e LCR, respectivamente. O Controle Experimental, utilizando o anticorpo Anti HIV p17 e parte do controle Alzheimer (sem autoanticorpos para as proteínas pesquisadas nesse trabalho), não puderam ser plotados pois, obtiveram o valor médio de zero, ou seja, não apresentaram nenhum espectro com pico dentre os 8100 espectros. Nesse caso, só foram plotados os controles que apresentaram sinal. Pode-se notar que em ambos os casos foi possível avaliar a positividade ou negatividade das amostras. Um fator interessante foi que tanto as amostras de soro quanto as de LCR o comportamento foi muito similar.

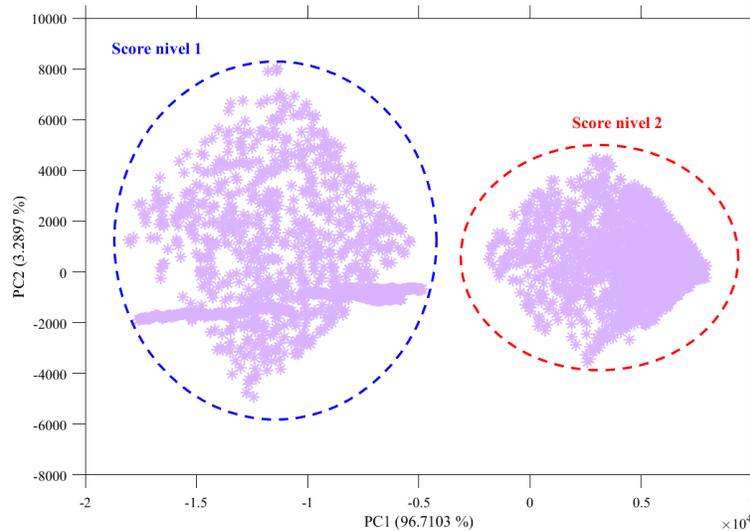


**Figura 41:** Validação do biossensor para o autoanticorpo Anti-ATP Sintase subunidade Beta. **Legenda:** Gráfico da Positividade das amostras de Soro baseado na intensidade dos picos. **Fonte:** Arquivo pessoal



**Figura 42:** Validação do biossensor para o autoanticorpo Anti-ATP Sintase subunidade Beta. **Legenda:** Gráfico da Positividade das amostras de Soro baseado na intensidade dos picos. **Fonte:** Arquivo pessoal.

O biossensor para DA baseado na pesquisa do autoanticorpo Anti-ATP Sintase Subunidade Beta apresentou resultados muito interessantes. Através da análise de PCA (figura 43), foi possível visualizar a formação bem definida de dois grupos com alto grau de homogeneidade e congruência entre eles. A PCA apresentou uma correlação PC1 (96,7%) / PC2 (3,2%) com alto valor de confiabilidade, uma vez que, quando uma alta variância está presente na primeira componente principal significa que a variância global dos dados não se dispersou nas outras componentes. Isto é a variância possui um comportamento bem definido o que colabora para a proposta atual de classificação.



**Figura 43:** Análise de PCA para o biossensor Anti-ATP Sintase subunidade Beta. **Legenda:** Através da técnica de PCA foi possível estabelecer dois grupos de DA. **Fonte:** Arquivo pessoal.

Esse fenômeno possibilitou o estabelecimento de uma correlação entre os Scores obtidos pelo MEEM e os Scores obtidos pela técnica de SERS como apresentado na tabela 7.

**Tabela 7:** Correlação entre os Scores do MEEM e os Scores de SERS. (Saudável:25-30, Leve: 24-20, Moderado: 10-20, Grave:<9(171–173))

Paciente	Score MEEM	Classificação MEEM	Score SERS
CA1	30	Saudável	----
CA2	30	Saudável	----
CA3	30	Saudável	----
CA4	28	Saudável	----
CA5	30	Saudável	----
CA6	28	Saudável	----
CA7	25	Saudável	----
CA8	30	Saudável	----
CA9	29	Saudável	----
CA10	30	Saudável	----
DA1	11	Moderado	Nível 1
DA2	19	Moderado	Nível 2
DA3	13	Moderado	Nível 1
DA4	16	Moderado	Nível 1
DA5	17	Moderado	Nível 2
DA6	10	Moderado	Nível 1
DA7	0 (não foi possível realizar o exame)	Grave	Nível 1
DA8	17	Moderado	Nível 2
DA9	20	Leve	Nível 2
DA10	24	Leve	Nível 2

**Fonte:** Arquivo Pessoal

Fazendo uma correlação entre os gráficos de Grau de Positividade e a Correlação dos Scores é possível se inferir que: o Score nível 1 de SERS está relacionado com os casos mais graves ou no limiar entre grave e moderado, o Score nível 2 está associado com os casos considerados leves ou no limiar entre leve e moderado.

## 6 CONCLUSÃO

Com a ajuda da equipe médica do Departamento de Neurologia quanto a equipe de enfermagem do HC de Botucatu, foi criado um pequeno banco de amostras de LCR e Soro tanto de pacientes portadores de Alzheimer como de pacientes com perfil similar, porém não portadores de Alzheimer. Para tal, foi respeitado o código de Ética e os princípios da Declaração de Helsinki, ISO14155 e diretrizes para Boas Práticas Clínicas. Nenhum paciente, de ambos os grupos, foi sujeito aos exames e coleta de amostra se os mesmos não fossem clinicamente necessários.

O presente estudo também conseguiu desenvolver biossensores óticos baseados em imunoenaios e utilizando a técnica de SERS para mensurar os biomarcadores, autoanticorpos, anti-ATP Sintase Subunidade beta e anti-FRMD8 para o auxílio diagnóstico da doença de Alzheimer. O biossensor para detecção do biomarcador anti-FRMD8 foi capaz de detectar até uma concentração de 1ng/mL de anticorpo e o biossensor para anti-ATP Sintase Subunidade beta foi capaz de identificar uma concentração de 10ng/mL. No entanto, no teste de validação o biossensor para anti-FRMD8 se demonstrou ineficaz.

