Akemi Martins Higa

Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Prata Aplicadas à
Detecção de Imunoglobulinas G Autorreativas

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de
São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientador: Prof. Dr. Fabio de Lima Leite

São Paulo

2017

Ficha catalográfica
Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo
© Reprodução **NÃO** autorizada pelo autor

Higa, Akemi Martins

Síntese e caracterização de nanopartículas de prata aplicadas à detecção de imunoglobulinas G autorreativas / Akemi Martins Higa. – São Paulo, 2017.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Fábio de Lima Leite

Descritores: 1. NANOPARTÍCULAS. 2. NANOTECNOLOGIA. 3. MANIFESTAÇÕES NEUROLÓGICAS. 4. IMUNOGLOBULINAS. 5. PEPTÍDEOS.

USP/IMTSP/BIB-17/2017.

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Newton Higa e Elisabete Higa, as
boas dádivas que recebi de Deus.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fabio de Lima Leite, pela sua orientação e amizade e, principalmente, por sempre me lembrar de enxergar a essência daquilo que estudamos e buscamos.

Ao Prof. Dr. Giovanni Pimenta Mambrini pela sua orientação sempre esclarecedora, pelo incentivo e pelas boas ideias.

À equipe de profissionais da empresa Rheabiotech, em especial ao Dr. Luís Antonio Peroni, pelo fornecimento dos anticorpos utilizados neste trabalho.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Química de Peptídeos da Universidade de São Paulo, principalmente à Prof. Dra. Maria Terêsa Machini, pelo fornecimento dos peptídeos utilizados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco Trivinho Strixino, ao Prof. Dr. Vadim Viviani, à Dra. Juliana Aparecida Scramin e à Dra. Moema Hausen pelas colaborações, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos do GNN – Grupo de Pesquisa em Nanoneurobiofísica – principalmente à Jéssica Ierich, à Pâmela Soto e à Ariana Moraes pela amizade e colaboração direta na execução e discussão deste trabalho. Também agradeço à Livia Francischini, Jéssica Assumpção, Amanda Jabur, Gisela Bevilacqua, Mariana Arnaud, Letícia Ceschi, Vanessa de Luca, Adriano Amarante e Guedmiller Oliveira pela amizade e trabalho em equipe.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro, que viabilizou esta pesquisa.

Ao corpo docente, direção e administração do IMT e da UFSCar pela oportunidade de estudo e pesquisa.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, pelo exemplo de esperança e de fé. Sempre dou graças a Deus por vocês.

À toda minha família, especialmente à minha avó Leonor e ao meu tio Cláudio (in memoriam), que sempre me incentivaram com os estudos e que deixaram saudades.

A Deus e à minha segunda família da IEQ de Vila Hortência, que me dedicam amor fraternal e amizade em todos os momentos.

*We should be taught not to wait for
inspiration to start a thing. Action always generates
inspiration. Inspiration seldom generates action.*
Frank Tibolt

RESUMO

Higa AM. Síntese e caracterização de nanopartículas de prata aplicadas à detecção de imunoglobulinas G autorreativas (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2017.

Esta dissertação analisa a aplicação de nanopartículas de prata na detecção de imunoglobulinas G reativas aos epítomos da glicoproteína oligodendrocítica da mielina e da proteína básica da mielina, que são duas proteínas que compõem a estrutura da bainha de mielina, alvo de processos inflamatórios em doenças desmielinizantes. Há uma busca por marcadores biológicos para a diferenciação das doenças dentro desse espectro em seus estágios iniciais, anteriormente à disseminação de placas de desmielinização no sistema nervoso central, estágio no qual a detecção é realizada por exames de imagem no diagnóstico clínico. Nessa fase, porém, a bainha de mielina já apresenta alterações em nível molecular. Assim, a nanotecnologia oferece a possibilidade de investigação de processos biológicos em nanoescala, por meio de nanoestruturas biocompatíveis. Neste trabalho, o sistema desenvolvido foi o de nanopartículas de prata conjugadas aos epítomos da bainha de mielina, para detecção de anticorpos reativos às sequências peptídicas, com o objetivo de estabelecer os protocolos de síntese, funcionalização e de interação molecular, utilizando epítomos que são imunogênicos nos modelos experimentais das doenças desmielinizantes. As nanopartículas de prata foram obtidas por um processo de redução química e suas superfícies foram quimicamente modificadas para a funcionalização covalente dos epítomos da bainha de mielina. Esse processo foi caracterizado por técnicas de espectroscopia e microscopia. Os resultados de morfologia e diâmetro das nanopartículas foram obtidos pelas técnicas de microscopia de força atômica e difratometria de raios-X. A atividade das nanopartículas funcionalizadas em resposta aos anticorpos foi avaliada por espectrofotometria na região do ultravioleta-visível e por espectroscopia de força atômica. Os resultados obtidos por essas técnicas mostraram que o processo de funcionalização dos epítomos nas superfícies das nanopartículas de prata foi efetivo, já que o complexo foi responsivo aos anticorpos de forma específica. A resposta do sistema foi observável por sinais ópticos detectáveis na espectrofotometria na região ultravioleta-visível, por alterações visíveis de cor da suspensão de nanopartículas e por meio da quantificação das forças de interação por espectroscopia de força atômica. O conjugado nanopartícula-peptídeo apresenta, portanto, potencial para ser aplicado em estudos de investigação de biomarcadores para as doenças desmielinizantes.

Descritores: Nanopartículas. Nanotecnologia. Manifestações Neurológicas. Imunoglobulinas. Peptídeos.

ABSTRACT

Higa, AM. *Synthesis and characterization of silver nanoparticles applied to immunoglobulin G detection* (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2017.

This dissertation addresses the immunoglobulins G detection using silver nanoparticles. The chosen molecules are reactive to myelin oligodendrocyte glycoprotein and myelin basic protein epitopes, which are important components of myelin sheath structure, the main target of inflammatory processes in demyelinating diseases. In the context of demyelinating disorder spectrum, there is an effort in searching for biological markers that enable early differential diagnosis, prior to the spread damage in the white matter of the central nervous system, when lesions are usually seen on magnetic resonance imaging. At this stage, however, the myelin sheath has already undergone changes at the molecular level. Thus, nanotechnology offers the possibility of investigating biological processes at the nanoscale, using biocompatible nanostructures. In this work, silver nanoparticles were functionalized with myelin sheath epitopes to detect the antibodies reactive to these peptide sequences, aiming to establish protocols for the synthesis, functionalization and molecular interaction processes, using the immunogenic epitopes of experimental autoimmune encephalomyelitis model. The silver nanoparticles were chemically synthesized using a reduction method and the peptide sequences were covalently conjugated to the modified nanoparticle surfaces. This process was characterized with spectroscopy and microscopy techniques. The nanoparticle morphology and diameter results were obtained by atomic force microscopy and X-ray diffraction techniques. The activity of the functionalized nanoparticles in response to the antibodies was evaluated by spectrophotometry in the ultraviolet-visible electromagnetic region and by atomic force spectroscopy. The results obtained by these techniques showed that the functionalization process was effective since the nanoparticle-peptide complexes were specifically responsive to the antibodies. This response was observable by detectable optical signals in spectrophotometry in the ultraviolet-visible region, by the suspensions visible color changes and by interaction forces quantification by atomic force spectroscopy. The nanoparticle-peptide conjugate has, therefore, the potential to be applied in researches for biomarkers involved in the demyelinating diseases.

Descriptors: Nanoparticles. Nanotechnology. Neurological Manifestations. Immunoglobulins. Peptides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura (A) e proteínas componentes da bainha de mielina (B). Modificado de Podbielska <i>et al.</i> ³²	8
Figura 2 – Esquema de uma molécula da MOG, apresentando seu domínio extracelular, a região transmembranar e o domínio citoplasmático. Adaptado de Weissert <i>et al.</i> ³⁸	9
Figura 3 – Estrutura da bainha de mielina com a localização da MBP na linha densa, onde une os folhetos de fosfolipídeos das membranas. Fonte: Adaptado de Ahmed <i>et al.</i> ⁴⁰	10
Figura 4 – Perfis dos mecanismos patofisiológicos da EMRR, EMPS com recorrência, EMPS sem recorrência e EMPP. Adaptado de Grigoriadis e Pesch ⁴⁵ ...	11
Figura 5 – Possível via imunopatológica da EM. Adaptado de Chen <i>et al.</i> ⁴⁷	14
Figura 6 – Esquema da estrutura de uma molécula de imunoglobulina G. Extraído de Abbas <i>et al.</i> ⁵⁷	16
Figura 7 – Tipos de determinantes antigênicos, em laranja, vermelho e azul: determinante conformacional, determinante linear gerado por desnaturação e neodeterminantes derivados de modificações pós-traducionais. Adaptado de Abbas <i>et al.</i> ⁵⁷	18
Figura 8 – Comparação de tamanho entre nanomateriais e moléculas em nanoescala. Modificado de Yokel e MacPhail ⁶⁸	20
Figura 9 – Oscilação plasmônica na superfície de nanopartículas de prata representada pela nuvem eletrônica gerada pela excitação da radiação eletromagnética incidente. Adaptado de Yasun <i>et al.</i> ⁸³	22
Figura 10 – Métodos <i>top down</i> e <i>bottom up</i> utilizados para síntese de nanopartículas. Adaptado de Zahmakiran <i>et al.</i> ⁹¹	24
Figura 11 – Representação do processo de síntese de nanopartículas de prata pelo Método do Citrato. Adaptado de Agnihotri <i>et al.</i> ¹²⁵	32
Figura 12 – Apresentação do espectro de absorbância plasmônica no UV-Vis característico de AgNPs e da cor padrão da suspensão utilizada nos experimentos. .	41
Figura 13 – Síntese de nanopartículas de prata pelo método do citrato, sem e com adição de solução de amônia (28%) à suspensão durante o processo de síntese. As imagens representam a coloração das nanopartículas logo após o processo de síntese	

(T ₀), 72 h e 96 h após a síntese. As amostras foram armazenadas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.	42
Figura 14 – Imagens de MCL de (A) AgNPs não funcionalizadas com leitura em 560-610nm e em (B) com leitura em 720-280. As regiões de interesse marcadas nas imagens apresentam área de 3μm ² e foram selecionadas para gerar gráficos de intensidade de fluorescência. As barras de escala apresentam 10μm.	44
Figura 15 – Intensidade de fluorescência das AgNPs não funcionalizadas, a partir da contagem de pixels em valores de tons de cinza, respectiva às áreas de interesse marcadas nas imagens bidimensionais geradas no MCL. A leitura realizada no intervalo de 560-610 nm está representada em verde e a leitura em 720-280, em vermelho.	45
Figura 16 – Imagens de altura bidimensional (A) e tridimensional (B) da amostra de AgNPs obtidas por AFM, em uma área de 1μm ² de varredura.	47
Figura 17 – Difratoograma de raios-X de AgNPs sintetizadas por método de redução química.	48
Figura 18 – Distribuição de tamanho da suspensão de nanopartículas de prata obtida pela técnica de DLS.	51
Figura 19 – Variação no diâmetro hidrodinâmico em cada etapa de funcionalização das AgNPs com o peptídeo MOG 92-106 e MBP 85-99.	52
Figura 20 – Reação de acoplamento de proteína por EDC-NHS no processo de funcionalização de nanopartículas modificadas com 11-MUA. Adaptado de Thermo Fischer Scientific. Disponível em:< www.thermofisher.com >.	53
Figura 21 – Imagem bidimensional da altura do filme de AgNPs-MBP em uma área de 10μm ² (A) e imagem tridimensional da mesma amostra (B) obtidas por AFM	54
Figura 22 – Espectro de FTIR das AgNPs (linha preta), AgNPs funcionalizadas com MOG (linha vermelha) e interação com anticorpo anti-MOG (linha azul).	58
Figura 23 – Espectro de FTIR das AgNPs (linha preta), AgNPs funcionalizadas com MBP (linha vermelha) e interação com anticorpo anti-MBP (linha azul).	59
Figura 24 – Imagens de MEV de uma haste de AFM não funcionalizada (A) e funcionalizada com nanopartículas (B). Aumento de 2000X.	60
Figura 25 – Diagramas de caixa das distribuições de Fad em pN entre pontas de AFM funcionalizadas com AgNPs_MOG (vermelho) e AgNPs não funcionalizadas	

com o peptídeo (preto) interagindo com anticorpos anti-MOG nos substratos de mica. As imagens inseridas na figura são curvas de forças típicas de um sistema específico (esquerda) e não específico (direita).	61
Figura 26 – Diagramas de caixa das distribuições de Fad em pN entre pontas de AFM funcionalizadas com AgNPs_MBP (vermelho) e AgNPs não funcionalizadas com o peptídeo (preto) interagindo com anticorpos anti-MBP nos substratos de mica. As imagens inseridas na figura são curvas de forças típicas de um sistema específico (esquerda) e não específico (direita).	62
Figura 27 – Espectros gerados na região UV-Vis referente às AgNPs funcionalizadas com a MOG, nos quais observa-se a variação na absorbância plasmônica em resposta à interação com o anticorpo específico (anti-MOG) e anticorpos-controle (anti-MBP e anti-GST).	64
Figura 28 – Espectros gerados na região UV-Vis referente às AgNPs funcionalizadas com a MBP, nos quais observa-se a variação na absorbância plasmônica em resposta à interação com o anticorpo específico (anti-MBP) e anticorpos-controle (anti-MOG e anti-GST).	65
Figura 29 – Variação do comprimento de onda de máxima absorbância das AgNPs funcionalizadas com MOG em interação com diferentes concentrações de anti-MOG em um intervalo de 0,1 a 20 nM.	67
Figura 30 – Variação do comprimento de onda de máxima absorbância das AgNPs funcionalizadas com MBP em interação com diferentes concentrações de anti-MBP em um intervalo de 0,1 a 20 nM.	68
Figura 31 – Fotografias das AgNPs (A), AgNPs funcionalizadas com MOG (92-106) (B), AgNPs funcionalizadas em interação com anticorpo anti-MOG (C) e em interação com anticorpo inespecífico (anti-MBP) (D). A mesma ordem das amostras se repete para as fotografias tiradas sob iluminação UV (E – H) e após a iluminação UV (I – L).	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas dos peptídeos (Resultados fornecidos pelo <i>software online</i> PepCalc.com).....	30
Tabela 2 – Parâmetros de entrada (<i>input parameters</i>) e de saída (<i>output parameters</i>) do script computacional desenvolvido para obter o fator de diluição ótimo para a funcionalização das nanopartículas de prata com o peptídeo MOG 92-106.....	49
Tabela 3 - Parâmetros de entrada (<i>input parameters</i>) e de saída (<i>output parameters</i>) do script computacional desenvolvido para obter o fator de diluição ótimo para a funcionalização das nanopartículas de prata com o peptídeo MBP 85-99.....	50
Tabela 4 – Estabilidade das suspensões com relação ao potencial zeta	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11-MUA	Ácido 11-mercaptoundecanoico
ADEM	Encefalomielite Disseminada Aguda
AFM	Microscopia de Força Atômica
AFP	Antígeno Alfa-fetoproteína
AFS	Espectroscopia de Força Atômica
AgNPs	Nanopartículas de Prata
Anti-AQP4	Anti-aquaporina 4
Anti-GST	Anti-Glutathione-S-Transferase
Anti-MOG	Anti-Glicoproteína Oligodendrocítica da Mielina
Anti-MBP	Anti-Proteína Básica da Mielina
APTES	3-aminopropiltrietoxissilano
ATR-FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de <i>Fourier</i> , em modo Reflectância Total Atenuada
AuNPs	Nanopartículas de Ouro
BHE	Barreira Hematoencefálica
CNP	2'3'- cíclico-nucleotídeo 3'- fosfodiesterase
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRX	Difratometria de Raios-X
EAE	Encefalomielite Autoimune Experimental
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EM	Esclerose Múltipla
EMPP	Esclerose Múltipla Progressivo-Primária
EMPS	Esclerose Múltipla Progressivo-Secundária
EMRR	Esclerose Múltipla Recorrente-Remitente
Fad	Força de Adesão
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IDPs	Proteínas Intrinsecamente Desordenadas
IFN- γ	Interferon-gama

IgGs	Imunoglobulinas G
IgV	Domínio extracelular variável de Imunoglobulina
IL-12	Interleucina-12
IL-23	Interleucina-23
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MAG	Glicoproteína Associada à Mielina
MBP	Proteína Básica da Mielina
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MOG	Glicoproteína Oligodendrocítica da Mielina
NHS	N-hidroxisuccinimida
NMO	Neuromielite Óptica
nN	Nanonewton
PLP	Proteína Proteolipídica de Mielina
PMT	<i>Photomultiplier tube</i>
pN	Piconewton
SASA	<i>Solvent-accessible surface area</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
TCL	<i>Tool Command Language</i>
TCR	Receptor de Células T
UV-Vis	Ultravioleta-visível
VMD	<i>Visual Molecular Dynamics</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
2.1	Geral.....	3
2.2	Específicos	3
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	4
3.1	Relevância clínica da MOG e da MBP em doenças desmielinizantes	4
3.2	Proteínas da bainha de mielina do sistema nervoso central	7
3.3	Imunopatologia da esclerose múltipla	11
3.4	Imunidade humoral.....	15
3.5	Nanotecnologia.....	19
3.6	Nanomateriais aplicados à detecção de biomoléculas	21
3.7	Nanopartículas de prata associadas às biomoléculas.....	23
3.8	Caracterização de nanopartículas	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1	Obtenção dos peptídeos MOG 92-106 e MBP 85-99	30
4.2	Obtenção dos anticorpos policlonais anti-MOG e anti-MBP.....	31
4.3	Síntese de nanopartículas de prata.....	31
4.4	<i>Script</i> computacional baseado em <i>Tool Command Language</i> (TCL)	33
4.5	Funcionalização das nanopartículas com os peptídeos MOG 92-106 e MBP 85-99	36
4.6	Microscopia de força atômica (AFM)	36
4.7	Difratometria de raios-X (DRX)	37
4.8	Microscopia confocal à laser (MCL)	37
4.9	Espectroscopia de infravermelho com transformada de <i>Fourier</i> em modo reflectância total atenuada (ATR-FTIR)	38

4.10	Espalhamento dinâmico de Luz (DLS) e potencial zeta	38
4.11	Espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)	38
4.12	Espectroscopia de força atômica (AFS)	39
4.13	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	40
4.14	Transiluminador UVB	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	Processo de síntese das nanopartículas de prata	41
5.2	Caracterização estrutural das nanopartículas de prata	46
5.3	Funcionalização covalente AgNPs-peptídeo	49
5.4	Interação peptídeo-anticorpo mediada por nanopartículas funcionalizadas	56
5.4.1	Padronização da condição experimental	56
5.4.2	Espectroscopia na região do infravermelho	57
5.4.3	Espectroscopia de força atômica	59
5.4.4	Espectroscopia UV-Vis	63
5.4.5	Sensoriamento óptico com as AgNPs	69
6	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

As manifestações clínicas das doenças desmielinizantes apresentam um amplo espectro, com a sobreposição de características clínicas e imagiológicas que, quando analisadas, não são típicas ao ponto de definir o diagnóstico diferencial nos estágios iniciais dessas doenças ¹. A bainha de mielina é a estrutura do neurônio que sofre os danos e, com a progressão da doença, os axônios podem ser degenerados. As doenças mais comuns dentro dessa classificação são a Esclerose Múltipla (EM), a Encefalomielite Disseminada Aguda (ADEM, do inglês *Acute Disseminated Encephalomyelitis*) e a Neuromielite Óptica (NMO), que são decorrentes de processos inflamatórios ².

Neste contexto, o valor de anticorpos marcadores das doenças tem sido investigado. Lennon *et al.*³ identificaram um marcador sorológico da NMO, que possibilitou a sua diferenciação da EM e de outras doenças desmielinizantes. Os pesquisadores demonstraram que o anticorpo Anti-aquaporina 4 (anti-AQP4) ligava-se seletivamente ao canal de água aquaporina-4 dos astrócitos no Sistema Nervoso Central (SNC), concluindo o papel da imunidade humoral na patogênese da doença. A identificação desse marcador foi crucial para diferenciação de duas doenças que apresentam prognóstico e tratamento distintos e, assim, contribuiu para o correto diagnóstico e abordagem terapêutica dos pacientes.

Dentro desse contexto, foram realizados estudos com modelos experimentais das doenças desmielinizantes, para investigar os mecanismos imunológicos envolvidos no processo de desmielinização dessas doenças. Historicamente, a glicoproteína oligodendrocítica da mielina (MOG, do inglês *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*), foi a principal candidata a alvo antigênico, devido a sua localização mais externa na estrutura. Existe um amplo conteúdo bibliográfico com resultados gerados a partir de estudos com essa proteína e que foram importantes para a compreensão dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na EM ⁴. A proteína básica da mielina (MBP, do inglês *Myelin Basic Protein*) também é alvo de investigações, já que as alterações patológicas ocorrem na composição lipídica da bainha de mielina e essa proteína têm importante função na compactação da estrutura. Assim, estudos investigaram a imunogenicidade de epítomos dessa importante proteína ⁵.

Apesar dos estudos realizados em modelos experimentais, os antígenos-alvo ainda não foram identificados na EM em humanos. Além disso, foram gerados resultados controversos em relação a relevância clínica dos anticorpos nessa doença, devido aos métodos de detecção e padronizações distintas realizadas pelos pesquisadores. Assim, o efeito patológico de anticorpos contra as proteínas mielínicas ainda necessita de investigações ⁶.

Sabe-se, entretanto, que quando o diagnóstico clínico é estabelecido, a bainha de mielina já passou por significativas alterações em sua estrutura em nível molecular, gerando a disseminação espacial de placas de desmielinização monitoradas por exames de imagem ⁷.

Neste contexto, a nanotecnologia pode ser aplicada em diagnóstico de estágios iniciais de patologias e tratamento médico, pela possibilidade de investigação de mecanismos biológicos em nanoescala, com alta sensibilidade e especificidade ⁸. Dentre as diversas nanoestruturas já estudadas, as nanopartículas de prata (AgNPs) exibem propriedades ópticas que as tornam potentes transdutores de sinais, que são perceptíveis a olho nu. Essas nanopartículas interagem facilmente com biomoléculas, podendo ser integradas e aplicadas ao sensoriamento de diversos analitos ⁹.

A superfície das AgNPs pode se ligar às moléculas biológicas, que atuam na interação com algum alvo. Quando essa nanoestrutura, que contém uma molécula alvo de reconhecimento, detecta um analito por ligação em sua superfície, as nanopartículas apresentam alterações nas propriedades de absorção e espalhamento de luz, acompanhadas de mudanças visíveis na coloração da suspensão de nanopartículas com as biomoléculas ¹⁰.

