Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Ariana de Souza Moraes dos Santos

Desenvolvimento do nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀ para o diagnóstico altamente específico e sensível de doenças do espectro da neuromielite óptica

Tese apresentada ao Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Prof. Dr. Fabio de Lima Leite

São Paulo
2019

Ariana de Souza Moraes dos Santos

Desenvolvimento do nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀ para o diagnóstico altamente específico e sensível de doenças do espectro da neuromielite óptica

Tese apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Prof. Dr. Fabio de Lima Leite

São Paulo

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
da Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

Santos, Arianas de Souza Moraes dos

Desenvolvimento do nanoimunossensor-AQP₄₆₁₋₇₀ para o diagnóstico altamente específico e sensível de doenças do espectro da neuromielite óptica / Arianas de Souza Moraes dos Santos. – São Paulo, 2019.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Fábio de Lima Leite

Descritores: 1. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA. 2. SENSOR. 3. ANTICORPOS. 4. NEUROCIÊNCIAS. 5. NEUROMIELITE ÓPTICA. 6. DIAGNÓSTICO.

USP/IMTSP/BIB-12/2019.

*Dedico este trabalho (mais uma vez) à minha maior
inspiração em realizá-lo, Joana, que mesmo sem saber me
lembra, cada dia, o porquê de não desistir.
Aos que sabiam o que aqui contém antes mesmo de eu tê-lo
escrito, reflexo do fato de terem me acompanhado bem de
perto neste período importante de minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo Fábio Leite por todo o ensinamento científico e pessoal responsáveis pelo meu crescimento como cientista desde a graduação, pela sua paciência, disponibilidade e prontidão, conselhos e amizade. Por acreditar que juntos “vamos descobrir algo” (como sempre diz) e confiar em mim para fazer parte disso.

À Dra. Doralina, co-orientadora deste trabalho, pela coleta das amostras e todo o cuidado e organização com elas, e principalmente, por sua incansável disponibilidade e presença na discussão do trabalho, da execução e dos resultados, desde a concepção deste projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais e Saúde Internacional do Instituto de Medicina Tropical da USP (IMTSP) pela oportunidade de execução deste trabalho e aos colaboradores do IMTSP, especialmente à Eliane Araújo por todo o cuidado, paciência e prontidão.

À banca de qualificação (Dra. Thelma Suely Okay, Prof. Dra. Camila Malta Romano, Dr. Renan Barros Domingues e Prof. Dr. Marcelo A. Pereira da Silva) por todas as considerações naquele exame que nortearam e enriqueceram muito a continuidade e finalização deste trabalho. Agradeço também à Prof. Dra. Hiro Goto que, das poucas vezes que a vi (geralmente em bancas de alunas do nosso grupo de pesquisa), aprendi coisas que me auxiliaram muito, principalmente nas análises de nossos dados. Embora a pouca convivência, percebi que sempre tem algo para ensinar (um consenso em nosso grupo de pesquisa).

Aos colaboradores deste trabalho: Prof. Dra. M. Teresa Machini (IQ-USP), Dr. Luís Antonio Peroni (Rheabiotech), Dr. Paulo Diniz da Gama (Instituto do Cérebro), Prof. Dra. Marystela Ferreira, Dra. Celina M. Miyazaki, Dr. Flávio Makoto Shimizu e Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr.: sua colaboração foi extremamente importante para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Ciência de Superfícies (LCS) do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), instalações do Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais (CNPEM), especialmente ao Dr. Carlos Alberto Rodrigues Costa e aos estagiários pelo grande auxílio nas análises com o AFM-IR, pelas conversas e troca de experiências.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), *Campus* Sorocaba, pelas instalações que possibilitaram a execução deste trabalho.

Aos professores que conheci e dividiram comigo seu conhecimento neste período de Doutorado, por meio das disciplinas, de um modo especial à Prof. Dra. Chao Yun Irene Yan, à Prof. Dra. Estela Maris A. F. Bevilacqua, ao Prof. Dr. Sérgio Ferreira de Oliveira, ao Prof. Dr. Alexandre Alarcon Steiner e ao Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt (ICB-USP).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento desta pesquisa no âmbito do convênio CAPES/FAPESP, via processo FAPESP nº 2015/05283-6, no período de julho/2015 a junho/2019.

Ao Grupo de Pesquisa em Nanoneurobiofísica (GNN), a família científica que eu vejo crescer e que me faz crescer. Agradeço especialmente à Akemi, Jéssica e Lívia por dividirem o amor à Ciência comigo em forma de discussões de achados e resultados, todos os dias. Às alunas de iniciação científica Amanda, Bruna Santos, Bruna Galo e Raquel, com vocês também aprendo. Aos amigos de laboratório e de vida, Lucas, André e Tiago.

A todos os voluntários que cederam suas amostras para este estudo.

À minha família: meus pais Maria e Roberto, meu irmão Alberto e minha cunhada Gisele; Mielina e Holly.

Aos amigos que de perto ou de longe me acompanharam neste período: Joana, Tati, Bárbara, Kazu, Jadder, Camila, Gabriela, Manu, Alessandra, Daniela, Monique, Neto e Eric, obrigada por seu constante apoio. Ao meu esposo Jonas por sua paciência, companheirismo e toda a ajuda.

A Deus, agradeço por tudo até aqui, pelas conquistas e dificuldades que Ele conhece melhor do que ninguém e por tudo o que me permitiu viver até aqui, que foram momentos como tijolos para esta construção.

A todos os que também indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

“L’essentiel est invisible pour les yeux.”
(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

Santos ASM. Desenvolvimento do nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀ para o diagnóstico altamente específico e sensível de doenças do espectro da neuromielite óptica (Tese). São Paulo: Instituto de Medicina de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2019.

As doenças do espectro da neuromielite óptica (ENMO) são caracterizadas por uma síndrome inflamatória do sistema nervoso central, caracterizada por neurite óptica e mielite transversa que afeta principalmente a medula espinal e os nervos ópticos. Estas síndromes têm forte indicativo de mecanismo de ação humoral (envolvendo anticorpos). O diagnóstico correto para ENMO é extremamente importante para melhorar o prognóstico dos pacientes acometidos por esta síndrome, por isso requer métodos altamente específicos e sensíveis. O teste CBA, método atual altamente recomendado para o diagnóstico do ENMO na detecção do anticorpo anti-AQP4, possui 100% de especificidade e 76% de sensibilidade. Neste trabalho, foram testados peptídeos das alças externas da proteína AQP4 (AQP4₆₁₋₇₀, AQP4₁₃₁₋₁₄₀, AQP4₁₄₁₋₁₅₀, e AQP4₂₀₁₋₂₁₀), potenciais alvos do anti-AQP4, utilizando um nanoimunossensor de microscopia de força atômica para o desenvolvimento de um método de diagnóstico. Os resultados mostraram alta especificidade do nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀, tendo sido capaz de detectar o anti-AQP4 em amostras de IgGs purificadas do soro de pacientes do ENMO soropositivos com 100% de especificidade (95% IC 63,06–100,00), determinado pelo ponto de corte da força de adesão de 241,30 pN. Além disso, o nanoimunossensor distinguiu os pacientes do ENMO soropositivos dos indivíduos saudáveis, pacientes de esclerose múltipla e ENMO anti-AQP4 soronegativos, com sensibilidade de 81,25% (95% IC 56,50–99,43); resultado mais significativo do que aquele obtido pelo método CBA. Os resultados indicam que as diferenças entre os fenótipos do ENMO estudados (anti-AQP4 soropositivo e anti-AQP4 soronegativo) se referem à epítomos específicos da doença. A ausência do anti-AQP4 em pacientes soronegativos pode ser devido à existência de uma sequência peptídica da proteína AQP4 diferente da AQP4₆₁₋₇₀ ou, ainda, à presença antígenos-alvo em outras proteínas que devem ser explorados para o diagnóstico deste fenótipo do ENMO.

Descritores: Microscopia de força atômica. Sensor. Anticorpos. Neurociências. Neuromielite óptica. Diagnóstico.

ABSTRACT

Santos ASM. Development of the nanoimmunosensor-AQP4₆₁₋₇₀ for the highly specific and sensitive diagnosis of neuromyelitis optica spectrum disorders (Thesis). São Paulo: Instituto de Medicina de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2019.

Neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD) are inflammatory syndromes of the central nervous system, characterized by myelitis and optic neuritis events, which affect predominantly spinal cords and optic nerves. A precise diagnosis for NMOSD is crucial to improve patients' prognostic, which requires highly specific and sensitive tests. The cell-based assay with a sensitivity of 76% and specificity of 100% is the most recommended test to detect anti-aquaporin-4 antibodies (AQP4-Ab). Here, four AQP4 external loop peptides (AQP4₆₁₋₇₀, AQP4₁₃₁₋₁₄₀, AQP4₁₄₁₋₁₅₀, and AQP4₂₀₁₋₂₁₀) were tested with an atomic force microscopy nanoimmunosensor to develop a diagnostic assay. The results show the highest reactivity with AQP4₆₁₋₇₀-nanoimmunosensor. This assay was effective in detecting AQP4-Ab in sera of NMOSD patients with 100% specificity (95% CI 63.06–100.00), determined by the cut-off adhesion force value of 241.3 pN. NMOSD patients were successfully discriminated from a set of healthy volunteers, patients with multiple sclerosis, and AQP4-Ab-negative patients. AQP4₆₁₋₇₀ sensitivity was 81.25% (95% CI 56.50–99.43). This sensitivity value was higher than the obtained by CBA method. The results with the AQP4₆₁₋₇₀-nanoimmunosensor indicate that the differences between NMOSD seropositive and seronegative phenotypes are related to disease-specific epitopes. The absence of AQP4-Ab in sera of NMOSD AQP4-Ab-negative patients may be interpreted by assuming the existence of another potential AQP4 peptide sequence or non-AQP4 antigens for NMOSD diagnosis purposes.

Descriptors: Atomic force microscopy. Sensor. Antibodies. Neuroscience. Neuromyelitis optica. Diagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema representativo da imunopatologia (A) do ENMO anti-AQP4+ e (B) da EM.	39
Figura 2 – Diagrama do monômero e do tetrâmero estrutural da AQP4. (A) monômero da AQP4, constituído de seis hélices de domínio transmembranar e duas hélices curtas que circundam o poro, nomeadas de M1 a M8. (B) Tetrâmero em visão de topo, do lado extracelular para dentro, no eixo simétrico das quatro subunidades.	41
Figura 3 – Isoformas da AQP4 humana: a M-1 que inicia na metionina 1 da porção N-terminal e a M-23 que inicia na metionina 23 da porção N-terminal.	41
Figura 4 – Estrutura da IgG. (A) IgG1, evidenciando as cadeias pesadas e suas regiões conservadas (C _H) e regiões variáveis (V _H), bem como as cadeias leves e suas regiões conservadas (C _L) e regiões variáveis (V _L). Os domínios C _{H2} e C _{H3} formam a região Fc, e os domínios C _{H1} , C _L , V _H e V _L formam a região Fab da IgG. (B) Forma em “Y” da IgG1 e forma em “T” da IgG2a, conferidas devido aos ângulos de abertura e mobilidade entre as cadeias.	43
Figura 5 – Princípio de funcionamento do microscópio de força atômica: o laser é defletido sobre o cantilever que o reflete novamente ao fotodetector; um controlador recebe o sinal que é expresso no software.	45
Figura 6 – Interação de biomoléculas por AFS. Curva de força gerada a partir da interação da ponta com a amostra e do desprendimento ponta-amostra, oferecendo informações da força de interação entre as moléculas.	46
Figura 7 – Funcionalização de nanossuperfícies. No topo, a ponta de AFM de silício recoberta por uma monocamada de 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) e da enzima ACCase (acetil-CoA carboxilase) (representada em azul, amarelo e roxo). Na base, o substrato de silício recoberto com APTES e herbicida diclofop, inibidor da ACCase.	47
Figura 8 – Etapas de funcionalização e imobilização aleatória de IgGs. (1) A mica não-funcionalizada é silanizada com (2) APTES, proporcionando grupamentos químicos para (3) imobilização das IgGs. (3-a) A IgG pode ser imobilizada na posição na qual as regiões variáveis fiquem totalmente disponíveis, (3-b) parcialmente disponíveis ou, ainda, (3-c) totalmente indisponíveis.	48
Figura 9 – Imobilização orientada de IgGs. (1) Superfície de silício com (2) APTES. (3) Imobilização da PtA para interação com a região Fc da IgG e (4) consequente imobilização orientada da IgG, proporcionando alta especificidade e alta sensibilidade ao nanoimunossensor. Adaptado com “Proteína A” de Nilsson et al. (arquivo PDB 1H0T) ¹⁰¹	49
Figura 10 – Interações entre domínios da PtA e regiões Fc e Fab de IgG. (A) Os domínios C e D da PtA (SpA ^C e SpA ^D) podem interagir com a região Fab da IgG (região superior). (B) Quando a IgG está íntegra, é mais favorável a interação dos domínios com a região Fc (região inferior). O domínio C da PtA (SpA ^C) interage mais fortemente com a região Fc da IgG do que com a região Fab.	50
Figura 11 – Affibody Z _{SPA-1} formando o domínio Z da PtA. Molécula capaz de mimetizar a PtA em sua capacidade de interação com a região Fc da IgG.	50
Figura 12 – O formato da curva evidencia o reconhecimento de interação não-específica e interação específica. (A) Na curva de força típica não há mudança no declive da linha de retração. (B) A mudança no declive da linha	

de retração indica reconhecimento específico entre moléculas, devido ao relaxamento do cantilever.	53
Figura 13 – Curva de força com múltiplos picos. Este formato da curva de força evidencia o desenovelamento da proteína ou anticorpo em cada pico, antes que ocorra o total desprendimento intermolecular.	53
Figura 14 – Force Volume. Imagem de baixa resolução gerada no AFM, na qual em cada pixel é adquirida uma curva de força da interação entre a ponta e a amostra.	54
Figura 15 – SPR segundo a configuração de Kretschmann.	56
Figura 16 – Princípio de funcionamento do AFM-IR. Entre a ponta de AFM e a amostra incide um feixe de infravermelho pulsado, a expansão do laser faz com que a oscilação ressonante do cantilever seja proporcional ao coeficiente de absorção da imagem. A medida da oscilação do cantilever gera um gráfico de absorção.	57
Figura 17 – Localização dos peptídeos, utilizados neste trabalho, na proteína AQP4. Potencialmente reativos: AQP4 ₆₁₋₇₀ (verde oliva) e AQP4 ₂₀₁₋₂₁₀ (verde claro). Potencialmente não-reativos: AQP4 ₁₃₁₋₁₄₀ (rosa) e AQP4 ₁₄₁₋₁₅₀ (vermelho).	59
Figura 18 – Superfícies oxidadas e interação com reagentes de aminação. O nitreto de silício e a mica muscovita oxidados reagem com os grupos silanos do aminopropiltrietoxisilano. A superfície oxidada de ouro reage com os grupos tióis da cisteamina (Cist).	61
Figura 19 – Esquema do nanoimunossensor e substrato após a silanização/aminação, funcionalização e imobilização das biomoléculas.	63
Figura 20 – Curva ROC. (A) Cut-off (1, 2 e 3) que determina o nível de sensibilidade (eixo y) e de especificidade (eixo x). (B) A AUC diz respeito ao desempenho do teste, podendo variar de 0,5 a 1,0.	65
Figura 21 – Desenho experimental.	67
Figura 22 – Mapeamento das forças de adesão por Force Volume. (A) Pixels com curvas não-específicas (marcadas em vermelho), indicando a ausência de anti-AQP4 nesta amostra, pois as forças de adesão obtidas são provenientes de outros tipos de interações que não antígeno-anticorpo. (B) Curvas específicas (marcadas em verde) adquiridas da interação entre o peptídeo e anti-AQP4.	68
Figura 23 – Homogeneidade da imobilização orientada e aleatória. (A) A imobilização aleatória (ciano escuro) apresentou menor homogeneidade (maior rugosidade) comparada à imobilização orientada (vermelho). (B) Esquema da imobilização aleatória, no qual a, b e c representam as possíveis posições das IgGs imobilizadas, motivo pelo qual a rugosidade é maior quando comparado à imobilização orientada. (C) Esquema da imobilização orientada, da qual são obtidos menores valores de rugosidade devido à posição das IgGs imobilizadas. (As imagens analisadas possuem 10 µm x 10 µm ² . Valores de rugosidade estão apresentados na Tabela 7).	72
Figura 24 – Imagens de AFM para caracterização da funcionalização. (A) Nitreto de silício não-funcionalizado; (B) silanizado com APTES; (C) com PEG e peptídeo imobilizados e (D) com PtA e, posteriormente, com IgGs imobilizadas (Imagens de 140 µm x 110 µm ²).	74
Figura 25 – Caracterização da funcionalização do substrato (mica) por AFM-IR. (A) Imagem de AFM de 10 µm ² da região da mica analisada; o inserto mostra a imagem do microscópio óptico, na qual é possível ver a ponta de AFM do	