Por outro lado, o sensor para anti-ATP Sintase se demonstrou muito eficaz permitindo a separação das amostras DA das amostras CA, além de permitir a distinção de grupos de intensidades diferentes entre as amostras de DA. Essa cluterização das amostras permitiu uma correlação entre os níveis de autoanticorpos contra ATP Sintase Subunidade Beta e o teste de MEEM. Fazendo uma correlação entre os gráficos de Grau de Positividade e a Correlação dos Scores é possível se inferir que: o Score nível 1 de SERS está relacionado com os casos mais graves ou no limiar entre grave e moderado, o Score nível 2 está associado com os casos considerados leves ou no limiar entre leve e moderado.

Desta forma, um ponto extremamente importante a se destacar nesse trabalho é que não há biomarcador “perfeito” para a DA devido ao seu múltiplo interfaceamento, sendo, a melhor alternativa, uma análise de múltiplos marcadores.

## 7 REFERÊNCIAS

1. Tarawneh R, Holtzman DM. The clinical problem of symptomatic Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(5):1–16.
2. Deb A, Thornton JD, Sambamoorthi U, Innes K. Direct and Indirect Cost of Managing Alzheimer's Disease and Related Dementias in the United States. *Physiol Behav.* 2019;173(3)(1):665–76.
3. 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* 2021;17(3):327–406.
4. Braun A, Kurzmann P, Höfler M, Haber G, Auer S. Cost of care for persons with dementia: Using a discrete-time Markov chain approach with administrative and clinical data from the dementia service Centres in Austria. *Health Econ Rev.* 2020;10(1):1–9.
5. Leicht H, König HH. Krankheitskosten bei demenz aus gesellschaftlicher perspektive: Eine übersicht. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz.* 2012;55(5):677–84.
6. Schwarzkopf L, Menn P, Kunz S, Holle R, Lauterberg J, Marx P, et al. Costs of care for dementia patients in community setting: An analysis for mild and moderate disease stage. *Value Heal [Internet].* 2011;14(6):827–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jval.2011.04.005>
7. Kiencke P, Daniel D, Grimm C, Rychlik R. Direct costs of Alzheimer's disease in Germany. *Eur J Heal Econ.* 2011;12(6):533–9.
8. Schaller S, Mauskopf J, Kriza C, Wahlster P, Kolominsky-Rabas PL. The main cost drivers in dementia: A systematic review. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2015;30(2):111–29.
9. Lacey LA, Niecko T, Leibman C, Liu E, Grundman M. Association between illness progression measures and total cost in Alzheimer's disease. *J Nutr Heal Aging.* 2013;17(9):745–50.
10. Jones RW, Lebec J, Kahle-Wroblewski K, Dell'Agnello G, Bruno G, Vellas B, et al. Disease progression in mild dementia due to Alzheimer disease in an 18-month observational study (GERAS): The impact on costs and caregiver outcomes. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra.* 2017;7(1):87–100.
11. Wolstenholme J, Fenn P, Gray A, Keene J, Jacoby R, Hope T. Estimating the relationship between disease progression and cost of care in dementia. *Br J Psychiatry.* 2002;181(JULY):36–42.
12. Kurz X, Scuvee-Moreau J, Vernooij-Dassen M, Dresse A. Cognitive impairment, dementia and quality of life in patients and caregivers. *Acta Neurol Belg.* 2003;103(1):24–34.
13. Connolly S. Economics of dementia: A review of methods. *Dementia.* 2020;19(5):1426–40.
14. A public health priority.
15. Sloane PD, Zimmerman S, Suchindran C, Reed P, Wang L, Boustani M, et al. The public health impact of Alzheimer's disease, 2000-2050: Potential implication of treatment advances. *Annu Rev Public Health.* 2002;23:213–31.
16. International AD, University M. World Alzheimer Report 2021. 2021; Available from: <https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2021/>
17. Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's Dement [Internet].* 2013;9(1):63-75.e2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.007>
18. Nitrini R, Caramelli P, Bottino CM de C, Damasceno BP, Brucki SMD, Anghinah R. Diagnóstico De Doença De Alzheimer No Brasil. *Arq Neuropsiquiatr.* 2005;63:713–9.
19. Burlá C, Camarano AA, Kanso S, Fernandes D, Nunes R. Panorama prospectivo das demências no Brasil: Um enfoque demográfico. *Cienc e Saude Coletiva.* 2013;18(10):2949–56.
20. IBGE. Censo Nacional 2013 - Pesquisa Nacional de Saude [Internet]. Censo. Brasilia; 2019. Available from: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/saude/9160-pesquisa-nacional-de-saude.html?=&t=downloads 1/1>
21. Sociedade Brasileira de Geriatria e Gerontologia (SBGG). Em Dia Mundial do Alzheimer, dados ainda são subestimados, apesar de avanços no diagnóstico e tratamento da doença. *Entrevista [Internet].* 2019;(21):21–2. Available from: <https://sbgg.org.br/em-dia-mundial-do-alzheimer-dados-ainda-sao-subestimados-apesar-de-avancos-no-diagnostico-e-tratamento-da-doenca/>
22. Reitz C, Way R, Cb C. Epidemiology of Alzheimer disease. 2012;7(3):137–52.
23. Reitz C, Mayeux R. Alzheimer disease: Epidemiology, Diagnostic Criteria, Risk Factors and