Diante desse contexto, foi proposto neste trabalho, o desenvolvimento de AgNPs conjugadas com epítomos imunogênicos, em modelos experimentais, da MOG e da MBP, para avaliar o potencial dessa nanoestrutura na interação molecular com anticorpos autorreativos à essas sequências peptídicas. O objetivo das etapas realizadas nesse período foi o de desenvolver os protocolos relativos à cada etapa de construção do conjugado nanopartícula-biomolécula, com a perspectiva de aplicação em estudos mais aprofundados de investigação de biomarcadores para as doenças desmielinizantes, em especial a EM e a NMO.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a aplicabilidade de AgNPs funcionalizadas na detecção de imunoglobulinas G (IgGs) anti-MOG e anti-MBP.

2.2 Específicos

- a) Sintetizar AgNPs por redução química;
- b) Funcionalizar as AgNPs com epítomos da MOG e da MBP;
- c) Caracterizar as AgNPs funcionalizadas utilizando as técnicas de espectroscopia de infravermelho por transformada de *Fourier*, microscopia confocal à laser, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia de força atômica, difratometria de raios-X, espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta;
- d) Quantificar as forças de adesão entre as AgNPs funcionalizadas com os epítomos da MOG e da MBP e as IgGs anti-MOG e anti-MBP imobilizadas em superfície de mica;
- e) Avaliar a atividade das AgNPs funcionalizadas na ligação das IgGs anti-MOG e anti-MBP por espectrofotometria na região ultravioleta-visível do espectro eletromagnético.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Relevância clínica da MOG e da MBP em doenças desmielinizantes

As doenças desmielinizantes são aquelas em que ocorrem danos na bainha de mielina ou nas células que participam de sua formação, com relativa preservação dos axônios, os quais podem, posteriormente, sofrer atrofia e degeneração ¹¹. Uma possível classificação das doenças desmielinizantes é segundo a sua patogênese, que pode ser decorrente de processos inflamatórios. São inseridas nessa classificação a EM, sua variante aguda (doença de *Marburg*), a ADEM, a NMO, esclerose concêntrica de Baló e a leucoencefalite disseminada aguda. Assim, as doenças inflamatórias desmielinizantes compreendem um amplo espectro, das quais a EM é a mais comum ².

Essas patologias apresentam características clínicas que se sobrepõem, bem como similaridades nas imagens de ressonância magnética, fatores que dificultam o diagnóstico nos estágios iniciais dessas doenças ¹. O papel dos anticorpos no diagnóstico diferencial das doenças desmielinizantes ainda não é bem estabelecido, com exceção do anticorpo anti-aquaporina-4 (anti AQP-4) na NMO ¹². Alguns autoanticorpos já foram documentados para o diagnóstico de outras doenças neuroimunológicas, entre elas a *miastenia gravis*, em que o biomarcador é um anticorpo sorológico específico do receptor de acetilcolina ¹³.

Dentre os antígenos mielínicos estudados como possíveis alvos da resposta imune humoral, a MOG foi a principal candidata, devido à sua localização mais externa na bainha de mielina e nos oligodendrócitos, tornando-a acessível aos anticorpos ². Assim, a MOG tornou-se a proteína mais estudada, sendo identificada como alvo antigênico na encefalomielite autoimune experimental (EAE) ⁶.

A EAE é o modelo experimental mais comumente utilizado para estudar os mecanismos envolvidos na EM. Os resultados gerados dos estudos desse modelo contribuíram para a compreensão da resposta imune envolvida no processo de desmielinização, revelando que a MOG pode induzir essa resposta em diferentes espécies ⁴ e que suscetibilidade a essa proteína é determinada por genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) e não-MHC ¹⁴. A fisiopatologia dessa resposta envolve células T CD4+ ¹⁵ e

anticorpos fixadores de complemento, que apresentam-se patogênicos quando reconhecem epítomos conformacionais presentes no domínio extracelular da MOG ¹⁶. Também foi demonstrado que anticorpos anti-MOG circulantes contra epítomos conformacionais não induzem resposta autoimune, se não ganharem acesso ao SNC em processo inflamatório, via ruptura na Barreira Hematoencefálica (BHE) ¹⁷.

Os epítomos alvo de células T encefalitogênicas de diversas linhagens de murídeos estão localizados no domínio extracelular da MOG e na região transmembranar ¹⁸. O peptídeo MOG 92-106 foi identificado como altamente encefalitogênico em camundongos SJL, no qual houve a proliferação de células T contra esse epítomo. Essa mesma sequência da MOG foi utilizada para induzir um modelo de EAE espontânea recorrente-remitente em camundongos SJL/J transgênicos para o receptor de células T (TCR, do inglês *T-cell receptor*) MOG-específico ¹⁹⁻²¹.

Dessa forma, o estudo de EAE em modelo murino utilizando a MOG e outros antígenos possibilitou a compreensão das principais características patológicas envolvidas na EM, como a inflamação, a desmielinização, dano axonal e gliose, por meio da interação de mecanismos imuno e neuropatológicos, em uma cascata de eventos que compõem a patogenia da doença ¹⁷. A diferença entre o modelo animal e a doença em humanos é a necessidade de imunização externa com antígenos mielínicos conhecidos, para o desenvolvimento da EAE, enquanto que em humanos a sensibilidade aos autoantígenos não é artificialmente induzida, e os antígenos ainda não foram identificados ⁴.

Associado a isso, a busca por anticorpos anti-MOG específicos da EM gerou resultados controversos, devido ao uso de métodos muito distintos pelos pesquisadores, principalmente os métodos de detecção de anticorpos (ELISA, *Western blot* e imunohistoquímica), e diferentes antígenos (MOG nativa, MOG recombinante e peptídeos sintéticos) ²². O uso da MOG em sua conformação correta e com glicosilação, expressa em células de mamíferos em métodos de radioimunoensaios, citometria de fluxo e imunofluorescência possibilitou sua detecção em pacientes pediátricos com ADEM, com doenças do espectro de NMO soronegativos para AQP-4, neurite óptica monofásica e recorrente, mielite transversa e encefalite do tronco encefálico, porém raramente em pacientes adultos com EM ¹⁷.

Uma publicação de revisão bibliográfica comparou todos os estudos realizados para analisar a presença de anticorpos anti-MOG em doenças inflamatórias desmielinizantes. Os autores analisaram os 26 estudos que investigaram a presença de anti-MOG em EM, ADEM e pacientes soronegativos e soropositivos para AQP4, em comparação com grupos controle de pacientes com outras doenças neurológicas ou saudáveis. A presença de anti-MOG em pacientes com EM foi analisada em 23/26 estudos, e a sensibilidade para o anticorpo foi de 5,1%, sendo que a maior frequência foi encontrada em pacientes pediátricos e, raramente, em pacientes adultos. Em pacientes com ADEM, em 13/26 estudos analisados, a sensibilidade foi de 36,4%, sendo este o fenótipo clínico mais associado com a presença de anti-MOG. A frequência de anti-MOG foi maior entre os pacientes pediátricos. Em 15/26 estudos, pacientes AQP-4 soronegativos com neurite óptica, mielite transversa e doenças do espectro de NMO foram analisados e foi encontrada uma sensibilidade de 26,9%; e, para pacientes soropositivos para AQP4, a sensibilidade foi de apenas 2%, sendo assim incluídos no grupo controle ⁶.

Esse estudo revelou que não há um fenótipo clínico comum bem determinado para a presença de anticorpos anti-MOG. Esses anticorpos estão relacionados com apresentações clínicas distintas, principalmente em pacientes com início mais precoce dessas doenças desmielinizantes. De forma geral, esses pacientes apresentam as características típicas do padrão II de EM, no qual há placas de desmielinização, relativa preservação dos axônios, astrócitos bem preservados e macrófagos contendo resíduos de mielina, revelando a prevalência de resposta humoral na patogenia desses pacientes, cujo efeito patológico ainda necessita de intensas investigações ^{6,23}.

O diagnóstico clínico da EM inclui localizar as placas de desmielinização e monitorar sua evolução no tempo e no espaço. Em nível molecular, nesse estágio de diagnóstico, a bainha de mielina já passou por mudanças estruturais significativas, que foram acumuladas ao ponto de formar as placas de desmielinização ⁷. Essas mudanças ocorrem na composição lipídica da bainha de mielina e também são decorrentes de modificações pós-traducionais da MBP que, associadas, ocasionam a ruptura das forças que mantêm a mielina estruturada ²⁴.

Em pacientes com EM há níveis aumentados de deaminação (citrulinação) da MBP, que decorre da conversão enzimática dos resíduos de arginina em citrulina

pela peptilarginina deiminase. Essa modificação gera diminuição da carga positiva da proteína e, conseqüentemente, da capacidade de ligar as camadas da bainha de mielina ²⁵. Além de desestruturar a bainha, essa modificação expõe a região central da MBP, onde está localizada a região de ancoragem em α -hélice altamente conservada, que representa o principal epítipo imunogênico (MBP 85-96) em EM ⁵. Nas regiões de desintegração da bainha de mielina em lesões de EM aguda e em EAE são encontrados anticorpos anti-MBP ²⁶.

Uma primeira manifestação comum da EM é a neurite óptica unilateral monossintomática, em que há uma elevação nos níveis de células T e B contra diferentes antígenos e peptídeos da mielina, incluindo a MBP. No caso dessa proteína, foi observado que há proliferação de linfócitos B autorreativos no LCR de pacientes com EM, inicialmente manifestada como neurite óptica ²⁷. Pacientes com EM clinicamente ativa também apresentam aumento nos níveis de anti-MBP, enquanto que em pacientes em remissão não há níveis detectáveis do anticorpo. Os níveis de anti-MBP estão altamente relacionados com a atividade da doença e podem estar envolvidos na patogênese da desmielinização em EM ²⁶.

3.2 Proteínas da bainha de mielina do sistema nervoso central

A formação da bainha de mielina é fundamental para o desenvolvimento do SNC e ocorre pela organização espiralada da membrana dos oligodendrócitos, composta por um conjunto de lipídios e proteínas, que envolvem as fibras e provêm suporte trófico e metabólico ao axônio (Figura 1A) ²⁸.

Esses componentes estão organizados de acordo com as suas cargas, hidrofobicidade e massa molecular ²⁹. As regiões descontínuas da bainha de mielina compõem os nódulos de *Ranvier*, que contêm canais de sódio e potássio, essenciais para a rápida condução saltatória do impulso elétrico ³⁰.

O desenvolvimento completo da mielina do SNC ocorre por volta da segunda década de vida e resulta em uma rede de neurônios mielinizados sujeitos à plasticidade neuronal ³¹. Pelo fato das células do SNC serem altamente diferenciadas, os oligodendrócitos e os neurônios possuem capacidade limitada de regeneração em resposta a um dano ³². Essas células dependem da diferenciação de suas precursoras, para a formação de uma nova linhagem celular. As células progenitoras dos

oligodendrócitos devem migrar para a substância branca em desenvolvimento e se diferenciarem em oligodendrócitos maduros para, então, começarem a expressar as proteínas específicas da bainha de mielina ³³.

As proteínas mais abundantes da bainha de mielina (Figura 1B) são a proteína proteolípídica (PLP, do inglês *Proteolipid Protein*), que é integral, e a MBP, uma proteína periférica; as proteínas quantitativamente menos abundantes são a glicoproteína associada à mielina (MAG), a MOG e 2'3'- cíclico-nucleotídeo 3'-fosfodiesterase (CNP) ³⁴.

Figura 1 – Estrutura (A) e proteínas componentes da bainha de mielina (B). Modificado de Podbielska *et al.* ³².

A MOG é uma proteína presente apenas em mamíferos, com uma sequência de 245 aminoácidos e massa molecular de 26-28 kDa ⁶. Em humanos, o gene codificante da MOG está localizado no cromossomo 6, no *locus* gênico do sistema antígeno leucocitário humano (HLA, do inglês *Human Leukocyte Antigen*) ³⁵. A expressão da MOG ocorre exclusivamente no SNC, especificamente na superfície da bainha de mielina, sendo o componente proteico presente em menor quantidade, e nos oligodendrócitos ¹⁷.

A MOG pertence à superfamília das imunoglobulinas (Ig) e apresenta um único domínio extracelular variável (IgV), composta dos aminoácidos (aa) 1-122, glicosilada na posição 31, um domínio transmembranar (aa 122-150), uma alça citoplasmática, uma região associada à membrana celular e uma cauda citoplasmática (aa 150-218) (Figura 2) ^{6,36}. A função da MOG pode ter relação com o domínio

extracelular de Ig, atuando como um receptor celular de superfície ou molécula de adesão celular ³⁷.

Figura 2 – Esquema de uma molécula da MOG, apresentando seu domínio extracelular, a região transmembranar e o domínio citoplasmático. Adaptado de Weissert *et al.* ³⁸

Em um evento de ligação de anticorpos reativos ao domínio extracelular da MOG, ocorre a ativação de uma cascata de sinalização intracelular, que gera respostas ao estresse celular e alterações do citoesqueleto ³⁹. A exposição superficial dessa proteína a torna um alvo antigênico às respostas imunológicas celular e humoral em doenças inflamatórias desmielinizantes ⁶.

A MBP é a segunda proteína mais abundante da estrutura, localizada na linha densa da bainha de mielina, entre as superfícies exoplásmicas da membrana plasmática formadoras das linhas intraperíodos (Figura 3) ⁴⁰.

Figura 3 – Estrutura da bainha de mielina com a localização da MBP na linha densa, onde une os folhetos de fosfolípidos das membranas. Fonte: Adaptado de Ahmed *et al.* ⁴⁰

Esta proteína apresenta isoformas (14 a 21,5 kDa) que resultam da transcrição diferencial no *locus Golli-MBP*, sendo a isoforma de 18,5 kDa predominante no encéfalo adulto. Essa proteína é catiônica e, assim, une os folhetos de fosfolípidos das membranas, negativamente carregados ⁷.

A carga positiva e baixa hidrofobicidade são características de proteínas intrinsecamente desordenadas (IDPs, do inglês *Intrinsically Disordered Proteins*), que podem sofrer transição ordem-desordem por modificações pós-traducionais, como a deimação (citrulinação), na qual há a conversão de arginina positivamente carregada em citrulina neutra na membrana, prejudicial para a compactação da mielina ⁴¹.

Esse fator estrutural desordenado da MBP e a suscetibilidade à deimação são característicos da desmielinização em EM, cuja gravidade está associada ao nível de deimação da proteína. Portanto, a MBP é considerada participante na patogenia da doença e, potencialmente, um fator iniciante da desmielinização ⁷.

3.3 Imunopatologia da esclerose múltipla

A EM é uma doença neuroinflamatória crônica e desmielinizante do SNC ²⁶, que acomete cerca de 2,5 milhões de pessoas no mundo, frequentemente adultos jovens ⁴². No Brasil, segundo a Associação Brasileira de Esclerose Múltipla, há mais de 30.000 portadores da doença dos quais 10.376, aproximadamente, estariam em tratamento ⁴³. Por acometer adultos em idade ativa, a EM tem impacto individual e socioeconômico, em relação ao planejamento familiar e profissional ⁴⁴.

A EM apresenta manifestações clínicas heterogêneas relacionadas com a disseminação espaço-temporal das lesões desmielinizantes no SNC. Os principais sintomas incluem alterações sensoriais e visuais, deficiência motora, fadiga e disfunção cognitiva ⁴². Os fenótipos da EM expressos por recorrências são classificados como EM remitente-recorrente (EMRR), que é a manifestação clínica mais comum, caracterizada por períodos de surtos que podem durar algumas semanas e, em seguida, desaparecem; EM progressivo-secundária (EMPS) recorrente, com pontos de inflamação multifocais e períodos de remissão. A doença pode evoluir para o fenótipo progressivo-secundário sem recorrências e para o progressivo-primário (EMPP), nos quais há maiores danos nos neurônios e axônios, e falha nos mecanismos de reparo do SNC, caracterizados por maior progressão dos sintomas e acúmulo de sequelas (Figura 4) ⁴⁵.

Figura 4 – Perfis dos mecanismos patofisiológicos da EMRR, EMPS com recorrência, EMPS sem recorrência e EMPP. Adaptado de Grigoriadis e Pesch ⁴⁵.

As lesões características da EM são causadas pela infiltração de células do sistema imunológico através da BHE, o que causa inflamação, desmielinização, gliose e degeneração neuroaxonal, interrompendo a sinalização sináptica (Figura 5) ². As primeiras células a participarem da formação da lesão são os linfócitos T que iniciam a resposta autoimune à antígenos da bainha de mielina ⁴⁴. Essa desregulação imunológica é multifatorial, envolvendo diferentes fatores de predisposição genética em associação com fatores ambientais, que culminam em um processo patofisiológico multicelular ⁴⁶.

Nos primeiros estágios da EM há a presença de linfócitos T autorreativos aos antígenos da mielina nas lesões desmielinizantes. Os linfócitos T CD4⁺ infiltrados no SNC são reativados por células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas maduras do sistema imune inato. As células dendríticas imaturas estão envolvidas na manutenção da tolerância periférica, promovendo as respostas anti-inflamatórias das células Th2 e T reguladoras ⁴⁷.

A ligação das células T com as células dendríticas resulta em uma resposta inflamatória caracterizada pelo recrutamento de monócitos para o SNC e a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ virgem ^{45,48}.

A diferenciação dessas células depende das citocinas secretadas pelas células apresentadoras de antígenos. Caso predomine a interleucina-12 (IL-12), os linfócitos T CD4⁺ virgem se diferenciam em linfócitos T auxiliares Th1 produtores de interferon- γ (IFN- γ). Na presença de IL-23, ocorre a diferenciação em linfócitos Th17 produtores de IL-17 ⁴⁵. Os linfócitos Th17 também produzem metaloproteinases de matriz e espécies reativas do oxigênio que aumentam a permeabilidade da BHE ⁴⁹. As citocinas pró-inflamatórias também induzem a ativação de macrófagos e microglias, que produzem outros mediadores pró-inflamatórios e radicais livres (óxido nítrico), contribuindo para a desmielinização e dano axonal ⁵⁰.

A ativação de macrófagos e microglias pelos linfócitos T auxiliares são cruciais na manutenção dos mecanismos de amplificação da inflamação. As células microgлияis ativadas são encontradas em estágios mais precoces das lesões perivasculares, e os macrófagos periféricos são encontrados juntamente com a desmielinização ⁵¹. As microglias residentes não contribuem apenas para a

desmielinização, mas também apresentam função no reparo dos tecidos danificados pela fagocitose dos resíduos da bainha de mielina e pela produção de fatores de crescimento protetores dos axônios e neurônios ⁵².

Os linfócitos T CD8⁺ expressam um receptor de quimiocina e penetra no SNC por meio da ligação com a α 4-integrina. Essas células também produzem mediadores pró-inflamatórios e sua presença no líquido cefalorraquidiano (LCR) está relacionada a danos agudos ao axônio. Elas reconhecem antígenos apresentados por moléculas HLA de classe I expressas em todas as células nucleadas do SNC, incluindo os oligodendrócitos, os astrócitos e os neurônios ⁵³.

A infiltração de linfócitos B no SNC varia durante a progressão da doença. Os linfócitos B produzem anticorpos e auto-anticorpos que são detectáveis no LCR, tendo relevância no diagnóstico da EM ²⁶. A resposta humoral ocorre contra antígenos da mielina e outros componentes do SNC, como os neurônios e a glia. No SNC também ocorre a reativação dos linfócitos B de memória, que podem induzir danos mediados pelo sistema complemento e a reativação de linfócitos T, que amplificam a resposta induzindo a proliferação e diferenciação dos linfócitos B ⁵⁴.

A autorreatividade de linfócitos T e B ocorre devido à função reduzida de linfócitos T reguladores ou à resistência aumentada dos linfócitos efetores aos mecanismos de supressão na tolerância central que ocorre no timo ⁵⁵. Os linfócitos autorreativos liberados para a periferia podem ser ativados por mimetismo molecular e apresentação de autoantígenos do SNC. Fatores genéticos e ambientais contribuem para esses eventos. Uma vez ativados, os linfócitos iniciam o processo descrito nos parágrafos anteriores, contribuindo para o desenvolvimento da EM (Figura 5) ⁴⁴.

3.4 Imunidade humoral

A imunidade humoral é mediada por uma família de glicoproteínas estruturalmente relacionadas, denominadas anticorpos ou imunoglobulinas. Eles iniciam seus efeitos biológicos por meio da ligação com antígenos. Os anticorpos possuem alta capacidade de reconhecimento de diversos determinantes antigênicos, sendo altamente seletivos e específicos para um antígeno, com o qual se ligam de forma não-covalente ⁵⁶.

Os anticorpos são produzidos por linfócitos B e permanecem ligados à membrana do linfócito, atuando como receptores de antígenos, constituindo a fase de reconhecimento da imunidade humoral. Após o estímulo antigênico, os anticorpos são produzidos em forma secretada, pelos plasmócitos. Estes anticorpos ligam-se ao antígeno específico e iniciam diversas funções efetoras do sistema imunológico. Essas funções são mediadas pela porção do anticorpo que não está envolvida na interação com o antígeno ⁵⁶.

Os anticorpos são similares em estrutura e apresentam algumas características físico-químicas comuns, como carga e solubilidade. Todos os anticorpos possuem duas cadeias polipeptídicas leves idênticas de aproximadamente 24 kDa e duas cadeias polipeptídicas pesadas de 55-70 kDa. As cadeias leves e pesadas são divididas em duas regiões, de acordo com a variabilidade da sequência de aminoácidos. Assim, as cadeias leves possuem uma região variável (V_L - 110 aminoácidos) e uma região constante (C_L - 110 aminoácidos) e as cadeias pesadas também possuem uma região variável (V_H - 110 aminoácidos) e uma região constante (C_H - 330-440 aminoácidos). Essas cadeias são dobradas em regiões globulares, denominadas domínios imunoglobulina formados por folhas- β ligadas por pontes dissulfeto intracadeia, que são: domínios de cadeia leve (V_L e C_L) e domínios de cadeia pesada (V_H e C_{H1} - C_{H3}). Cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada e as duas cadeias pesadas são ligadas uma a outra, por pontes dissulfeto intercadeia (Figura 6) ⁵⁷.

Figura 6 – Esquema da estrutura de uma molécula de imunoglobulina G. Extraído de Abbas *et al.*⁵⁷.

Apesar da similaridade, as imunoglobulinas são divididas em cinco classes, de acordo com as sequências de aminoácidos na região constante das cadeias pesadas: IgA (cadeia pesada α), IgD (cadeia pesada δ), IgE (cadeia pesada ϵ), IgG (cadeia pesada γ) e IgM (cadeia pesada μ). As classes IgA e IgG podem ser divididas em subclasses, de acordo com pequenas diferenças nas sequências de aminoácidos na região constante das cadeias pesadas: IgG1 (γ 1), IgG2 (γ 2), IgG3 (γ 3) e IgG4 (γ 4) e IgA1(α 1) e IgA2 (α 2) ⁵⁸.