AFM-IR sobre a mica. (B) Perfil topográfico de A. (C) Espectro integrado e deconvolução dos espectros da região de filme fino. (D) Espectro integrado e deconvolução dos espectros da região de aglomerados dos compostos da funcionalização. 76

Figura 26 – Caracterização da funcionalização da ponta de AFM (nanoimunossensor) por AFM-IR. (A) Imagem de AFM de $10\ \mu\text{m}^2$ da região do nanoimunossensor analisada; o inserto mostra a imagem do microscópio óptico, na qual é possível ver a ponta de AFM do AFM-IR sobre o cantilever (nanoimunossensor). (B) Perfil topográfico de A. (C) Espectro integrado e deconvolução dos espectros da região de filme fino. (D) Espectro integrado e deconvolução dos espectros da região de aglomerados dos compostos da funcionalização. 77

Figura 27 – Caracterização do processo de funcionalização e detecção do anti-AQP4 por SPR. (A) Esquema do princípio de funcionamento do SPR. (B) Cinética da funcionalização após as injeções de PEG e de peptídeo. (C) e (D) Comparação entre o canal de referência e o canal de detecção do anti-AQP4. 81

Figura 28 – Reatividade do painel de peptídeos com o anti-AQP4. (A) Esquema do Force Volume, o qual contém curvas de retração não-específicas (vermelho) provenientes da formação de amida ou curvas de retração específicas (verde), das interações antígeno-anticorpo. A linha azul é a curva de aproximação. (B) IDMAP gerado a partir do Force Volume (imagens $40\ \mu\text{m} \times 40\ \mu\text{m}^2$; os pixels escuros indicam forças de adesão menores e os pixels claros, forças de adesão maiores), demonstrando a prevalência de curvas específicas somente para as medidas com o peptídeo AQP4₆₁₋₇₀. (C) Boxplot quantificando as forças de adesão da interação entre os peptídeos da AQP4 e o anti-AQP4; nenhuma diferença significativa foi encontrada entre: AQP4₁₃₁₋₁₄₀ e AQP4₁₄₁₋₁₅₀ ($p=0,68$); AQP4₁₃₁₋₁₄₀ e AQP4₂₀₁₋₂₁₀ ($p=0,79$); AQP4₁₄₁₋₁₅₀ e AQP4₂₀₁₋₂₁₀ ($p=0,57$). As interações foram estatisticamente diferentes entre o peptídeo AQP4₆₁₋₇₀ e os outros peptídeos (AQP4₁₃₁₋₁₄₀, $p=0,0009$; AQP4₁₄₁₋₁₅₀, $p=0,02$ e AQP4₂₀₁₋₂₁₀, $p=0,007$). Os formatos das curvas de adesão representativas estão apresentados na parte de cima do gráfico, mostrando as interações prevalentes em cada sistema. A região da força de adesão está circulada na curva. A barra de escala para a força é de 200 pN. 84

Figura 29 – Desempenho e acurácia do nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀. (A) IDMAP das curvas de retração mostrando grupos distintos para as interações específicas em ENMO (anti-AQP4+, em verde) e não-específicas (saudáveis, em preto; EM, em vermelho; e anti-AQP4-, em marrom). (B) Boxplot quantificando as medianas das forças de adesão obtidas com o nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀. O nanoimunossensor foi efetivo em distinguir ENMO anti-AQP4+ de saudáveis, EM, ENMO anti-AQP4- e ENMO anti-AQP4+ (saudáveis, $p=0,004$; EM, $p=0,008$; ENMO anti-AQP4-, $p=0,0008$). Os formatos das curvas de adesão representativas estão apresentados na parte de cima do gráfico, mostrando as interações prevalentes em cada sistema. A região da força de adesão está circulada na curva. A barra de escala para a força é de 200 pN. (C) Curva ROC para a comparação entre ENMO anti-AQP4+ e amostras soronegativas para anti-AQP4 (saudáveis e EM) com AUC de 1,0 e $p=0,0001$, confirmando a alta especificidade do nanoimunossensor. O ponto de corte da força de adesão foi de 241,3 pN a 100% de especificidade

(95%; IC 63,06–100,00). (D) Curva ROC para a comparação entre os pacientes ENMO anti-AQP4+ e ENMO anti-AQP4– com os saudáveis e pacientes de EM com AUC de 0,82 e $p=0,0078$, resultando em 81,25% de sensibilidade (95%; IC 56,50–99,43) do nanoimunossensor. 87

Figura 30 – Relação entre a titulação e a força de adesão. (A) Boxplot das medianas das forças de adesão medidas com nanoimunossensor nas amostras tituladas. (B) Correlação (R^2) de 90% entre a titulação de anti-AQP4 das amostras e a força de adesão medida pelo nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀. (Os valores das medianas e os IQR estão no Apêndice B). A linha tracejada marca o ponto de corte: 241,3 pN. 90

Figura 31 – Funcionalização e imobilização. (Topo) Ponta de AFM de nitreto de silício (marrom) funcionalizada com APTES, espaçador PEG e peptídeo AQP4₆₁₋₇₀ (verde). (Base) Mica (marrom) funcionalizada com APTES, PtA e IgG imobilizada. (Elaborado pelo aluno Adriano Moraes Amarante). 92

Figura 32 – Desprendimento do peptídeo AQP4₆₁₋₇₀ em complexo com a IgG e força de adesão teórica medida por SMD. (A) Estrutura do complexo região Fab da IgG com o peptídeo, indicando os átomos fixados C α dos resíduos ALA123 (cadeia leve) e ARG113 (cadeia pesada) da região Fab da IgG e o átomo C α do resíduo MET10 do peptídeo no qual foi aplicada a força externa para o desligamento do complexo. (B) Força de adesão teórica, 224,0 pN. (C) Ponto de corte da força de adesão experimental, 241,3 pN. 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Recomendações do painel para a terapia.	33
Tabela 2	– Proposta do critério diagnóstico para NMO elaborada por Wingerchuk et al. .	34
Tabela 3	– Critério diagnóstico revisado proposto para NMO por Wingerchuk et al.	35
Tabela 4	– Critério diagnóstico revisado para ENMO em adultos.....	36
Tabela 5	– Forças de ruptura de interações entre moléculas.....	51
Tabela 6	– Relação entre o resultado do teste e a presença da doença.	64
Tabela 7	– Valores de rugosidade das imobilizações aleatória e orientada.	72
Tabela 8	– Deslocamentos do pico e da amplitude dos espectros das regiões de compostos aglomerados e de filmes finos das superfícies caracterizadas (mica e nanoimunossensor). Em cada espectro está indicado à qual estrutura polipeptídica se refere.....	78
Tabela 9	– Percentagem da contribuição das principais estruturas presentes após o processo de funcionalização.	79
Tabela 10	– Valores de deslocamento dos ângulos de ressonância de cada etapa de funcionalização e da detecção do anti-AQP4 pelo peptídeo AQP4 ₆₁₋₇₀	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	anticorpo
ACCase	acetil-CoA carboxilase
AChr	do inglês <i>acetylcholine receptor</i>
AFM	do inglês <i>atomic force microscopy</i>
AFM-IR	AFM acoplado com infravermelho
AFS	do inglês <i>atomic force spectroscopy</i>
ALA	alanina
Anti-AQP4	anticorpo anti-aquaporina-4
APC	do inglês <i>antigen-presenting cells</i>
APTES	3-aminopropiltriethoxisilano
AQP4	proteína aquaporina-4
AQP4 ₁₃₁₋₁₄₀	peptídeo com os aminoácidos de 131-140 da AQP4
AQP4 ₁₄₁₋₁₅₀	peptídeo com os aminoácidos de 141-150 da AQP4
AQP4 ₂₀₁₋₂₁₀	peptídeo com os aminoácidos de 201-210 da AQP4
AQP4 ₆₁₋₇₀	peptídeo com os aminoácidos de 61-70 da AQP4
ARG	arginina
AUC	do inglês <i>area under the ROC curve</i>
B	linfócito B
BHE	barreira hematoencefálica
BOC	banda oligoclonal
CAM	complexo de ataque à membrana
CBA	do inglês <i>cell-based assay</i>
CD20	do inglês <i>cluster of differentiation 20</i>
CD4	células T CD4+
CD8	linfócito T CD8+ citotóxico
CDR	do inglês <i>complementarity determining region</i>
C _H	do inglês <i>constant heavy chain</i>
CI	do inglês <i>confidence interval</i>
Cist	cisteamina
C _L	do inglês <i>constant light chain</i>

CNPEM	Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais
C-terminal	carboxi-terminal
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDSS	do inglês <i>expanded disability status scale</i>
ELISA	do inglês <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EM	esclerose múltipla
ENMO	espectro da neuromielite óptica
EOS	eosinófilo
<i>et al.</i>	do latim, <i>et alli</i>
Fab	do inglês <i>fragment antigen-binding</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Fc	do inglês <i>fragment crystallizable</i>
FN	falso negativo
FP	falso positivo
Glu	glutaraldeído
hCG	do inglês <i>human chorionic gonadotropin</i>
HLA	do inglês <i>human leucocyte antigen</i>
HLA-DRB	HLA de classe II isótipo DR beta
IC	intervalo de confiança
ICAM-1	do inglês <i>intercellular adhesion molecule</i>
IDMAP	do inglês <i>interactive document mapping</i>
IFI	imunofluorescência indireta
IgG	imunoglobulina G
IQR	do inglês <i>interquartile range</i>
IR	infravermelho
LCR	líquido cefalorraquidiano
LFA-1	do inglês <i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LNNano	Laboratório Nacional de Nanotecnologia
LRP4	do inglês <i>lipoprotein-related protein 4</i>
MBP	do inglês <i>myelin basic protein</i>
MET	metionina
MG	miastenia gravis

MHC	do inglês <i>major histocompatibility class</i>
MMP-9	do inglês <i>matrix metalloproteinases 9</i>
MOG	do inglês <i>myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>
MT	mielite transversa
MusK	do inglês <i>muscle-specific kinase</i>
N	neutrófilo
NHS	N-hidroxisuccinimida
NMO	neuromielite óptica
NMOSD	do inglês <i>neuromyelitis optica spectrum disorders</i>
NO	neurite óptica
N-terminal	amino-terminal
PDB	do inglês <i>protein data bank</i>
PEG	polietileno glicol
Pep	peptídeo
pH	potencial hidrogeniônico
PLP	do inglês <i>proteolipid protein</i>
PtA	proteína A
RM	ressonância magnética
ROC	do inglês <i>receiver operating characteristic</i>
RyR1	do inglês <i>ryanodine receptor 1</i>
SMD	do inglês <i>Steered Molecular Dynamics</i>
SNC	sistema nervoso central
SpA ^B	domínio B da proteína A
SpA ^C	domínio C da proteína A
SpA ^D	domínio D da proteína A
SPR	do inglês <i>surface plasmon resonance</i>
T	linfócito T
TCLE	termo de consentimento e livre esclarecimento
TCR	do inglês <i>T-cell receptor</i>
UV	ultravioleta
VCAM-1	do inglês <i>vascular cell adhesion molecules 1</i>
V _H	do inglês <i>variable heavy chain</i>

V _L	do inglês <i>variable light chain</i>
VLA-4	do inglês <i>very late activation antigen 4</i>
VN	verdadeiro negativo
VP	verdadeiro positivo
Z _{SPA-1}	<i>affibody</i> , domínio Z da proteína A

LISTA DE SÍMBOLOS OU FÓRMULAS

%	porcentagem
Anti-AQP4+	soropositivo para anti-AQP4
Anti-AQP4–	soronegativo para anti-AQP4
:	razão
mm ³	milímetros cúbicos, unidade de medida de volume
*	chamada remissiva
T2	tempo de relaxamento transversal do tecido
T1	tempo de relaxamento longitudinal do tecido
MØ	macrófago
Å	ângstrom (10 ⁻¹⁰ m), unidade de medida de comprimento
pN	picoNewton (10 ⁻¹² m), unidade de medida de força
<i>x</i>	eixo das abcissas
<i>y</i>	eixo das ordenadas
<i>z</i>	eixo perpendicular aos eixos <i>x</i> e <i>y</i>
–SH	tiol
–COOH	carboxila
–NH ₂	amina primária
–SiH ₄	silano
–Au	ouro
–Si	silício
amina I	amina primária
~	aproximadamente
KCl	cloreto de potássio
MgCl ₂	cloreto de magnésio
C–C	ligação covalente simples (carbono-carbono)
C–O	ligação covalente simples (carbono-oxigênio)
Θ	ângulo
ΔΘ	deslocamento angular
u.a.	unidade arbitrária
cm ⁻¹	unidade de medida do número de onda (1/λ) (λ = comprimento de onda)

nm	nanômetro (10^{-9} m), unidade de medida de comprimento
n°	número
–OH	hidroxila
C ₉ H ₂₃ NO ₃ Si	3-aminopropiltrietoxisilano
C ₂ H ₇ NS	cisteamina
H ₂ O	água
mm	milímetro (10^{-3} m), unidade de medida de comprimento
mm ²	milímetro quadrado, unidade de medida de área
<i>k</i>	constante de mola
N/m	Newton/metro, unidade de medida da constante de mola
O ₃	ozônio
min	minuto, unidade de medida de tempo
μL	microlitro (10^{-3} L)
®	marca registrada
M	molar
NH ₂ –PEG–COOH	polietileno glicol bifuncional
μm	micrômetro (10^{-6} m), unidade de medida de comprimento
μm ²	micrômetro quadrado, unidade de medida de área
<i>p</i>	nível descritivo de probabilidade
™	<i>trademark</i> (marca comercial)
°C	graus Celsius
mg	miligrama (10^{-3} g), unidade de medida de massa
mL	mililitro (10^{-3} L), unidade de medida de medida de volume
amida I	amida primária
β	beta
α	alfa
C=O	carbonila
°	graus
amida II	amida secundária
R ²	coeficiente de determinação
x	vezes
ns	nanossegundo (10^{-9} s), unidade de medida de tempo

$C\alpha$	carbono alfa
$Kcal (mol \text{ \AA}^2)^{-1}$	unidade de medida da constante de mola computacional
$\text{\AA timestep}^{-1}$	unidade de medida da velocidade da aplicação do vetor força
$\text{\AA ps}^{-1}$	unidade de medida da velocidade da aplicação do vetor força
$\vec{F}$	vetor força