- Biomarkers. *Biochem Pharmacol*. 2014;88(4):640–51.
24. Alzheimer's Association. 2014 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* [Internet]. 2014;10(2):e47–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2014.02.001>
  25. Alladi S, Hachinski V. *World dementia*. 2018;1–8.
  26. Coskun P, Wyrembak J, Schriener S, Chen H-W, Marciniack C, LaFerla F, et al. A Mitochondrial Etiology of Alzheimer and Parkinson Diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(5):553–64.
  27. Zetterberg H, Mattsson N. Understanding the cause of sporadic Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*. 2014;14(6):621–30.
  28. Imtiaz B, Tolppanen AM, Kivipelto M, Soininen H. Future directions in Alzheimer's disease from risk factors to prevention. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2014;88(4):661–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2014.01.003>
  29. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement*. 2011;7(3):280–92.
  30. Cohen RM. Epidemiology and Clinical Diagnosis: Alzheimer Disease. *Positron Emiss Tomogr* [Internet]. 2013;8(4):391–405. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cpet.2013.08.001>
  31. Findeis MA. The role of amyloid  $\beta$  peptide 42 in Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther*. 2007;116(2):266–86.
  32. Reitz C. Genetic diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease: Challenges and opportunities. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015;15(3):339–48.
  33. Flanagan EP, Drubach DA, Boeve BF. Autoimmune dementia and encephalopathy [Internet]. 1st ed. Vol. 133, *Autoimmune Neurology*. Elsevier B.V.; 2016. 247–267 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63432-0.00014-1>
  34. Borroni B, Manes MA, Alberici A, Cosseddu M, Bernasconi P, Archetti S, et al. Autoimmune Frontotemporal Dementia A New Nosological Entity ? 2017;00(00):1–4.
  35. Nagele E, Han M, Demarshall C, Belinka B, Nagele R. Diagnosis of Alzheimer's Disease Based on Disease-Specific Autoantibody Profiles in Human Sera. 2011;6(8):1–7.
  36. Giil LM, Kristoffersen EK, Vedeler CA, Aarsland D. Autoantibodies Toward the Angiotensin 2 Type 1 Receptor : A Novel Autoantibody in Alzheimer's Disease. 2015;47:523–9.
  37. Deming Y, Dumitrescu L, Barnes LL, Thambisetty M, Kunkle B. Sex-specific genetic predictors of Alzheimer's disease biomarkers. 2018;(0123456789).
  38. Zhang J, Liu Q. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell*. 2015;6(4):254–64.
  39. Catricala S, Torti M, Ricevuti G. Alzheimer disease and platelets: How's that relevant. *Immun Ageing* [Internet]. 2012;9(1):1. Available from: *Immunity & Ageing*
  40. Beck SJ, Guo L, Phensy A, Tian J, Wang L, Tandon N, et al. Deregulation of mitochondrial F1FO-ATP synthase via OSCP in Alzheimer's disease. *Nat Commun* [Internet]. 2016;7(May):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms11483>
  41. Singh SK, Srivastav S, Yadav AK, Srikrishna S, Perry G. Overview of Alzheimer's disease and some therapeutic approaches targeting A  $\beta$  by using several synthetic and herbal compounds. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016.
  42. Jouanne M, Rault S, Voisin-Chiret AS. Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2017;139:153–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.070>
  43. Working A, Enough O, Gives PT, Patients BC, Mysteriously P, Are H, et al. *TOXIC*. 2021;6–11.
  44. Jen F. *NMSK B Path* 23. 2021;1–8.
  45. Panza F, Lozupone M, Logroscino G, Imbimbo BP. A critical appraisal of amyloid- $\beta$ -targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2019;15(2):73–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41582-018-0116-6>
  46. Lu H, Zhu X-C, Jiang T, Yu J-T, Tan L. Body fluid biomarkers in Alzheimer's disease. *Ann Transl*

- Med [Internet]. 2015;3(5):70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25992369>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4402605>
47. Vacirca D, Barbati C, Scazzocchio B, Masella R, Rosano G, Malorni W, et al. Anti-ATP synthase autoantibodies from patients with Alzheimer's disease reduce extracellular HDL level. *J Alzheimer's Dis*. 2011;26(3):441–5.
  48. Califf RM. Biomarker definitions and their applications. *Exp Biol Med*. 2018;243(3):213–21.
  49. Shirwany NA, Payette D, Xie J, Guo Q. The amyloid beta ion channel hypothesis of Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2007;3(5):597–612.
  50. Burns A, Iliffe S. Alzheimer's disease [Internet]. Vol. 82, *BMJ (Clinical research ed.)*. 2015. 756–771 p. Available from: <http://www.bmj.com/content/338/bmj.b158.long>
  51. Wu J, Li L. Autoantibodies in Alzheimer's disease: potential biomarkers, pathogenic roles, and therapeutic implications. *J Biomed Res [Internet]*. 2016;30(January):361–72. Available from: [http://www.jbr-pub.org/ch/reader/view\\_abstract.aspx?file\\_no=jbr160503&flag=1](http://www.jbr-pub.org/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=jbr160503&flag=1)
  52. Dujmovic I. Cerebrospinal Fluid and Blood Biomarkers of Neuroaxonal Damage in Multiple Sclerosis. *Mult Scler Int*. 2011;2011:1–18.
  53. Vacirca D, Delunardo F, Matarrese P, Colasanti T, Margutti P, Siracusano A, et al. Autoantibodies to the adenosine triphosphate synthase play a pathogenetic role in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging [Internet]*. 2012;33(4):753–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.013>
  54. Alard JE, Hillion S, Guillevin L, Saroux A, Pers JO, Youinou P, et al. Autoantibodies to endothelial cell surface ATP synthase, the endogenous receptor for hsp60, might play a pathogenic role in vasculatides. *PLoS One*. 2011;6(2).
  55. Humpel C. Cerebrospinal fluid and blood biomarkers in Alzheimer's disease. *World J Psychiatry [Internet]*. 2011;1(1):8. Available from: <http://www.wjgnet.com/2220-3206/full/v1/i1/8.htm>
  56. Talib LL. Platelet biomarkers in Alzheimer's disease. *World J Psychiatry [Internet]*. 2012;2(6):95. Available from: <http://www.wjgnet.com/2220-3206/full/v2/i6/95.htm>
  57. Aluise CD, Sowell RA, Butterfield DA. Peptides and proteins in plasma and cerebrospinal fluid as biomarkers for the prediction, diagnosis, and monitoring of therapeutic efficacy of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2008;1782(10):549–58.
  58. Biagioni MC, Galvin JE. Using biomarkers to improve detection of Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis Manag*. 2011;1(2):127–39.
  59. Kaj Blennowa,\*, Bruno Duboisb, Anne M. Faganc, Piotr Lewczukd, Mony J. de Leone, f, And Hampel H. Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer's disease. *Kaj. HHS Public Access*. 2015;11(1):58–69.
  60. Dekker AD, Fortea J, Blesa R, De Deyn PP. Cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease in Down syndrome. *Alzheimer's Dement Diagnosis, Assess Dis Monit [Internet]*. 2017;8:1–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dadm.2017.02.006>
  61. Engelhardt E. Aspectos da fisiopatologia da doença de Alzheimer esporádica Pathophysiological features of sporadic Alzheimer's disease. *Rev Bras Neurol [Internet]*. 2012;48(4):21–9. Available from: <http://files.bvs.br/upload/S/0101-8469/2012/v48n4/a3349.pdf>
  62. Zhang Y, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain [Internet]*. 2011;4(1):3. Available from: <http://molecularbrain.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-6606-4-3>
  63. Wu G, Sankaranarayanan S, Wong J, Tugusheva K, Michener MS, Shi X, et al. Characterization of plasma  $\beta$ -secretase (BACE1) activity and soluble amyloid precursor proteins as potential biomarkers for Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 2012;90(12):2247–58.
  64. Murphy MP, Levine H. Alzheimer's disease and the amyloid- $\beta$  peptide. *J Alzheimer's Dis*. 2010;19(1):311–23.
  65. Counts SE, Ikonovic MD, Mercado N, Vega IE, Mufson EJ. Biomarkers for the Early Detection and Progression of Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics [Internet]*. 2017;14(1):35–53. Available