Assim, as Igs de mesma classe apresentam extensas regiões de sequências de aminoácidos idênticas nas cadeias pesadas (C_{H2} e C_{H3}), com propriedades físico-químicas e antigênicas comuns, sendo essa porção denominada fragmento Fc (Figura 6). Ou seja, a divisão dos anticorpos em classes implica em diferentes funções efetoras ativadas no sistema imunológico, que podem ser de fixação ao complemento e de ligação a vários tipos celulares ⁵⁸.

Nas regiões variáveis das cadeias leve e pesada dos anticorpos ocorrem as variações nas sequências de aminoácidos, mais especificamente em três regiões denominadas regiões hipervariáveis ou regiões determinadoras de complementaridade (CDR), que é o sítio de combinação do anticorpo. O fragmento que contém uma cadeia leve ligada aos primeiros domínios V e C de uma cadeia contém essa porção necessária para o reconhecimento antigênico sendo, portanto, denominada fragmento Fab (Figura 6) ⁵⁹.

Um antígeno é definido como qualquer substância que pode ser especificamente ligada por um anticorpo ou receptor de célula T. As macromoléculas capazes de ativar os linfócitos e gerar uma resposta imune são denominadas imunógenos. Geralmente, o imunógeno é maior do que a região ligante de antígeno de um anticorpo (Fab), pois esta molécula liga-se a uma porção específica do imunógeno, que é o determinante ou epítopo ^{57,60}.

As macromoléculas possuem múltiplos epítomos, que podem ser ligados a um anticorpo. Em proteínas, os epítomos formados por sequências de aminoácidos adjacentes são denominadas determinantes lineares. Eles podem estar acessíveis aos anticorpos, quando localizadas na superfície da proteína ou em alguma região conformacional estendida. Eles também podem estar inacessíveis na proteína em sua conformação nativa, sendo expostos em um evento de desnaturação. Já os determinantes conformacionais são sequências de aminoácidos não adjacentes que são espacialmente justapostos em proteínas enoveladas. As proteínas estão sujeitas a modificações pós-traducionais, como fosforilação ou proteólise, que podem produzir novos epítomos antigênicos, designado determinante neoantigênico (Figura 7) ⁵⁷.

Figura 7 – Tipos de determinantes antigênicos, em laranja, vermelho e azul: determinante conformacional, determinante linear gerado por desnaturação e neodeterminantes derivados de modificações pós-traducionais. Adaptado de Abbas *et al.* ⁵⁷.

As sequências de aminoácidos das CDRs são as principais responsáveis pela especificidade de ligação entre o anticorpo e um antígeno. Esse reconhecimento envolve uma ligação não-covalente reversível. A força de ligação entre um antígeno e um anticorpo é definida como afinidade de interação. As IgGs e as IgEs podem se ligar a um antígeno por dois sítios de ligação, exceto quando algum sítio sofre alguma restrição estérica ⁵⁹.

Quando ocorre a ligação de um antígeno, as funções efetoras do anticorpo são ativadas, que dependem da estrutura, localização anatômica e isotipo (classe) do anticorpo. Essa fase de reconhecimento ocorre pelos anticorpos expressos na membrana dos linfócitos B, para então iniciar a proliferação e secreção de anticorpos específicos ⁶¹.

As IgGs apresentam diversas funções efetoras, para o contexto deste trabalho vale destacar a opsonização de antígenos para fagocitose por macrófagos e neutrófilos, a ativação da via clássica do complemento, citotoxicidade celular dependente de anticorpo e ativação do sistema complemento na resposta inflamatória ^{61,62}.

Assim, o sistema imunológico é capaz de reconhecer e responder a antígenos externos, mas não a autoantígenos. A ausência de resposta específica do sistema imune aos autoantígenos é designada autotolerância imunológica. O mecanismo de autotolerância é mantido por um processo de seleção que elimina ou bloqueia a maturação de linfócitos potencialmente autorreativos, que é a tolerância central nos órgãos linfoides primários (timo e medula óssea) e por mecanismos que inativam os linfócitos autorreativos nos tecidos periféricos. A perda da autotolerância resulta no desenvolvimento de doenças autoimunes, que podem ocorrer por múltiplos fatores, como a herança de genes de suscetibilidade, principalmente os genes HLA associados às doenças autoimunes mediadas por linfócitos T, gatilhos ambientais derivados de infecções que estimulam as reações cruzadas entre os antígenos microbianos e os autoantígenos, danos aos tecidos por processos inflamatórios e fatores hormonais ^{17,55,63}.

3.5 Nanotecnologia

O estudo da nanotecnologia dedica-se à síntese, caracterização e aplicação de materiais nanoestruturados, por meio do controle de suas propriedades físico-químicas e manipulação da estrutura, principalmente da forma, tamanho e ordem espacial dos átomos e moléculas ⁶⁴.

Assim, a nanotecnologia compõe o conjunto de tecnologias que permite a manipulação da matéria em nanoescala (tipicamente inferior a 100 nanômetros), com o objetivo de explorar propriedades novas e aplicá-las ao desenvolvimento de produtos. Esse campo encontra aplicações em diversas áreas das ciências e das engenharias ⁶⁵.

Desde que o potencial de construção de sistemas híbridos foi compreendido, a nanotecnologia tem sido foco de pesquisas nas áreas biomédicas. Esses sistemas complexos assimilam as propriedades dos sítios de reconhecimento das biomoléculas com as propriedades eletrônicas, ópticas e magnéticas das nanopartículas ⁸.

Essa possibilidade surge da compatibilidade de tamanho entre os nanomateriais e os átomos e moléculas (Figura 8) ⁶⁶. Nanoestruturas como um nanotubo de carbono possui um diâmetro de aproximadamente 2 nm, os nanocristais semicondutores podem ter de 2 a 10 nm; comparativamente, o diâmetro de um átomo possui de 0,1 a 0,5 nm, uma proteína apresenta de 1 a 10 nm, uma molécula de ácido

desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*) possui cerca de 2 nm e um vírus apresenta um diâmetro de cerca de 20 a 400 nm. Assim, essa escala abriu oportunidades para o desenvolvimento de novas tecnologias ⁶⁷.

Figura 8 – Comparação de tamanho entre nanomateriais e moléculas em nanoescala. Modificado de Yokel e MacPhail⁶⁸.

Pesquisas na área de biomedicina têm sido realizadas nos últimos 30 anos⁶⁹. Essa abordagem requer a compreensão dos parâmetros da matéria: tamanho, morfologia, propriedades físico-químicas, propriedades de superfície e de interfaces com sistemas biológicos, em associação com testes *in vitro* para avaliação da toxicidade potencial desses nanomateriais ⁷⁰.

Em relação ao desenvolvimento de dispositivos aplicados ao diagnóstico e tratamento médicos, destaca-se a construção de nanoestruturas associadas aos ácidos nucleicos, por meio da ligação de oligonucleotídeos às nanopartículas de ouro (AuNPs) ⁷¹. As nanoestruturas magnéticas, especialmente de Au-Fe₃O₄, também apresentam multifuncionalidades para o diagnóstico, tratamento e liberação controlada de fármacos ⁷².

A liberação controlada de fármacos também foi explorada com nanopartículas lipídicas desenvolvidas para quimioterapia intravesical para câncer de bexiga. Nesta abordagem, as nanopartículas foram recobertas com um material muco-adesivo não

citotóxico para interagir com o urotélio e liberar o medicamento localmente, otimizando o seu tempo de residência na bexiga ⁷³.

O transporte e a liberação controlada de fármacos encapsulados ou conjugados a nanopartículas também podem ser aplicados ao SNC, no qual as nanoestruturas são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e atingir específica e seletivamente sub-regiões do encéfalo e da medula espinhal, que apresentem alguma alteração de desenvolvimento, traumática, inflamatória, infecciosa ou degenerativa ⁷⁴.

Ainda com relação ao SNC, a nanotecnologia possibilita outras aplicações. Nanopartículas contendo óxido de ferro, gadolínio e manganês podem ser utilizadas como agentes de contraste em análises de ressonância magnética, devido à sua maior área superficial, às suas propriedades magnéticas e baixa toxicidade ⁷⁴.

Dentro do contexto da nanotecnologia aplicada ao diagnóstico e tratamento, o termo "Nanoneurobiofísica" foi criado para definir uma área de pesquisa multidisciplinar que investiga os mecanismos moleculares envolvidos nas doenças desmielinizantes e neurodegenerativas do SNC, com a finalidade de desenvolver novos métodos de sensoriamento e tratamento ⁷⁵. O estudo das doenças desmielinizantes associada à nanotecnologia demanda a compreensão de fenômenos químicos, físicos e biológicos, bem como o conhecimento da neurociência, por isso requer o envolvimento multidisciplinar de profissionais dessas áreas da ciência e da medicina ⁷⁶.

3.6 Nanomateriais aplicados à detecção de biomoléculas

A aplicação médica da nanotecnologia demanda a compreensão dos fundamentos das propriedades dos nanomateriais, o delineamento e a padronização de protocolos para a obtenção de tecnologias com alto desempenho, que atendam às necessidades clínicas ^{77,78}.

Os imunoenaios têm sido extensivamente aplicados ao diagnóstico clínico de rotina, principalmente o ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para detecção de proteínas em amostras fisiológicas. Porém, essa técnica envolve várias etapas de lavagem, o que aumenta o tempo necessário para o diagnóstico. Ainda, esta técnica é dependente de marcação com fluoróforos moleculares, suscetíveis à fotodegradação, e de equipamentos relativamente caros

para as análises, limitando sua versatilidade. Outro problema comum surge com as descobertas de novos biomarcadores, que podem estar presentes em quantidades não detectáveis pelos métodos convencionais ou que são detectáveis após atingirem níveis críticos, determinantes da evolução de uma doença. Essas demandas impulsionaram o desenvolvimento de nanomateriais para sensoriamentos ultrasensíveis e de baixo custo ⁷⁹.

A redução do tamanho dos materiais dentro da nanoescala (1-100 nm) resulta no aumento da razão superfície/volume e apresentação de propriedades e fenômenos ausentes nos mesmos materiais em macroescala ⁸⁰.

As propriedades físicas dos nanomateriais podem ser modificadas quimicamente, para serem aplicados na transdução de sinais em sistemas de biossensoriamento. As vantagens desses sistemas incluem sinais de forte intensidade e múltiplos processos simples de síntese e funcionalização, que resultam em materiais gerados dentro da escala natural das moléculas biológicas ^{81,82}

As nanopartículas metálicas de ouro e prata exibem um fenômeno óptico que pode ser utilizado para detectar a presença de uma biomolécula de interesse. Esse fenômeno é decorrente da oscilação coletiva dos elétrons presentes na banda de condução do metal em uma frequência de oscilação que, quando se torna coerente com a frequência de radiação eletromagnética incidente, resulta na ressonância plasmônica de superfície, devido à formação de um dipolo na nanopartícula (Figura 9) ⁹.

Figura 9 – Oscilação plasmônica na superfície de nanopartículas de prata representada pela nuvem eletrônica gerada pela excitação da radiação eletromagnética incidente. Adaptado de Yasun *et al.* ⁸³.

A ressonância plasmônica das nanopartículas metálicas resulta em um pronunciado pico de absorção na região visível do espectro eletromagnético ⁸⁴. Assim, quando ocorrem interações químicas na superfície das nanopartículas em suspensão, há uma modificação na frequência de ressonância, que pode ser detectada por meio de análises de absorção e espalhamento de luz, acompanhada da alteração de cor da suspensão de nanopartículas, de forma visível a olho nu ^{10,85}.

Essas propriedades ópticas evidentes na região ultravioleta-visível (UV-Vis) do espectro eletromagnético associadas às diversas técnicas de síntese de nanopartículas de formatos e tamanhos variados e à possibilidade de ligação de biomoléculas e outros ligantes, revelam que as nanopartículas possuem as características essenciais para serem aplicadas como transdutores de sinais, de um evento químico em um sinal óptico ^{86,87}.

Dentro desse contexto, existem numerosos estudos dedicados ao uso de AuNPs, para investigação de interações bioquímicas, e poucos estudos com nanopartículas de prata (AgNPs), devido à sua maior instabilidade, decorrente de oxidação. Porém, em relação às propriedades ópticas, as AuNPs apresentam um pico de absorção assimétrico, enquanto que as AgNPs exibem um pico de absorção estreito e simétrico, o que é vantajoso para análise de alargamento e deslocamento de bandas de absorção plasmônica em sistemas de reconhecimento molecular. O efeito de ressonância plasmônica, que é a base do funcionamento de um nanobiossensor, é dez vezes maior para as AgNPs. Essas características das AgNPs a tornam mais sensíveis à presença de uma biomolécula e geram resultados ópticos mais evidentes, em relação às AuNPs ⁸⁸.

3.7 Nanopartículas de prata associadas às biomoléculas

As propriedades físico-químicas e antibióticas singulares das AgNPs derivam da redução do seu tamanho, com consequente aumento na razão superfície/volume ⁸⁹. Os métodos utilizados para a preparação das nanopartículas podem ser agrupados em duas categorias: *top-down* e *bottom-up*. A primeira abordagem parte de um bloco sólido (macro) para se obter nanoestruturas, por processos físicos, e a segunda abordagem compreende a construção das nanoestruturas átomo a átomo ou molécula

a molécula, de composição orgânica ou inorgânica, em um processo de síntese química (Figura 10) ⁹⁰.

Figura 10 – Métodos *top down* e *bottom up* utilizados para síntese de nanopartículas. Adaptado de Zahmakiran *et al.* ⁹¹.

Dentre as nanopartículas inorgânicas, as AgNPs possuem vasta aplicação nas áreas biomédica e industrial, principalmente no sensoriamento biológico, na liberação controlada de fármacos e no desenvolvimento de produtos com propriedades antimicrobianas ^{81,92}. Para essas aplicações, os métodos de síntese em fase líquida e *bottom-up* são os mais adequados, pois resultam em nanopartículas bem dispersas em meio líquido, ambiente essencial para interação com biomoléculas⁹³.

Em geral, o processo de síntese química baseia-se no uso de um precursor metálico, um agente redutor e um agente estabilizante. A formação dos coloides de prata provém da redução dos sais de prata em um estágio de nucleação e

desenvolvimento a partir dos núcleos. Essa formação pode ser controlada pelo ajuste dos parâmetros da reação, como a temperatura, o pH, os agentes redutores e estabilizantes e a escolha do precursor⁹³.

Após o processo de síntese, as propriedades ópticas exibidas pelas AgNPs tornam-as atrativas para a funcionalização de biomoléculas em suas superfícies para o delineamento de sistemas de detecção⁹⁴. Essa combinação é possível pela correspondência da escala de tamanho entre as nanopartículas e as macromoléculas orgânicas, como os polímeros, anticorpos, proteínas, peptídeos, micelas e vesículas⁹⁵. Assim como as biomoléculas sofrem mudanças estruturais, as nanopartículas dentro dessa dimensão de tamanho também sofrem alterações quando em interação com íons e biomoléculas, dentre elas a aglomeração, efeito importante para avaliar a detecção de um evento de ligação específica entre a molécula-alvo e a nanopartícula⁹⁶.

A funcionalização das nanopartículas com ligantes e biomoléculas altera as propriedades físico-químicas da superfície, para a organização das moléculas, a fim de possibilitar a interação com o analito-alvo. Em geral, esse processo resulta em uma maior solubilidade, o que otimiza a sua interação com o meio, visto que a presença de biomoléculas hidrofílicas melhora a biocompatibilidade das nanopartículas. Essa hibridização pode resultar em um nanobiossensor reativo para diversas aplicações de biossensoriamento⁹⁷.

A associação das nanopartículas com peptídeos resulta em conjugados com propriedades novas, a principal é a capacidade de direcionamento do nanobiossensor ao anticorpo com alta especificidade, e a sinalização observável e mensurável desse evento de ligação⁹⁸.

Os peptídeos são moléculas compostas de sequências de aminoácidos ligados por ligações peptídicas e são variantes simples de proteínas. Eles podem apresentar propriedades ácidas, básicas, hidrofílicas ou hidrofóbicas dependendo dos aminoácidos constituintes. Além disso, o uso de peptídeos possibilita o uso dos grupos funcionais presentes nos vinte aminoácidos essenciais encontrados no organismo⁹⁹. Dessa forma, apresentam características químicas e biológicas que podem ser exploradas na construção de nanopartículas funcionais¹⁰⁰.

Existem poucos estudos aplicados à funcionalização das AgNPs com peptídeos para sensoriamento, geralmente essas nanopartículas são aplicadas em estudos que exploram a sua atividade antimicrobiana. Um exemplo dessa aplicação, é a funcionalização do peptídeo glutathiona na superfície das AgNPs, processo que gerou um conjugado nanopartícula-peptídeo com forte ação bactericida e capacidade de penetração nas células bacterianas. Também existem estudos que descrevem o efeito do peptídeo no processo de síntese das nanopartículas de prata ⁹⁹.

Wang *et al.* ¹⁰¹ descreveram o desenvolvimento de um ensaio para detecção de um marcador de câncer (ciclina A2), no qual foi explorado o efeito de dispersão e aglomeração das AgNPs na presença do marcador e de uma sonda de peptídeo catiônico. Na ausência de ciclina A2, o peptídeo ligou-se às nanopartículas, causando aglomeração no sistema. Na presença de ciclina A2, a aglomeração das nanopartículas é reduzida de forma dependente da concentração do marcador. Essa resposta foi observável por mudança de cor da suspensão.

Há, no entanto, mais exemplos que se dedicaram ao estudo de detecção de proteínas, por meio da funcionalização de anticorpos na superfície das AgNPs. Em um estudo realizado por Tang, Dong e Ren (2010) com um biomarcador de câncer, o antígeno alfa-fetoproteína (AFP), foi demonstrado que a AFP apresentou alta afinidade pelo complexo anticorpo anti-AFP funcionalizado na superfície de AgNPs. Dawan *et al.* ¹⁰³ modificaram eletrodos com nanopartículas funcionalizadas com anticorpos específicos, o anti-soroalbumina humana, o anti-penicilina G e o anti-microcistina-LR, para avaliarem a sensibilidade e o limite de detecção de soroalbumina humana, penicilina G e a microcistina-LR, respectivamente. Foi demonstrado que há maior sensibilidade e menor limite de detecção para os eletrodos modificados com as AgNPs. Chen *et al.* ¹⁰⁴ funcionalizaram AgNPs com a estreptavidina por interação eletrostática, para o reconhecimento de aptâmeros biotinilados em meio de cultura celular. Os aptâmeros marcados com a biotina foram reconhecidos pela estreptavidina funcionalizada na superfície das AgNPs e, portanto, apresentaram potencial para serem aplicadas como sondas biocompatíveis em cultura de células.

Naja *et al.* ¹⁰⁵ funcionalizaram AgNPs com a proteína A, para a conjugação do anticorpo anti-*Escherichia coli*. Para atestarem a seletividade das nanopartículas

funcionalizadas, os pesquisadores realizaram dois ensaios de detecção, o específico contendo células bacterianas de *E. coli*, e o não específico, com células de *Rhodococcus rhodochrous*. Ao empregarem a técnica de espectroscopia Raman, os pesquisadores demonstraram que a suspensão de *R. rhodochrous* não foi adsorvida nas AgNPs funcionalizadas com o anti-*E.coli*, atestando a seletividade do nanobiossensor.

Os poucos estudos nessa área revelam que a aplicação de AgNPs em pesquisas dedicadas à detecção de biomoléculas específicas têm apresentado resultados promissores e, portanto, é um campo de investigação que apresenta potencial para contribuir com os avanços na área da biomedicina aplicada ao diagnóstico clínico e laboratorial de imunopatologias ¹⁰⁶.

3.8 Caracterização de nanopartículas

O delineamento de sistemas nanoestruturados em associação com biomoléculas depende da caracterização apropriada das propriedades físico-químicas dos nanomateriais, principalmente o tamanho, a carga superficial, morfologia e as etapas de funcionalização, para que ocorra a correta integração com sistemas biológicos ⁷⁷.

A interação entre esses sistemas ocorre por uma variedade de forças físicas e químicas, como forças eletrostáticas, ligação de hidrogênio, forças hidrofóbicas e por propriedades inerentes às biomoléculas, como as múltiplas conformações que elas podem assumir. Para compreender essas interações, são necessárias diversas estratégias de caracterização experimental e computacional ^{107,108}.

A primeira propriedade a ser considerada no desenvolvimento de um nanomaterial é o tamanho da estrutura, pois determina sua entrada nas células e nos órgãos e a travessia de barreiras fisiológicas, quando desenvolvido para liberação controlada de fármacos e, também determina as suas propriedades físico-químicas ¹⁰⁹. Ainda, estas propriedades estão relacionadas com a composição da superfície, com os grupos funcionais envolvidos na interação molecular e com o ambiente local que, somadas, determinam a estabilidade da suspensão, a aglomeração e a dissolução ^{110,111}.

As técnicas analíticas mais utilizadas para caracterizar e avaliar as propriedades físico-químicas e biológicas desses sistemas são a espectroscopia de absorção no UV-Vis, Difratometria de Raios-X (DRX), Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de *Fourier* (FTIR, do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e microscopia de força atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*) ¹¹².

A espectroscopia UV-Vis é utilizada para monitorar o processo de síntese e estabilidade das AgNPs que, devido suas características ópticas, interagem fortemente com a luz visível ¹¹³. O comprimento de onda de absorção das AgNPs depende do tamanho, da morfologia e de seu ambiente local, que alteram a ressonância plasmônica, facilmente observada pelos deslocamentos de bandas plasmônicas na região do UV-Vis ¹⁰.

A técnica de DRX é aplicada na caracterização microestrutural das nanopartículas. Ela permite caracterizar a cristalinidade do nanomaterial, bem como a identificação da fase cristalina formada durante o método sintético e o tamanho da partícula, sendo estes dados obtidos a partir da posição dos picos de difração ¹¹⁴.

A técnica de DLS é um método de análise *in situ* e não destrutivo, relevante para analisar a distribuição de tamanho das nanopartículas em suspensão, sua dispersão, estabilidade coloidal e carga superficial das nanopartículas. Outras técnicas podem ser aplicadas para análise de tamanho das nanopartículas, porém a vantagem do DLS é que este não demanda secagem, nem métodos de imageamento da amostra. Essa técnica realiza uma relação teórica entre o tamanho das nanopartículas e coeficientes de difusão rotacional e translacional ¹¹⁵. O tamanho obtido por esta técnica é geralmente maior do que o obtido por MET e AFM, devido à influência do movimento Browniano e da camada de solvatação das nanopartículas em suspensão ¹¹⁶.