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
2	OBJETIVOS.....	28
2.1	Geral.....	28
2.2	Específicos.....	28
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	30
3.1	Neuromielite óptica.....	30
3.1.1	Definição, prevalência e epidemiologia.....	30
3.1.2	Sintomas, prognóstico e terapia.....	31
3.1.3	Revisões do critério diagnóstico: o que ocorreu nos últimos 20 anos ...	33
3.1.4	Papel do anti-AQP4 na imunopatologia do ENMO	37
3.2	Conhecendo as principais biomoléculas da patogenia de ENMO anti-AQP4+.....	40
3.2.1	Proteína AQP4	40
3.2.2	Autoanticorpo anti-AQP4.....	42
3.3	Nanoimunossensor	44
3.3.1	Nanoimunossensor de AFM: sensor capaz de detectar anticorpos por meio da força de adesão.....	44
3.3.2	Funcionalização covalente de superfícies: espectroscopia de força química	46
3.3.3	Proteína A e interação com a região Fc de IgGs	49
3.3.4	Interações específicas e não-específicas pela AFS: valor da força de adesão e formato da curva de força	51
3.3.5	Mapeamento da força de adesão (<i>Force Volume</i>).....	54
3.4	Caracterização da funcionalização pela técnica de ressonância plasmônica de superfície	55
3.5	Caracterização da funcionalização pela técnica de AFM acoplada com espectroscopia de absorção do infravermelho.....	56
3.6	Caracterização da funcionalização por imagens de AFM	57
4	MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.1	Obtenção dos peptídeos	59
4.2	Obtenção dos soros	60
4.3	Purificação dos soros	60
4.4	Protocolos de funcionalização das superfícies e imobilização das biomoléculas.....	60
4.4.1	Protocolo de silanização/aminação da ponta de AFM e do substrato...	61

4.4.2	Imobilização de peptídeos para as medidas de curva de força	62
4.4.3	Imobilização das IgGs para as medidas de curva de força	62
4.5	Nanoimunossensor e substrato	62
4.6	Medidas de curva de força.....	63
4.7	Análise estatística das forças de adesão.....	63
4.8	Análise de significância (valor de <i>p</i>).....	66
4.9	Desenho experimental.....	66
4.10	Mapeamento da força de adesão (<i>Force Volume</i>)	67
4.11	Imagens de AFM.....	68
4.12	AFM-IR.....	69
4.13	Medidas de SPR.....	69
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
5.1	Caracterizações	71
5.1.1	Caracterização da imobilização de IgGs no substrato	71
5.1.2	Caracterização das etapas da funcionalização do substrato e do sensor por imagens de AFM.....	73
5.1.3	Caracterização química do substrato e do sensor por AFM-IR	74
5.1.4	Caracterização das etapas da funcionalização do sensor em tempo real por SPR	80
5.2	Triagem de peptídeos a partir de um painel	82
5.3	Aplicação do nanoimunossensor como ferramenta de diagnóstico	85
5.4	Relação entre a força de adesão e a titulação de anti-AQP4	89
5.5	Abordagens computacionais.....	91
5.5.1	Simulação computacional da funcionalização do substrato e do nanoimunossensor-AQP4 ₆₁₋₇₀	92
5.5.2	Comparação da força de adesão experimental com a força de adesão teórica	93
6	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	96
	REFERÊNCIAS.....	99
	APÊNDICES	115
	ANEXOS.....	123

1 INTRODUÇÃO

Recentemente, a nanotecnologia foi aplicada no desenvolvimento de nanobiossensores e nanoimunossensores para a detecção de herbicidas¹⁻⁴, como ponto de partida para uma nova linha de pesquisa na Ciência, a Nanoneurobiofísica⁵. Tal linha de pesquisa surgiu da necessidade do diagnóstico diferencial e preciso na detecção de doenças desmielinizantes autoimunes inflamatórias do sistema nervoso central (SNC). Em especial, a Nanoneurobiofísica estuda duas doenças, a esclerose múltipla (EM), que acomete, em sua maioria, mulheres caucasianas com idade entre 20 e 40 anos, e doenças do espectro da neuromielite óptica (ENMO), síndrome que afeta principalmente mulheres descendentes africanas e asiáticas, com idade média de 40 anos, caracterizada por ataques de neurite óptica (NO) e mielite transversa (MT), ambas com forte indicativo de mecanismo de ação humoral (envolvendo anticorpos). Os nanobiossensores desenvolvidos foram imprescindíveis para vislumbrar que tal ferramenta poderia ser aplicada na detecção dos biomarcadores dessas doenças.

Ambas doenças são de difícil distinção, pois há uma linha tênue para a clara separação entre ENMO e EM, uma vez que a síndrome de neuromielite óptica pode ocorrer em ambas, ao ponto de o ENMO ter sido considerada uma variante da EM por décadas⁷. Contudo, o padrão dessas doenças difere, incluindo a imunopatologia e a terapia.

Em 2004, foi descrito um autoanticorpo que participa na imunopatologia do ENMO, o anti-aquaporina-4 (anti-AQP4), também conhecido como NMO-IgG, um marcador sorológico altamente específico para a doença encontrado em três quartos dos pacientes com esta síndrome⁸. O anti-AQP4 reconhece uma proteína dos canais de água nos processos podais (terminações) dos astrócitos, a aquaporina-4 (AQP4), e em conjunto com as moléculas do sistema complemento causa lesão desmielinizante e axonal, necrose, espessamento e hialinização vascular⁶.

Atualmente, para diagnóstico do ENMO, além do quadro clínico, são realizados testes laboratoriais para análise da presença do anti-AQP4 no soro dos pacientes⁹. Imunofluorescência indireta (IFI)^{8,10}, teste de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*)¹¹ e teste baseado em célula

(CBA, do inglês *cell-based assay*)¹² são testes com cerca 90-100% de especificidade, mas apenas 76% de sensibilidade para a detecção de anti-AQP4. Portanto, há um percentual de cerca de 24% de pacientes portadores do ENMO nos quais não foi possível detectar o anti-AQP4.

Neste sentido, este projeto investigou a aplicação de nanoimunossensores para contribuir com os diagnósticos diferenciais do ENMO, a partir da detecção do anti-AQP4, buscando saber se os 24% de pacientes negativos para anti-AQP4 em IFI, ELISA e CBA seriam soronegativos para este anticorpo ou se a sensibilidade dos atuais testes diagnósticos poderia ser melhorada com a aplicação dos nanoimunossensores.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver um nanoimunossensor, utilizando a microscopia de força atômica, para detectar o biomarcador do ENMO e auxiliar no diagnóstico da doença.

2.2 Específicos

- a) funcionalizar as nanossuperfícies (mica e ponta de AFM) com os peptídeos pré-selecionados da proteína aquaporina-4 (AQP4) (sequências de aminoácidos presentes nas alças extracelulares) e o biomarcador do ENMO (anti-AQP4);
- b) medir as forças de adesão da interação peptídeo-anticorpo por espectroscopia de força atômica (AFS, do inglês *atomic force spectroscopy*);
- c) avaliar a afinidade da interação entre os peptídeos da AQP4 e o anti-AQP4;
- d) detectar o biomarcador do ENMO por meio do nanoimunossensor;
- e) avaliar a especificidade do nanoimunossensor e seu potencial como ferramenta de diagnóstico por meio do estudo de amostras de indivíduos saudáveis e pacientes de EM, comparando com a força de adesão obtida nas amostras de pacientes do ENMO anti-AQP4+ (soropositivos);
- f) avaliar a sensibilidade do nanoimunossensor e, também, seu potencial como ferramenta de diagnóstico analisando amostras de pacientes do ENMO anti-AQP4– (soronegativos), comparando com a força de adesão obtida nas amostras de pacientes do ENMO anti-AQP4+;
- g) comparar a força de adesão experimental obtida por AFS com a força de adesão teórica obtida por simulações computacionais da interação do complexo entre peptídeo da AQP4 e anti-AQP4.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Neuromielite óptica

3.1.1 Definição, prevalência e epidemiologia

Devic e Gault, em 1894, descreveram a NO e a MT grave que, atualmente, são constituídas como algumas das características clínicas das doenças do ENMO¹³. Também conhecida como Doença de Devic, por anos ENMO foi considerado como uma variante da EM⁷. Atualmente, sabe-se que o ENMO é uma desordem distinta da EM, menos prevalente e pode estar associada a outras doenças autoimunes, contabilizando cerca de 20 a 30% de casos de comorbidade¹⁴.

As doenças do ENMO manifestam-se por uma síndrome de neuromielite óptica como resultado de ataques inflamatórios do SNC⁶, sem etiologia conhecida, porém de provável decorrência de fatores ambientais e genéticos⁷.

Esta doença é nove vezes mais prevalente em mulheres do que em homens, com idade média de 39 anos, embora possa atingir também crianças e idosos; além de ser mais frequente em descendentes asiáticos, africanos e latino-americanos^{7,15}. Embora um estudo da Austrália e da Nova Zelândia sobre a prevalência mundial do ENMO (sob sua definição mais atual¹⁶) relata nenhuma associação entre menor prevalência do ENMO com o aumento da latitude^{17,18}, o trabalho de Koduah *et al.*¹⁹ sugere atenção aos níveis de vitamina D em pacientes do ENMO, uma vez que, ainda que haja poucos estudos, níveis baixos dessa vitamina foram detectados em pacientes com manifestação monofásica e, ainda, níveis significativamente baixos foram associados ao aumento em quatro vezes do risco de remissão da doença. Além disso, um estudo mais recente de Miyamoto *et al.*²⁰ relatou a prevalência em mulheres, com um percentual de cerca de 60% dos casos estudados, acometendo pacientes com idade média de 42 anos, que ocorreu em maiores taxas no sul do Japão, demonstrando um padrão de distribuição diferente da EM neste país.

Pittock *et al.*²¹ relataram em seu estudo incidência de 88% em mulheres, dos pacientes portadores do ENMO estudados, com idade média de 37 anos. Com base em imagens de ressonância magnética (RM), 70% dos pacientes estudados apresentaram lesões de ataques de NO uni ou bilateral e 75% apresentaram lesões de ataque de MT.

Um estudo multicêntrico na Itália reportou a incidência do ENMO em mulheres com percentual de cerca de 80% em comparação aos homens, com idade média de 40 anos, incluindo pacientes com idade de 12 anos. NO foi relatada em 56% dos casos, enquanto MT ocorreu em 39% e ambas, NO e MT concomitantemente, ocorreram em 4% do grupo de pacientes²².

No Japão, Yamakawa *et al.*²³ relataram um caso de ENMO familiar, onde ainda não havia sido reportado nenhum caso desse aspecto, embora quatro pacientes envolvidos no estudo haviam históricos familiares de EM.

Devido ao fato de poucos casos familiares de ENMO serem relatados, as causas genéticas ainda são desconhecidas, principalmente em se tratando da falta de associação das mutações na proteína-alvo dos biomarcadores, a AQP4, com as manifestações clínicas do ENMO²⁴. Contudo sabe-se que o complexo HLA (do inglês *human leucocyte antigen*) está envolvido na etiologia do ENMO¹⁵. Em um estudo no qual foram avaliados os alelos de HLA-DRB (HLA de classe II isótipo DR beta) de pacientes de doenças do ENMO e pacientes de EM, brasileiros descendentes africanos, foi constatado que o perfil DRB de pacientes do ENMO difere dos pacientes de EM²⁵.

Del Negro *et al.*²⁶ apresentam um panorama da epidemiologia do ENMO no Brasil que coincide com a prevalência e epidemiologia mundial. Esse estudo demonstrou maior prevalência feminina (numa razão de 8:1) dentre os pacientes de ENMO brasileiros, com idade média de 40 anos e maior incidência em não-caucasianos.

3.1.2 Sintomas, prognóstico e terapia

Para melhorar a qualidade de vida dos pacientes do ENMO é necessária uma equipe multidisciplinar que esteja apta a minimizar as manifestações clínicas provenientes dos surtos. Os sintomas podem ser variados, concomitantes ou não, dependendo da gravidade do surto e das comorbidades.

A MT completa leva à perda sensorial simétrica e para ou tetraparesia (disfunções motoras de membros superiores e inferiores), a qual é observada por meio de uma escala expandida do estado de incapacidade (EDSS^a, do inglês *expanded*

^a EDSS (*expanded disability status scale*): método utilizado para avaliar a progressão de ENMO e EM²⁷, levando em consideração sistemas funcionais, visualizados na incapacidade de marcha. A avaliação é feita por meio de pontuação de 0 a 10, do menor ao maior grau de incapacidade.

disability status scale). A MT pode levar também à disfunção dos esfíncteres, dor radicular, espasmos, vômito, soluços intratáveis, vertigem, perda auditiva, fraqueza facial, visão dupla, ptose (pálpebra caída) e nistagmo (oscilação involuntária dos olhos), além de falha respiratória neurogênica. A NO, que pode ocorrer uni ou bilateralmente, leva à dor e perda visual parcial ou completa, esta última em pelo menos 60% dos casos²⁸.

Na Ásia, um estudo tailandês encontrou associação de NO em primeiro episódio com a recorrência de surto, e de síndrome da área postrema com manifestação monofásica. Além disso, o tratamento das manifestações graves com plasmaférese, altas doses orais de esteroides com redução escalonada e prevenção de surtos com azatioprina diminuíram os riscos de recorrência de surto²⁹.

Em Hong Kong, um estudo que acompanhou por nove anos um grupo de vinte e dois pacientes anti-AQP4+, em sua maioria mulheres com idade média de 47 anos em tratamento a longo prazo com imunossupressores, demonstrou que 62% dos pacientes tiveram surto recorrente, com espaçamento médio de vinte e sete meses. Desses, 68% foram acometidos com disfunção motora e 9% com disfunção visual. Tendo alcançado uma taxa de mortalidade de 13%³⁰.

No Brasil, vinte e quatro pacientes foram acompanhados quanto ao prognóstico, dos quais vinte e dois possuíam curso clínico recorrente e dois pacientes, o curso monofásico. Foram encontradas as seguintes associações: dois pacientes com encefalomielite disseminada aguda monofásica, um com encefalomielite disseminada recorrente, três com neuromielite óptica associadas com síndrome de Hughes, autoanticorpos e poliarterite nodosa, seis com neuromielite recorrente com endocrinopatias, e quatro casos com EM. Dos doze casos de neuromielite óptica (NMO) recorrente em afro descendentes acompanhados, seis morreram³¹.

Outro estudo que acompanhou a resposta de um grupo de pacientes brasileiros ao tratamento do ENMO concluiu que apenas azatioprina ou esta associada a prednisona reduziram a frequência de surtos e interromperam a progressão da incapacidade, além de efeitos adversos menores e gerenciáveis³².

Algumas recomendações do painel (especialistas da área) para a primeira e segunda linhas de tratamento, acerca da terapia para a prevenção de surtos em pacientes do ENMO, estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1 – Recomendações do painel para a terapia.

Linha de opção	Ordem de opção	Medicamento	Ação do princípio
Primeira	Primeira	Azatioprina com corticoide	Inibe a proliferação de células B e T.
		Rituximabe	Anticorpo monoclonal contra CD20 (do inglês <i>cluster differentiation 20</i>), proteína de membrana de células B. Reduz a atividade de células B.
	Segunda	Micofenolato de mofetila	Inibe a proliferação de linfócitos B e T e a produção de anticorpos pelos linfócitos B.
Segunda		Metotrexato	Inibe a proliferação de células B e T.
		Ciclosporina A	Inibe a proliferação de linfócitos T ativados.

Fonte: Frota *et al.*³³ e Baghbanian *et al.*³⁴.

Alguns imunomoduladores utilizados no tratamento da EM são ineficientes no tratamento de pacientes do ENMO, podendo até mesmo exacerbar os surtos nesses pacientes^{34–38}, exceto o acetato de glatiramer que demonstrou potencial eficácia em pacientes do ENMO não-responsivos a imunossupressores^{39,40}. Devido a isso, investigações acerca de imunoterapias têm sido assunto atual, a fim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes do ENMO^{38,41}.