- from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13311-016-0481-z>
66. Humpel C. Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2011;29(1):26–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.09.007>
  67. Lutz HU. Naturally occurring antibodies. Vol. 750, *Advances in experimental medicine and biology*. 2012.
  68. de Paula V de JR, Guimarães FM, Diniz BS, Forlenza OV. Neurobiological pathways to Alzheimer's disease: Amyloid-beta, TAU protein or both? *Dement e Neuropsychol*. 2009;3(3):188–94.
  69. Tapiola T, Alafuzoff I, Herukka S-K, Parkkinen L, Hartikainen P, Soininen H, et al. Cerebrospinal fluid {beta}-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Arch Neurol*. 2009;66(3):382–9.
  70. Avrameas S, Selmi C. Natural autoantibodies in the physiology and pathophysiology of the immune system. *J Autoimmun* [Internet]. 2013;41:46–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2013.01.006>
  71. Lim EW, Aarsland D, Ffytche D, Taddei RN, van Wamelen DJ, Wan YM, et al. Amyloid- $\beta$  and Parkinson's disease. *J Neurol* [Internet]. 2019;266(11):2605–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00415-018-9100-8>
  72. Irwin DJ, Lee VM, Trojanowski JQ. Amyloid beta-peptide and the dementia of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(9):626–636.
  73. Lauwers E, Lalli G, Brandner S, Collinge J, Compennolle V, Duyckaerts C, et al. Potential human transmission of amyloid  $\beta$  pathology: surveillance and risks. *Lancet Neurol*. 2020;19(10):872–8.
  74. Jaunmuktane Z, Mead S, Ellis M, Wadsworth JDF, Nicoll AJ, Kenny J, et al. Evidence for human transmission of amyloid- $\beta$  pathology and cerebral amyloid angiopathy. *Nature*. 2015;525(7568):247–50.
  75. Buongiorno M, Compta Y, Martí MJ. Amyloid- $\beta$  and  $\tau$  biomarkers in Parkinson's disease-dementia. *J Neurol Sci* [Internet]. 2011;310(1–2):25–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2011.06.046>
  76. Hithersay R, Hamburg S, Knight B, Strydom A. Cognitive decline and dementia in Down syndrome. *Curr Opin Psychiatry*. 2017;30(2):102–7.
  77. Hartley D, Blumenthal T, Carrillo M, DiPaolo G, Esralew L, Gardiner K, et al. Down syndrome and Alzheimer's disease: Common pathways, common goals HHS Public Access Author manuscript. *Alzheimers Dement* [Internet]. 2015;11(6):700–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4817997/pdf/nihms-768591.pdf>
  78. Gomez W, Morales R, Maracaja-Coutinho V, Parra V, Nassif M. Down syndrome and alzheimer's disease: Common molecular traits beyond the amyloid precursor protein. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(1):1011–33.
  79. Damoiseaux J, Andrade LE, Fritzier MJ, Shoenfeld Y. Autoimmunity Reviews Autoantibodies 2015 : From diagnostic biomarkers toward prediction , prognosis and prevention. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2015;14(6):555–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2015.01.017>
  80. Lopez OL, Rabin BS, Huff FJ, Rezek D, Reinmuth OM. Serum autoantibodies in patients with alzheimer's disease and vascular dementia and in nondemented control subjects. *Stroke*. 1992;23(8):1078–83.
  81. Maetzler W, Apel A, Langkamp M, Deuschle C, Dilger SS, Stirnkorb JG, et al. Comparable autoantibody serum levels against amyloid- and inflammation-associated proteins in Parkinson's disease patients and controls. *PLoS One*. 2014;9(2):1–6.
  82. DeMarshall C, Sarkar A, Nagele EP, Goldwasser E, Godsey G, Acharya NK, et al. Utility of Autoantibodies as Biomarkers for Diagnosis and Staging of Neurodegenerative Diseases [Internet]. 1st ed. Vol. 122, *International Review of Neurobiology*. Elsevier Inc.; 2015. 1–51 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.irn.2015.05.005>
  83. Gronwall C, Clancy RM, Getu L, Lloyd KA, Siegel DL, Reed JH, et al. Modulation of natural IgM autoantibodies to oxidative stress-related neo-epitopes on apoptotic cells in newborns of mothers