A técnica de AFM é utilizada para caracterizar a morfologia e o diâmetro das nanopartículas por imageamento em modo contato intermitente "*tapping mode*". Pelo modo contato intermitente é possível realizar análises de amostras não rígidas sem danificá-las, pois, a ponta não permanece em contato com a amostra durante a varredura. Neste modo de operação, a haste (*cantilever*) sofre uma vibração gerada

por um sistema piezoelétrico e a ponta localizada na extremidade da haste oscila numa amplitude que varia de 20 a 100 nm e toca amostra de forma intermitente durante essa vibração. A vantagem da técnica é que não demanda métodos específicos para a preparação da amostra ¹¹⁷. A análise de MET também é empregada nas medidas quantitativas do diâmetro e distribuição do tamanho das nanopartículas e para obtenção da imagem de morfologia do material ⁷⁷.

O FTIR é utilizado para determinar os grupos funcionais presentes nas amostras em análise, sendo possível observar se as biomoléculas foram efetivamente integradas às nanopartículas, de forma a validar o processo de funcionalização ^{118,119}.

Devido a complexidade dos nanomateriais bioconjugados são, então, necessárias diversas técnicas analíticas, que permitam a caracterização precisa das propriedades físico-químicas dos sistemas, para que sejam devidamente desenvolvidos para as aplicações biomédicas, com a preservação da atividade biológica das moléculas envolvidas ¹¹².

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos peptídeos MOG 92-106 e MBP 85-99

A sequência MOG 92-106 foi sintetizada no Laboratório de Química de Peptídeos da USP, sob a responsabilidade da Profa. Dra. M. Terêsa Machini. O protocolo seguido foi de síntese manual em sistema *SPPS Discover™* (CEM Corporation, Charlotte/NC, EUA) por fase sólida via estratégia química 9-fluorenilmetoxycarbonila (Fmoc) à 60°C^{120,121}. Seguindo o mesmo método, foram realizadas as clivagens dos peptídeos contidos nas resinas, seguidas da desproteção total para resultar em peptídeos brutos para serem purificados. Os conteúdos peptídicos foram determinados pela análise do hidrolisado total do peptídeo purificado por um sistema *Dionex*. Os peptídeos MOG 92-106 foram obtidos com sucesso, com um grau de pureza de 90% e conteúdo peptídico de 77%. O peptídeo MBP 85-99 foi comercialmente obtido na empresa *Aminotech* - Pesquisa e Desenvolvimento. As informações acerca das propriedades físico-químicas dos peptídeos foram obtidas em um *software* online, que estima as propriedades a partir da sequência de aminoácidos fornecida pelo usuário (Tabela 1).

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas dos peptídeos (Resultados fornecidos pelo *software online* PepCalc.com).

Peptídeo	MOG 92-106	MBP 85-99
Sequência de aminoácidos	NH ₂ - Asp - Glu - Gly - Gly - Tyr - Thr - Cys - Phe - Phe - Arg - Asp - His - Ser - Tyr - Gln - COOH	NH ₂ - Glu - Asn - Pro - Val - Val - His - Phe - Phe - Lys - Asn - Ile - Val - Thr - Pro - Arg - COOH
Número de resíduos	15	15
Massa Molecular	1824,88 g/mol	1797,06 g/mol
Fórmula Química	C ₈₀ H ₁₀₅ N ₂₁ O ₂₇ S ₁	C ₈₄ H ₁₂₉ N ₂₃ O ₂₁
Carga em pH 7	-2 (ácido)	1.1 (básico)
Ponto isoelétrico	4.16	10.11
Solubilidade	Boa solubilidade em água	Baixa solubilidade em água

Resultados fornecidos pelo *software online* PepCalc.com

4.2 Obtenção dos anticorpos policlonais anti-MOG e anti-MBP

Uma amostra de cada sequência peptídica foi enviada ao Dr. Luís Antonio Peroni, diretor sócio da empresa Rheabiotech - Desenvolvimento, Produção e Comercialização de Produtos de Biotecnologia Ltda (Campinas, SP), para a produção dos anticorpos anti-MOG e anti-MBP policlonais em coelhos.

Nesta empresa foi realizada a produção do soro policlonal em dois coelhos da raça branca da Nova Zelândia, pesando entre 2,0 e 2,5 kg, com aproximadamente três meses de idade. Os animais foram imunizados com três doses subsequentes nos dias 0, 14 e 28 e uma dose reforço no dia 35. As doses foram administradas subcutaneamente contendo 0,5 mL da suspensão de antígenos com proteínas totais na quantia entre 200 e 400 µg. Os antígenos foram emulsionados na proporção 1:1 (v/v) com adjuvante de Freund completo na primeira imunização, e incompleto nas demais inoculações. Após a terceira dose, foi realizada uma sangria de prova (5 mL) e o soro imune foi avaliado em ELISA indireto usando o antígeno a 1 µg/mL na sensibilização e soro normal como controle negativo.

Após a dose de reforço, uma sangria branca foi realizada para obter o soro imune. Este soro é purificado por cromatografia de afinidade à proteína G (Proteína G Sefarose, GE *Healthcare*) e quantificado pelo método de *Bradford*.

4.3 Síntese de nanopartículas de prata

As AgNPs podem ser sintetizadas por diferentes métodos, como citado anteriormente. Neste trabalho, a preparação das AgNPs envolveu um método de redução química do nitrato de prata por citrato de sódio, também conhecido como Método do Citrato, proposto originalmente por Turkevich para síntese de AuNPs ¹²².

Para a formação de AgNPs, é necessário que ocorra uma reação de redução química da prata na presença de citrato de sódio, que cede elétrons aos cátions de prata (Ag^+), para a formação de átomos de prata (Ag^0) (Figura 11A). Os átomos resultantes dessa reação unem-se em um arranjo cristalino, formando as nanopartículas metálicas ¹²³.

Quando a solução de nitrato de prata atinge a temperatura de 90 °C, sob agitação intensa, o citrato é adicionado rapidamente, para a formação simultânea de núcleos de prata, segundo protocolo apresentado por Gorup *et al.* ¹²⁴. Essa formação

resulta diretamente na queda da concentração de cátions metálicos presentes em solução. A redução das espécies químicas altamente solúveis (AgNO_3) em menos solúveis (Ag^0) estabelece uma condição de supersaturação de núcleos metálicos coordenados por moléculas de água ⁹⁰.

No estágio de supersaturação, há a tendência de que os átomos de prata reduzam a sua área superficial, formem *clusters* e finalmente formem partículas (Figura 11B e 11C), que sofrem um crescimento uniforme até que seja estabelecida a condição de equilíbrio, quando a concentração de íons prata livres é menor do que na condição de supersaturação. O aumento da concentração de partículas coloidais eleva a tendência de choque e aglomeração entre as nanopartículas, devido às interações intermoleculares de *London* ou força de van der *Waals* ^{86,125}.

Figura 11 – Representação do processo de síntese de nanopartículas de prata pelo Método do Citrato. Adaptado de Agnihotri *et al.* ¹²⁵.

Para promover a estabilidade do sistema, são necessários mecanismos eletrostáticos e/ou estéreo, em que o equilíbrio entre as forças atrativas e forças repulsivas pode ser gerado, diminuindo a energia total do sistema ¹²⁶.

No caso da estabilização eletrostática, a intensidade da repulsão eletrostática *coulombiana* gerada pelo citrato deve superar as forças atrativas por interações de *London*, por meio da formação de cargas superficiais negativas adsorvidas nas nanopartículas ^{126,127}.

Após a adição do citrato de sódio é iniciada a contagem do tempo de reação na formação das nanopartículas, que se estende até o aparecimento da coloração amarelada na suspensão, o parâmetro referência para a interrupção da reação e resfriamento até a temperatura ambiente. O tempo de reação é considerado empírico, pois é dependente da observação da intensidade de coloração da suspensão ¹²⁴.

O tempo de reação estabelecido para este método foi de 12 min à 90 °C. O aquecimento posterior a esse tempo determinou uma coloração alaranjada da suspensão, o que indica a diminuição do espaço interparticular e a formação de agregados maiores ¹²⁸.

O nitrato de prata (AgNO₃, 99%, Labsynth, Diadema, São Paulo) e o citrato de sódio (C₆H₅O₇Na₃, 99%, Labsynth, Diadema, São Paulo) foram utilizados como recebidos e todas as soluções foram preparadas em água Milli-Q. Uma solução aquosa de 100 mL de AgNO₃ com concentração de 1 mmol/L foi preparada. Ao atingir a temperatura de 90 °C sob agitação intensa, uma solução de 1 mL de C₆H₅O₇Na₃ com concentração de 0,3 mol/L foi adicionada à essa solução. Após 12 min de reação, a solução incolor passa a apresentar uma coloração amarelada e, após essa etapa de nucleação, são adicionados 200 µL de uma solução aquosa de amônia (28%) para estabilização das AgNPs. Após essa etapa, a suspensão foi retirada do aquecimento, resfriada até a temperatura ambiente e armazenada à 4°C, ao abrigo da luz.

4.4 Script computacional baseado em *Tool Command Language* (TCL)

Anteriormente à funcionalização das nanopartículas com os peptídeos, foram realizados cálculos específicos para estabelecer a quantidade mínima de peptídeos necessária para estabilizar as AgNPs, de forma a impedir a sua aglomeração, levando em consideração a razão entre a área superficial das AgNPs com a concentração peptídica.

O cálculo da área superficial (A_{np}) foi realizado por meio da Eq. 1, levando em consideração a morfologia esférica e o raio das AgNPs, a partir de resultados de caracterização obtidos pela técnica de AFM.

$$A_{np} = 4\pi r^2 \quad (1)$$

O comprimento e a área superficial dos peptídeos foram obtidos computacionalmente em ambiente *Bash* ¹²⁹. Primeiramente, o comprimento dos peptídeos foi estimado pela aplicação combinada dos programas de visualização e manipulação de moléculas *Swiss-PDB viewer* ^{130,131}, para modelagem das estruturas

tridimensionais peptídicas a partir das sequências de aminoácidos, e *Visual Molecular Dynamics* (VMD) ¹³², para análise e caracterização das dimensões da estrutura 3D dos peptídeos. Posteriormente, com base nos cálculos da área da superfície disponível ao solvente (SASA, do inglês *solvent-accessible surface area*)^{133,134}, foi possível estimar a área da superfície dos peptídeos. Assim, a partir dos valores de área superficial das nanopartículas e dos peptídeos, foi possível estabelecer a razão nanopartícula/peptídeo.

Com base na massa molar do AgNO₃ utilizada para a síntese das AgNPs, foi possível obter a massa de prata utilizada no processo sintético. E, por meio da Eq. 2 a massa da AgNP foi calculada, utilizando o valor de densidade, ρ - *rho*, da prata (10490 kg/m³):

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (2)$$

Com a razão da massa total de prata utilizada na síntese das AgNPs e da massa de cada nanopartícula, é possível calcular o número de nanopartículas presentes na suspensão. A partir desse valor, pode-se calcular a concentração de nanopartículas no volume de interesse para o processo de funcionalização, pela Eq.3:

$$C = \frac{\text{número de partículas}}{\text{Volume da suspensão}} \quad (3)$$

Outro cálculo realizado foi o da massa de um peptídeo em gramas, a partir do valor da massa molecular em Daltons (Da), por meio da relação com o valor de unidade de massa atômica (u.m.a. = 1,66 x 10⁻²⁴ g). E, a partir do valor encontrado, pode-se calcular o número de peptídeos, por meio da razão entre a massa total de peptídeos obtida na síntese peptídica e a massa de um peptídeo.

Assim, a partir da razão nanopartícula/peptídeo encontrada e do valor do número de nanopartículas presentes na suspensão, pode-se calcular o número de peptídeos necessários para a funcionalização dessa quantidade de nanopartículas. Com o valor do número de peptídeos necessários disponível, é possível, por meio da

relação entre a massa de cada peptídeo e do número de peptídeos, encontrar a massa de peptídeos necessária para a funcionalização.

Com esse valor, pode-se finalmente obter o fator de diluição ($F_{\text{diluição}}$) necessário para atingir a concentração mínima de peptídeos necessária para a cobertura das nanopartículas presentes na suspensão, por meio das Eqs. 4.1 e 4.2:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad (4.1)$$

$$F_{\text{diluição}} = \frac{V_2}{V_1} \quad (4.2)$$

Para automatizar as etapas deste cálculo, foi elaborado um *script* computacional baseado em *Tool Command Language* (TCL) ^{135–137} em parceria com a doutoranda e bolsista, Jéssica Cristiane Magalhães Ierich (Processo FAPESP: 2014/12082-4), atuante na equipe de teoria computacional do Grupo de Pesquisas em Nanoneurobiofísica (GNN). Neste *script*, o usuário deve fornecer dados característicos das nanopartículas de trabalho, com relação às dimensões e processo de síntese, bem como características dos peptídeos a serem utilizadas na funcionalização e dados experimentais de diluições envolvendo a solução estoque de peptídeos.

Os dados fornecidos pelo usuário, referidos como conjunto de parâmetros de entrada (*input parameters*), são descritos por: (i) raio estimado das nanopartículas em nanômetros; (ii) quantidade de nitrato de prata usada no processo de síntese das nanopartículas em gramas; (iii) área superficial dos peptídeos de trabalho em nanômetros quadrados, (iv) massa molecular dos peptídeos de trabalho em Daltons, (v) quantidade de peptídeos diluída na solução estoque em gramas, (vi) volume da suspensão em mililitro e (vii) volume inicial da solução estoque disponível para a diluição em μL .

Aplicando os dados de entrada de acordo com as aproximações e equações supracitadas, o *script* computacional, assim, gerará uma série de parâmetros de saída (*output parameters*). O conjunto de *output parameters*, é composto por: (i) área superficial da nanopartícula em nanômetros quadrados; (ii) razão entre a área do peptídeo e a área das nanopartículas; (iii) a massa de prata utilizada no processo de síntese das nanopartículas, em gramas; (iv) o volume de uma nanopartícula em metros cúbicos; (v) a massa individual da nanopartícula em gramas; (vi) o número de

nanopartículas sintetizadas; (vii) a concentração de nanopartículas em 1 mililitro de solução; (viii) a massa de peptídeo a ser funcionalizada, em gramas; (ix) o número de peptídeos na solução estoque; (x) o número de peptídeos necessários para cobrir todas as nanopartículas; (xi) a massa de peptídeos utilizados no recobrimento das nanopartículas em gramas; (xii) o volume final de da diluição em mililitros; e, finalmente, (xiii) o fator de diluição a ser utilizado pelo usuário. Desta forma, a diluição a partir da solução estoque adequada à concentração ideal de peptídeos para funcionalização das nanopartículas pode ser delineada computacionalmente. Em geral, a concentração de peptídeo deve exceder até dez vezes a quantidade teórica para cobertura de superfície total obtida com os cálculos ¹³⁸.

4.5 Funcionalização das nanopartículas com os peptídeos MOG 92-106 e MBP 85-99

As AgNPs foram primeiramente modificadas com ácido 11-mercaptoundecanoico (11-MUA 95% Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA) via ligação Ag-S. Para isso, 350 µL de 0,025 mM de 11-MUA em etanol foram adicionados a 3mL de AgNPs (0,02 mg/mL) e a solução foi homogeneizada por 30 s. Essa mistura foi mantida em temperatura ambiente por 2 h. Para a funcionalização das AgNPs modificadas, foram adicionados dois agentes reticulantes, 325 µL de 0,04 mM de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC ≥97% Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA) e 325 µL de 0,3 mM de N-hidroxissuccinimida (NHS 98% Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA) à solução de AgNPs-11-MUA. Essa mistura foi mantida por 40 min em temperatura ambiente, para formar amida nos grupamentos carboxila do 11-MUA. Posteriormente, foi adicionada 1 mL da solução de peptídeo, diluído de acordo com o fator de diluição encontrado no *script* computacional (1:1000). As nanopartículas funcionalizadas foram mantidas em reação por 2 h em temperatura ambiente e armazenadas à 4 °C ¹⁰².

4.6 Microscopia de força atômica (AFM)

O microscópio de força atômica SOLVER Nano - NT-MDT foi utilizado para caracterizar a morfologia e o diâmetro das AgNPs por meio da obtenção de imagens em modo contato intermitente "*tapping mode*". Foram utilizadas pontas de AFM de

nitreto de silício (constante de mola 1,7 N/m, raio ~10 nm, frequência de ressonância 90kHz e superfície reflexiva de ouro, modelo AN-NSG03, NT-MDT). Para essa análise, 50 µL de AgNPs, diluídas em água Milli-Q em uma proporção de 1:10, foram depositadas sobre uma superfície de mica com dimensão 15x15 mm (Ted Pella Inc, Redding, California, USA), previamente clivada e esterilizada por 20 min em equipamento de emissão de luz ultravioleta e ozônio, ProCleaner™ modelo UV.PC.220 Plus (BIOFORCE Nanosciences, Ames, Iowa, USA). As micas contendo a suspensão de nanopartículas foram mantidas em um dessecador até total secagem, para a posterior obtenção das imagens do filme formado sobre a mica. A caracterização com a análise topográfica das AgNPs foi realizada com o *software* da Nova-Px 3.2.5 - NT-MDT.

4.7 Difractometria de raios-X (DRX)

A caracterização microestrutural das AgNPs foi realizada através da técnica de DRX (XRD-6100, Shimadzu). Para esta análise, 10 camadas de suspensão coloidal de AgNPs de 50µL foram depositadas e secas sobre uma lâmina de vidro lisa para microscopia, a fim de separar a fase sólida. O filme formado foi analisado por DRX no modo θ -2 θ , com ângulo θ variando entre 30 e 80°.

4.8 Microscopia confocal à laser (MCL)

Neste trabalho foram geradas imagens bidimensionais de amostras de AgNPs para análise da intensidade de fluorescência emitida. Após a construção dessas imagens, regiões de interesse limitadas em 3 µm² foram construídas sobre as imagens, para a formação de gráficos de intensidade de fluorescência a partir da contagem de *pixels* por nível de intensidade de valores de tons de cinza, que é a cor real dos *pixels* gerados no MCL. As cores exibidas nas imagens geradas (verde e vermelho) foram definidas pelo usuário, para melhorar a visibilidade dos detalhes.

Uma alíquota de 50 µL de cada amostra foi depositada sobre lamínulas de vidro e observadas no microscópio CMI6000 em modo confocal à laser TCS SP8 (Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Alemanha). Por meio do *software* LAS X, as imagens das amostras foram analisadas em modo PMT (*photomultiplier tube*),

com as linhas de laser 552 à 10% e 638 à 15% para emissão, e para a excitação das amostras o laser 405 à 5% ultravioleta foi utilizado.

4.9 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo reflectância total atenuada (ATR-FTIR)

A técnica de ATR-FTIR foi empregada para identificar os grupos funcionais presentes nas amostras referentes às etapas de funcionalização das AgNPs com os peptídeos e a interação com os anticorpos específicos. Os espectros foram obtidos em um equipamento da *Thermo Scientific Nicolet™ IR 200*, num intervalo espectral de 4000 e 400 cm^{-1} , com 256 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} . As amostras foram preparadas sobre placas de monocristais de silício dopado tipo n, previamente limpos com acetona, para remoção de resíduos lipídicos. Foram depositadas 10 camadas de cada amostra, com volume de 50 μL , e mantidas em dessecador até secagem total dos filmes.

4.10 Espalhamento dinâmico de Luz (DLS) e potencial zeta

A técnica de DLS foi aplicada às medidas *in situ* de tamanho e distribuição de tamanho de nanopartículas em suspensão. As distribuições de tamanho das AgNPs e das etapas de funcionalização foram obtidas por medidas realizadas à 25°C, em triplicata, utilizando o equipamento Malvern Spectrometer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK) pertencente à Embrapa em São Carlos-SP. Neste mesmo equipamento, os potenciais zeta das suspensões de AgNPs e das etapas de funcionalização foram medidos à 25 °C.

4.11 Espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)

A espectrofotometria no UV-Vis foi aplicada ao acompanhamento da síntese das AgNPs, do processo de funcionalização com os peptídeos e da interação com os anticorpos. As leituras de absorção de luz pelas suspensões foram efetuadas em um equipamento de espectrofotometria (*Shimadzu UV-Vis-NIR 3600*) na região ultravioleta-visível do espectro eletromagnético (200 - 800 nm), com intervalo de leitura de 0,1 nm.

4.12 Espectroscopia de força atômica (AFS)

O objetivo da aplicação da técnica de AFS foi o de quantificar as forças de adesão entre as AgNPs funcionalizadas com os peptídeos imobilizadas na ponta de AFM e a solução de anticorpos funcionalizados na superfície da mica. As forças de adesão do sistema controle foram geradas pela interação entre as AgNPs não funcionalizadas e a mica funcionalizada com anticorpo.

O equipamento utilizado foi um AFM Veeco, modelo NanoscopeV™ (Veeco Instruments Inc, Plainview, New York, USA), sistema Multimode-VS, com pacote PicoForce, para medidas de espectroscopia de força. As curvas de força foram tratadas com o *software Nanoscope Analysis*. O AFM foi preparado para as medidas em ambiente líquido, utilizando-se uma célula fluida. Foi obtida a constante de mola para cada ponta utilizada, e o tempo de contato ponta-amostra (tempo de interação) foi de 20 segundos. Foram obtidas 150 medidas de adesão para cada sistema analisado.

As micas utilizadas apresentavam dimensão de 15x15 mm (Ted Pella Inc, Redding, California, USA) e as pontas de AFM de nitreto de silício triangulares (constante de mola 0.24N/m, raio ~20 nm, frequência de ressonância 56kHz e superfície reflexiva de ouro, modelo DNP-10, Bruker Nano Inc.). Anteriormente à funcionalização, a mica foi clivada, a fim de retirar impurezas inorgânicas. As pontas de AFM e mica foram esterilizadas em UV e ozônio no equipamento ProCleaner™ (UV.PC.220, Bioforce Nanosciences, Ames, Iowa, USA).

As superfícies das pontas e das micas foram silanizadas pela vaporização de 40 µL de 3-aminopropiltrietoxissilano (APTES 98% Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA), e 40 µL de trietilamina (99%, Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA), seguindo o protocolo estabelecido por Etchegaray *et al.* ¹³⁹. Após a silanização, as pontas foram imersas na suspensão de AgNPs funcionalizadas com os peptídeos e, no sistema controle, imersas na suspensão de AgNPs modificadas com 11-MUA. E as micas foram imersas em solução de proteína A recombinante (Thermo Scientific Pierce™), que interage especificamente com a região Fc da IgG, de forma a orientar a imobilização dos anticorpos na mica, deixando a região de interação (Fab) livre para ligação com o peptídeo imobilizado na ponta de AFM ¹⁴⁰.