Além disso, a plasmaférese se demonstrou efetiva em diminuir a EDSS em pacientes após surtos do ENMO em comparação com o tratamento com a metilprednisolona⁴²: obteve melhor resposta em MT isolada quando comparada às altas doses intravenosas de esteroides⁴³, bem como foi melhor tolerada pelos pacientes tratados comparada à metilprednisolona intravenosa, levando a uma melhora imediata de 50% dos surtos e, após 6 meses, 78% dos surtos, além de diminuir significativamente os níveis de anti-AQP4 na corrente sanguínea⁴⁴.

3.1.3 Revisões do critério diagnóstico: o que ocorreu nos últimos 20 anos

O critério diagnóstico é importante para avaliar, de modo prospectivo, se as manifestações de NO e MT, por exemplo, são indicativas de ENMO e para nortear o

tratamento, uma vez que é crucial a rápida identificação da doença e o correto tratamento em se tratando de doença com manifestações graves⁶. Neste tópico, sendo um breve histórico do que ocorreu com relação ao ENMO nos últimos 20 anos, ENMO será chamada de NMO até o momento em que passou a ser denominada ENMO, por consenso dos especialistas.

Em 1999, Wingerchuk *et al.*⁶ propuseram um critério diagnóstico acerca da NMO, a qual até então era considerada como uma síndrome monofásica, com MT grave e NO bilateral simultânea ou sequencial, resultando em paraplegia e cegueira, além de ser ainda considerada por alguns uma variante da EM e com patogênese desconhecida. Esse trabalho propôs então que para ser diagnosticado com NMO, o paciente deveria atender a todos os critérios absolutos *e* um critério de apoio principal *ou* dois critérios de apoio secundários, listados na Tabela 2.

Tabela 2 – Proposta do critério diagnóstico para NMO elaborada por Wingerchuk *et al.*

Critérios		Manifestações
Critérios absolutos		NO
		MT
		Nenhuma evidência de doença clínica fora do nervo óptico ou medula espinal
Critérios de apoio	Principais	RM encefálica sem lesões no início
		RM medular com lesões que se estendem por três corpos vertebrais ou mais
		Pleocitose do líquido cefalorraquidiano (LCR) maior que 50 leucócitos/mm ³ <i>ou</i> maior que 5 neutrófilos/mm ³
	Secundários	NO bilateral
		NO grave com acuidade visual invariável pior do que 20/200 (80% de perda) em pelo menos um olho Fraqueza grave, invariável, relacionada ao surto em um ou mais membros

Fonte: Wingerchuk *et al.*⁶.

Além de propor um critério diagnóstico para orientar médicos e pacientes, Wingerchuk *et al.*⁶ concluíram que a partir desse critério era possível distinguir NMO de EM.

Em 2004, Lennon *et al.*⁸ descreveram um autoanticorpo que participa na imunopatologia da NMO, o anti-AQP4, um marcador sorológico altamente específico

para a doença encontrado pelos testes atuais em três quartos dos pacientes com esta síndrome. O anti-AQP4 reconhece uma proteína dos canais de água nos processos podais (terminações) dos astrócitos, a AQP4, permeabilizando a barreira hematoencefálica (BHE), o que afeta a homeostase do glutamato no SNC e permite a entrada de células do sistema imune no encéfalo, como as moléculas do sistema complemento, que causam lesão axonal, necrose, espessamento e hialinização vascular^{6,45}.

Em 2006, com a descoberta do anti-AQP4 e sua relevância na patogênese da NMO, Wingerchuk *et al.*⁹ publicaram um trabalho propondo uma revisão dos critérios diagnósticos de 1999, removendo a restrição absoluta do envolvimento do SNC, nervo óptico e medula espinal, e enfatizando a especificidade da lesão longitudinalmente extensiva da medula espinal e incorporando a soropositividade do anti-AQP4 como critério para diagnóstico de NMO e, principalmente, para distinção desta com a EM (Tabela 3).

Tabela 3 – Critério diagnóstico revisado proposto para NMO por Wingerchuk *et al.*

Define NMO:	
1. NO	
2. MT	
3. Ao menos dois dos três critérios de apoio	RM com lesão contígua à medula espinal que se estende por três corpos vertebrais ou mais
	RM encefálica sem lesões do padrão para EM
	Soropositividade para anti-AQP4

Fonte: Wingerchuk *et al.*⁹.

Com a ampliação da abrangência de manifestações distintas do que eram consideradas até então no diagnóstico da NMO e com a mudança nos critérios diagnósticos, houve a necessidade de uma nova nomenclatura, tendo sido introduzido o termo “espectro da NMO” (ENMO)⁷.

Este novo termo incluiu pacientes soropositivos para anti-AQP4 (anti-AQP4+) com manifestações limitadas ou inaugurais de NMO (como primeiro surto de mielite transversa longitudinalmente extensiva – MTLE – ou NO bilateral ou recorrente) e pacientes com lesões cerebrais, diencefálicas e no tronco cerebral (menos recorrentes

em manifestações típicas da NMO), além de pacientes com comorbidades para outras doenças autoimunes e as formas de EM optico-espinal^{7,16}.

Em 2015, o Painel Internacional para Diagnóstico da NMO foi convocado para consenso no critério diagnóstico diante da necessidade de rever sua abrangência, além de melhor conceituar o termo ENMO¹⁶. Dessa maneira, as nomenclaturas NMO e ENMO foram unificadas no termo ENMO, estratificado quanto à presença ou ausência do anti-AQP4 no soro dos pacientes (ENMO anti-AQP4+ e ENMO anti-AQP4-) ^{16,46}. O critério diagnóstico foi revisado, como apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 – Critério diagnóstico revisado para ENMO em adultos.

Critério diagnóstico para ENMO com resultado para anti-AQP4 positivo	
1	Ao menos uma característica clínica principal*
2	Resultado positivo para anti-AQP4, utilizando melhor teste disponível (CBA é fortemente recomendado)
3	Exclusão de diagnósticos alternativos
Critério diagnóstico para ENMO com resultado negativo ou desconhecido para anti-AQP4	
1	Ao menos duas características clínicas principais*, ocorrendo como resultado de um ou mais episódios clínicos e que atendam aos seguintes requisitos:
a	Ao menos uma característica clínica principal* que deve ser NO, MTLE ou síndrome da área postrema.
b	Disseminação no espaço (duas ou mais características clínicas principais*)
c	Preenchimento dos requisitos adicionais de RM, quando aplicável
2	Resultado negativo para anti-AQP4 (utilizando o melhor teste disponível) ou resultado desconhecido
3	Exclusão de diagnósticos alternativos
Requisitos adicionais de RM para ENMO com resultado negativo ou desconhecido para anti-AQP4	
1	NO grave requer:
a	RM encefálica normal ou com lesões não-específicas na substância branca OU
b	RM de NO com lesão hiperintensa em T2 (tempo de relaxamento transversal do tecido) ou lesão com realce pelo gadolínio em T1 (tempo de relaxamento longitudinal do tecido), estendendo-se para além de metade do nervo óptico ou atingindo o quiasma óptico
2	Mielite grave: requer lesão intramedular que se estende para além de três corpos vertebrais (MTLE) ou atrofia focal da medula espinal contígua para além de três corpos vertebrais em pacientes com histórico prévio compatível com mielite grave
3	Síndrome da área postrema: requer lesão na medula dorsal ou área postrema
4	Síndrome grave do tronco encefálico: requer lesão periependimária do tronco encefálico
*Características clínicas principais	
1	NO
<i>(Continua na próxima página)</i>	

(Continuação da página anterior)

***Características clínicas principais**

2	Mielite grave
3	Síndrome da área postrema: episódios sem explicação de soluços ou náuseas e vômitos
4	Síndrome grave do tronco encefálico
5	Narcolepsia sintomática ou síndrome clínica diencefálica grave com lesões típicas de ENMO na RM
6	Síndrome encefálica sintomática com lesões típicas de ENMO na RM

Fonte: Wingerchuk *et al.*¹⁶; Frota *et al.*³³; Weinshenker e Wingerchuk⁴⁶; Bennet *et al.*⁴⁷; Bruscolini *et al.*⁴⁸.

Atualmente, tem-se verificado pelos testes laboratoriais que a maioria dos pacientes sem níveis detectáveis de anti-AQP4 no sangue, ou seja, ENMO anti-AQP4–, apresentam manifestação monofásica da doença, e, desses, uma minoria possuem níveis detectáveis de anticorpos contra a glicoproteína oligodendrocítica da mielina (MOG, do inglês *myelin oligodendrocyte glycoprotein*), anti-MOG, na corrente sanguínea, podendo apresentar características diferentes quando comparados aos pacientes de ENMO anti-AQP4+ (baixa frequência em mulheres, geralmente em jovens, com menor recorrência de surtos)^{16,49–51}.

Devido a isso, discute-se se esse perfil seria uma doença a parte⁵², no entanto, a função da anti-MOG ainda desconhecida na imunopatologia do ENMO^{53–55} fez com que o painel mantivesse esse fenótipo incluso no ENMO. Isso porque, segundo o Painel Internacional para Diagnóstico da NMO, embora atualmente os métodos laboratoriais alcancem apenas cerca de 76% de sensibilidade, podendo ter alguma explicação técnica para a não-deteção do anti-AQP4 em alguns pacientes do ENMO, pode acontecer de haver detecção desse autoanticorpo com o progresso da doença. Ocasionalmente, os níveis de anti-AQP4 aumentam com as recidivas clínicas e diminuem quando os pacientes são tratados com imunossupressores^{16,56}.

3.1.4 Papel do anti-AQP4 na imunopatologia do ENMO

Após a associação do anti-AQP4 com as manifestações do ENMO, pesquisadores têm buscado melhor entender a função deste autoanticorpo na patologia desta doença. A seguir serão apresentados os dados e correlações, obtidos até então, desta associação entre o anti-AQP4 e ENMO, em estudo até os dias atuais.

Autoanticorpos, como anti-AQP4 e anti-MOG, são potenciais biomarcadores para prognósticos de NO em pacientes de ENMO ou EM: em um estudo, dos vinte e três pacientes com lesões compatíveis com NO, 34% foram soropositivos para anti-MOG, 47% foram soropositivos para anti-AQP4 e 26% foram soropositivos para ambos os autoanticorpos⁵³. Com a descoberta do anti-AQP4 como biomarcador específico do ENMO anti-AQP4+, a distinção entre EM e NMO passou a ser realizada com maior precisão do que até então, uma vez que os testes detectaram pacientes soropositivos para anti-AQP4 com mais de 90% de especificidade e 73% de sensibilidade para NMO: dos quatorze pacientes estudados por Lennon *et al.*⁸, doze eram portadores de NMO ou possuíam alto risco para esta síndrome. No entanto, para um rápido e correto diagnóstico espera-se que essa taxa de 73% de sensibilidade possa ser aumentada, por isso busca-se, com este trabalho, elevar a taxa de precisão no que diz respeito à sensibilidade de detecção do sensor.

Roemer *et al.*⁵⁷ estudaram a perda de AQP4, proteína reconhecida pelo anti-AQP4, como parâmetro para a distinção entre EM e NMO. Foi possível descrever um padrão de perda de AQP4 recorrente em todos os nove pacientes de NMO estudados, padrão este distinto do padrão de expressão de AQP4 em pacientes de EM inclusive no estudo. Estudos consolidados, portanto, apontam que a imunopatologia do ENMO anti-AQP4+ pode ser desencadeada pelo autoanticorpo anti-AQP4 que reconhece a proteína AQP4, presente nos canais de água dos pés dos astrócitos que formam a BHE^{58,59}, diferente do que ocorre com pacientes de EM.

Embora não se conheça como ocorre a imunização no ENMO anti-AQP4+, segundo Wingerchuck *et al.*⁷, é possível observar algumas diferenças entre a imunopatologia da EM e ENMO anti-AQP4+: dentre todas as IgGs na corrente sanguínea dos pacientes de ENMO pode estar presente o anti-AQP4 que atinge o parênquima do SNC devido a lesões na BHE ou mesmo por transcitose endotelial, ocasionando neste local a ativação do complemento.

Como representado na Figura 1A, o anti-AQP4 reconhece a proteína AQP4, aumentando a permeabilidade da BHE, o que permite a entrada de eosinófilos (EOS) e neutrófilos (N) no SNC. Este reconhecimento antígeno-anticorpo causa lesões axonais e necrose do nervo óptico, além de espessamento e hialinização dos vasos sanguíneos, devido à montagem do complexo de ataque à membrana (CAM). Na fase

aguda do ENMO anti-AQP4+, o processo proinflamatório é detectado pela presença de grandes quantidades de EOS, N e linfócitos B no LCR, mas não IgGs^{7,60}.

Figura 1 – Esquema representativo da imunopatologia (A) do ENMO anti-AQP4+ e (B) da EM.

Fonte: Adaptado de Wingerchuk *et al.*⁷.

A hipótese da imunopatologia da EM (Figura 1B), por sua vez, descreve a ação de linfócitos T ativados (T) da corrente sanguínea interagindo, por meio de integrinas antígeno-1 associadas à função linfocitária (LFA-1, do inglês *lymphocyte function-associated antigen 1*) e antígeno-4 de aparecimento tardio (VLA-4, do inglês *very late activation antigen 4*), com os receptores nomeados moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1, do inglês *intercellular adhesion molecules 1*) e moléculas de adesão de célula vascular-1 (VCAM-1, do inglês *vascular cell adhesion molecules 1*) das células endoteliais, permeabilizando a BHE, juntamente com a ação de proteinases nomeadas metaloproteinases da matriz extracelular-9 (MMP-9, do inglês *matrix metalloproteinases 9*) e causando a inflamação no SNC⁷.

O processo inflamatório inicia com o reconhecimento de antígenos da EM ainda em estudo, como MOG, proteína básica de mielina (MBP, do inglês *myelin basic*

protein), proteína proteolipídica (PLP, do inglês *proteolipid protein*) ou β -arrestina⁶¹, apresentados pelo complexo de histocompatibilidade principal (MHC, do inglês *major histocompatibility class*) de classe II das células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *antigen-presenting cells*) às células T CD4⁺ (CD4) (célula receptora de antígeno – TCR, do inglês *T-cell receptor*). Nesse processo, a secreção de citocinas e quimiocinas causa a quimioatração de linfócito B (B) e T CD8⁺ (CD8), e monócitos. O processo proinflamatório desencadeado acarreta em desmielinização e dano axonal causados por mecanismos diferentes, envolvendo macrófagos (MØ) e linfócitos T CD8⁺ citotóxicos. Ocorre produção local (no parênquima do SNC) de anticorpos, ocasionado provavelmente pela expansão clonal dos linfócitos B que infiltraram no parênquima, agravando o dano axonal. Devido à proinflamação desencadeada, as bandas oligoclonais (BOC) de pacientes de EM apresentam pequenas concentrações de IgGs^{7,62}.

Assim, a inclusão do autoanticorpo anti-AQP4 nos critérios diagnósticos de ENMO se mostra consistente com o que vem sendo estudado com relação à imunopatologia de EM e de ENMO, sendo o teste de detecção de anti-AQP4 complementar aos testes clínicos e laboratoriais de BOC.

3.2 Conhecendo as principais biomoléculas da patogenia de ENMO anti-AQP4+

3.2.1 Proteína AQP4

As aquaporinas são membros de uma família de proteínas de membrana envolvidas no transporte de água para o interior das células com alta seletividade. Há cerca de duzentos tipos de aquaporinas, em diversas espécies, sendo doze expressas em mamíferos, dentre as quais está a AQP4 que é expressa no nervo óptico no encéfalo, mais abundante nos processos podais dos astrócitos^{63,64}.

Ho *et al.*⁶⁵ descreveram a estrutura da AQP4 por cristalografia de raio-X de alta resolução (1,8 Å), evidenciando que o monômero é constituído de seis hélices de domínio transmembranar e dois segmentos de hélices curtas, como representado na Figura 2A, nomeados de M1 a M8. Na Figura 2B, podemos observar o tetrâmero que forma o poro celular, visto da porção extracelular para baixo.