- with anti-Ro autoimmunity. *Physiol Behav.* 2017;176(3):139–48.
84. Lacroix-Desmazes S, Mouthon L, Kaveri S V., Kazatchkine MD, Weksler ME. Stability of natural self-reactive antibody repertoires during aging. *J Clin Immunol.* 1999;19(1):26–34.
  85. Mirilas P, Fesel C, Guilbert B, Beratis NG, Avrameas S. Natural antibodies in childhood: Development, individual stability, and injury effect indicate a contribution to immune memory. *J Clin Immunol.* 1999;19(2):109–15.
  86. Colasanti T, Barbati C, Rosano G, Malorni W, Ortona E. Autoantibodies in patients with Alzheimer's disease: Pathogenetic role and potential use as biomarkers of disease progression. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2010;9(12):807–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2010.07.008>
  87. Burns A, Iliffe S. Alzheimer's disease. *BMJ.* 2009;338(7692):467–71.
  88. Cai H, Cong W, Ji S, Rothman S, Maudsley S, Martin B. Metabolic Dysfunction in Alzheimers Disease and Related Neurodegenerative Disorders. *Curr Alzheimer Res* [Internet]. 2012;9(1):5–17. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1567-2050&volume=9&issue=1&spage=5>
  89. Taurino F, Gnoni A. Systematic review of plasma-membrane ecto-ATP synthase: A new player in health and disease. *Exp Mol Pathol* [Internet]. 2018;104(1):59–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.12.006>
  90. Veitinger M, Varga B, Guterres SB, Zellner M. Platelets , a reliable source for peripheral Alzheimer ' s disease biomarkers ? 2014;1–15.
  91. Gerle C. On the structural possibility of pore-forming mitochondrial FoF1 ATP synthase. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* [Internet]. 2016;1857(8):1191–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.03.008>
  92. Nirody JA, Budin I, Rangamani P. ATP synthase: Evolution, energetics, and membrane interactions. *J Gen Physiol.* 2020;152(11):1–18.
  93. Guan SS, Sheu ML, Wu CT, Chiang CK, Liu SH. ATP synthase subunit- $\beta$  down-regulation aggravates diabetic nephropathy. *Sci Rep* [Internet]. 2015;5:1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep14561>
  94. Cadonic C, Sabbir MG, Albensi BC. Mechanisms of Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer ' s Disease. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2016;(November 2015):6078–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-015-9515-5>
  95. Cha M, Cho HJ, Kim C, Jung YO, Kang MJ, Murray ME, et al. Mitochondrial ATP synthase activity is impaired by suppressed O -GlcNAcylation in Alzheimer ' s disease. 2015;24(22):6492–504.
  96. Adav SS, Park JE, Sze SK. Quantitative profiling brain proteomes revealed mitochondrial dysfunction in Alzheimer ' s disease. 2019;1–12.
  97. Yu H, Lin X, Wang D, Zhang Z, Guo Y, Ren X. Mitochondrial Molecular Abnormalities Revealed by Proteomic Analysis of Hippocampal Organelles of Mice Triple Transgenic for Alzheimer Disease. 2018;11(March):1–13.
  98. Lopez OL, Rabin BS, Huff FJ, Rezek D, Reinmuth OM, KÖHLER G, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases from cells. *Nature* [Internet]. 2017;1(2):127–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2014.02.001>
  99. Moss ML, Jin SLC, Milla ME, Bickett DM, Burkhart W, Carter HL, et al. Erratum: Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- $\alpha$  (*Nature* (1997) 385 (733-736)). *Nature.* 1997;386(6626):738.
  100. Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med.* 2009;29(5):258–89.
  101. Wang YQ, Qu DH, Wang K. Therapeutic approaches to Alzheimer's disease through stimulating of non-amyloidogenic processing of amyloid precursor protein. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20(11):2389–403.
  102. Bernstein HG, Stricker R, Lendeckel U, Bertram I, Dobrowolny H, Steiner J, et al. Reduced neuronal co-localisation of nardilysin and the putative  $\alpha$ -secretases ADAM10 and ADAM17 in Alzheimer's