Esses testes foram realizados em parceria com a doutoranda e bolsista Pâmela Soto Garcia (Processo nº 2014/21530)

4.13 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As pontas utilizadas para obtenção das curvas de força foram caracterizadas por imagem em MEV Hitachi TM 3000 Table Microscope™, para análise da integridade das pontas após a funcionalização. Para a análise, as pontas foram fixadas em fita adesiva de carbono, colocadas em câmara a vácuo no equipamento, e observadas em diversos aumentos.

4.14 Transiluminador UVB

As análises de variação de cor das suspensões de nanopartículas em resposta à presença de ligantes específicos foram realizadas por meio de registro fotográfico em um transiluminador UVB Loccus Biotecnologia LTB-20X20 HE.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Processo de síntese das nanopartículas de prata

As propriedades eletrônicas e ópticas das AgNPs são determinadas pelo seu formato e tamanho. As nanopartículas metálicas, como o ouro, a prata e o cobre, apresentam colorações intensas, que estão ausentes em sua forma sólida, e que surgem devido ao fenômeno de ressonância plasmônica de superfície. Nas AgNPs, a formação das nanopartículas é evidenciada pela coloração amarela da suspensão. Associado à cor, as AgNPs apresentam um pico de absorção característico decorrente do modo de oscilação dos elétrons em suas superfícies ¹⁴¹. A espectroscopia UV-Vis revelou a formação de AgNPs esféricas pela apresentação de um único pico característico máximo em 421-425 nm. Nanopartículas esféricas apresentam apenas um pico de absorção máximo ¹⁴². A cor da suspensão e o valor de absorção máximo apresentados na figura 12 são os parâmetros padrão para todas as análises comparativas subsequentes de funcionalização e interação molecular com os anticorpos.

Figura 12 – Apresentação do espectro de absorbância plasmônica no UV-Vis característico de AgNPs e da cor padrão da suspensão utilizada nos experimentos.

Além do citrato, a amônia também foi utilizada na estabilização eletrostática, pois ela impede a redução dos íons prata, responsáveis pelo crescimento por

aglomeração das nanopartículas tanto sob aquecimento, quanto em temperatura ambiente, essa estabilização aprimorada permite que a suspensão permaneça estável por um longo tempo de armazenamento sem sofrer mais aglomeração e precipitação¹²⁴.

A diferença de estabilidade das AgNPs sintetizadas apenas com o uso do citrato como agente estabilizante e das AgNPs sintetizadas com o uso do citrato e da solução aquosa de amônia, como agentes estabilizantes, foi observada (Figura 13).

No primeiro caso, 72h após a síntese, a suspensão já apresentava aglomeração, evidenciada pela coloração acinzentada da suspensão, e em 96 h houve a precipitação total da prata. No segundo caso, com a adição da amônia, a suspensão permaneceu estável e apresentou a mesma coloração obtida em T₀ após o processo de síntese. As duas amostras foram mantidas sob as mesmas condições, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A partir desse resultado, a síntese com adição de amônia foi escolhida como melhor protocolo a ser seguido nos experimentos deste trabalho, segundo o protocolo apresentado por Gorup *et al.*¹²⁴.

Figura 13 – Síntese de nanopartículas de prata pelo método do citrato, sem e com adição de solução de amônia (28%) à suspensão durante o processo de síntese. As imagens representam a coloração das nanopartículas logo após o processo de síntese (T₀), 72 h e 96 h após a síntese. As amostras foram armazenadas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

As propriedades ópticas das AgNPs incluem a oscilação coletiva de elétrons condutores, que é a ressonância plasmônica de superfície, juntamente com a fotoluminescência ou fluorescência ¹⁴³. As AgNPs podem atuar como fluoróforos estáveis, pois ao interagirem com a luz incidente produzem um amplo espectro de absorção e emissão de fluorescência ¹⁴⁴. Quando a suspensão de nanopartículas está em condição de temperatura ambiente, os elétrons geralmente ocupam os níveis de energia do estado eletrônico mais baixo (estado fundamental). A excitação gerada pelo laser ultravioleta promoveu uma intensa absorção de luz pelas nanopartículas, cujos elétrons passaram a ocupar níveis de energia mais altos e o excesso de energia foi perdido na forma de fótons, cuja fluorescência foi visualizada em faixas de comprimento de onda maiores do que a de absorção ¹⁴⁵.

As propriedades de fluorescência das amostras foram analisadas pela técnica de MCL. Essa técnica aplica um único laser para excitar a amostra, neste caso autofluorescente, e detecta a fluorescência do material utilizando filtros ópticos para selecionar os comprimentos de onda relevantes ¹⁴⁶.

A excitação das nanopartículas por MCL ocasiona a sua deposição no substrato na área de foco do laser, permitindo a obtenção de imagens com boa resolução. O processo de deposição depende do comprimento de onda do laser de excitação. Foi observado que esse processo ocorria com a linha de laser 405 nm ultravioleta, o que corrobora a importância da ressonância plasmônica das AgNPs para esse processo. A emissão máxima é observada no intervalo de 560-610 nm e um deslocamento da emissão ao infravermelho (720-780 nm) é observado para as partículas depositadas no substrato, que sofreram aglomeração por atração entre as partículas e com o substrato de vidro ¹⁴⁷.

Na configuração de trabalho explicada no parágrafo anterior foram geradas as imagens apresentadas na figura 14. Em A e em B estão apresentadas as imagens referentes à captura da fluorescência das AgNPs, nos intervalos espectrais em que se observam as maiores intensidades de fluorescência, 560-610 e 720-780 nm, apresentados nas colorações arbitrárias verde e vermelho, respectivamente.

Figura 14 – Imagens de MCL de (A) AgNPs não funcionalizadas com leitura em 560-610nm e em (B) com leitura em 720-280. As regiões de interesse marcadas nas imagens apresentam área de $3\mu\text{m}^2$ e foram selecionadas para gerar gráficos de intensidade de fluorescência. As barras de escala apresentam $10\mu\text{m}$.

A construção das imagens no MCL são geradas na escala do cinza, na qual cada pixel é formado entre 0 e 255, ou seja, do preto ao branco ¹⁴⁶. A intensidade de fluorescência observada nas imagens pode ser quantificada por esses valores da escala de cinza em forma de gráfico, em que o eixo X representa a escala do cinza e o eixo Y, a contagem de *pixels* na imagem. No caso da amostra analisada, a maioria das informações ficou concentrada no intervalo de 0 a 100, por isso a figura 15 apresenta a análise dos tons de 0-100 no eixo X.

A figura 15 refere-se às imagens 14A e 14B das AgNPs. Observa-se que há uma distribuição homogênea de fluorescência nos dois intervalos de comprimentos de onda trabalhados. A sobreposição dos histogramas refere-se à colocação das AgNPs nos dois intervalos de comprimento de onda, ou seja, os *pixels* refletem a emissão de fluorescência das mesmas nanopartículas ¹⁴⁸.

A partir da análise das imagens bidimensionais das amostras e das informações em gráfico, é possível observar que esta técnica permitiu, a partir a análise de intensidade de fluorescência, que a excitação das AgNPs ocorre em comprimento de onda próximo à sua ressonância plasmônica e que a emissão de fluorescência depende do tamanho dos aglomerados.

Figura 15 – Intensidade de fluorescência das AgNPs não funcionalizadas, a partir da contagem de pixels em valores de tons de cinza, respectiva às áreas de interesse marcadas nas imagens bidimensionais geradas no MCL. A leitura realizada no intervalo de 560-610 nm está representada em verde e a leitura em 720-280, em vermelho.

5.2 Caracterização estrutural das nanopartículas de prata

Após a finalização do processo sintético das AgNPs e a caracterização da cor e absorbância da suspensão, esta foi submetida à análise de morfologia e diâmetro das nanopartículas constituintes. Para esta análise, foi empregada a técnica de AFM, em modo contato intermitente.

A AFM é uma técnica versátil, que pode ser operada em diferentes modos, de acordo com as características da amostra a ser analisada. O modo contato intermitente é o mais apropriado para a obtenção de imagens de nanopartículas adsorvidas em substrato de mica, pois a haste oscila próximo à amostra, com um regime repulsivo aplicado à oscilação, possibilitando que a ponta toque na amostra, sem que mantenha contato contínuo durante a varredura, o que impede que a amostra seja arrastada e danificada. Este modo de operação permite a obtenção de imagens de altura com boa resolução lateral ¹⁴⁹.

Neste modo de operação, a interação entre a ponta e amostra resulta em uma mudança na amplitude de oscilação da haste. O mecanismo de retroalimentação do equipamento mantém a amplitude de oscilação da haste constante durante a varredura da amostra, por meio do ajuste da distância, no eixo z, entre a ponta e a amostra. Dessa forma, a altura da nanopartícula é resultante da diferença entre a interação da ponta com o substrato limpo e com o local onde existe uma nanopartícula que, por apresentar morfologia esférica, essa medida é correspondente ao diâmetro da nanopartícula ¹⁵⁰.

A figura 16A apresenta a imagem bidimensional das AgNPs, na qual observa-se uma uniformidade na distribuição de tamanho das nanopartículas. A síntese de nanomateriais com distribuição estreita de tamanho tem sido considerada importante para as propriedades ópticas e físico-químicas de uma suspensão coloidal. Os métodos que geram nanopartículas com baixa dispersão em meio aquoso e com tamanhos heterogêneos são considerados desvantajosos para aplicações tecnológicas, pois dificultam o delineamento de protocolos de funcionalização química e biológica apropriados ¹⁵¹. Assim, o método sintético resultou na uniformidade de tamanho das nanopartículas em meio aquoso, o que é vantajoso para aplicações biomédicas ¹⁵². Na figura tridimensional 16B, é possível visualizar a morfologia esférica das AgNPs e a

altura máxima em 10 nm. Considerando a morfologia esférica, pode-se afirmar que a altura e o diâmetro são correspondentes ¹⁵⁰.

Figura 16 – Imagens de altura bidimensional (A) e tridimensional (B) da amostra de AgNPs obtidas por AFM, em uma área de 1 μm² de varredura.

A medida de diâmetro e a informação topográfica das AgNPs são importantes para a compreensão das propriedades ópticas da nanoestrutura ^{153,154}, e essenciais no delineamento de um protocolo de funcionalização adequado às características da superfície da nanopartícula de trabalho, para a imobilização apropriada dos grupos químicos e das moléculas para atuarem num sistema de biossensoriamento ¹⁵⁵.

Os padrões de difração de raios-X das AgNPs foram investigados por DRX e apresentados no difratograma da figura 17. Os picos estão localizados em 38,12° (2θ), 44,26° (2θ), 64,46° (2θ) e 77,48° (2θ). O intenso pico de difração observado em 38,12° (2θ) corresponde ao plano (111) da estrutura cristalina cúbica de face centrada da prata, o que indica que as partículas são compostas de prata pura, e não de óxido de prata. As bandas mais largas observadas em 44,26° (2θ), 64,46° (2θ) e 77,48° (2θ), correspondem aos planos (200), (220) e (331) da prata, respectivamente. Os outros picos observados são decorrentes de impurezas cristalográficas de sais mistos gerados dos elementos utilizados no processo sintético ¹⁵⁶.

A estimativa do diâmetro dos cristais de nanopartículas foi realizada pela equação de Debye-Scherrer:

$$D = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta} ,$$

onde, D = diâmetro do cristalito,

k = constante

λ = comprimento de onda dos raios-X

β = largura de meio pico do ângulo de Bragg 2θ

Foi utilizada a largura do plano (111) na fórmula apresentada:

$$k = 0,9$$

$$\lambda = 1,5406 \times 10^{-10}$$

$$\beta = 0,36789^\circ \times \pi/180 = 6,41 \times 10^{-3}$$

$$\text{Difração do ângulo de Bragg } 2\theta = 38,11$$

$$\theta = 19,055$$

$$D = 0,94 \times 1,54 \times 10^{-10} / 6,41 \times 10^{-3} \times \cos(19,055)$$

$$D = 23,8 \text{ nm}$$

O diâmetro obtido por essa técnica é maior do que o resultado observado nas imagens de AFM. Isso ocorre porque o espesso filme formado para a análise de DRX causa a deposição de aglomerados policristalinos, evidenciado pela maior intensidade do pico (111). A coalescência das nanopartículas durante a formação do filme gera partículas maiores, com o crescimento dos cristalitos em todas as direções, especialmente no plano (111) ¹⁵⁷.

Figura 17 – Difratograma de raios-X de AgNPs sintetizadas por método de redução química.

5.3 Funcionalização covalente AgNPs-peptídeo

Anteriormente à funcionalização das AgNPs com os peptídeos MOG 92-106 e MBP 85-99, foram realizados cálculos específicos para estabelecer a quantidade mínima de peptídeos apropriada para funcionalizar as AgNPs, de forma a impedir a sua aglomeração, levando em consideração a razão entre a área superficial das AgNPs com a concentração peptídica ¹⁵⁸. A cobertura completa das nanopartículas corresponde à concentração máxima de peptídeos possível de ser funcionalizada na área superficial disponível. Para garantir a saturação completa das AgNPs, a concentração de peptídeos utilizada excedeu dez vezes o valor teórico obtido ¹³⁸.

No *script* desenvolvido, os dados característicos das AgNPs, com relação às dimensões e o processo de síntese, bem como as características da MOG e da MBP foram aplicados aos dados de entrada. Dentre os parâmetros de saída fornecidos pelo *script*, o fator de diluição para atingir a concentração ótima de peptídeos para a funcionalização foi gerado (Tabelas 2 e 3). Desta forma, a diluição a partir da solução estoque adequada à concentração ideal de peptídeos delineada computacionalmente foi utilizada como base para a realização dos processos de funcionalização.

Tabela 2 – Parâmetros de entrada (*input parameters*) e de saída (*output parameters*) do script computacional desenvolvido para obter o fator de diluição ótimo para a funcionalização das nanopartículas de prata com o peptídeo MOG 92-106

```

Peptide MOG
>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>> INPUT PARAMETERS<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
Estimated nanoparticle radius: 5 nm
Amount of AgNO3 used in nanoparticle synthesis process: 0.017 g
Estimated peptide surface area: 16.2 nm2
Peptide (or target molecule) molecular weight: 1824.89 Da
Amount of peptide (or target molecule) used in the stock solution:
1.47 g
AgNPs suspension volume: 2 mL
Initial volume of the stock solution determined for dilution: 1 uL
-----
-->>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>> OUTPUT PARAMETERS<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
Surface nanoparticle area: 3.1e+02 nm2
Peptide and NP area ratio: 1.9e+01
Ag mass used in NP synthesis process: 1.1e-02 g
Nanoparticle volume: 5.2e-25 m3
Nanoparticle individual mass: 5.5e-18 g
Number of nanoparticles: 2.0e+15 NPs
Concentration of nanoparticles in 1 mL of solution: 9.8e+17 particles
Peptide to be functionalized mass: 3.0e-21 g
Number of peptides in the stock solution: 4.9e+20
Number of peptides necessary to cover all the NPs: 3.8e+16

```


esperado, uma vez que o tamanho obtido por esta técnica é geralmente maior do que o obtido por MET e AFM, devido à influência do movimento Browniano das nanopartículas em suspensão ¹¹⁶. As AgNPs apresentam um tamanho médio de 43,8 nm, revelado pelo segundo pico do gráfico. O outro pico observado em 4,8 nm representa nanopartículas menores que podem ter tido a coalescência dos *clusters* (50-100 átomos ou 1-1,5 nm) afetada pela variação na taxa de redução e de nucleação. Outro efeito possível pode ser devido aos produtos de oxidação dos ânions de citrato (acetonedicarboxílico e ácido itacônico) que podem ter sido adsorvidos na superfície das AgNPs, afetando a formação de nanopartículas maiores. Assim, esse pico menor apresenta uma distribuição de tamanho mais estreita, com aglomerados menores de AgNPs. No caso do pico maior (43,8 nm), os *clusters* de prata continuaram a sofrer coalescência e formaram aglomerados maiores de AgNPs¹²⁶. Esse valor médio é o referencial para análise da variação do diâmetro nas etapas de funcionalização.

Figura 18 – Distribuição de tamanho da suspensão de nanopartículas de prata obtida pela técnica de DLS.

A ligação de biomoléculas às superfícies de nanopartículas inorgânicas deve considerar os parâmetros químicos e biológicos que afetam a cinética da reação. Dentre os métodos aplicados para a reação cruzada entre biomoléculas e

nanopartículas, o mais usualmente empregado baseia-se na reação de acoplamento EDC/NHS ¹⁶⁰.

Primeiramente, é realizada a modificação química da superfície das AgNPs com 11-MUA, que contém um grupo tiol, que interage fortemente com superfícies metálicas e apresenta, na outra extremidade, um grupamento carboxila, que serve como sítio de ligação para o peptídeo ¹⁶¹. A modificação química das AgNPs com monocamadas automontadas de alcanotiois, como o 11-MUA, possibilita a utilização das nanopartículas como plataformas para a ligação de diversas biomoléculas, para reconhecimento molecular em sistemas de sensoriamento ¹⁶².

O ácido carboxílico desprotonado em pH levemente alcalino das AgNPs (~8,6) resulta na maior estabilidade eletrostática e, conseqüentemente, menor aglomeração no sistema coloidal. Em pH abaixo de 5, a maior parte dos grupos carboxílicos estarão protonados, o que levaria à aglomeração ¹⁴³. Assim, o diâmetro hidrodinâmico das AgNPs modificadas com 11-MUA diminui para 28 ± 8.6 nm, devido à dispersão causada pela repulsão eletrostática das carboxilas desprotonadas (Figura 19). A adição de 11-MUA causa a adsorção competitiva entre os íons citrato e mercapto, sendo este em maior concentração para a substituição completa da monocamada estabilizante de citrato ¹⁶³.

Figura 19 – Variação no diâmetro hidrodinâmico em cada etapa de funcionalização das AgNPs com o peptídeo MOG 92-106 e MBP 85-99.

O EDC é um agente de acoplamento que reage com o terminal carboxila do 11-MUA e forma um intermediário reativo, o *o*-acilisourea, que reage com uma amina primária para formar uma ligação amida. Na presença de solventes polares,

esse intermediário pode ser clivado pelos átomos de oxigênio da água, liberando isoureia, o que levaria à inativação do EDC. Por esse motivo, o NHS é utilizado com conjunto com o EDC, para formar um éster ativo com o grupamento carboxila das AgNPs modificadas. Esse intermediário formado é mais hidrofílico e estável, sendo hidrolisado mais lentamente em água, o que é interessante para que ocorram as reações de acoplamento. Na presença de um grupamento amina da proteína, o éster intermediário é rapidamente hidrolisado, permitindo a ligação amida entre a proteína e a nanopartícula modificada (Figura 20) ¹⁶¹.

Figura 20 – Reação de acoplamento de proteína por EDC-NHS no processo de funcionalização de nanopartículas modificadas com 11-MUA. Adaptado de Thermo Fischer Scientific. Disponível em:<www.thermofisher.com>.

O complexo EDC/NHS causou um aumento no diâmetro hidrodinâmico para 43 ± 1.8 nm. Esse aumento ocorre porque a adição de EDC e NHS promove a conversão dos grupos carboxílicos em tioésteres, que resulta no aumento da aglomeração no sistema, indicado pela variação no diâmetro hidrodinâmico ¹⁶⁴.

A funcionalização covalente com os peptídeos aumenta o diâmetro hidrodinâmico para 44 ± 3.6 nm (MOG) e 141 ± 10.7 nm (MBP). A ligação dos peptídeos na superfície funcionalizada das nanopartículas causa mudanças na conformação dos peptídeos em suspensão e, a maior concentração peptídica na superfície das nanopartículas promove a sua aglomeração ¹⁶⁵. A distribuição em

aglomerados maiores de nanopartículas pode ser observada na caracterização por AFM nas figuras 21A e 21B. Observa-se uma nítida diferença na distribuição de tamanho das AgNPs, que não apresenta-se uniforme, como nas nanopartículas não funcionalizadas e, a suspensão apresenta colóides com diâmetros maiores, apresentado por valores de altura superiores a 100 nm.

Figura 21 – Imagem bidimensional da altura do filme de AgNPs-MBP em uma área de $10\mu\text{m}^2$ (A) e imagem tridimensional da mesma amostra (B) obtidas por AFM

A aglomeração foi mais pronunciada para o sistema funcionalizado com MBP, devido ao ponto isoelétrico (pI) do peptídeo (10,11). Quando o pH da suspensão ($\sim 8,5$) é mantido abaixo do pI do peptídeo, as AgNPs sofrem maior aglomeração, que é o caso desse sistema. Quando o pH é mantido acima do pI do peptídeo, no caso do sistema da MOG, a suspensão tende a permanecer mais estável, evidenciada pela menor aglomeração do sistema ¹⁶⁶. A maior hidrofobicidade da MBP contribui para a aglomeração das nanopartículas, pois a atração hidrofóbica tende a superar a repulsão eletrostática no sistema ¹⁶⁵.

Quando as nanopartículas funcionalizadas com o peptídeo MOG 92-106 foram misturadas com uma solução de anticorpos anti-MOG, este induziu a aglomeração da nanopartículas, que é detectada como um aumento no diâmetro hidrodinâmico ¹⁶⁷, para 49 ± 4.4 nm. O sistema da MBP, no entanto, apresentava-se mais aglomerado, devido às forças hidrofóbicas e à baixa solubilidade do peptídeo. Assim, quando a solução de anticorpo anti-MBP foi adicionada à suspensão, a interação entre o anticorpo e o peptídeo conjugado dissipou a aglomeração interparticular, ao ocupar os sítios de ligação dos peptídeos disponíveis na superfície das partículas ¹⁶⁸. Assim, o grau de aglomeração do sistema da MBP foi determinante

para a diminuição do diâmetro hidrodinâmico (27 ± 2.5 nm) das nanopartículas, na presença de anti-MBP.

Neste mesmo equipamento, os potenciais zeta das suspensões de AgNPs e das etapas de funcionalização foram medidos. Naturalmente, as AgNPs carregam uma carga eletrostática em suas superfícies, formada pelos íons adsorvidos e isso modifica o potencial de superfície total das nanopartículas, que apresentam uma dupla camada elétrica. Essa carga é alterada conforme a interação e o pH da suspensão, sendo que quanto maior o potencial negativa ou positivamente, mais estável é o sistema coloidal. A camada mais interna é denominada camada de *Stern*, esta se liga mais fortemente à superfície das AgNPs e a camada mais externa é a camada difusa. Os íons dentro dessas camadas movem-se juntamente com as nanopartículas, quando estas se movem em suspensão, num limite denominado superfície de corte hidrodinâmico ¹⁰.