Figura 2 – Diagrama do monômero e do tetrâmero estrutural da AQP4. (A) monômero da AQP4, constituído de seis hélices de domínio transmembranar e duas hélices curtas que circundam o poro, nomeadas de M1 a M8. (B) Tetrâmero em visão de topo, do lado extracelular para dentro, no eixo simétrico das quatro subunidades.
Fonte: Adaptado de Ho *et al.*⁶⁵.

A AQP4 humana é produzida em duas isoformas: uma isoforma longa, a M-1, que inicia no aminoácido metionina na posição 1, e a isoforma mais curta, a M-23, com sua porção amino-terminal (N-terminal) iniciando na metionina localizada na posição 23^{64,66,67}, representada pela Figura 3.

Figura 3 – Isoformas da AQP4 humana: a M-1 que inicia na metionina 1 da porção N-terminal e a M-23 que inicia na metionina 23 da porção N-terminal.
Fonte: Adaptado de Verkman *et al.*⁶⁴.

Devido ao fato de alguns antígenos alvo de estudos pertencerem a proteínas intermembranares, sendo impossível a manipulação dessas proteínas, há trabalhos que utilizaram peptídeos ao invés do antígeno de determinado anticorpo^{68,69}, até mesmo no estudo de epítomos da AQP4⁷⁰, pois dessa maneira é possível otimizar os testes imunológicos.

Kampyalfka *et al.*⁷⁰ realizaram uma triagem de epítomos por meio de testes com peptídeos da AQP4 e detectaram epítomos intracelulares desta proteína que, em seu estudo, foram reconhecidos pelo anti-AQP4 com especificidade. Embora nesse estudo o peptídeo imunodominante (que obteve maior especificidade de interação com o anti-AQP4) seja intracelular, o que é possível, pois uma proteína pode apresentar mais de um epítomo, outros estudos mais recentes relatam a imunodominância de peptídeos das alças extracelulares, nomeados alças A, C e E⁷¹⁻⁷³. É esperado que na patologia do ENMO os epítomos da AQP4 em sua forma nativa (nos processos podais dos astrócitos) sejam extracelulares, em se tratando de uma proteína intermembranar, principalmente nas regiões que contém as três alças externas⁶⁴, nas quais estão contidos os peptídeos utilizados no presente trabalho.

3.2.2 Autoanticorpo anti-AQP4

O anti-AQP4 é um autoanticorpo, ou seja, reconhece o que é próprio do organismo, a proteína AQP4⁸. É uma imunoglobulina (IgG) formada por cadeias leves (C_L, do inglês *constant light chain*) e cadeias pesadas (C_H, do inglês *constant heavy chain*) que possuem regiões variáveis N-terminais (V_L e V_H, do inglês *variable light chain* e *variable heavy chain*, respectivamente), as quais são as regiões de reconhecimento de antígeno, ou seja, possuem alças da região determinante de complementariedade (CDRs, do inglês *complementarity determining region*). Os domínios C_{H2} e C_{H3} formam a região do fragmento cristalizável (Fc, do inglês *fragment crystallizable*), e os domínios C_{H1}, C_L, V_H e V_L formam a região do fragmento ligante de antígeno (Fab, do inglês *fragment antigen-binding*) (Figura 4A)⁷⁴.

Além disso, o anti-AQP4 é uma IgG do subtipo 1^{75,76} e possui características estruturais intrínsecas deste subtipo de IgG, como os ângulos de abertura e mobilidade entre as cadeias, unidas por pontes dissulfeto, conferindo-lhe o formato em “Y”, o que

a difere, por exemplo, de IgGs de subtipo 2a, que devido a estas características, ângulos de abertura distintos e menor mobilidade, possuem o formato em T⁷⁷ (Figura 4B).

Figura 4 – Estrutura da IgG. (A) IgG1, evidenciando as cadeias pesadas e suas regiões conservadas (C_H) e regiões variáveis (V_H), bem como as cadeias leves e suas regiões conservadas (C_L) e regiões variáveis (V_L). Os domínios C_{H2} e C_{H3} formam a região Fc, e os domínios C_{H1}, C_L, V_H e V_L formam a região Fab da IgG. (B) Forma em “Y” da IgG1 e forma em “T” da IgG2a, conferidas devido aos ângulos de abertura e mobilidade entre as cadeias.

Fonte: Adaptado de Harris *et al.* (IgG1, arquivo 1IGY⁷⁷) e Harris *et al.* (IgG2a, arquivo 1IGT⁷⁸), com imagens depositadas no *Protein data bank* (PDB)⁷⁹.

Deste modo, a patologia do ENMO é desencadeada a partir do reconhecimento da AQP4 pelas CDRs do anti-AQP4, provavelmente por meio das alças extracelulares da proteína AQP4 formadas por peptídeos lineares, como ocorre com a maioria dos autoanticorpos em doenças autoimunes em humanos, facilitando a internalização de moléculas próinflamatórias no SNC⁶⁴.

Tendo este conhecimento com relação à estrutura da proteína e do autoanticorpo anti-AQP4 e sua participação na imunopatogênese do ENMO, foi possível vislumbrar o desenvolvimento de sensores capazes de detectar o anti-AQP4 presente no soro de portadores dessa doença, com peptídeos da AQP4, ou seja, partes sintéticas da proteína, adequada às dimensões do sensor.

Um sensor de microscopia de força atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*), é capaz de detectar forças de interação da ordem de picoNewtons (pN), ou seja, trata-se de uma técnica altamente sensível. Assim, a proposta do presente trabalho foi desenvolver um sensor altamente sensível, a fim de melhorar a sensibilidade dos testes laboratoriais atuais para a detecção e a avaliação da presença ou ausência de anti-AQP4 em amostras de pacientes do ENMO, os quais atingem no máximo 76% de sensibilidade, ou ainda, confirmar a ausência deste autoanticorpo nos pacientes de ENMO anti-AQP4–.

3.3 Nanoimunossensor

3.3.1 Nanoimunossensor de AFM: sensor capaz de detectar anticorpos por meio da força de adesão

Os sensores de AFM foram inicialmente denominados nanobiossensores, pois utilizavam enzimas para a detecção de herbicidas^{1–3,80–82}; os herbicidas inibidores de enzimas eram detectados por meio de ligações específicas nos sítios ativos dessas enzimas, com grande sensibilidade.

Posteriormente, buscando aliar maior especificidade^b à alta sensibilidade do nanobiossensor, passou-se a utilizar anticorpos no lugar de enzimas⁴, uma vez que anticorpos são capazes de reconhecer um único antígeno, por meio da ligação a seus epítomos, ou seja, peptídeos com sequências de aminoácidos que determinam a imunogenicidade da proteína⁷⁴. Desta forma, os nanobiossensores passaram a ser chamados de nanoimunossensores.

Os nanoimunossensores de AFM utilizam o microscópio de força atômica, cujo princípio de funcionamento consiste na deflexão de um feixe de laser sobre o cantilever que, por sua vez, reflete o sinal a um espelho direcionando-o ao fotodetector. Este sinal recebido no fotodetector passa por um controlador, por meio de um computador acoplado, que transforma o sinal elétrico em informações de medidas de força e/ou imagens, como resultado da varredura da amostra pela ponta. Uma cerâmica

^bQuando o termo “específico(a)” se refere às ligações e interações intermoleculares (antígeno-anticorpo) diz respeito à afinidade desta interação no complexo antígeno-anticorpo, conceito este diferente do termo relativo à **especificidade do teste diagnóstico**, que também é abordado neste trabalho, explanado no item 4.7.1.

piezoelétrica realiza a oscilação da amostra nos eixos x , y e z sob a ponta do cantilever⁸³, como mostrado na Figura 5.

Figura 5 – Princípio de funcionamento do microscópio de força atômica: o laser é defletido sobre o cantilever que o reflete novamente ao fotodetector; um controlador recebe o sinal que é expresso no software.

Com esta ferramenta é possível realizar imagens e também medidas de interação da ponta com a amostra, principalmente a força de adesão que resulta de forças atrativas e repulsivas durante a varredura ponta-amostra, gerando uma curva de força *versus* distância de deslocamento da cerâmica piezoelétrica⁸⁴⁻⁸⁶. Esta potencialidade da AFM é chamada de AFS⁸⁷.

A AFS permite, portanto, medir a interação entre a ponta e amostra, podendo estas serem modificadas quimicamente com biomoléculas imobilizadas na superfície, a fim de medir a interação entre essas biomoléculas e seus ligantes: enzima-herbicida ou antígeno-anticorpo (Figura 6).

Figura 6 – Interação de biomoléculas por AFS. Curva de força gerada a partir da interação da ponta com a amostra e do desprendimento ponta-amostra, oferecendo informações da força de interação entre as moléculas.

Para realizar a AFS, é necessário modificar quimicamente as superfícies, utilizando protocolos de funcionalização covalente das pontas de AFM e substrato, bem como protocolos de imobilização de biomoléculas nas superfícies funcionalizadas.

3.3.2 Funcionalização covalente de superfícies: espectroscopia de força química

A imobilização de biomoléculas na ponta de AFM e no substrato é possível devido à modificação química destas superfícies, a fim de proporcionar grupamentos químicos para ligação covalente entre os elementos envolvidos na funcionalização.

Este conceito de modificação de pontas de AFM por meio de funcionalização química⁸⁸ torna a AFM sensível a interações moleculares específicas. A funcionalização pode ser feita com camadas auto-organizáveis de grupos tióis ($-SH$)⁸⁹, de terminações em grupos funcionais ($-COOH$ ou $-NH_2$) ou de grupos silanos ($-SiH_4$)⁹⁰, funcionalizados sobre pontas recobertas com ouro ($-Au$) ou superfícies de silício ($-Si$). Diferentes tipos de interações podem, a princípio, ser estudados variando os grupos funcionais, por exemplo, desenovelamento de proteínas⁹¹, adesão entre

superfícies^{92,93}, interações enzima-herbicida⁹⁴ (Figura 7), ou ainda, interações antígeno-anticorpo^{95,96}.

Figura 7 – Funcionalização de nanossuperfícies. No topo, a ponta de AFM de silício recoberta por uma monocamada de 3-aminopropiltrietoxissilano (APTES) e da enzima ACCase (acetil-CoA carboxilase) (representada em azul, amarelo e roxo). Na base, o substrato de silício recoberto com APTES e herbicida diclofop, inibidor da ACCase.

Fonte: Amarante et al.⁹⁴.

A funcionalização pode ocorrer, portanto, com a montagem de uma camada de APTES que interage covalentemente com a superfície oxidada do silício (ponta de AFM ou substrato de mica) (Figura 8-1 e Figura 8-2), disponibilizando grupamentos amina para a próxima etapa da funcionalização⁹⁷. A extremidade carboxi-terminal (C-terminal) da IgG interage com os grupamentos amina do APTES, com a adição de agentes reticulantes, o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS), que ativa a carboxila para reação espontânea com amina primária (amina I)⁹⁸ (Figura 8-3).

Figura 8 – Etapas de funcionalização e imobilização aleatória de IgGs. (1) A mica não-funcionalizada é silanizada com (2) APTES, proporcionando grupamentos químicos para (3) imobilização das IgGs. (3-a) A IgG pode ser imobilizada na posição na qual as regiões variáveis fiquem totalmente disponíveis, (3-b) parcialmente disponíveis ou, ainda, (3-c) totalmente indisponíveis.

Neste caso, a imobilização é aleatória, podendo variar as posições nas quais a IgG será imobilizada. Há três orientações, equivalentes aos descritos por Lu *et al.*⁹⁹ nas quais, em algumas delas, as regiões variáveis de interação com o antígeno podem ficar comprometidas. Como ilustrado pela Figura 8-3a, a IgG pode ser imobilizada com as regiões variáveis totalmente disponíveis, parcialmente disponíveis (Figura 8-3b), perdendo 50% da sua habilidade em interagir com o antígeno ou, ainda, totalmente indisponíveis (Figura 8-3c), perdendo 100% de sua capacidade de interação com o antígeno.

Desta maneira, é necessário considerar a posição das moléculas imobilizadas para a realização de medidas de interação antígeno-anticorpo, uma vez que, buscando aliar maior sensibilidade à potencial especificidade do nanoimunossensor, é possível facilitar a imobilização orientada de IgGs.

Para tal, há protocolos de imobilização orientada de IgGs com proteínas que interagem especificamente com a região Fc dessas IgGs (Figura 9). Desta forma, é importante saber qual o subtipo e a espécie na qual foi produzida a IgG para que a imobilização seja otimizada. Proteína A (PtA), por exemplo, interage específica e fortemente com a região Fc de IgGs de subtipo 1 de humanos, enquanto a proteína G, por sua vez, interage com a região Fc de IgGs de subtipo 3 de humanos¹⁰⁰.

Figura 9 – Imobilização orientada de IgGs. (1) Superfície de silício com (2) APTES. (3) Imobilização da PtA para interação com a região Fc da IgG e (4) consequente imobilização orientada da IgG, proporcionando alta especificidade e alta sensibilidade ao nanoimunossensor. Adaptado com “Proteína A” de Nilsson *et al.* (arquivo PDB 1H0T)¹⁰¹.

Desta forma, a imobilização orientada de IgGs permite manter as regiões viáveis disponíveis, garantindo que a habilidade em interagir com o antígeno não seja perdida, conferindo alta especificidade e alta sensibilidade ao nanoimunossensor e, consequentemente, maior eficácia na detecção de IgGs^{100,102–104}.

3.3.3 Proteína A e interação com a região Fc de IgGs

Proteína A é um componente da parede celular de diversas cepas de *Staphylococcus aureus* e possui de quatro a cinco domínios homólogos^{105,106}. Esses domínios possuem afinidade de interação com a região Fc de IgGs e estão alocados na região N-terminal da proteína, enquanto cerca de oito peptídeos da região C-terminal são responsáveis pela ancoragem da proteína à parede celular da *S. aureus*^{107,108}.

Dos cinco domínios da PtA, quatro são conhecidos ser altamente similares¹⁰⁹ e, embora todos os domínios individualmente possam interagir também com a região Fab da IgG, principalmente os domínios C e D (SpA^C e SpA^D) (Figura 10A)^{110,111}, a interação PtA-Fc, em especial mediada pelo domínio B da PtA (SpA^B), é mais forte que a interação PtA-Fab¹¹². Devido a isso, a interação da PtA é mais favorável com a região Fc da IgG quando estas estiverem interagindo em suas formas íntegras *in vivo* (Figura 10B).

Figura 10 – Interações entre domínios da PtA e regiões Fc e Fab de IgG. (A) Os domínios C e D da PtA (SpA^C e SpA^D) podem interagir com a região Fab da IgG (região superior). (B) Quando a IgG está íntegra, é mais favorável a interação dos domínios com a região Fc (região inferior). O domínio C da PtA (SpA^C) interage mais fortemente com a região Fc da IgG do que com a região Fab.

Fonte: Adaptado de Deis *et al.*¹¹⁰.

Levando em consideração algumas alterações na sequência de aminoácidos dos domínios da PtA e a importância dessa proteína em imunossaios, Nilsson *et al.*¹⁰¹, através da engenharia de proteínas, sintetizaram o domínio Z da PtA, derivado do domínio B da proteína nativa. Essa síntese permitiu a predição da estrutura tridimensional do *affibody* Z_{SPA-1} (Figura 11), uma molécula que pode mimetizar a PtA em sua capacidade de interação com a região Fc da IgG.

Figura 11 – *Affibody* Z_{SPA-1} formando o domínio Z da PtA. Molécula capaz de mimetizar a PtA em sua capacidade de interação com a região Fc da IgG.

Fonte: Nilsson *et al.* (arquivo PDB 1H0T)¹⁰¹.

Atualmente, a PtA utilizada em imunoenaios trata-se de proteína recombinante, produzida em *Escherichia coli*, possuindo quatro domínios de interação específica com a região Fc de IgGs, principalmente de subtipo 1 produzidas em humanos¹¹³.