- disease and Down syndrome brains. *Age (Omaha)*. 2009;31(1):11–25.
103. Hsia HE, Tüshaus J, Brummer T, Zheng Y, Scilabra SD, Lichtenthaler SF. Functions of ‘A disintegrin and metalloproteases (ADAMs)’ in the mammalian nervous system. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2019;76(16):3055–81. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03173-7>
  104. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases from cells. *Nature*. 1997;385(February):729–33.
  105. Sahin U, Weskamp G, Kelly K, Zhou HM, Higashiyama S, Peschon J, et al. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol*. 2004;164(5):769–79.
  106. Sahin U, Blobel CP. Ectodomain shedding of the EGF-receptor ligand epigen is mediated by ADAM17. *FEBS Lett*. 2007;581(1):41–4.
  107. Grieve AG, Xu H, Künzel U, Bambrough P, Sieber B, Freeman M. Phosphorylation of iRhom2 at the plasma membrane controls mammalian TACE-dependent inflammatory and growth factor signalling. *Elife*. 2017;6:1–22.
  108. Künzel U, Grieve AG, Meng Y, Sieber B, Cowley SA, Freeman M. FRMD8 promotes inflammatory and growth factor signalling by stabilising the iRhom/ADAM17 sheddase complex. *Elife*. 2018;7:1–33.
  109. Dombernowsky SL, Samsøe-petersen J, Petersen CH, Instrell R, Hedegaard AB, Thomas L, et al. HHS Public Access. 2015;44(0):1–31.
  110. Qian M, Shen X, Wang H. The Distinct Role of ADAM17 in APP Proteolysis and Microglial Activation Related to Alzheimer’s Disease. *Cell Mol Neurobiol*. 2016;36(4):471–82.
  111. Hartl D, May P, Gu W, Mayhaus M, Pichler S, Spaniol C, et al. A rare loss-of-function variant of ADAM17 is associated with late-onset familial Alzheimer disease. *Mol Psychiatry*. 2020;25(3):629–39.
  112. San Segundo-Acosta P, Montero-Calle A, Fuentes M, Rábano A, Villalba M, Barderas R. Identification of Alzheimer’s Disease Autoantibodies and Their Target Biomarkers by Phage Microarrays. *J Proteome Res*. 2019;18(7):2940–53.
  113. Syedmoradi L, Daneshpour M, Alvandipour M, Gomez FA, Hajghassem H, Omidfar K. Point of care testing: The impact of nanotechnology. *Biosens Bioelectron*. 2017;87:373–87.
  114. Turner APF. Biosensors: Fundamentals and applications - Historic book now open access. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2015;65:A1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.10.027>
  115. BUERK D. Biosensors - Theory and Applications. *Acta Biotechnol*. 14, editor. Lancaster, Pennsylvania, U. S.A: Technomic Publishing Company; 1994. 219 p.
  116. Garzón V, Pinacho DG, Bustos RH, Garzón G, Bustamante S. Optical biosensors for therapeutic drug monitoring. *Biosensors*. 2019;9(4):1–26.
  117. Mukaetova-ladinska EB, Garyfallou G, Ketebu O, Sahin S. Electrochemical Detection of Plasma Immunoglobulin as a Biomarker for Alzheimer ’ s Disease. :1–13.
  118. Azimzadeh M, Nasirizadeh N, Rahaie M, Naderi-Manesh H. Early detection of Alzheimer’s disease using a biosensor based on electrochemically-reduced graphene oxide and gold nanowires for the quantification of serum microRNA-137. *RSC Adv* [Internet]. 2017;7(88):55709–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C7RA09767K>
  119. Islam K. Development of a Label-Free Immunosensor for Clusterin Detection as an Alzheimer ’ s Biomarker. 2018;1–12.
  120. Brazaca LC, Sampaio I, Zucolotto V, Janegitz BC. Applications of biosensors in Alzheimer’s disease diagnosis. *Talanta* [Internet]. 2020;210(December 2019):120644. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120644>
  121. Negahdary M, Heli H. An electrochemical peptide-based biosensor for the Alzheimer biomarker amyloid- $\beta$ (1–42) using a microporous gold nanostructure. *Microchim Acta*. 2019;186(12):1–8.
  122. Kim H, Lee JU, Kim S, Song S, Sim SJ. A Nanoplasmonic Biosensor for Ultrasensitive Detection of Alzheimer’s Disease Biomarker Using a Chaotropic Agent. *ACS Sensors*. 2019;4(3):595–602.
  123. Carlomagno C, Cabinio M, Picciolini S, Gualerzi A, Baglio F, Bedoni M. SERS-based biosensor

- for Alzheimer disease evaluation through the fast analysis of human serum. *J Biophotonics*. 2020;13(3):1–11.
124. Gold CT, Biosensor F, Dai Y. In Vitro Quantified Determination of  $\beta$ -Amyloid 42 Peptides, a Biomarker of Neuro-Degenerative Disorders, in PBS and Human Serum Using a Simple, . 2017;1–11.
  125. François M, Bull C, Fenech M, Leifert W. Current State of Saliva Biomarkers for Aging and Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res*. 2019;16(1):56–66.
  126. Islam K, Jang Y, Chand R, Jha SK, Lee HH, Kim Y. Microfluidic Biosensor for  $\beta$ -Amyloid (1-42) Detection Using Cyclic Voltammetry. 2011;11(7):5657–62.
  127. Guan SS, Sheu ML, Wu CT, Chiang CK, Liu SH. ATP synthase subunit- $\beta$  down-regulation aggravates diabetic nephropathy. *Sci Rep [Internet]*. 2015;5:1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep14561>
  128. Demarshall CA, Nagele EP, Sarkar A, Acharya NK. Detection of Alzheimer's disease at mild cognitive impairment and disease progression using autoantibodies as blood-based biomarkers. *Alzheimer's Dement Diagnosis, Assess Dis Monit [Internet]*. 2016;3:51–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dadm.2016.03.002>
  129. Laske C, Leyhe T, Stransky E, Hoffmann N, Fallgatter AJ, Dietzsch J. Identification of a blood-based biomarker panel for classification of Alzheimer's disease. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011;14(9):1147–55.
  130. Van Nest SJ, Nicholson LM, Devorkin L, Brolo AG, Lum JJ, Jirasek A. Raman Spectroscopic Signatures Reveal Distinct Biochemical and Temporal Changes in Irradiated Human Breast Adenocarcinoma Xenografts. *Radiat Res*. 2018;189(5):497–504.
  131. Camacho SA, Sobral-Filho RG, Aoki PHB, Constantino CJL, Brolo AG. Zika Immunoassay Based on Surface-Enhanced Raman Scattering Nanoprobes. *ACS Sensors*. 2018;3(3):587–94.
  132. Sobral-Filho RG, DeVorkin L, Macpherson S, Jirasek A, Lum JJ, Brolo AG. Ex Vivo Detection of Circulating Tumor Cells from Whole Blood by Direct Nanoparticle Visualization. *ACS Nano*. 2018;12(2):1902–9.
  133. Camacho SA, Sobral-Filho RG, Aoki PHB, Constantino CJL, Brolo AG. Immunoassay quantification using surface-enhanced fluorescence (SEF) tags. *Analyst*. 2017;142(15):2717–24.
  134. Rodrigues ADG, Galzerani JC. Espectroscopia de IV, UV e Raman. *Rev Bras Ensino Física*. 2012;34(4):4309.
  135. Sala O. Vibrações em cristais. *Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho*. 2008. p. 237–41.
  136. De Oliveira TR, Erbereli CR, Manzine PR, Magalhães TNC, Balthazar MLF, Cominetti MR, et al. Early Diagnosis of Alzheimer's Disease in Blood Using a Disposable Electrochemical Microfluidic Platform. *ACS Sensors*. 2020;5(4):1010–9.
  137. Corio P, Rubim JC. A contribuição do mecanismo de transferência de carga para o efeito SERS em interfaces eletroquímicas. 1998;
  138. Ribeiro Claro P. Espectroscopia Vibracional. *Rev Ciência Elem*. 2018;6(2):1–5.
  139. Escolar P, Kids E. Energia térmica. 2021;1–14.
  140. Instrumental M. 20. Medida Instrumental de Oxigênio Dissolvido (OD). 2021;1–28.
  141. Ferraro JR, Nakamoto K, Brown CW. *Introductory Raman Spectroscopy: Second Edition*. Introductory Raman Spectroscopy: Second Edition. 2003. 1–434 p.
  142. Granite. What is Raman Spectroscopy? | Raman Spectroscopy Principle. Edinburgh Instruments [Internet]. 2020;1–5. Available from: <https://www.edinst.com/blog/what-is-raman-spectroscopy/%0Ahttp://files/1445/what-is-raman-spectroscopy.html>
  143. Moxfyre. Raman energy levels [Internet]. Wikipedia. 2009. Available from: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=7845122>
  144. Fleischmann M, Hendra PJ, McQuillan AJ. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem Phys Lett*. 1974;26(2):163–6.
  145. Jeanmaire DL, Dwyne R. Surface raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic,

- aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *J Electroanal Chem Interfacial Electrochem* [Internet]. 1977;84(1):1–20. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(77\)80224-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(77)80224-6)
146. Zong C, Xu M, Xu L, Wei T, Ma X, Zheng X, et al. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Bioanalysis : Reliability and Challenges. *Chem Rev.* 2018;118(10):4946–80.
  147. Jenkins CA, Lewis PD, Dunstan PR, Harris DA, Jenkins CA, Lewis PD, et al. Role of Raman spectroscopy and surface enhanced Raman spectroscopy in colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 2016;8(5):427–38.
  148. Akçan R, Yildirim MŞ, İlhan H, Güven B, Tamer U, Sağlam N. Surface enhanced Raman spectroscopy as a novel tool for rapid quantification of heroin and metabolites in saliva. *Turk J Med Sci.* 2020;50(5):1470–9.
  149. Kitahama Y, Ozaki Y. Surface-enhanced resonance Raman scattering of hemoproteins and those in complicated biological. *Analyst.* 2016;141(17):8–16.
  150. Auner GW, Koya SK, Huang C, Broadbent B, Trexler M, Auner Z, et al. Applications of Raman spectroscopy in cancer diagnosis. *Cancer Metastasis Rev.* 2018;37(4):691–717.
  151. Siew J, Low Y, Thevarajah TM, Chang SW, Tong B, Khor SM. Critical Reviews in Biotechnology Biosensing based on surface-enhanced Raman spectroscopy as an emerging / next-generation point-of-care approach for acute myocardial infarction diagnosis. *Crit Rev Biotechnol* [Internet]. 2020;0(0):1–19. Available from: <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1808582>
  152. Online VA, Guven B, Dudak FC, Boyaci IH, Tamer U, Ozsoz M. SERS-based direct and sandwich assay methods for mir-21 detection. *Analyst.* 2014;1141–7.
  153. Li M, Cushing SK, Wu N. Plasmon-enhanced optical sensors : a review. *Analyst* [Internet]. 2014;140:386–406. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C4AN01079E>
  154. Howes PD, Rana S, Stevens MM. Europe PMC Funders Group Plasmonic nanomaterials for biodiagnostics. *Plasmonic Nanomater biodiagnostics.* 2017;43(11):3835–53.
  155. Wang Y, Yan B, Chen L. SERS Tags : Novel Optical Nanoprobes for Bioanalysis. *Chem Rev.* 2012;
  156. Nagele E, Han M, Demarshall C, Belinka B, Nagele R, Camilo DE, et al. Surface enhanced Raman spectroscopy as a novel tool for rapid quantification of heroin and metabolites in saliva. *World J Gastrointest Oncol* [Internet]. 2020;8(1):427–38. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(77\)80224-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(77)80224-6)
  157. Article E, Fan M, Lai F, Chou H, Lu W, Hwang B. Surface-enhanced Raman scattering ( SERS ) from Au : Ag. *Chem Sci.* 2013;509–15.
  158. Shaw CP, Fan M, Lane C, Barry G, Jirasek AI, Brolo AG. Statistical Correlation between SERS Intensity and Nanoparticle Cluster Size. *J Phys Chem.* 2013;117(32).
  159. Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem Rev.* 2005;
  160. Ni J, Lipert RJ, Dawson GB, Porter MD. Immunoassay Readout Method Using Extrinsic Raman Labels Adsorbed on Immunogold Colloids. *Anal Chem.* 1999;71(21):4903–8.
  161. Bennett DA. A / T / N: An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers. *Neurology.* 2016;0:539–47.
  162. Jack CRJ, Bennett DA, Kaj Blennowa, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein S, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer’s disease. 2018;14(4):535–62.
  163. Zengin A, Tamer U, Çaykara T. A SERS-based sandwich assay for ultrasensitive and selective detection of Alzheimer’s tau protein A SERS-based sandwich assay for ultrasensitive and selective detection of Alzheimer’s tau protein. *Biomacromolecules.* 2013;
  164. Zhang X, Liu S, Song X, Wang H, Wang Y, Huang J, et al. Robust and Universal SERS Sensing Platform for Multiplexed Detection of Alzheimer’s Disease Core Biomarkers Using PAapt-AuNPs Conjugates Robust and Universal SERS Sensing Platform for Multiplexed Detection of Alzheimer’s Disease Core Biomarkers Using . *ACS Sensors.* 2019;
  165. Park HJ, Cho S, Kim M, Jung YS. Carboxylic-acid-functionalized , 3-dimensional SERS substrate for label-free analysis of Alzheimer’s disease biomarkers. *Nano Lett.* 2020;