A modificação química das nanopartículas mediante a formação de uma monocamada automontada com o 11-MUA e o complexo EDC/NHS resulta em nanopartículas negativamente carregadas com potencial zeta médio de -17.2 mV. Estudos demonstraram que nanopartículas com potencial zeta maior do que 20 mV ou menor do que -20 mV apresentam repulsão eletrostática suficiente para se manterem estáveis em suspensão (Tabela 4) ¹⁶⁹.

Como observado nos valores de diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas, a funcionalização com a MOG e a posterior adição do anticorpo causam o aumento da aglomeração no sistema, refletido na diminuição do potencial zeta médio para -12.6 e -8.0 mV, respectivamente (Tabela 4). Com a diminuição do potencial zeta, as forças atrativas de van der *Waals* são superiores às forças repulsivas de *Coulomb*, o que diminui a distância interparticular ¹⁷⁰.

Apesar da funcionalização com a MBP causar um aumento aparente do diâmetro médio das nanopartículas, o potencial zeta médio resultante é duas vezes maior (-27.6 mV) do que o observado nas nanopartículas funcionalizadas com a MOG. E a interação com o anticorpo específico anti-MBP causa a diminuição do valor de potencial zeta para -23.2 mV. Possivelmente, a camada polimérica do peptídeo MBP contribuiu na estabilização estérica das nanopartículas. Apesar dessa camada de peptídeo ter causado a diminuição do espaço entre as partículas e um

aumento aparente do diâmetro hidrodinâmico, a combinação da estabilização eletrostática e estérica resultou em um potencial zeta de ± 20 mV, valor considerado necessário para manter um sistema estável (Tabela 4) ^{171,172}.

Tabela 4 – Estabilidade das suspensões com relação ao potencial zeta

Amostra	Potencial zeta médio (mV)
AgNPs	-17.2
AgNPs_MOG	-12.6
AgNPs_MOG_anti-MOG	-8.0
AgNPs_MBP	-27.6
AgNPs_MBP_anti-MBP	-23.2

5.4 Interação peptídeo-anticorpo mediada por nanopartículas funcionalizadas

5.4.1 Padronização da condição experimental

As forças que atuam na formação do complexo antígeno-anticorpo são interações fracas, dentre elas a força de van der *Waals* é a mais fraca, porém capaz de atrair moléculas, as ligações de hidrogênio e as forças hidrofóbicas entre moléculas apolares. Em temperatura fisiológica (37°C) as moléculas de água apresentam energia cinética maior do que as interações fracas, assim elas se mantêm por frações de segundos nessa condição. Para que a ligação se torne estável, são necessárias várias ligações fracas, o que requer complementaridade entre as moléculas, com tempo de reação para que essas ligações sejam estabelecidas ¹⁷³.

As reações imunológicas entre as nanopartículas funcionalizadas com os peptídeos e seus anticorpos foram realizadas por meio da incubação das amostras à 37°C, que é a temperatura ótima para interação com IgG, por 30 min, tempo adequado para a formação dos complexos AgNPs-peptídeo-anticorpo ^{102,174}. Após esse processo, as análises de interação foram realizadas.

As interações moleculares podem ser investigadas por meio do estudo dos espectros derivados da interação das amostras com a luz, gerando informações que permitem identificar os grupos químicos constituintes ¹⁷⁵. A espectroscopia óptica permite analisar a interação entre a matéria e a radiação eletromagnética, por meio das transições eletrônicas que ocorrem nos átomos e moléculas na região do ultravioleta e visível e das vibrações associadas à região do infravermelho ¹⁷⁶.

5.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho foi utilizada para a determinação dos grupos funcionais presentes nas amostras em análise, sendo possível observar a efetividade de ligação das biomoléculas às nanopartículas ^{118,119}. As amostras analisadas foram: AgNPs, AgNPs funcionalizadas com os peptídeos e AgNPs funcionalizadas com os peptídeos em interação com os anticorpos específicos, para identificação dos grupos químicos constituintes. Foi utilizada a técnica de ATR-FTIR para análise dos filmes formados a partir dessas amostras.

O espectro da amostra de AgNPs apresenta vibrações de estiramento de ligação C=O na escala de frequência em 1655-1513 cm⁻¹ e de dobramento de ligação O-H na escala de 1450-1330 cm⁻¹ referente aos íons citrato na superfície das nanopartículas (Figura 22) ¹⁷⁷.

Após a funcionalização com o peptídeo MOG 92-106, observam-se dois picos no intervalo de 3000-2840 cm⁻¹ referente ao estiramento da ligação C-H dos alcanos da monocamada na superfície das AgNPs ¹⁷⁸. Também existe um pico no intervalo de 1650-1580 cm⁻¹ de dobramento de ligação N-H referente ao grupo funcional amina dos aminoácidos constituintes do peptídeo. Outro pico é localizado no intervalo de 1310-1250 cm⁻¹ correspondente ao estiramento de ésteres aromáticos, possivelmente dos intermediários formados entre o NHS e o grupo carboxila do 11-MUA. A ligação amida é localizada no intervalo de 1360-1080 cm⁻¹, com estiramento da ligação C-N e os pequenos picos no intervalo de 900-700 cm⁻¹ representam o dobramento das ligações C-H dos aminoácidos. O espectro das AgNPs funcionalizadas em interação com o anticorpo mostra picos característicos de grupos amina no intervalo de 1550-1640 cm⁻¹ do anticorpo e dobramento de ligações C-H em 1390 cm⁻¹ (Figura 22) ^{179,180}.

Figura 22 – Espectro de FTIR das AgNPs (linha preta), AgNPs funcionalizadas com MOG (linha vermelha) e interação com anticorpo anti-MOG (linha azul).

A funcionalização das AgNPs com a MBP 85-99 resulta em espectro com picos no intervalo de 3000-2840 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação C–H da monocamada de alcanotiol ¹⁷⁸. Também apresenta picos no intervalo de 1640-1550 cm^{-1} referente ao dobramento de ligações N–H dos aminoácidos do peptídeo. Observa-se uma pequena banda em 1520 cm^{-1} , característica da ligação N–O aromático do éster aminorreativo. No intervalo de 1440-1395 cm^{-1} observa-se pico de dobramento de ligação O–H do ácido carboxílico. Em 1230 cm^{-1} há a apresentação do pico referente ao estiramento da ligação C–O também do ácido carboxílico do peptídeo. No intervalo de 1190-1130 cm^{-1} observa-se o estiramento da ligação amida (C–N) entre o peptídeo e a monocamada funcionalizada na nanopartícula. E a partir de 830 cm^{-1} estão os picos de dobramento das ligações C–H dos aminoácidos (Figura 23) ^{180,181}.

O espectro referente à interação das AgNPs funcionalizadas com a MBP e o anticorpo anti-MBP apresenta um pico no intervalo de 1610-1550 cm^{-1} de carboxilatos C=O derivados de ácidos carboxílicos do peptídeo e do anticorpo. No intervalo de 1440-1395 cm^{-1} observa-se o dobramento de ligações O–H do ácido carboxílico. Observa-se no intervalo de 1095-1020 cm^{-1} o estiramento da ligação

C–O. Em 900 cm^{-1} e 830 cm^{-1} estão os picos de dobramento das ligações C–H das proteínas (Figura 23) ^{179,181}.

Por meio da análise dos espectros gerados a partir das amostras nas etapas de funcionalização e interação molecular, foi possível identificar os grupos químicos envolvidos nesse processo de integração nanopartícula-peptídeo e sua interação com o anticorpo. Dessa forma, estes resultados possibilitaram a constatação dessas ligações, pela determinação dos picos característicos em cada amostra.

Figura 23 – Espectro de FTIR das AgNPs (linha preta), AgNPs funcionalizadas com MBP (linha vermelha) e interação com anticorpo anti-MBP (linha azul).

5.4.3 Espectroscopia de força atômica

A técnica de espectroscopia de força atômica (AFS, do inglês *Atomic Force Spectroscopy*) foi aplicada ao estudo das interações entre os peptídeos e anticorpos envolvidos neste trabalho. A técnica quantifica forças em *piconewtons* (10^{-12}N) associadas às interações intermoleculares, de modo que auxilia na investigação da efetividade do processo de funcionalização das AgNPs com os peptídeos e da preservação da atividade biológica dessas moléculas após a conjugação às nanopartículas ¹⁸². Esse estudo foi realizado por meio da análise do valor de força de adesão (F_{ad}), que representa a força de ruptura entre a molécula funcionalizada na ponta e o seu analito-alvo imobilizado no substrato ¹⁸³.

Essa técnica associada às nanopartículas tem sido aplicada no estudo das forças entre as partículas e diversos materiais, já que a ligação dos colóides na ponta de AFM promove maior área de contato com a amostra e disponibilidade de moléculas para interação ¹⁸⁴. A aproximação da ponta de AFM com aglomerados de nanocristais aumenta a superfície de interação, quando a ponta é aproximada da amostra ¹⁸⁵. A diferença da superfície de uma haste de AFM sem nanopartículas e com nanopartículas é apresentada nas figuras 24A e B, respectivamente, obtidas por MEV com aumento de 2000x. Na figura 24B, é possível observar o aumento da área de contato promovida com a ligação das AgNPs, que formaram uma rede de nanocristais na superfície da haste.

Figura 24 – Imagens de MEV de uma haste de AFM não funcionalizada (A) e funcionalizada com nanopartículas (B). Aumento de 2000X.

As figuras 25 e 26 apresentam dois diagramas de caixa com as medidas de Fad para os sistemas específico (vermelho) e controle (preto). O diagrama referente ao sistema específico foi construído com base nas medidas de Fad obtidas entre as nanopartículas funcionalizadas com a MOG 92-106 imobilizadas na ponta de AFM e os anticorpos anti-MOG imobilizados no substrato de mica. O diagrama referente ao sistema inespecífico foi construído a partir das medidas obtidas entre as nanopartículas sem o peptídeo MOG 92-106 imobilizadas na ponta de AFM e os anticorpos anti-MOG sobre a mica.

Na literatura, experimentos similares envolvendo antígenos e anticorpos

registraram valores de Fad no intervalo de 60 a 244 pN ¹⁸⁶. A figura 25 mostra que no sistema específico de interação AgNPs-MOG e anti-MOG foram obtidos valores de Fad na faixa de 43-264 pN e um valor mediano de 91 pN. Os pontos acima do diagrama são valores de Fad discrepantes, que podem ser representativos de eventos de multiadesão gerados com o aumento da área de contato proporcionada pelas nanopartículas ¹⁸⁷. O sistema controle das AgNPs não funcionalizadas com o peptídeo MOG interagindo com os anticorpos anti-MOG apresenta uma maior representação de forças não específicas atuando no desprendimento ponta-amostra ¹⁸⁸, indicado pela maior variação dos valores de Fad, cujo máximo é 1700 pN.

Figura 25 – Diagramas de caixa das distribuições de Fad em pN entre pontas de AFM funcionalizadas com AgNPs_MOG (vermelho) e AgNPs não funcionalizadas com o peptídeo (preto) interagindo com anticorpos anti-MOG nos substratos de mica. As imagens inseridas na figura são curvas de forças típicas de um sistema específico (esquerda) e não específico (direita).

O diagrama de caixa vermelho na figura 26 apresenta a distribuição de Fad para o sistema específico da MBP, no qual foram obtidos os valores de 193 e 248 pN de mediana e média, respectivamente. Estes valores estão de acordo com os intervalos característicos de interação antígeno e anticorpo encontrados na literatura ^{186,189,190}. O sistema controle está apresentado no diagrama de caixa preto e demonstra o mesmo padrão de variação obtido no sistema controle com o peptídeo

MOG (figura 25, diagrama de caixa preto), com valor de Fad máximo de 1800 pN, que não representa interação específica entre antígeno e anticorpo.

Figura 26 – Diagramas de caixa das distribuições de Fad em pN entre pontas de AFM funcionalizadas com AgNPs_MBP (vermelho) e AgNPs não funcionalizadas com o peptídeo (preto) interagindo com anticorpos anti-MBP nos substratos de mica. As imagens inseridas na figura são curvas de forças típicas de um sistema específico (esquerda) e não específico (direita).

A análise do valor de Fad deve ser acompanhada do estudo do formato da curva de força, pois este depende das diferentes interações que ponta e amostra sofrem durante a aproximação e retração ^{218,219}. Para extrair os valores da Fad nos sistemas específicos, apenas as curvas de forças típicas de ruptura de ligações específicas foram selecionadas para as análises e para os sistemas inespecíficos, foram utilizadas as curvas de forças tipicamente inespecíficas.

As imagens inseridas acima dos diagramas de caixa vermelhos nas figuras 25 e 26 representam as curvas de força tipicamente específicas. As linhas vermelhas são as curvas de retração, nas quais no início da retração (extremidade direita da curva), a haste encontra-se relaxada; porém, durante com o decorrer do processo de retração, a haste, os ligantes e as moléculas que estão em interação na ponta e no substrato, tornam-se estiradas ¹⁹³. Essas curvas refletem a interação peptídeo-anticorpo, uma vez que força de atração entre as moléculas causa uma não linearidade da curva, com

a apresentação de picos referentes ao estiramento ou alongamento das moléculas ligadas após o contato da ponta com a amostra. Essa ligação é mantida até o ponto de dissociação das moléculas (extremidade esquerda da curva), caracterizando a força de adesão das moléculas ¹⁸⁶.

As imagens inseridas acima dos diagramas de caixa pretos nas figuras 25 e 26 apresentam um padrão linear no processo de retração após o estabelecimento do contato ponta-amostra refletem as interações não específicas ¹⁹⁴. Nos sistemas inespecíficos não ocorre a interação entre as moléculas, dessa forma, quando a ponta estabelece o contato com a amostra, a haste sofre uma inclinação e se desprende da amostra, sem promover o desenovelamento das proteínas, uma vez que estas não se associam ¹⁹¹. Assim, o padrão de curva observado nos sistemas inespecíficos apresenta uma linearidade da curva de retração.

Os experimentos com a técnica de AFS permitiram analisar a efetividade da funcionalização dos peptídeos na superfície das AgNPs, pois quando as AgNPs funcionalizadas com os peptídeos interagiram com seus anticorpos específicos, foi possível obter valores de Fad dentro do intervalo característico de ligação antígeno-anticorpo, associado com a apresentação de curvas de força com padrão de alongamento de biomoléculas. Assim, foi possível comprovar que os peptídeos foram efetivamente ligados às superfícies das AgNPs e mantiveram sua atividade de reconhecimento molecular dos anticorpos específicos.

5.4.4 Espectroscopia UV-Vis

A absorbância plasmônica das AgNPs foi utilizada como parâmetro comparativo na avaliação da atividade de detecção das nanopartículas funcionalizadas com os peptídeos. A aplicação da espectroscopia UV-Vis provém da possibilidade de acompanhar, por meio da absorbância plasmônica, a variação de tamanho, de formato e a distância interpartícula, que é a base do sensoriamento ¹⁶².

A espectroscopia UV-Vis revelou a formação de AgNPs esféricas com absorção plasmônica no intervalo de 421-425 nm, sendo estes os valores referenciais para as análises de funcionalização e interação com os anticorpos. A funcionalização do peptídeo MOG 92-106 resultou no deslocamento da absorbância plasmônica para 427,6 nm. O deslocamento para um maior comprimento de onda é consequência da

aglomeração das nanopartículas, que promove o acoplamento dos modos plasmônicos das partículas próximas (Figura 27) ¹⁹⁵.

Figura 27 – Espectros gerados na região UV-Vis referente às AgNPs funcionalizadas com a MOG, nos quais observa-se a variação na absorbância plasmônica em resposta à interação com o anticorpo específico (anti-MOG) e anticorpos-controle (anti-MBP e anti-GST).

Os espectros resultantes da funcionalização com os peptídeos apresentam uma forte absorção em ~280 nm, que está relacionado com a transição eletrônica de aminoácidos aromáticos. Os sistemas aromáticos geralmente absorvem a luz na região do ultravioleta próximo (150-400 nm). A MOG 92-106 e a MBP 85-99 apresentam aminoácidos aromáticos em suas sequências, dentre eles a fenilalanina, que absorvem em 257 nm (Figura 27 e 28) ^{196,197}.

Figura 28 – Espectros gerados na região UV-Vis referente às AgNPs funcionalizadas com a MBP, nos quais observa-se a variação na absorbância plasmônica em resposta à interação com o anticorpo específico (anti-MBP) e anticorpos-controle (anti-MOG e anti-GST).

Essa variação na absorbância plasmônica também é detectada quando ocorre um reconhecimento molecular entre as moléculas funcionalizadas às nanopartículas e seus ligantes específicos ¹⁹⁸. No sistema de interação das AgNPs funcionalizadas com a MOG, foi observado um aumento na amplitude de absorção e deslocamento do pico para 437,3 nm, quando em interação com o anticorpo anti-MOG (Figura 27). O deslocamento para um maior comprimento de onda também foi verificado no sistema de AgNPs funcionalizadas com a MBP, no qual observou-se um deslocamento de 423,7 nm para 430,6 nm, quando interagiram com anticorpo anti-MBP (Figura 28).

O deslocamento dos picos para maiores comprimentos de onda e o seu alargamento são decorrentes da mudança do meio dielétrico da suspensão mediante o reconhecimento molecular e as interações partícula-partícula ¹⁹⁹. Esse efeito de deslocamento da absorbância plasmônica pode ser derivado da formação de ligações de hidrogênio interpartículas, uma vez que os grupos terminais (COOH) da região Fc dos anticorpos ficam expostos ²⁰⁰.

Os sistemas controle foram compostos de anticorpos não específicos às sequências peptídicas funcionalizadas nas AgNPs. Assim, foi verificada a variação

na absorbância plasmônica na presença de anti-MBP e anti-GST (Glutathione-S-Transferase), para o sistema de AgNPs funcionalizadas com MOG 92-106 e, para o sistema funcionalizado com MBP, foram investigadas as respostas para anti-MOG e anti-GST.

No sistema funcionalizado com a MOG 92-106, a resposta ao anticorpo anti-MBP foi observado um deslocamento de 2,7 nm e o deslocamento na presença de anti-GST foi de 0,8 nm, enquanto que a resposta ao anticorpo específico anti-MOG promoveu um deslocamento de 9,7 nm (Figura 27). E, para o sistema funcionalizado com a MBP 85-99, a resposta ao anticorpo anti-MOG promoveu um deslocamento de 1,7 nm e, em relação ao anti-GST, o deslocamento foi de 0,5 nm, já o deslocamento em resposta ao anticorpo específico anti-MBP foi de 6,9 nm (Figura 28).

O deslocamento observado nos sistemas inespecíficos pode ser explicado com base na similaridade dos peptídeos de trabalho. Foi realizado o alinhamento das sequências peptídicas com o servidor *online* EMBOSS Needle, para avaliar a similaridade e a identidade dos peptídeos.

A similaridade entre dois peptídeos é definida como o nível de correspondência entre duas sequências peptídicas em nível de aminoácidos, gerando um resultado quantitativo. Ela pode ser medida com base na porcentagem de identidade e similaridade; no primeiro caso calcula-se a porcentagem de resíduos idênticos entre as sequências, dividida pelo comprimento da sequência mais curta e, no segundo caso, há a inclusão dos intervalos na sequência e das similaridades das propriedades bioquímicas dos aminoácidos ²⁰¹.

A similaridade entre os peptídeos MOG 92-106 e MBP 85-99 é de 36,5% e a identidade é de 26,9%. Valores de similaridade e identidade acima de 25% revelam que as sequências peptídicas comparadas estão relacionadas funcional e/ou estruturalmente, assim as sequências são consideradas similares em sua totalidade²⁰². Dessa forma, o deslocamento observado na interação entre AgNPs-MOG com anti-MBP e AgNPs-MBP com anti-MOG pode ser derivado do reconhecimento de alguns resíduos similares e idênticos nas duas sequências de trabalho. No caso da interação com o anticorpo anti-GST, o deslocamento observado foi consideravelmente menor, em relação à resposta aos outros anticorpos em seus sistemas inespecíficos, por apresentar valores de similaridade e identidade abaixo do referencial de 25%. O

alinhamento realizado pelo mesmo servidor revelou que a similaridade da GST com a MOG 92-106 e com a MBP 85-99 é de 4,7 e 3,2 %; e a identidade é de 4,5 e 3,1%, respectivamente.

Foi realizada a incubação das nanopartículas funcionalizadas com os peptídeos juntamente com seus anticorpos específicos, num intervalo de concentração de 0,1 a 20 nM de anti-MOG e anti-MBP e os deslocamentos no espectro foram analisados, a partir do valor referencial de absorbância das AgNPs funcionalizadas com a MOG 92-106 (426,6 nm) e funcionalizadas com MBP 85-99 (423,7 nm).

No sistema funcionalizado com a MOG 92-106, o deslocamento ocorreu de 427 a 431,5 nm, com o mínimo de quantificação de 1,0 nM de anti-MOG (Figura 29). Para o sistema da MBP 85-99, houve um deslocamento de 425,1 a 433,9 nm, com o mínimo de quantificação de 0,1 nM de anti-MBP (Figura 30).

Figura 29 – Variação do comprimento de onda de máxima absorbância das AgNPs funcionalizadas com MOG em interação com diferentes concentrações de anti-MOG em um intervalo de 0,1 a 20 nM.

Figura 30 – Variação do comprimento de onda de máxima absorbância das AgNPs funcionalizadas com MBP em interação com diferentes concentrações de anti-MBP em um intervalo de 0,1 a 20 nM.

Como discutido anteriormente, esse deslocamento é indicativo de formação de aglomerados maiores de nanopartículas ¹⁹⁵. A formação de redes maiores de nanopartículas mostrou-se dependente do aumento da quantidade de moléculas de anticorpos em suspensão. Isso ocorre porque a maior quantidade de anticorpos ligados nos sítios disponíveis na superfície das AgNPs funcionalizadas com os peptídeos promove a formação de ligações de hidrogênio entre as partículas, ocasionando a aglomeração do sistema ^{200,203}. A ligação dos anticorpos na superfície das AgNPs funcionalizadas é dependente da eficiência na colisão entre as moléculas, o que está diretamente relacionado com a densidade de analito e dos sítios ativos na nanopartícula, assim a frequência de colisão aumenta de forma dependente da concentração ²⁰⁴.

O processo de aglomeração atinge um estado máximo quando todos os sítios de ligação dos peptídeos estão ocupados por anticorpos. Nesse caso, existem moléculas livres de anticorpos em maior concentração na suspensão, o que reduz a eficiência de colisão entre o analito e a nanopartícula. Dentro do intervalo estudado, essa concentração não foi alcançada, uma vez que nos dois sistemas não há a estabilização do deslocamento em um valor de comprimento de onda ²⁰⁵.