3.3.4 Interações específicas e não-específicas pela AFS: valor da força de adesão e formato da curva de força

A sensibilidade da AFS e o desenvolvimento de nanoimunossensores permitem o reconhecimento de diferentes forças atuantes nas interações durante a aquisição das curvas de força, dentre elas, interações fracas, como ligações individuais de hidrogênio com cerca de 10 pN de força de adesão¹¹⁴ e interações fortes, como ruptura de ligações covalentes (~4000 pN)¹¹⁵. Neste contexto, as forças da interação antígeno-anticorpo são encontradas na literatura com forças de adesão entre ~20 e 400 pN, quando medidas as interações de uma única molécula de anticorpo com um antígeno^{116–119}. Em se tratando de sistema no qual há várias moléculas em interação, a força de adesão pode variar até cerca de 2000 pN¹²⁰, devido à somatória das forças individuais, representando a força total de interação das moléculas no sistema (Tabela 5).

Tabela 5 – Forças de ruptura de interações entre moléculas.

Sistema	Moléculas	Força de adesão	Referências
Força eletrostática	Solução de cloreto de potássio (KCL)	6 pN	Butt ¹²¹
Força de hidratação	Solução de cloreto de magnésio (MgCl ₂)	7 pN	
Ligações individuais de hidrogênio	--	10 pN	Hoh <i>et al.</i> ¹¹⁴
Antígeno-anticorpo	Ferritina/anti-ferritina	50 pN	Lee <i>et al.</i> ¹¹⁹
	Fluoresceína/anti-fluoresceína	200 pN	
	Receptor 1 de rianodina (RyR1, do inglês ryanodine receptor 1)/anti-RYR1	42-73 pN	
	hCG (do inglês human chorionic gonadotropin)/anti-hCG	507 pN	
Ligações covalentes	C – C C – O	4000 pN	Müller <i>et al.</i> ¹¹⁵ Grandbois <i>et al.</i> ¹²²

A curva de força típica adquirida pela AFS nos dá diversas informações que dizem respeito à interação ponta-amostra. Uma vez que ponta de AFM e substrato estão modificados quimicamente, essas informações passam a ser com relação às interações entre as biomoléculas, sendo possível detectar as forças específicas de complexos antígeno-anticorpo^{68,95} e outras forças atuantes no sistema¹²³, devido à sensibilidade da AFS.

Em sistemas biológicos, para se certificar que a força de adesão obtida no sistema é proveniente do reconhecimento de uma interação específica antígeno-anticorpo é necessário observar dois fatores importantes: (a) os valores da força de adesão, que variam na ordem de centenas de pN, enquanto que outras interações não-específicas correspondem a variações de dezenas ou então milhares de pN (veja Tabela 5)¹¹⁹; (b) e o formato da curva de força que para ser resultado de uma interação específica deve apresentar mudança no declive, bem como múltiplos picos na curva de retração^{117,119}, como será visto a seguir. A importância da observação destes dois fatores é imprescindível para se ter a certeza da obtenção de interações antígeno-anticorpo e não haver enganos, como por exemplo com a interação proteína-proteína, da qual o formato da curva é semelhante, com múltiplos picos, no entanto os valores variam entre milhares de pN, como é o caso da interação insulina-insulina (1300 pN) e avidina-biotina (2000 a 15000 pN)¹²⁴.

A declividade da linha de retração dá informações sobre o caráter de especificidade das interações que estão ocorrendo no sistema. Para identificar essa informação sobre a especificidade, deve-se analisar o seguinte: (a) a declividade da linha de retração da curva de força retorna em linha constante, sem mudança do declive (Figura 12A), evidenciando uma interação não-específica; (b) já numa interação específica, haverá mudança no declive da linha, ou seja, o declive da linha de retração não será constante¹²⁵ (Figura 12B). Essa diferença na declividade indica que há um reconhecimento específico, pois no momento em que a ponta começa a se desprender da amostra, ocorre o relaxamento do cantilever, refletido na curva, devido ao esticamento das biomoléculas do sistema^{119,126}.

Figura 12 – O formato da curva evidencia o reconhecimento de interação não-específica e interação específica. (A) Na curva de força típica não há mudança no declive da linha de retração. (B) A mudança no declive da linha de retração indica reconhecimento específico entre moléculas, devido ao relaxamento do cantilever.

Além da alteração no declive da linha de retração, outra alteração no formato da curva é importante para o estudo da interação antígeno-anticorpo. Devido ao fato de uma molécula formada por domínios proteicos, que é o anticorpo, estar envolvida no sistema, antes que haja o desprendimento total do antígeno ligado à essa molécula, cada domínio é primeiramente esticado e desenovelado¹²⁷.

O desenovelamento do anticorpo pode ser visto na curva de força por meio do seu formato com múltiplos picos (Figura 13): cada domínio ao ser esticado produz um pico, repete-se esse processo até que haja o subsequente desprendimento do antígeno em complexo com o anticorpo^{128–130}.

Figura 13 – Curva de força com múltiplos picos. Este formato da curva de força evidencia o desenovelamento da proteína ou anticorpo em cada pico, antes que ocorra o total desprendimento intermolecular.

Portanto, quando a interação antígeno-anticorpo é estudada, há dois momentos distintos para a ruptura total da interação intermolecular: (a) o desenovelamento do anticorpo e (b) desprendimento intermolecular^{130,131}.

3.3.5 Mapeamento da força de adesão (*Force Volume*)

Para realizar a AFS a fim de detectar ligações antígeno-anticorpo é possível utilizar uma metodologia de aquisição de curvas de força denominada *Force Volume* ou mapeamento da força de adesão¹³².

O *Force Volume* consiste em uma imagem realizada no microscópio de força atômica, de baixa resolução, na qual em cada pixel da imagem topográfica é adquirida também uma curva de força da interação entre a ponta e a amostra, gerando um arranjo tridimensional de forças, um *force volume*¹³³ (Figura 14), ou seja, a força de adesão é mapeada na amostra por meio da imagem.

Figura 14 – *Force Volume*. Imagem de baixa resolução gerada no AFM, na qual em cada pixel é adquirida uma curva de força da interação entre a ponta e a amostra.

Com o *Force Volume* é possível mapear receptores ou ligantes de células¹³⁴ ou mesmo analisar o perfil de adesão de receptores-ligantes de amostras com conteúdo heterogêneo, como IgGs purificadas de amostras de soro^{135,136}.

3.4 Caracterização da funcionalização pela técnica de ressonância plasmônica de superfície

O princípio da técnica de ressonância plasmônica de superfície (SPR, do inglês *surface plasmon resonance*), a qual é baseada na excitação do plasmon de superfície pela incidência de uma luz polarizada sobre uma superfície de vidro (prisma), foi proposto inicialmente por Kretschmann, em 1971¹³⁷.

Interações moleculares podem ser monitoradas e quantificadas em tempo real por SPR, inclusive interações reversíveis entre antígenos e anticorpos imobilizados em superfícies, sendo analisadas a associação e a dissociação das biomoléculas em interação¹³⁸⁻¹⁴¹.

Desde a década de 80, a técnica de SPR tem sido utilizada para a construção de sensores¹⁴². E já em 1983, o SPR foi utilizado para a detecção de biomoléculas com o estudo da adsorção de anticorpos e o sensoriamento da ligação deste com seu antígeno^{143,144}.

Atualmente é utilizada a configuração de Kretschmann (Figura 15), que se baseia em eventos ópticos, resultantes da interação da luz incidente com elétrons do plasmon (interface formada por uma fina camada de metal depositada no prisma), em um ângulo bem definido, podendo detectar alterações nos índices de refração, causadas pelas interações intermoleculares no sistema estudado¹⁴⁵.

Figura 15 – SPR segundo a configuração de Kretschmann.

O diferencial do SPR na caracterização da montagem das camadas de funcionalização em uma superfície está relacionado ao fato de não necessitar marcação, permitindo que a análise seja realizada com menos processos, podendo ser acompanhada em tempo real, além da alta sensibilidade da técnica¹⁴⁵.

3.5 Caracterização da funcionalização pela técnica de AFM acoplada com espectroscopia de absorção do infravermelho

A caracterização química das interações entre os grupamentos dos compostos, resultantes da funcionalização por ligações covalentes no substrato e na ponta de AFM pode ser realizada por meio da AFM acoplada com espectroscopia de absorção do infravermelho (AFM-IR)¹⁴⁶. O feixe de infravermelho (IR) é pulsado na ponta de AFM em contato com a amostra a ser caracterizada, a rápida expansão do laser faz com que a oscilação ressonante do cantilever de AFM do equipamento seja proporcional ao coeficiente de absorção da amostra. Um espectro de absorção é gerado pela medida da amplitude de oscilação do cantilever, evidenciando a assinatura espectral química da região amostrada¹⁴⁷ (Figura 16).

Figura 16 – Princípio de funcionamento do AFM-IR. Entre a ponta de AFM e a amostra incide um feixe de infravermelho pulsado, a expansão do laser faz com que a oscilação ressonante do cantilever seja proporcional ao coeficiente de absorção da imagem. A medida da oscilação do cantilever gera um gráfico de absorção.

3.6 Caracterização da funcionalização por imagens de AFM

A deposição das camadas de cada etapa da funcionalização pode também ser verificada pela caracterização topográfica com AFM, ou seja, por meio de imagens de AFM, analisar a altura das superfícies, pois a cada camada depositada há aumento na altura (nm) das imagens, indício da montagem das camadas da funcionalização^{95,97}.

Materiais e métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos peptídeos

Em conjunto com projeto FAPESP nº 2012/50839-4 da Prof^a Dra. Doralina Guimarães Brum Souza, foram adquiridos os peptídeos da proteína AQP4, comercialmente. Foram sintetizados os peptídeos com base na isoforma M-1 da proteína AQP4 humana dividida em trinta e dois peptídeos de dez aminoácidos sequenciais.

Preliminarmente, o citado projeto fez a triagem de peptídeos pelo teste ELISA, a fim de determinar a reatividade, ou seja, a qualidade da interação desses peptídeos com os soros dos pacientes.

Neste trabalho, foram utilizados os dois peptídeos (AQP4₆₁₋₇₀ e AQP4₂₀₁₋₂₁₀) que mostraram um potencial de maior reatividade contra o anti-AQP4 e os dois peptídeos com um potencial de menor reatividade (AQP4₁₃₁₋₁₄₀ e AQP4₁₄₁₋₁₅₀) após o teste ELISA, segundo as análises do projeto citado acima (Figura 17).

Figura 17 – Localização dos peptídeos, utilizados neste trabalho, na proteína AQP4. Potencialmente reativos: AQP4₆₁₋₇₀ (verde oliva) e AQP4₂₀₁₋₂₁₀ (verde claro). Potencialmente não-reativos: AQP4₁₃₁₋₁₄₀ (rosa) e AQP4₁₄₁₋₁₅₀ (vermelho).

Fonte: Adaptado de Verkman *et al.*⁶⁴.

4.2 Obtenção dos soros

Após aprovação pelos comitês de ética das instituições envolvidas neste projeto, via Plataforma Brasil (Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, CAAE: 51297215.3.0000.5504; Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, CAAE: 51297215.3.3002.5411; e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, CAAE: 51297215.3.3001.0065) e preenchimento dos termos de consentimento livre e esclarecido (Anexos A e B), os soros foram coletados pela Prof^a Dra. Doralina G. Brum Souza, sendo dezessete pacientes portadores de ENMO anti-AQP4+ (nove com titulação conhecida de anti-AQP4), oito pacientes de ENMO anti-AQP4–, quatro pacientes de EM e dois indivíduos saudáveis. Amostras de três indivíduos saudáveis foram coletados pelo Dr. Paulo Diniz da Gama e pela Dra. Pâmela Soto Garcia. Todas as amostras passaram pelo processo de purificação, das quais foram purificadas as IgGs totais. Todos os pacientes de ENMO foram diagnosticados segundo os critérios de Wingerchuk *et al.*¹⁶ e os pacientes de EM, segundo os critérios revisados de Mc Donald de 2010¹⁴⁸.

4.3 Purificação dos soros

As IgGs utilizadas neste trabalho foram purificadas dos soros dos pacientes pelo Dr. Luís Antonio Peroni, especialista na área de Imunologia com ênfase em anticorpos monoclonais e sócio-diretor da Rheabitech Desenvolvimento, Produção e Comercialização de Produtos de Biotecnologia Ltda (Campinas, SP).

4.4 Protocolos de funcionalização das superfícies e imobilização das biomoléculas

Neste trabalho foram utilizadas três superfícies distintas para as análises de caracterização e detecção da IgG, mas que exercem funções semelhantes no que se refere à funcionalização, devido à sua superfície oxidada capazes de serem silanizadas e aminadas. A saber, este trabalho foi realizado com superfícies de (a) nitreto de silício (ponta de AFM), (b) mica muscovita (substrato para as medidas de AFM) e (c) ouro (substrato para as medidas de SPR) (Figura 18).

Figura 18 – Superfícies oxidadas e interação com reagentes de aminação. O nitreto de silício e a mica muscovita oxidados reagem com os grupos silanos do aminopropiltrietoxissilano. A superfície oxidada de ouro reage com os grupos tióis da cisteamina (Cist).

As superfícies de nitreto de silício e de mica muscovita oxidadas permitem a interação com os grupos silanos do APTES⁹⁰, assim como ocorre na interação da superfície oxidada do ouro com os grupos tióis da cisteamina (Cist)⁸⁹. Desta maneira, os hidrogênios desses compostos, APTES e Cist, interagem com as hidroxilas das superfícies oxidadas, resultando em água (H₂O) e mantendo amina disponível para as próximas etapas que sucedem no processo de funcionalização.

4.4.1 Protocolo de silanização/aminação da ponta de AFM e do substrato

Foram utilizadas micas (15 mm x 15 mm², Ted Pella Inc, Redding, California, USA) e pontas de AFM de nitreto de silício (AC40, Bruker), com 8 nm de raio e constante de mola (k) de 0,02 N/m, segundo especificações indicadas para pontas utilizada em medidas de AFS¹²⁶. As micas foram clivadas com fita adesiva, a fim de retirar impurezas inorgânicas. Pontas de AFM e micas foram esterilizadas sob radiação ultravioleta (UV) e ozônio (O₃) no equipamento ProCleaner™ (UV.PC.220, Bioforce

Nanosciences, Ames, Iowa, USA). Para a silanização das superfícies (pontas e substratos), foram utilizados, para funcionalização por vaporização por 45 min, 40 μL de APTES (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA), e 40 μL de trietilamina (99%, Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA), que mantém o potencial hidrogeniônico (pH) estável para as reações, com base no protocolo estabelecido por Etchegaray *et al.*¹⁴⁹.

4.4.2 Imobilização de peptídeos para as medidas de curva de força

Após a silanização, as pontas de AFM foram funcionalizadas com uma solução de EDC (0,4 M), NHS (0,1 M) para ativação dos grupamentos C-terminais para interação com os grupamentos de amina I do APTES. Após, foi adicionado polietileno glicol (PEG) bifuncional ($\text{NH}_2\text{--PEG--COOH}$, de tamanho molecular 2000 e com concentração $0,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ^{150–152}) como espaçador para aumentar o alcance dos peptídeos durante as medidas. Após este processo as pontas de AFM foram lavadas com água MilliQ® e adicionadas em solução com os peptídeos (concentração $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para imobilização. Depois de um período de 2h, as pontas foram lavadas e utilizadas para realizar as medidas de AFS. Todos os reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA.

4.4.3 Imobilização das IgGs para as medidas de curva de força

Uma quantidade de 30 μL de solução de PtA (Fastbio Ltda, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) em água MilliQ® (concentração $0,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi depositada sobre as micas e mantida por duas horas em temperatura ambiente. As micas foram lavadas três vezes com água MilliQ® e adicionados 30 μL de solução de IgGs (concentração $56 \mu\text{g.mL}^{-1}$), por duas horas em temperatura ambiente. Após este processo, as micas foram lavadas e utilizadas nas medidas de AFS.