166. Guerrini L, Arenal R, Mannini B, Chiti F, Pini R, Matteini P, et al. SERS Detection of Amyloid Oligomers on Metallorganic-decorated Plasmonic Beads. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(18).
167. Reis M. Punção lombar : o que é , para que serve , como é feita e riscos Como é feita a punção [Internet]. <https://www.tuasaude.com/puncao-lombar/>. 2021. p. 1–5. Available from: <https://www.tuasaude.com/puncao-lombar/>
168. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. “Mini-mental state”. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*. 1975;12(3):189–98.
169. Departamento da Saude do Estado de São Paulo. Mini Exame de estado mental. [Internet]. Vol. 79. 2021. Available from: <https://www.saude.sc.gov.br/index.php/documentos/informacoes-gerais/vigilancia-em-saude/assistencia-farmaceutica/componente-especializado-da-assistencia-farmaceutica-ceaf/protocolos-clinicos-ter-resumos-e-formularios/doenca-de-alzheimer/14300-mini-exame-de-estado-mental-meem/file>
170. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. “Mini-metal state”. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*. 1975;12(3):189–98.
171. E S, T M, M van der L, C D, G F. Anterior cingulate and motor network metabolic impairment in progressive supranuclear palsy. *Neuroimaging*. 1997;5:173–8.
172. Fillenbaum GG, Belle G Van, Morris JC, Richard C, Mirra SS, Davis PC, et al. CERAD (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer’s Disease) the first 20 years. *Alzheimer Dement*. 2010;4(2):96–109.
173. MF M, AR M, Sung JH, WH F. Clinically diagnosed Alzheimer disease: neuropathologic findings in 650 cases. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 1992;6:35–42.
174. Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie R, et al. Complete sequencing and characterization of 21 , 243 full-length human cDNAs. *Nat Genet*. 2004;36(1):1–2.
175. Campos PP, Fernandes L, Ferreira M. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Layer-by-layer films containing emodin or emodin encapsulated in liposomes for transdermal applications. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2018;162:69–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.11.030>
176. Massumi C, Paschoal T, Branco D, Mascagni T, Leite M, Moraes D, et al. Monoamine oxidase B layer-by-layer fi lm fabrication and characterization toward dopamine detection. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2016;58:310–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.042>
177. Rodrigues VC, Moraes ML, Soares JC, Soares AC, Sanfelice R, Rodrigues VC, et al. detect D-dimer as biomarker for venous thromboembolism Immunosensors made with layer-by-layer films on chitosan / gold nanoparticle matrices to detect D-dimer as biomarker for venous thromboembolism. 2018;
178. Luo W, Legge S, Luo J, Lagugn labarthe F, Workentin MS. Interface-Rich Materials and Assemblies Investigation of Au SAMs Photoclick Derivatization by PM-IRRAS Investigation of Au SAMs Photoclick Derivatization by PM-IRRAS. *Langmuir*. 2020;
179. Alwis C De, Leftwich T, Perrine KA. A New Approach to Simultaneous In Situ Measurements of the Air / Liquid / Solid Interface using PM-IRRAS A New Approach to Simultaneous In Situ Measurements of the Air / Liquid / Solid Interface using PM-IRRAS. *Langmuir*. 2020;
180. Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. 2006;(95 mL):15700–7.
181. Fan M, Brolo AG. Self-Assembled Au Nanoparticles as Substrates for Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy: Optimization and Electrochemical Stability. *chemphyschem*. 2008;6:1899–907.
182. Qian X, Peng X, Ansari DO, Yin-goen Q, Chen GZ, Shin DM, et al. In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags. *Nat Biotechnol*. 2008;26(1):83–90.
183. Storey EE, Helmy AS. Optimized preprocessing and machine learning for quantitative Raman spectroscopy in biology. *J Raman Spectrosc*. 2019;(February):1–11.
184. Amigo J, Marti I, Gowen A. Hyperspectral Imaging and Chemometrics : A Perfect Combination for

- the Analysis of Food Structure , Composition and Quality Provided for non-commercial research and educational use only . Not for reproduction , distribution or commercial use . 2013.
185. Zhao J, Lui H, Mclean DI, Zeng H. Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical raman spectroscopy. *Appl Spectrosc.* 2007;61(11):1225–32.
  186. Paulter NG. Comparison of Some Algorithms to Estimate the Low and Ingh State Level of Pulses. In: *Proc IEEE Instrumentation and Technology Conference (IMTC)* [Internet]. Budapest; 2001. p. 96–101. Available from: [https://tsapps.nist.gov/publication/get\\_pdf.cfm?pub\\_id=25572](https://tsapps.nist.gov/publication/get_pdf.cfm?pub_id=25572)
  187. McClave J, Sincich TT. *STATISTICS ( 13TH EDITION )*. 13th ed. 2012.
  188. Soares AC, Soares JC, Shimizu FM, Melendez ME, Carvalho AL, Oliveira ON, et al. Controlled Film Architectures to Detect a Biomarker for Pancreatic Cancer Using Impedance Spectroscopy. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;9:7–14.
  189. Camilo DE, Miyazaki CM, Shimizu FM, Ferreira M. Improving direct immunoassay response by layer-by-layer films of gold nanoparticles – Antibody conjugate towards label-free detection. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2019;102(April):315–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.055>
  190. Ibáñez-redín G, Joshi N, Freitas G, Wilson D, Melendez ME. Determination of p53 biomarker using an electrochemical immunoassay based on layer-by-layer films with NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Microchim Acta.* 2020;187(11):619.
  191. Oliveira RM De, Ferreira J, Santos MJL, Faria RM. Probing the Functionalization of Gold Surfaces and Protein Adsorption by PM-IRRAS. *chemphyschem.* 2011;1736–40.
  192. Scattering DL. Average size Cumulants analysis Polydispersity Index Polydispersity Diffusion Coefficient Hydrodynamic diameter Correlation Curve – or correlation function Y-Intercept or Intercept [Internet]. Inform White Paper. 2008. p. 2–6. Available from: [https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/DLS\\_terminology.pdf](https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/DLS_terminology.pdf)
  193. Characterization D. Stability and Dispersion Characterization of Nanofluid 3.1. In: *Preparation, Characterization, Properties and Application of Nanofluid.* Elsevier Inc; 2019. p. 1–66.