As concentrações mínimas de anticorpos necessárias para a detecção nos

sistemas foram obtidas dentro da ordem de nanomol por litro, uma importante escala de detecção para aplicações biomédicas. As proteínas presentes nos fluidos biológicos estão presentes no intervalo de milimolar a nanomolar, ou até em níveis inferiores. Assim, as técnicas desenvolvidas para detecção de biomoléculas devem ser capazes de responder à baixas concentrações de analito, para que possam ser aplicadas ao diagnóstico médico.

A resposta à diferentes concentrações de analito é importante para a indicação do estágio de uma doença ²⁰⁵. Portanto, o acompanhamento da resposta do sensor em um intervalo de concentração do analito-alvo é essencial para o aperfeiçoamento de um protocolo de detecção baseado em nanopartículas.

5.4.5 Sensoriamento óptico com as AgNPs

A ressonância plasmônica de superfície também determina a cor observada nas suspensões coloidais de AgNPs esféricas. Esse efeito está ausente nos átomos individuais e nos metais em macroescala ²⁰⁶. As AgNPs apresentam uma forte banda de absorção em ~425 nm, ou seja, absorvem a cor violeta-azulado, portanto a cor visualizada na suspensão é amarela (Figura 31A). As suspensões foram iluminadas com luz UVB (280-320 nm) (Figura 31E), que promove a catálise de reações de radicais que causam a degradação da superfície das nanopartículas, pela diminuição da taxa de ressonância plasmônica associada ao aumento da concentração de íons citrato livres, liberação de íons Ag^+ e formação de óxido de prata Ag_2O ²⁰⁷, que confere a cor observada na Figura 31I registrada após irradiação com luz UVB.

A monocamada de peptídeo funcionalizado na superfície das AgNPs (Figura 31B) resulta em um efeito protetor do núcleo da nanopartícula, o que aumenta a estabilidade em suspensão, ou seja, diminui a liberação de íons metálicos e a oxidação, como observado nas figuras 31F e 31J, nas quais a apresentação da cor da suspensão é similar às das AgNPs funcionalizadas não irradiadas com luz UVB (Figura 31B) ²⁰⁸.

Conforme ocorre a aglomeração das AgNPs devido à interação com anticorpo específico na figura 31C, a luz incidente não promove a polarização homogênea das nanopartículas, causando a predominância de oscilação em maiores comprimentos de onda, com menor energia. O deslocamento no espectro é acompanhado de uma

mudança visível da cor da suspensão, do amarelo para o laranja ²⁰⁹. A aglomeração causada pela ligação do anticorpo à superfície funcionalizada das nanopartículas diminui a estabilidade da suspensão e, conseqüentemente, após irradiação com luz UVB (Figura 31G), ocorre a formação de Ag₂O em suspensão, deixando a variação de cor mais evidente (Figura 31K).

Essa variação de cor não é evidente quando as nanopartículas funcionalizadas interagem com o anticorpo não específico (Figura 31D). Nesse caso, a aglomeração não atinge o mesmo estado observado em um reconhecimento molecular específico entre o peptídeo e o anticorpo, que é o analito alvo. Assim, após irradiação com luz UVB (Figura 31H) a suspensão apresenta o mesmo padrão de cor observado nas nanopartículas apenas funcionalizadas com o peptídeo (Figura 31L), pois não houve interação no sistema.

Figura 31 – Fotografias das AgNPs (A), AgNPs funcionalizadas com MOG (92-106) (B), AgNPs funcionalizadas em interação com anticorpo anti-MOG (C) e em interação com anticorpo inespecífico (anti-MBP) (D). A mesma ordem das amostras se repete para as fotografias tiradas sob iluminação UV (E – H) e após a iluminação UV (I – L).

Essa propriedade óptica das AgNPs revela seu potencial para a aplicação como dispositivos de sensoriamento de um analito alvo baseado na transdução de sinais, de um evento molecular em um sinal óptico. Assim, essa plataforma explora a variação de cor gerada do acoplamento dos *plasmons* entre as partículas ou da mudança do índice de refração local induzido pelo deslocamento da absorbância plasmônica decorrente do reconhecimento molecular entre um analito alvo e a molécula funcionalizada na nanopartícula ²¹⁰. A mudança de cor é observável à olho nu, portanto, para uma análise qualitativa, elimina-se a necessidade de qualquer equipamento, com apresentação de uma resposta rápida.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, os parâmetros de tempo de reação, agente estabilizante, modo de armazenamento e da cor referencial da suspensão foram obtidos, juntamente com os padrões de absorbância plasmônica e autofluorescência características para essas nanopartículas. Foi realizada a caracterização estrutural das nanopartículas por AFM, que gerou os resultados de diâmetro e morfologia das nanopartículas; e a caracterização química por DRX, que comprovou a formação das AgNPs.

O fator de diluição de 1:1000 obtido com o *script* computacional foi aplicado aos experimentos e foi efetivo para a ligação das moléculas. A dinâmica de cada etapa de funcionalização foi acompanhada pela análise da variação do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas por DLS e por imagem de AFM e o potencial zeta resultante atingiu o intervalo considerado necessário para manter a estabilidade do sistema.

O tempo e temperatura de incubação das AgNPs com os anticorpos foram estabelecidos. A funcionalização com os peptídeos e interação com os anticorpos foram verificadas pela identificação dos grupos químicos constituintes das amostras pela técnica de ATR-FTIR. A espectroscopia UV-Vis permitiu identificar os deslocamentos de absorbância plasmônica de 427,6 para 437,3 nm e 423,7 para 430,6 nm gerados pelo reconhecimento molecular específico entre as AgNPs funcionalizadas com os peptídeos funcionalizados com os peptídeos MOG (92-106) e MBP (85-99) e os anticorpos anti-MOG e anti-MBP, respectivamente. Também foi possível comprovar a especificidade do conjugado nanopartícula-peptídeo pelo seu anticorpo específico. Essa técnica também gerou resultados com demonstraram que as AgNPs funcionalizadas respondem à baixas concentrações de anticorpos, na faixa de 0,1 a 20 nM, nível importante para aplicação como dispositivo diagnóstico.

O resultado que revela o potencial da AgNPs para um sensoriamento prático é a análise de variação de cor em resposta ao analito específico. Essa variação foi observável a olho nu, constituindo uma resposta rápida à presença do anticorpo específico. Assim, as AgNPs foram eficientes na transdução de um evento biológico em um sinal óptico observável.

A integração da AgNPs com a técnica de AFS gerou resultados quantitativos em relação às forças de interação entre as AgNPs funcionalizadas com os peptídeos e

os anticorpos. Essa técnica provou que os peptídeos foram eficientemente funcionalizados às superfícies das AgNPs e tiveram sua atividade de reconhecimento preservada, pois foram obtidas Fad características de interação antígeno-anticorpo para os sistemas específicos, bem como a apresentação de curvas com padrões de desenovelamento de proteínas, que reflete a ocorrência de uma interação molecular entre a ponta e amostra.

Esses resultados mostraram que o objetivo geral do trabalho foi atingido, o de analisar a aplicabilidade das AgNPs funcionalizadas com peptídeo no reconhecimento molecular de um anticorpo específico. A resposta das AgNPs à presença dos anticorpos específicos em baixas concentrações e com sinais ópticos de alta intensidade revela o potencial do sistema em um contexto de investigação de biomarcadores no espectro das doenças desmielinizantes.

REFERÊNCIAS

1. Prayoonwiwat N, Siritho S. White matter disease: Early treatment of inflammatory demyelinating disease. *Nat Publ Gr.* 2013;9(5):246–7.
2. Popescu BFG, Lucchinetti CF. Pathology of Demyelinating Diseases. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2012;7:185–217.
3. Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet.* 2004;364(9451):2106–12.
4. Constantinescu CS, Farooqi N, Brien KO, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol.* 2011;164:1079–106.
5. Bates IR, Feix JB, Boggs JM, Harauz G. An immunodominant epitope of myelin basic protein is an amphipathic alpha-helix. *J Biol Chem.* 2004;279(7):5757–64.
6. Reindl M. Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein: Deciphering a Target in inflammatory Demyelinating Diseases. *Front Immunol.* 2017;8:1–15.
7. Vassall KA, Bamm V V, Harauz G. MyelStones: the executive roles of myelin basic protein in myelin assembly and destabilization in multiple sclerosis. *Biochem J.* 2015;472(1):17–32.
8. Willner I, Willner B. Biomolecule-based nanomaterials and nanostructures. *Nano Lett.* 2010;10(10):3805–15.
9. Mock JJ, Barbic M, Smith DR, Schultz DA, Schultz S. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *J Chem Phys.* 2002;116(15):6755.
10. Mahmoudi M, Lynch I, Ejtehadi MR, Monopoli MP, Bombelli FB, Laurent S. Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges. *Chem Rev.* 2011;111(9):5610–37.
11. Love S. Demyelinating diseases. *J Clin Pathol.* 2006;59:1151–9.
12. Reindl M, Pauli F Di, Rostásy K, Berger T. The spectrum of MOG autoantibody- associated demyelinating diseases. *Nat Publ Gr.* 2013;9(8):455–61.
13. Zisimopoulou P, Brenner T, Trakas N, Tzartos SJ. Serological diagnostics in myasthenia gravis based on novel assays and recently identified antigens. *Autoimmun Rev.* 2013;12(9):924–30.
14. Weissert R, Wallström E, Storch MK, Stefferl A, Lorentzen J, Lassmann H, et

- al. MHC Haplotype-dependent Regulation of MOG-induced EAE in Rats. *J Clin Invest.* 1998;102(6):1265–73.
15. Anderson AC, Chandwaskar R, Lee DH, Sullivan JM, Solomon A, Rodriguez-Manzanet R, et al. A Transgenic Model of Central Nervous System Autoimmunity Mediated by CD4+ and CD8+ T and B Cells. *J Immunol.* 2012;188(5):2084–92.
 16. de Graaf KL, Albert M, Weissert R. Autoantigen conformation influences both B- and T-cell responses and encephalitogenicity. *J Biol Chem.* 2012;287(21):17206–13.
 17. Ramanathan S, Dale RC, Brilot F. Autoimmunity Reviews Anti-MOG antibody: The history , clinical phenotype , and pathogenicity of a serum biomarker for demyelination. 2015;15(2016):307–24.
 18. Shetty A, Gupta SG, Varrin-Doyer M, Weber MS, Prod'homme T, Molnarfi N, et al. Immunodominant T-cell epitopes of MOG reside in its transmembrane and cytoplasmic domains in EAE. *Neurol - Neuroimmunol Neuroinflammation.* 2014;1(2):e22.
 19. Amor S, Groome N, Linington C, Morris MM, Dornmair K, Gardinier M V, et al. Identification of epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein for the induction of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and Biozzi AB/H mice. *J Immunol.* 1994;153(10):4349–56.
 20. Devaux B, Enderlin F, Wallner B, Smilek DE. Induction of EAE in mice with recombinant human MOG, and treatment of EAE with a MOG peptide. *J Neuroimmunol.* 1997;75(1–2):169–73.
 21. Pollinger B, Krishnamoorthy G, Berer K, Lassmann H, Basl MR, Dunn R, et al. Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. *J Exp Med.* 2009;206(6):1303–16.
 22. Kuhle J, Pohl C, Mehling M, Edan G, Freedman MS, Hartung H-P, et al. Lack of association between antimyelin antibodies and progression to multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2007;356(4):371–8.
 23. Spadaro M, Gerdes LA, Mayer MC, Ertl-Wagner B, Laurent S, Krumbholz M, et al. Histopathology and clinical course of MOG-antibody-associated encephalomyelitis. *Ann Clin Transl Neurol.* 2015;2(3):295–301.
 24. Ohler B, Graf K, Bragg R, Lemons T, Coe R, Genain C, et al. Role of lipid interactions in autoimmune demyelination. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2004;1688(1):10–7.
 25. Bates IR, Libich DS, Wood DD, Moscarello MA, Harauz G. An Arg/Lys Gln mutant of recombinant murine myelin basic protein as a mimic of the deiminated form implicated in multiple sclerosis. *Protein Expr Purif.*

2002;25(2):330–41.

26. Aslani MK, Hamid KM, Nazer NH, Mirshafiey A. The Role of Autoantibodies in Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Int Trends Immun.* 2014;2(1):29–35.
27. Söderström M, Link H, Xu Z, Fredriksson S. Optic neuritis and multiple sclerosis: anti-MBP and anti-MBP peptide antibody-secreting cells are accumulated in CSF. *Neurology.* 1993;43(6):1215–22.
28. Simons M, Lyons DA. Axonal selection and myelin sheath generation in the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol.* 2013;25(4):512–9.
29. Rosetti CM, Maggio B, Oliveira RG. The self-organization of lipids and proteins of myelin at the membrane interface. Molecular factors underlying the microheterogeneity of domain segregation. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1778(7–8):1665–75.
30. Quarles RH, Morell P. Myelin formation, Structure and Biochemistry. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.* 6th ed. North Carolina: Elsevier; 2006. p. 51–71.
31. Wang S, Young KM. White Matter Plasticity in Adulthood. *Neuroscience.* 2014;276:148–60.
32. Podbielska M, Banik NL, Kurowska E, Hogan EL. Myelin recovery in multiple sclerosis: the challenge of remyelination. *Brain Sci.* 2013;3(3):1282–324.
33. Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev.* 2001;81:871–927.
34. Quarles RH. Myelin lipids and proteins: structure, function, and roles in neurological disorders. In: David R. Sibley, Hanin I, Kuhar M, Skolnick P, editors. *Handbook of Contemporary Neuropharmacology.* 1st Editio. Wiley-Interscience; 2007. p. 591–620.
35. Pham-dinh D, Matteit M, Nussbaum J, Rousselt G, Pontarotti P, Roeckelt N, et al. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a member of a subset of the immunoglobulin superfamily encoded within the major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(17):7990–4.
36. Gaspera B Della, Lu W, Genain C, Gelot A, Rodriguez D, Pham-dinh D. Complex alternative splicing of the myelin oligodendrocyte glycoprotein gene is unique to human and non-human primates. *J Neurochem.* 2006;98(6):1707–17.
37. Johns TG, Bernard CCA. The Structure and Function of Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein. *J Neurochem.* 1999;72(1):1–9.

38. Weissert R, Kuhle J, Graaf KL De, Herrmann MM, Müller C, Thomas G, et al. High Immunogenicity of Intracellular Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Epitopes. *J Immunol*. 2015;169(1):548–56.
39. Marta CB, Montano MB, Taylor CM, Taylor AL, Bansal R, Pfeiffer SE. Signaling Cascades Activated upon Antibody Cross-linking of Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein. *J Biol Chem*. 2005;280(10):8985–93.
40. Ahmed MAM, Bamm V V, Harauz G, Ladizhansky V. Solid-State NMR Spectroscopy of Membrane-Associated Myelin Basic Protein — Conformation and Dynamics of an Immunodominant Epitope. *Biophysj*. 2010;99(4):1247–55.
41. Musse AA, Boggs JM, Harauz G. Deimination of membrane-bound myelin basic protein in multiple sclerosis exposes an immunodominant epitope. *PNAS*. 2006;103(12):4422–7.
42. Mohamed K, Koriem M. Multiple sclerosis: new insights and trends. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2016;6(5):429–40.
43. MACHADO S et al. Recomendações: Esclerose Múltipla. 1ª Edição. Machado S, editor. Academia Brasileira de Neurologia. São Paulo: Editora OMNIFARMA Ltda.; 2012. 112 p.
44. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(9):545–58.
45. Grigoriadis N, Pesch V Van. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. *Eur J Immunol*. 2015;22(Suppl. 2):3–13.
46. Oksenberg JR, Baranzini SE. Multiple sclerosis genetics—is the glass half full, or half empty? *Nat Publ Gr*. 2010;6(8):429–37.
47. Chen S-J, Wang Y-L, Fan H-C, Lo W-T, Wang C-C, Sytwu H-K. Current status of the immunomodulation and immunomediated therapeutic strategies for multiple sclerosis. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:970789.
48. Ifergan I, Ke H, Bernard M, Wosik K, Dodelet-devillers A, Cayrol R, et al. The blood brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells. *Brain*. 2008;131:785–99.
49. Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R, Kulig P, Pietrowski E, et al. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J*. 2017;24(4):1023–34.
50. Kawanokuchi J, Shimizu K, Nitta A, Yamada K, Mizuno T. Production and functions of IL-17 in microglia. *J Neuroimmunol*. 2008;194(1–2):54–61.
51. Maggi P, Macri SMC, Gaitán MI, Wholer JE, Knight HL, Ellis M, et al. The formation of inflammatory demyelinated lesions in cerebral white matter. *Ann*

- Neurol. 2014;76(4):594–608.
52. Napoli I, Neumann H. Protective effects of microglia in multiple sclerosis. *Exp Neurol*. 2010;225(1):24–8.
 53. Gandhi R, Laroni A, Weiner HL. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2010;221(1–2):7–14.
 54. Reindl M, Kuenz B, Berger T. B Cells and Antibodies in MS. *Results Probl Cell Differ*. 2010;51:99–113.
 55. Goverman JM. Immune tolerance in multiple sclerosis. *Immunol Rev*. 2011;241(1):228–40.
 56. Jefferies R. Antibodies. In: Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt I, editors. *Immunology*. 8th ed. Saunders; 2012. p. 51–71.
 57. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Anticorpos e Antígenos. In: *Imunologia Celular e Molecular*. 7ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012. p. 89–109.
 58. Spiegelberg HL. Biological Role of Different Antibody Classes. *Int Arch Allergy Immunol*. 1989;90(1):22–7.
 59. Padlan EA. Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol*. 1994;31(3):169–217.
 60. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001;357(9270):1777–89.
 61. Burton DR, Woof JM. Human Antibody Effector Function. *Adv Immunol*. 1992;51:1–84.
 62. Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Grummel V, Sommer N, Brück W, et al. Identification of a pathogenic antibody response to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(50):19057–62.
 63. Goldman AS, Prabhakar BS. *Immunology Overview*. Medical Microbiology. University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
 64. Roduner E. Size matters: why nanomaterials are different. *Chem Soc Rev*. 2006;35(7):583–92.
 65. Sekhon BS. Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Nanotechnol Sci Appl*. 2014;7:31–53.
 66. Pitkethy MJ. Nanoparticles as building blocks? *Mater Today*. 2003;6(12):36–42.
 67. Cheng HN, Doemeny LJ, Geraci CL, Schmidt DG, Boulevard REL, Orleans

- N, et al. Nanotechnology Overview : Opportunities and Challenges. Am Chem Soc. 2016;1:1–12.
68. Yokel RA, MacPhail RC. Engineered nanomaterials: exposures, hazards, and risk prevention. J Occup Med Toxicol. 2011;6(1):7.
 69. Singh NA. Nanotechnology innovations, industrial applications and patents. Environ Chem Lett. 2017;1–7.
 70. Nobile L, Nobile S. Recent advances of nanotechnology in medicine and engineering. AIP Conf Proc. 2016;1736.
 71. Giljohann DA, Seferos DS, Daniel WL, Massich MD, Patel PC, Mirkin CA. Gold Nanoparticles for Biology and Medicine. Angew Chemie Int Ed. 2010;49(19):3280–94.
 72. Kim M Il, Shim J, Li T, Lee J, Park HG. Fabrication of Nanoporous Nanocomposites Entrapping Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles and Oxidases for Colorimetric Biosensing. Chem - A Eur J. 2011;17(38):10700–7.
 73. Neoh KG, Lu S, Kang E-T, Mahendran R, Chiong E. Tailoring Soft Nanoparticles for Potential Application as Drug Carriers in Bladder Cancer Chemotherapy. In: Nanotechnology: Delivering on the Promise Volume 2. Vol. 1224. ACS Symposium Series; 2016. p. 167–95.
 74. Gendelman HE, Anantharam V, Bronich T, Ghaisas S, Jin H, Kanthasamy AG, et al. Nanoneuromedicines for degenerative, inflammatory, and infectious nervous system diseases. Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med. 2015;11(3):751–67.
 75. Hausen M, Oliveira GS, Leite FL. Nanoneurobiophysics: The Leading Highway for Neurodegenerative Diseases Research. J Nanomedicine Res. 2016;4(2):1–2.
 76. Leite FL, Hausen M, Oliveira GS, Brum DG, Oliveira ON. Nanoneurobiophysics: new challenges for diagnosis and therapy of neurologic disorders. Nanomedicine (Lond). 2015;10(23):3417–9.
 77. Lin P-C, Lin S, Wang PC, Sridhar R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. Biotechnol Adv. 2014;32(4):711–26.
 78. Rosi NL, Mirkin CA. Nanostructures in biodiagnostics. Chem Rev. 2005;105(4):1547–62.
 79. Howes PD, Rana S, Stevens MM. Plasmonic nanomaterials for biodiagnostics. Chem Soc Rev. 2017;43(11):3835–53.
 80. Ratyakshi, Chauhan. Colloidal Synthesis of Silver Nano Particles. Asian J Chem. 2009;21(10):113–6.

81. Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotechnol.* 2010;28(11):580–8.
82. Ravindran A, Chandran P, Khan SS. Biofunctionalized silver nanoparticles: Advances and prospects. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2013;105(2013):342–52.
83. Yasun E, Kang H, Erdal H, Cansiz S, Ocsoy I, Huang Y-F, et al. Cancer cell sensing and therapy using affinity tag-conjugated gold nanorods. *Interface Focus.* 2013;3(3):1–9.
84. Šileikaitė A, Puišo J, Prosyčėvas I, Tamulevičius S. Investigation of Silver Nanoparticles Formation Kinetics During Reduction of Silver Nitrate with Sodium Citrate. *Issn Mater Sci.* 2009;15(1):1392–1320.
85. Rosarin FS, Mirunalini S. Nobel Metallic Nanoparticles with Novel Biomedical Properties. *J Bioanal Biomed.* 2011;3(4).
86. Oh J-H, Park DH, Joo JH, Lee J-S. Recent advances in chemical functionalization of nanoparticles with biomolecules for analytical applications. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407(29):8627–45.
87. Majdalawieh A, Kanan MC, El-Kadri O, Kanan SM. Recent Advances in Gold and Silver Nanoparticles: Synthesis and Applications. *J Nanosci Nanotechnol.* 2014;14(7):4757–80.
88. Lismont M, Dreesen L. Comparative study of Ag and Au nanoparticles biosensors based on surface plasmon resonance phenomenon. *Mater Sci Eng C.* 2012;32(6):1437–42.
89. Kelly KL, Coronado E, Zhao LL, Schatz GC. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J Phys Chem B.* 2003;107(3):668–77.
90. Iravani S, Korbekandi H, Mirmohammadi S V, Zolfaghari B. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Res Pharm Sci.* 2014;9(6):385–406.
91. Zahmakıran M, Özkar S, Na HB, Hyeon T, Song H, Marinas J, et al. Metal nanoparticles in liquid phase catalysis; from recent advances to future goals. *Nanoscale.* 2011;3(9):3462.
92. Ravindran A, Chandran P, Khan SS. Biofunctionalized silver nanoparticles: advances and prospects. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013;105:342–52.
93. Tran QH, Nguyen VQ, Le A-T. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol.* 2013;4(3):33001.