4.5 Nanoimunossensor e substrato

Após as etapas de funcionalização (silanização/aminação) e imobilização dos peptídeos na ponta de AFM e IgGs purificadas das amostras de soro no substrato, o nanoimunossensor estava pronto para o estudo das amostras (Figura 19).

Figura 19 – Esquema do nanoimunossensor e substrato após a silanização/aminação, funcionalização e imobilização das biomoléculas.

4.6 Medidas de curva de força

As medidas de AFS foram realizadas no equipamento de AFM Bruker com controlador *Nanoscope V* (Veeco Instruments Inc, Plainview, New York, USA), com programa *Nanoscope 7.0*, em modo contato. As medidas foram obtidas com o sistema de medidas de força *Picoforce*, pela técnica de *Force Volume*, em célula líquida com água MilliQ®, com pH 6,2 monitorado. Todas as medidas foram analisadas e tratadas no programa *Nanoscope Analysis 7.30* e *Origin 8.0*.

Para as medidas de *Force Volume* foram realizados, em cada amostra, mapas de adesão de $41\ \mu\text{m} \times 41\ \mu\text{m}^2$ e selecionadas cinquenta curvas de força, mantendo a ponta por cinco segundos em contato com a amostra em cada curva de força. Este procedimento foi realizado com cada uma das trinta e quatro amostras de soros, em triplicata.

4.7 Análise estatística das forças de adesão

Os resultados de força de adesão foram analisados por meio de *boxplot* por se tratarem de dados não-paramétricos. Os valores de *p* foram calculados com teste U de Mann Whitney a fim de avaliar as diferenças estatísticas. A acurácia (especificidade e a sensibilidade) do nanoimunossensor foi avaliada pela curva característica de operação

do receptor (ROC, do inglês *receiver operating characteristic*), o qual fornece o valor de p das associações analisadas, ponto de corte da força de adesão e a área sob a curva ROC (AUC, do inglês *area under the ROC curve*), que indica o nível de acurácia do nanoimunossensor, ou seja, a eficiência do nanoimunossensor em distinguir amostras de ENMO anti-AQP4+ de amostras de indivíduos, pacientes de EM e de ENMO anti-AQP4-.

4.7.1 Análise de especificidade e sensibilidade do sensor pela curva ROC

A análise de acurácia de um teste pela curva ROC nos auxilia a determinar o quão bom um teste diagnóstico pode ser, ainda que haja superposições de indivíduos dentro das categorias “positivos” e “negativos” para uma determinada doença, quando a distinção no cenário real não é clara como a esperada pelo cenário ideal.

Acurácia envolve a especificidade e a sensibilidade de um teste ao diagnosticar um paciente frente à sua positividade ou negatividade a um alvo, um biomarcador por exemplo, por sua presença ou ausência. Quando há positividade em um teste diagnóstico, isso pode englobar verdadeiros positivos e falsos positivos; o nível de cada positividade (falsa ou verdadeira) é correspondente à acurácia do teste. Da mesma forma, quando há negatividade em um teste, isso pode englobar verdadeiros negativos e falsos negativos¹⁵³, como mostra a Tabela 6.

Tabela 6 – Relação entre o resultado do teste e a presença da doença.

Teste	Doença presente	Doença ausente	Total
Positivo	Verdadeiro positivo (VP)	Falso positivo (FP)	(VP) + (FP)
Negativo	Falso negativo (FN)	Verdadeiro negativo (VN)	(FN) + (VN)
Total	(VP) + (FN)	(FP) + (VN)	
Sensibilidade = $VP / [(VP) + (FN)]$			
Especificidade = $VN / [(FP) + (VN)]$			

Desta maneira, a razão entre VP e doença presente (VP + FN) nos dá a informação da sensibilidade do teste, da mesma forma que a razão entre VN e doença ausente (FP + VN), nos dá informações sobre a especificidade do teste. Em outras palavras, um teste terá alta acurácia quando for capaz de atingir alta sensibilidade, ou seja, quando for capaz de detectar uma maior porcentagem de VP em detrimento de

FN (dar positivo quando a doença estiver presente); assim como quando for capaz de atingir alta especificidade, sendo hábil a detectar VN em detrimento de FP (dar negativo quando a doença estiver ausente)¹⁵⁴ (Figura 20A).

Figura 20 – Curva ROC. (A) *Cut-off* (1, 2 e 3) que determina o nível de sensibilidade (eixo y) e de especificidade (eixo x). (B) A AUC diz respeito ao desempenho do teste, podendo variar de 0,5 a 1,0.

O nível de sensibilidade e especificidade é determinado pelo ponto de corte (*cut-off*) que se trata de um ponto ótimo na curva ROC, localizado o mais próximo possível do canto superior esquerdo do gráfico, formado pelos maiores valores possíveis de sensibilidade (no eixo y) e de especificidade (no eixo x)¹⁵⁴. A Figura 20A mostra três opções de *cut-off* (1, 2 e 3), dos quais o ponto 2 é o ponto ótimo, sendo possível inferir que aumentando o valor da sensibilidade (migrando para o ponto 3), diminui-se o valor de especificidade, e vice-versa. Outro parâmetro que a curva ROC fornece é a AUC, ou seja, a área calculada abaixo da curva ROC que indica o desempenho do teste, o qual pode variar de 0,5 (inútil) a próximo de 1,0 (bom), como mostra a Figura 20B; AUC de 1,0 reflete um teste com 100% de sensibilidade e 100% de especificidade¹⁵⁵. Estas análises com a curva ROC, AUC e *cut-off* determinam se um teste pode ser considerado como o padrão-ouro, ou seja, o melhor teste para diagnóstico existente¹⁵⁶, juntamente com outros testes complementares existentes.

4.8 Análise de significância (valor de p)

A significância estatística pode ser avaliada pelo valor de p (probabilidade de significância), ou seja, o valor de p auxilia na decisão de rejeitar ou não uma hipótese nula¹⁵⁷. A hipótese nula é assumir que, em comparação ao controle, o grupo de estudo não possui diferença no parâmetro que está sendo analisado. Diante do valor de p , por sua vez, a hipótese nula é rejeitada quando este valor for menor que 0,05, ou seja, quando o valor de p é menor que 5%, assume-se que os dados da amostra refletem as características de toda a população da qual foi retirada essa amostra¹⁵⁸.

4.9 Desenho experimental

Inicialmente, foi realizada a triagem de peptídeos para a qual foram utilizados quatro peptídeos que fazem parte das alças externas da proteína AQP4 para analisar amostras de pacientes de ENMO anti-AQP4+. Posteriormente, após a triagem, foi utilizado o peptídeo mais imunorreativo dentre os quatro peptídeos, a fim de testar a especificidade e sensibilidade do nanoimunossensor, por meio da análise de amostras de pacientes de ENMO anti-AQP4-, EM e indivíduos saudáveis. Por fim, foram analisadas amostras de pacientes de ENMO anti-AQP4+ tituladas para relacionar os resultados de força de adesão com a titulação de anti-AQP4 nas amostras (Figura 21).

Figura 21 – Desenho experimental.

4.10 Mapeamento da força de adesão (*Force Volume*)

Foram obtidos *Force Volume*, a fim de realizar o mapeamento de interações antígeno-anticorpo¹³⁶ em cada amostra de IgGs purificadas do soro com cada um dos peptídeos, uma vez que as amostras contêm IgGs totais e o alvo desse projeto foi a interação de um complexo específico: peptídeo da AQP4 e anti-AQP4. Com o *Force Volume* (Figura 22) foi possível extrair de cada pixel da imagem uma curva de força, resultante da interação do peptídeo na ponta de AFM com o anti-AQP4 imobilizado no substrato (quando presente), identificando curvas provenientes de interações não-específicas (Figura 22A) ou específicas (Figura 22B).

Figura 22 – Mapeamento das forças de adesão por *Force Volume*. (A) Pixels com curvas não-específicas (marcadas em vermelho), indicando a ausência de anti-AQP4 nesta amostra, pois as forças de adesão obtidas são provenientes de outros tipos de interações que não antígeno-anticorpo. (B) Curvas específicas (marcadas em verde) adquiridas da interação entre o peptídeo e anti-AQP4.

O *Force Volume*, que permite o mapeamento das interações na área na qual foi realizada esse mapeamento de forças, auxilia no reconhecimento da região do substrato na qual houve a detecção do anti-AQP4, uma vez que foram imobilizadas IgGs totais e não somente o anti-AQP4. Com isso, foi possível de maneira aleatória, no entanto seletiva, selecionar as curvas de força obtidas exatamente da interação antígeno-anticorpo, para que as forças interferentes provenientes de curvas de força não-específicas, não interferissem nos valores e na análise dos resultados.

4.11 Imagens de AFM

A caracterização da funcionalização foi realizada pela análise topográfica das superfícies por meio de imagens obtidas com AFM Bruker com controlador *Nanoscope V* (Veeco Instruments Inc, Plainview, New York, USA), com programa *Nanoscope 7.0*. Mica e placa de nitreto de silício (mesmo material da ponta de AFM substituído por esta placa devido ao fato de a ponta de AFM ter dimensões nanométricas de difícil análise). A mica e a placa de nitreto de silício foram

funcionalizadas seguindo o protocolo relatado anteriormente. Foram realizadas imagens de área $110\ \mu\text{m} \times 141\ \mu\text{m}^2$, em modo contato. O tratamento da imagem e as medidas de altura foram realizadas com o programa *WSxM*¹⁵⁷.

4.12 AFM-IR

As medidas com o AFM-IR foram realizadas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), do Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais (CNPEM), após a submissão e aprovação da Proposta de Pesquisa “AFM-23137: Caracterização da funcionalização química de pontas e hastes de AFM, e substrato”. Foi utilizado o equipamento AFM-IR Nano IR2-S (Anasys Instruments Corporation-Bruker Corporation, Billerica, Massachusetts, USA). Foram realizadas imagens de $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}^2$ e medidas as absorções do IR na faixa entre $1570\text{-}1800\ \text{cm}^{-1}$ em dois pontos de cada amostra: uma região com aglomerados dos compostos e outra em filme fino. Os espectros e valores de área sob o espectro, picos de absorção e amplitude foram analisadas no programa *Origin 8.0*.

4.13 Medidas de SPR

Esta etapa foi realizada em colaboração com a Prof. Dra. Marystela Ferreira e a Dra. Celina Massumi Miyazaki (Processo FAPESP nº 2014/15093-7). As medidas de SPR foram adquiridas com comprimento de onda de 670 nm na configuração de Kretschmann, em equipamento MP-SPR Navi™ (sistema Navi 200, BioNavis Ltd, Hermiankatu, Tampere, Finlândia) com substrato de vidro coberto com camada de 50 nm de ouro. O substrato foi limpo e hidrofiliado em uma solução de $5\text{H}_2\text{O}:1\text{H}_2\text{O}_2:1\text{NH}_4\text{OH}$ (v:v) por 10 min a 80°C . Após, o ouro do substrato foi aminado com solução de Cist ($1,92\ \text{mg.mL}^{-1}$). No equipamento, foi injetada solução de $\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$ ($0,10\ \text{mg.mL}^{-1}$), e, após, foi injetada solução de peptídeo AQP4₆₁₋₇₀ ($0,1\ \text{mg.mL}^{-1}$). Para o sistema de detecção, após os passos relatados, foi injetada amostra de IgGs purificadas de soro paciente do ENMO (contendo anti-AQP4 e outras IgGs). Em cada ciclo de injeção com os compostos, o sistema foi extensivamente lavado com injeções de água MilliQ®.

Resultados e discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterizações

5.1.1 Caracterização da imobilização de IgGs no substrato

O avanço no desenvolvimento de nanobiossensores (com enzimas) culminou aos nanoimunossensores, para a detecção de anticorpos. Para isso, foi necessário adequar o protocolo que antes era utilizado para a imobilização das biomoléculas, a fim de otimizar o funcionamento do sensor. A imobilização de IgGs deve ser orientada para que as regiões de interação com antígeno fiquem disponíveis.

Aqui foram caracterizados então um protocolo de imobilização aleatória e outro protocolo de imobilização orientada, utilizando a PtA.

Uma maneira de caracterizar a imobilização aleatória e/ou orientada das IgGs na superfície é a análise da rugosidade, medidas a partir de imagens de AFM, sendo que numa superfície com maior variação espera-se menor homogeneidade devido à irregularidade topográfica diretamente relacionada à posição aleatória das moléculas sobre a superfície. Da imobilização orientada espera-se menor variação, ou seja, a superfície é topograficamente mais homogênea, evidenciando uma imobilização orientada uniforme¹⁵⁸ (Figura 23).

Neste trabalho, na imobilização aleatória a superfície permaneceu com a rugosidade inicial (em torno de 0,240 nm) até a etapa de funcionalização do glutaraldeído (Glu). Após a imobilização da IgG, a rugosidade aumentou para $0,430 \pm 0,003$ nm (Figura 23A).

Na imobilização orientada, a rugosidade inicial da superfície, também em torno de 0,240 nm, diminuiu para $0,130 \pm 0,002$ nm após a imobilização da PtA, evidenciando uma superfície mais homogênea quando comparado com as etapas anteriores e com a funcionalização com Glu, devido à camada PtA sem sítios remanescentes de amina do APTES; após a imobilização da IgG, a rugosidade foi $0,27 \pm 0,02$ nm, 37% mais homogênea do que na imobilização aleatória (Figura 23A).

Figura 23 – Homogeneidade da imobilização orientada e aleatória. (A) A imobilização aleatória (ciano escuro) apresentou menor homogeneidade (maior rugosidade) comparada à imobilização orientada (vermelho). (B) Esquema da imobilização aleatória, no qual *a*, *b* e *c* representam as possíveis posições das IgGs imobilizadas, motivo pelo qual a rugosidade é maior quando comparado à imobilização orientada. (C) Esquema da imobilização orientada, da qual são obtidos menores valores de rugosidade devido à posição das IgGs imobilizadas. (As imagens analisadas possuem 10 μm x 10 μm^2 . Valores de rugosidade estão apresentados na Tabela 7).

A imobilização aleatória de IgGs compromete a sensibilidade do nanoimunossensor, o que pode diminuir em 50% ou 100% a disponibilidade das regiões de interação com o antígeno⁹⁹, devido aos resíduos contendo grupamentos carboxila em diversas regiões da IgG, não somente na região Fc, que podem interagir com os grupamentos amina do APTES (Figura 23B). Desta maneira, o protocolo ideal a ser utilizado deve garantir uma imobilização orientada das IgGs, de modo que as regiões de interação com o antígeno estejam livres (Figura 23C).

Tabela 7 – Valores de rugosidade das imobilizações aleatória e orientada.

Etapa	Rugosidade* (nm)	
	Imobilização aleatória	Imobilização orientada
Mica não-funcionalizada	0,230 ± 0,004	0,240 ± 0,005
APTES	0,240 ± 0,006	0,240 ± 0,003
Glu ou PtA	0,25 ± 0,01	0,130 ± 0,002
IgG	0,430 ± 0,003	0,26 ± 0,01

* média±desvio padrão.

Pudemos, portanto, caracterizar a orientação da imobilização e comprovar que os protocolos são compatíveis com a literatura, indício de que as regiões variáveis da IgG estavam disponíveis para interação com o epítipo, imprescindível para a aplicação do nanoimunossensores¹⁰⁴.

5.1.2 Caracterização das etapas da funcionalização do substrato e do sensor por imagens de AFM

A funcionalização das superfícies tem relação direta com a confiabilidade e eficiência do nanoimunossensor, uma vez que é necessário certificar-se de que a construção das camadas de funcionalização foi efetiva¹⁵⁹. A fim de caracterizar as superfícies funcionalizadas, foram realizadas imagens de AFM de cada etapa da funcionalização, como realizado em trabalhos anteriores^{4,95}.