94. Katz Sand I. Classification, diagnosis, and differential diagnosis of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2015;28(3):193–205.
95. García-Barrasa J, López-de-Luzuriaga J, Monge M. Silver nanoparticles: synthesis through chemical methods in solution and biomedical applications. *Open Chem*. 2011;9(1).
96. Agasti SS, Rana S, Park M-H, Kim CK, You C-C, Rotello VM. Nanoparticles for detection and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(3):316–28.
97. Nghiem Thi Ha L, La Thi H, Vu Xuan H, Chu Viet H, Nguyen Thanh H, Le Quang H, et al. Synthesis, capping and binding of colloidal gold nanoparticles to proteins. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol*. 2010;1(2):1–5.
98. Ramesh S, Grijalva M, Debut A, De La Torre BG, Albericio F, Cumbal LH. Peptides conjugated to silver nanoparticles in biomedicine-a “value-added” phenomenon. *Biomater Sci*. 2016;4(12).
99. Tauran Y, Brioude A, Coleman AW, Rhimi M, Kim B. Molecular recognition by gold, silver and copper nanoparticles. *World J Biol Chem*. 2013;4(3):35–63.
100. Graf P, Mantion A, Foelske A, Shkilnyy A, Masić A, Thünemann AF, et al. Peptide-coated silver nanoparticles: synthesis, surface chemistry, and pH-triggered, reversible assembly into particle assemblies. *Chemistry*. 2009;15(23):5831–44.
101. Wang X, Wu L, Ren J, Miyoshi D, Sugimoto N, Qu X. Label-free colorimetric and quantitative detection of cancer marker protein using noncrosslinking aggregation of Au/Ag nanoparticles induced by target-specific peptide probe. *Biosens Bioelectron*. 2011;26(12):4804–9.
102. Tang L, Dong C, Ren J. Highly sensitive homogenous immunoassay of cancer biomarker using silver nanoparticles enhanced fluorescence correlation spectroscopy. *Talanta*. 2010;81(2010):1560–7.
103. Dawan S, Kanatharana P, Wongkittisuksa B, Limbut W, Numnuam A, Limsakul C, et al. Label-free capacitive immunosensors for ultra-trace detection based on the increase of immobilized antibodies on silver nanoparticles. *Anal Chim Acta*. 2011;699(2011):232–41.
104. Chen LQ, Xiao SJ, Peng L, Wu T, Ling J, Li YF, et al. Aptamer-based silver nanoparticles used for intracellular protein imaging and single nanoparticle spectral analysis. *J Phys Chem B*. 2010;114:3655–9.
105. Naja G, Bouvrette P, Hrapovic S, Luong JHT. Raman-based detection of bacteria using silver nanoparticles conjugated with antibodies. *Analyst*. 2007;132:679–86.
106. Shim S-Y, Lim D-K, Nam J-M. Ultrasensitive optical biodiagnostic methods

- using metallic nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)*. 2008;3:215–32.
107. Nel AE, Madler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM V., Somasundaran P, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater*. 2009;8(7):543–57.
 108. Chen R, Riviere JE. Biological and environmental surface interactions of nanomaterials: characterization, modeling, and prediction. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology*. 2016;9(3):1–31.
 109. Gao K, Jiang X. Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Int J Pharm*. 2006;310(1–2):213–9.
 110. Basu S, Ghosh SK, Kundu S, Panigrahi S, Praharaj S, Pande S, et al. Biomolecule induced nanoparticle aggregation: Effect of particle size on interparticle coupling. *J Colloid Interface Sci*. 2007;313(2):724–34.
 111. Liu J, Legros S, Ma G, Veinot JGC, von der Kammer F, Hofmann T. Influence of surface functionalization and particle size on the aggregation kinetics of engineered nanoparticles. *Chemosphere*. 2012;87(8):918–24.
 112. Zhang X-F, Liu Z-G, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*. 2016;17(9):1534.
 113. Link S, El-Sayed MA. Optical Properties and Ultrafast Dynamics of Metallic Nanocrystals. *Annu Rev Phys Chem*. 2003;54(1):331–66.
 114. Zhang P, Sham T. X-Ray Studies of the Structure and Electronic Behavior of Alkanethiolate-Capped Gold Nanoparticles: The Interplay of Size and Surface Effects. *Phys Rev Lett*. 2003;90(24):245502-1-245502-4.
 115. Pecora R. Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids. *J Nanoparticle Res*. 2000;2(2):123–31.
 116. Lange H. Comparative Test of Methods to Determine Particle Size and Particle Size Distribution in the Submicron Range. Part Part Syst Charact. 1995;12(3):148–57.
 117. Varol A, Gunev I, Orun B, Basdogan C. Numerical simulation of nano scanning in intermittent-contact mode AFM under Q control. *Nanotechnology*. 2008;19(7):75503.
 118. Alaqad K, Saleh TA. Gold and Silver Nanoparticles: Synthesis Methods, Characterization Routes and Applications towards Drugs. *J Environ Anal Toxicol*. 2016;6(4).
 119. Li Shang, Yizhe Wang, Janguang Jiang A, Dong S. pH-Dependent Protein Conformational Changes in Albumin:Gold Nanoparticle Bioconjugates: A

- Spectroscopic Study. *Langmuir*. 2007;23(5):2714–21.
120. Varanda LM, Miranda MT. Solid-phase peptide synthesis at elevated temperatures: a search for and optimized synthesis condition of unsulfated cholecystokinin-12. *J Pept Res*. 1997;50(2):102–8.
 121. Loffredo C, Assunção NA, Gerhardt J, Miranda MTM. Microwave-assisted solid-phase peptide synthesis at 60 degrees C: alternative conditions with low enantiomerization. *J Pept Sci*. 2009;15(12):808–17.
 122. Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *J Phys Chem B*. 2006;110(32):15700–7.
 123. Bastús NG, Merkoçi F, Piella J, Puentes V. Synthesis of Highly Monodisperse Citrate-Stabilized Silver Nanoparticles of up to 200 nm: Kinetic Control and Catalytic Properties. *Chem Mater*. 2014;26(9):2836–46.
 124. Gorup LF, Longo E, Leite ER, Camargo ER. Moderating effect of ammonia on particle growth and stability of quasi-monodisperse silver nanoparticles synthesized by the Turkevich method. *J Colloid Interface Sci*. 2011;360(2):355–8.
 125. Agnihotri S, Mukherji S, Mukherji S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv*. 2014;4(8):3974–83.
 126. Krutyakov YA, Kudrinskiy AA, Olenin AY, Lisichkin G V. Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects. *Russ Chem Rev*. 2008;77(3):233–57.
 127. El Badawy AM, Scheckel KG, Suidan M, Tolaymat T. The impact of stabilization mechanism on the aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Sci Total Environ*. 2012;429:325–31.
 128. Popa M, Pradell T, Crespo D, Calderón-Moreno JM. Stable silver colloidal dispersions using short chain polyethylene glycol. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2007;303(3):184–90.
 129. FREE SOFTWARE FOUNDATION. Bash (3.2.48) [Unix shell program]. 2007.
 130. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. 1997;18(15):2714–23.
 131. Guex N, Peitsch MC, Schwede T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. *Electrophoresis*. 2009;30 Suppl 1:S162–73.

132. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph.* 1996;14(1):33–8, 27–8.
133. Adamczak R, Porollo A, Meller J. Combining prediction of secondary structure and solvent accessibility in proteins. *Proteins.* 2005;59(3):467–75.
134. Lee B, Richards FM. The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J Mol Biol.* 1971;55(3):379–400.
135. Ousterhout JK, Jones K. Tcl and the Tk Toolkit. Pearson Education; 2009. 816 p.
136. XCHANGE TD. Latest Release: Tcl/Tk 8.6.5 (Feb 29, 2016). 2016.
137. Welch B, Jones K, Hobbs J. Practical Programming in Tcl and Tk. 4th Editio. New Jersey: Prentice Hall Professional Technical Reference; 2003. 960 p.
138. Hinterwirth H, Kappel S, Waitz T, Prohaska T, Lindner W, Lämmerhofer M. Quantifying thiol ligand density of self-assembled monolayers on gold nanoparticles by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *ACS Nano.* 2013;7(2):1129–36.
139. Etchegaray A, Bueno C de C, Teschke O. Identificação de microcistina LR ao nível molecular empregando microscopia de força atômica. *Quim Nova.* 2010;33(9):1843–8.
140. Anderson GP, Jacoby MA, Ligler FS, King KD. Effectiveness of protein A for antibody immobilization for a fiber optic biosensor. *Biosens Bioelectron.* 1997;12(4):329–36.
141. Link S, El-Sayed MA. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *J Phys Chem B.* 1999;103(21):4212–7.
142. Šileikaitė A, Puišo J, Prosyčėvas I, Tamulevičius S. Investigation of Silver Nanoparticles Formation Kinetics During Reduction of Silver Nitrate with Sodium Citrate. *Mater Sci.* 2009;15(1):21–7.
143. Ristig S, Kozlova D, Meyer-Zaika W, Epple M, Leifert A, Pan-Bartnek Y, et al. An easy synthesis of autofluorescent alloyed silver–gold nanoparticles. *J Mater Chem B.* 2014;2(45):7887–95.
144. Díez I, Ras RHA. Fluorescent silver nanoclusters. *Nanoscale.* 2011;3(5):1963–70.
145. Zhang LW, Monteiro-Riviere N. Use of confocal microscopy for nanoparticle drug delivery through skin. *J Biomed Opt.* 2013;18(6):61214.
146. Monteiro-Riviere NA, Tran CL. Nanotoxicology: Progress toward Nanomedicine, Second Edition. CRC Press; 2014. 514 p.

147. Culhane KM, Spendier K, Pinchuk AO. Functionalized fluorescent silver nanoparticle surfaces for novel sensing and imaging techniques. In: Dhar NK, Dutta AK, editors. International Society for Optics and Photonics; 2015. p. 948106.
148. Manders EMM, Verbeek FJ, Aten JA. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J Microsc.* 1993;169(3):375–82.
149. Ünler M. Characterization and Imaging of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers. In: Aliofkhazraei M, editor. Handbook of Nanoparticles. Istanbul: Springer International Publishing; 2016. p. 117–41.
150. Babic B, Lawn MA, Coleman VA, Jamting AK, Herrmann J. Minimising the effect of nanoparticle deformation in intermittent contact amplitude modulation atomic force microscopy measurements. *J Appl Phys.* 2016;119(21):214307.
151. Sreeram KJ, Nidhin M, Indumathy R, Nair BU. Synthesis of iron oxide nanoparticles of narrow size distribution on polysaccharide templates. *Bull Mater Sci.* 2008;31(1):93–6.
152. Jiang W, Yang HC, Yang SY, Horng HE, Hung JC, Chen YC, et al. Preparation and properties of superparamagnetic nanoparticles with narrow size distribution and biocompatible. *J Magn Magn Mater.* 2004;283(2–3):210–4.
153. Ghimire S, Lebek W, Godehardt R, Lee WI, Adhikari R. Morphology and Optical Properties of Bare and Silica Coated Hybrid Silver Nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol.* 2016;16(5):5200–6.
154. Yuval Ebenstein, Eyal Nahum A, Banin U. Tapping Mode Atomic Force Microscopy for Nanoparticle Sizing: Tip–Sample Interaction Effects. *Nano Lett.* 2002;2(9):945–50.
155. Hoo CM, Starostin N, West P, Mecartney ML. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *J Nanoparticle Res.* 2008;10(S1):89–96.
156. Prema P. Chemical Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and its Potential Antibacterial Application. In: Carpi A, editor. Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications. InTech; 2011. p. 151–65.
157. Andrade JE De, Machado R, Macêdo MA, Cunha FGC. AFM and XRD characterization of silver nanoparticles films deposited on the surface of DGEBA epoxy resin by ion sputtering. *Polímeros.* 2013;23:19–23.
158. Niemeyer CM. Bioconjugation protocols: strategies and methods. Second Edi. Mark SS, editor. Humana Press; 2011. 605 p.

159. Murdock RC, Braydich-Stolle L, Schrand AM, Schlager JJ, Hussain SM. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicol Sci.* 2008;101(2):239–53.
160. Quarta A, Ragusa A, Deka S, Tortiglione C, Tino A, Cingolani R, et al. Bioconjugation of rod-shaped fluorescent nanocrystals for efficient targeted cell labeling. *Langmuir.* 2009;25(21):12614–22.
161. Bartczak D, Kanaras AG. Preparation of peptide-functionalized gold nanoparticles using one pot EDC/sulfo-NHS coupling. *Langmuir.* 2011;27(16):10119–23.
162. McFarland AD, Van Duyne RP. Single Silver Nanoparticles as Real-Time Optical Sensors with Zeptomole Sensitivity. *Nano Lett.* 2003;3(8):1057–62.
163. Tripathy SK, Yu Y-T. Spectroscopic investigation of S-Ag interaction in omega-mercaptopundecanoic acid capped silver nanoparticles. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2009;72(4):841–4.
164. Chirra HD, Sexton T, Biswal D, Hersh LB, Hilt JZ. Catalase-coupled gold nanoparticles: comparison between the carbodiimide and biotin-streptavidin methods. *Acta Biomater.* 2011;7(7):2865–72.
165. Zaman M, Ahmad E, Qadeer A, Rabbani G, Khan RH. Nanoparticles in relation to peptide and protein aggregation. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:899–912.
166. Tullman JA, Finney WF, Lin YJ, Bishnoi SW. Tunable assembly of peptide-coated gold nanoparticles. *Plasmonics.* 2007;2(3):119–27.
167. Lai YH, Koo S, Oh SH, Driskell EA, Driskell JD, Zhen SJ, et al. Rapid screening of antibody antigen binding using dynamic light scattering (DLS) and gold nanoparticles. *Anal Methods.* 2015;7(17):7249–55.
168. Chen L, Wang X, Chen L, Fu X, Ding Y. Highly sensitive surface-enhanced Raman scattering sensing of heparin based on antiaggregation of functionalized silver nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2013;5(21):11059–65.
169. Tak YK, Pal S, Naoghare PK, Rangasamy S, Song JM. Shape-Dependent Skin Penetration of Silver Nanoparticles: Does It Really Matter? *Sci Rep.* 2015;5:16908.
170. Leermakers F, Eriksson JC, Lyklema H. Association Colloids and their Equilibrium Modelling. In: Lyklema J, editor. *Fundamentals of Interface and Colloid Science.* 1st Editio. London: Elsevier Academic Press; 2005. p. 4.1-4.123.
171. Honary S, Zahir F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano - Drug

- Delivery Systems - A Review (Part 2). *Trop J Pharm al Res.* 2013;12(2):265–73.
172. Pavlin M, Bregar VB. Stability of Nanoparticle Suspensions in Different Biologically Relevant Media. *Dig J Nanomater Biostructures.* 2012;7(4):1389–400.
 173. Reverberi R, Reverberi L. Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfus.* 2007;5(4):227–40.
 174. Yeow N, Tabor RF, Garnier G. Mapping the distribution of specific antibody interaction forces on individual red blood cells. *Sci Rep.* 2017;7:41956.
 175. Bellisola G, Sorio C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. *Am J Cancer Res.* 2012;2(1):1–21.
 176. Stedwell N, Polfer C. Spectroscopy and the Electromagnetic Spectrum. In: Polfer NC, Dugourd P, editors. *Laser Photodissociation and Spectroscopy of Mass-separated Biomolecular Ions.* Gainesville, Florida: Springer International Publishing Switzerland; 2013. p. 1–20.
 177. Kora A, Beedu S, Jayaraman A. Size-controlled green synthesis of silver nanoparticles mediated by gum ghatti (*Anogeissus latifolia*) and its biological activity. *Org Med Chem Lett.* 2012;2(1):17.
 178. Simsikova M, Antalík M, Kanuchova M, Skvarla J. Anionic 11-mercaptoundecanoic acid capped ZnO nanoparticles. *Appl Surf Sci.* 2013;282:342–7.
 179. Mohan J. *Organic spectroscopy: principles and applications.* Second Edi. Mohan J, editor. Rohtak: Alpha Science International Limited; 2004. 563 p.
 180. Socrates G. *Infrared and Raman characteristic group frequencies: Tables and Charts.* 3rd Editio. Long DA, editor. Middlesex: John Wiley & Sons, Ltd.; 2004. 366 p.
 181. Smith BC. *Infrared spectral interpretation: a systematic approach.* First Edit. Smith BC, editor. Shrewbury: CRC Press; 1998. 288 p.
 182. Clausen-Schaumann H, Seitz M, Krautbauer R, Gaub HE. Force spectroscopy with single bio-molecules. *Curr Opin Chem Biol.* 2000;4(5):524–30.
 183. Hinterdorfer P, Dufrêne YF. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nat Methods.* 2006;3(5):347–55.
 184. Cheng H-W, Chang Y-C, Tang S-N, Yuan C-T, Tang J, Tseng F-G. Characterization of single 1.8-nm Au nanoparticle attachments on AFM tips for single sub-4-nm object pickup. *Nanoscale Res Lett.* 2013;8(1):482.

185. Xing M, Zhong W, Xu X, Thomson D. Adhesion Force Studies of Nanofibers and Nanoparticles. *Langmuir*. 2010;26(14):11809–14.
186. Hinterdorfer P, Baumgartner W, Gruber HJ, Schilcher K, Schindler H. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(8):3477–81.
187. Harada Y, Kuroda M, Ishida A. Specific and Quantized Antigen-Antibody Interaction Measured by Atomic Force Microscopy. *Langmuir*. 2000;16(2):708–15.
188. Chtcheglova LA, Shubeita GT, Sekatskii SK, Dietler G. Force spectroscopy with a small dithering of AFM tip: a method of direct and continuous measurement of the spring constant of single molecules and molecular complexes. *Biophys J*. 2004;86(2):1177–84.
189. Allen S, Chen X, Davies J, Davies MC, Dawkes AC, Edwards JC, et al. Detection of Antigen–Antibody Binding Events with the Atomic Force Microscope†. *Biochemistry*. 1997;36(24):7457–63.
190. Stuart JK, Hlady V. Effects of Discrete Protein-Surface Interactions in Scanning Force Microscopy Adhesion Force Measurements. *Langmuir*. 1995;11(4):1368–74.
191. Lee C-K, Wang Y-M, Huang L-S, Lin S. Atomic force microscopy: Determination of unbinding force, off rate and energy barrier for protein–ligand interaction. *Micron*. 2007;38(5):446–61.
192. Dupres V, Verbelen C, Dufrêne YF. Probing molecular recognition sites on biosurfaces using AFM. *Biomaterials*. 2007;28(15):2393–402.
193. Li M, Xiao X, Liu L, Xi N, Wang Y, Dong Z, et al. Atomic force microscopy study of the antigen-antibody binding force on patient cancer cells based on ROR1 fluorescence recognition. *J Mol Recognit*. 2013;26(9):432–8.
194. Bizzarri AR, Cannistraro S. Antigen–antibody biorecognition events as discriminated by noise analysis of force spectroscopy curves. *Nanotechnology*. 2014;25(33):1–8.
195. Shipway AN, Katz E, Willner I. Nanoparticle Arrays on Surfaces for Electronic, Optical, and Sensor Applications. *ChemPhysChem*. 2000;1(1):18–52.
196. Martin R, Howell MD, Jaraquemada D, Flerlage M, Richert J, Brostoff S, et al. A myelin basic protein peptide is recognized by cytotoxic T cells in the context of four HLA-DR types associated with multiple sclerosis. *J Exp Med*. 1991;173(1):19–24.
197. Ellmerich S, Mycko M, Takacs K, Waldner H, Wahid FN, Boyton RJ, et al. High incidence of spontaneous disease in an HLA-DR15 and TCR transgenic

- multiple sclerosis model. *J Immunol.* 2005;174(4):1938–46.
198. Frederix F, Friedt J-M, Choi K-H, Laureyn W, Campitelli A, Mondelaers D, et al. Biosensing Based on Light Absorption of Nanoscaled Gold and Silver Particles. *Anal Chem.* 2003;75:6894–900.
 199. Joseph Y, Besnard I, Rosenberger M, Guse B, Nothofer H-G, Wessels JM, et al. Self-Assembled Gold Nanoparticle/Alkanedithiol Films: Preparation, Electron Microscopy, XPS-Analysis, Charge Transport, and Vapor-Sensing Properties†. *J Phys Chem B.* 2003;107(30):7406–7413.
 200. Johnson SR, Evans SD, Brydson R. Influence of a Terminal Functionality on the Physical Properties of Surfactant-Stabilized Gold Nanoparticles. *Langmuir.* 1998;14(23):6639–47.
 201. Kanduc D. Homology, similarity, and identity in peptide epitope immunodefinition. *J Pept Sci.* 2012;18(8):487–94.
 202. Venclovas C. Methods for Sequence Structure Alignment. *Methods Mol Biol.* 2011;857:55–82.
 203. Borase HP, Patil CD, Salunkhe RB, Suryawanshi RK, Kim BS, Bapat V a., et al. Bio-Functionalized Silver Nanoparticles: a Novel Colorimetric Probe for Cysteine Detection. *Appl Biochem Biotechnol.* 2015;(2015):3479–93.
 204. Yuan Y, Zhang J, Zhang H, Yang X. Silver nanoparticle based label-free colorimetric immunosensor for rapid detection of neurogenin 1. *Analyst.* 2012;137(2):496–501.
 205. Raj V, Vijayan AN, Joseph K. Naked eye detection of infertility using fructose blue-A novel gold nanoparticle based fructose sensor. *Biosens Bioelectron.* 2014;54:171–4.
 206. Zeng S, Yong K, Roy I. A Review on Functionalized Gold Nanoparticles for Biosensing Applications. *Plasmonics.* 2011;6:491–506.
 207. Mittelman AM, Fortner JD, Pennell KD, Lifia J, Amal R, Sun H, et al. Effects of ultraviolet light on silver nanoparticle mobility and dissolution. *Environ Sci Nano.* 2015;2(6):683–91.
 208. Labille J, Feng J, Botta C, Borschneck D, Sammut M, Cabie M, et al. Aging of TiO₂ nanocomposites used in sunscreen. Dispersion and fate of the degradation products in aqueous environment. *Environ Pollut.* 2010;158(12):3482–9.
 209. Zhao W, Brook MA, Li Y. Design of Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Biosensing Assays. *ChemBioChem.* 2008;9(15):2363–71.
 210. Teichroeb JH, Forrest JA, Ngai V, Jones LW. Anomalous thermal denaturing of proteins adsorbed to nanoparticles. *Eur Phys J E.* 2006;21(1):19–24.