A Figura 24A (topo) apresenta a imagem do nitreto de silício, simulando a ponta de AFM, e da mica (na base da figura), ambos sem funcionalização. Em seguida, a Figura 24B mostra ambas superfícies após a etapa de silanização com APTES, na qual é possível observar aumento na altura, ou seja, a formação da camada de funcionalização, sendo acrescidos 10,8 nm e 25,5 nm, respectivamente. A Figura 24C apresenta o aumento de 23,9 nm na altura da superfície de nitreto de silício após a funcionalização com PEG e peptídeo. Na Figura 24D pode ser observada a imobilização da PtA e, após, a imobilização das IgGs na superfície, os quais aumentaram a altura em 180,5 nm e 100,0 nm, respectivamente.

Figura 24 – Imagens de AFM para caracterização da funcionalização. (A) Nitreto de silício não-funcionalizado; (B) silanizado com APTES; (C) com PEG e peptídeo imobilizados e (D) com PtA e, posteriormente, com IgGs imobilizadas (Imagens de $140\ \mu\text{m} \times 110\ \mu\text{m}^2$).

Desta maneira, foi possível avaliar as etapas da funcionalização das superfícies pela deposição das camadas, em cada qual há o aumento da altura, evidenciando a adsorção dos compostos em cada camada por meio do aumento de altura¹⁶⁰.

5.1.3 Caracterização química do substrato e do sensor por AFM-IR

A caracterização química das interações entre os grupamentos dos compostos, resultantes da funcionalização por ligações covalentes no substrato e na ponta de AFM pode ser realizada por meio do AFM-IR¹⁴⁶. Esta técnica possibilita tal caracterização a partir da interpretação do espectro de absorção que é gerado pela medida da amplitude de oscilação do cantilever do AFM-IR que varre a amostra a ser caracterizada, evidenciando a assinatura espectral química da região amostrada¹⁴⁷.

O equipamento de AFM-IR utilizado aqui para a caracterização química das superfícies engloba a absorção na região compreendida entre $1570\text{--}1800\ \text{cm}^{-1}$, desse modo foi possível obter informações de amida primária (amida I), da qual a absorção ocorre na faixa entre $1600\text{--}1700\ \text{cm}^{-1}$.

Uma estratégia utilizada neste trabalho foi analisar as regiões com aglomerados dos compostos utilizados na funcionalização e regiões sem aglomerados visíveis na mesma amostra, essa escolha de regiões é possível pela imagem de AFM gerada durante a caracterização. Dessa maneira pudemos verificar se a funcionalização, embora, distribuída de maneira a ocorrerem alguns aglomerados, é quimicamente homogênea, ou seja, se ocorre tanto em aglomerados como em filmes finos, pela observação da assinatura espectral.

A Figura 25A mostra por meio de microscópio óptico e AFM a região da mica analisada, na qual foram imobilizadas as IgGs, com os pontos escolhidos para a leitura da assinatura espectral marcados com os pontos vermelho e azul. Como pode ser observado na Figura 25B, perfil da imagem de AFM, o ponto vermelho é a região com aglomerados e o ponto azul a região de filme fino. Os espectros integrados e a deconvolução destes, em ambas regiões da amostra, estão apresentados nas Figura 25C e Figura 25D.

Figura 25 – Caracterização da funcionalização do substrato (mica) por AFM-IR. (A) Imagem de AFM de 10 μm² da região da mica analisada; o inserto mostra a imagem do microscópio óptico, na qual é possível ver a ponta de AFM do AFM-IR sobre a mica. (B) Perfil topográfico de A. (C) Espectro integrado e deconvolução dos espectros da região de filme fino. (D) Espectro integrado e deconvolução dos espectros da região de aglomerados dos compostos da funcionalização.

De modo geral, as folhas-β das associações dos polipeptídeos que formam a PtA e as IgGs pode ser observada pela presença dos picos 1706 cm⁻¹, 1673 cm⁻¹ e 1637 cm⁻¹ da Figura 25C, bem como a presença de voltas-β nesses dois últimos picos. Na Figura 25D, os picos em 1684 cm⁻¹ e 1633 cm⁻¹ evidenciam a presença de folhas-β, e o pico em 1654 cm⁻¹ corresponde à presença de α-hélices.

O mesmo foi realizado para a caracterização da ponta de AFM, na qual foi imobilizado o peptídeo AQP4₆₁₋₇₀, na área possível de ser analisada, ou seja, a deflexão do cantilever da ponta de AFM a qual está sendo caracterizada (nanoimunossensor),

devido sua constante de mola e oscilação, inviabiliza a leitura da expansão do IR e absorção deste pela amostra, por isso é necessário que as medidas sejam realizadas em uma área estável do cantilever, como pode ser observado no inserto da Figura 26A. A Figura 26B mostra o perfil e localiza a região de aglomeração e de filme fino da Figura 26A.

Figura 26 – Caracterização da funcionalização da ponta de AFM (nanoimunossensor) por AFM-IR. (A) Imagem de AFM de $10 \mu\text{m}^2$ da região do nanoimunossensor analisada; o inserto mostra a imagem do microscópio óptico, na qual é possível ver a ponta de AFM do AFM-IR sobre o cantilever (nanoimunossensor). (B) Perfil topográfico de A. (C) Espectro integrado e deconvolução dos espectros da região de filme fino. (D) Espectro integrado e deconvolução dos espectros da região de aglomerados dos compostos da funcionalização.

As folhas- β formadas pelas interações das cadeias laterais dos peptídeos é evidenciada pela presença dos picos em 1682 cm^{-1} e 1628 cm^{-1} , bem como a interação das cadeias laterais da mesma molécula de peptídeo pode ser vista pela formação de voltas- β , também evidenciadas pelo pico em 1682 cm^{-1} (Figura 26C). O pico em 1656 cm^{-1} é devido à presença de espirais aleatórios, ou seja, os peptídeos assumem conformações ainda que estejam imobilizados na ponta de AFM.

Na Figura 26D, é possível observar a presença de folhas- β pelos picos em 1689 cm^{-1} e 1633 cm^{-1} , bem como a presença de α -hélices no pico em 1660 cm^{-1} .

Comparando as regiões de aglomerados com as regiões de filmes finos é possível observar pequenos deslocamentos dos picos, no entanto, esse resultado não denota modificações no conteúdo químico das amostras, apenas apresenta mudança na complexidade estrutural passando de folhas- β e voltas- β para α -hélice que pelo deslocamento do pico em 1673 cm^{-1} para 1654 cm^{-1} (Figura 25C e Figura 25D). O mesmo ocorre com os peptídeos funcionalizados na ponta de AFM observado nas Figura 26C e Figura 26D, nas quais o deslocamento do pico em 1656 cm^{-1} para 1660 cm^{-1} evidencia a mudança conformacional de espirais aleatórios para α -hélices. O deslocamento da amplitude do espectro está relacionado ao aumento de concentração de amostra devido às ligações de hidrogênio que ocorrem nessa situação^{147,161} (veja deslocamentos dos picos e das amplitudes na Tabela 8).

Tabela 8 – Deslocamentos do pico e da amplitude dos espectros das regiões de compostos aglomerados e de filmes finos das superfícies caracterizadas (mica e nanoimunossensor). Em cada espectro está indicado à qual estrutura polipeptídica se refere.

Superfície	Picos (cm ⁻¹)				Deslocamento do pico (cm ⁻¹)	Deslocamento de amplitude (u.a.)
	Filme fino		Aglomerado			
Mica	1706	folhas-β	1684	voltas-β	22	1,20
	1673	folhas-β	1654	α-hélices	19	13,79
	1637	folhas-β	1633	voltas-β	4	9,56
Ponta de AFM	1682	folhas-β; voltas-β	1689	folhas-β	7	3,63
	1656	espirais aleatórios	1660	α-hélices	4	23,31
	1628	folhas-β	1633	folhas-β	5	4,92

Nota: Estruturas das sequências peptídicas extraído de Bakshi *et al.*¹⁶².

Por meio da área sob o espectro (Tabela 9) é possível verificar qual é a proporção de cada estrutura presente, ou seja, qual é a prevalência de estruturas presentes nas amostras, evidenciando quais possuem maior participação nas interações posteriormente ocorridas com a aplicação do nanoimunossensor.

Tabela 9 – Percentagem da contribuição das principais estruturas presentes após o processo de funcionalização.

Superfície	Região	Pico (cm^{-1})	Contribuição de cada espectro (%)
Mica	Filme fino	1706	4
		1673	53
		1637	43
	Aglomerado	1684	14
		1654	53
		1633	33
Nanoimunossensor	Filme fino	1682	21
		1656	63
		1628	16
	Aglomerado	1689	12
		1660	76
		1633	12

Desta maneira, em questão de contribuição das estruturas polipeptídicas, é possível observar uma grande presença de: (a) estruturas formadas por folhas- β da PtA e das IgGs (mica) pelos picos em 1673 cm^{-1} (53%) e 1637 cm^{-1} (43%); (b) espirais aleatórios peptídicos, estrutura secundária do peptídeo AQP4₆₁₋₇₀ (nanoimunossensor), pelo pico em 1656 cm^{-1} (63%); e (c) estruturas formadas por α -hélices da PtA e IgGs (mica) no pico 1654 cm^{-1} (53%) e conformação em estrutura secundária do peptídeo AQP4₆₁₋₇₀ (nanoimunossensor) no pico 1660 cm^{-1} (76%) (Tabela 8 e Tabela 9).

A absorção na região da amida I é estudada para espectros de IR obtidos de peptídeos e proteínas, uma vez que é possível observar as conformações e estruturas primárias e secundárias devido às vibrações de estiramento das ligações $\text{C}=\text{O}$ ¹⁶³. Devido ao fato de os deslocamentos correspondentes às sequências polipeptídicas e às proteínas serem de poucos números de ondas (entre $2\text{-}12 \text{ cm}^{-1}$) é primordial a utilização de técnicas que permitam alta resolução nas análises¹⁶². O AFM-IR se mostrou uma técnica que vai ao encontro dessa necessidade para o estudo de proteínas, devido à alta resolução química (10 nm) do cantilever em contato com a amostra o que

confere alta sensibilidade à análise e direciona o laser, concentrando-o na região de expansão e absorção do IR¹⁴⁷, como pode ser encontrado na literatura, inclusive no estudo de tecidos humanos¹⁶⁴.

Os picos na região de absorção de amida I e as respectivas estruturas e associações de ligações de hidrogênio encontradas neste trabalho são compatíveis com os as faixas de absorção encontradas na literatura¹⁶⁵, evidência da eficácia do processo de funcionalização.

5.1.4 Caracterização das etapas da funcionalização do sensor em tempo real por SPR

Por meio da técnica de SPR é possível caracterizar a cinética dos processos de interação entre os grupamentos químicos imobilizados na placa de ouro, ou seja, a técnica nos permite acompanhar, em tempo real, a montagem de camadas de funcionalização em cada etapa, sequencialmente¹³⁹.

É possível encontrar na literatura a utilização da AFM como validação da construção de um sensor de SPR^{166–168}, bem como, igualmente esperado neste trabalho, a utilização do SPR para validar a funcionalização e as interações medidas por meio da AFM^{169,170}.

Os mesmos grupos funcionais considerados na funcionalização da ponta de AFM foram utilizados para realizar a funcionalização no SPR, baseado na funcionalização covalente. Duas abordagens foram aplicadas: (a) montagem do sensor e (b) aplicação do sensor com a detecção de IgGs, simulando o reconhecimento do nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀ pelo anti-AQP4.

Foram utilizados dois canais de SPR ao mesmo tempo para as injeções dos reagentes, os quais diferem apenas na última etapa: em um dos canais foi injetada fluxo de água Milli-Q® como controle negativo (canal de referência) e, no outro canal, foi injetado fluxo de IgGs purificadas de paciente de ENMO anti-AQP4+ (canal de detecção).

O sensorgrama da Figura 27A ilustra o ângulo de ressonância extraído dos parâmetros cinéticos das etapas de montagem do sensor, em tempo real. A adsorção do PEG, utilizado para ancoragem, na superfície aminada com Cist está mostrado no gráfico da Figura 27B, no qual foi obtido um deslocamento do ângulo ($\Delta\theta$) de 0,09° em ambos os canais de referência e de detecção. A adsorção das moléculas de peptídeo

sobre a camada de PEG é observada pelo $\Delta\theta$ de $0,43^\circ$ e $0,51^\circ$ nos canais de referência e de detecção, respectivamente (Figura 27B).

Figura 27 – Caracterização do processo de funcionalização e detecção do anti-AQP4 por SPR. (A) Esquema do princípio de funcionamento do SPR. (B) Cinética da funcionalização após as injeções de PEG e de peptídeo. (C) e (D) Comparação entre o canal de referência e o canal de detecção do anti-AQP4.

Com relação à aplicação do sensor, a comparação dos sistemas de controle negativo (fluxo de água Milli-Q®) e aplicação (fluxo de IgGs) (Figura 27C e Figura 27D) resultou no reconhecimento do peptídeo AQP4₆₁₋₇₀ pelo anti-AQP4, visto por meio do $\Delta\theta$ $0,01^\circ$ e $\Delta\theta$ $0,26^\circ$, respectivamente. Os valores de deslocamento nos ângulos de ressonância podem ser vistos na Tabela 10.

Tabela 10 – Valores de deslocamento dos ângulos de ressonância de cada etapa de funcionalização e da detecção do anti-AQP4 pelo peptídeo AQP4₆₁₋₇₀.

Etapa	Canal de referência ($\Delta\theta$)	Canal de detecção ($\Delta\theta$)
Ouro-Cist	0°	0°
Ouro-Cist-PEG	0,09°	0,09°
Ouro-Cist-PEG-Pep	0,43°	0,52°
Detecção	0,01°	0,25°

As moléculas que permanecem adsorvidas na superfície após a lavagem com o fluxo de água Milli-Q®, resultam em valores de $\Delta\theta$ ^{171,172}, como observados aqui. De acordo com Janmanee *et al.*¹⁷³, cada etapa da adsorção ocorre por ligações covalentes. Neste trabalho, na primeira etapa, a adsorção foi devido à formação de amida secundária (amida II) entre o grupamento –NH₂ da Cist e o grupamento –COOH do PEG. Na segunda etapa, a mesma amida II foi formada entre o grupamento –NH₂ do PEG e o grupamento –COOH do peptídeo AQP4₆₁₋₇₀. Finalmente, o aumento do $\Delta\theta$, comparando os canais de referência e de detecção, evidenciou a detecção do anti-AQP4 pelo peptídeo AQP4₆₁₋₇₀, como visto em outros estudos^{174–176}.

5.2 Triagem de peptídeos a partir de um painel

O primeiro objetivo da aplicação do nanoimunossensor foi verificar com as medidas de AFS se um ou mais dos peptídeos teriam interações específicas com as amostras de IgGs purificadas de pacientes de ENMO anti-AQP4+. Interações específicas são aquelas que ocorrem no complexo antígeno-anticorpo, diferentes das não-específicas que derivam de outros tipos de interações, podendo ser fracas (ligações de hidrogênio ou forças *van der Waals*, por exemplo)¹⁷⁷ ou ligações covalentes que formam os grupamentos amida (interações proteína-proteína ou IgG-proteína A, por exemplo)¹⁷⁸. Em princípio, dois fatores podem ser utilizados para distinguir forças específicas de não-específicas: a amplitude do valor da força de adesão e o formato da curva de força medidos pelo AFM^{119,124}.

Foram obtidas as forças de adesão para as amostras de IgGs purificadas do soro de oito pacientes de ENMO anti-AQP4+ utilizando o *Force Volume*, contendo curvas de força em cada um dos 256 pixels do mapa. Foram identificados os dois padrões no formato das curvas de força: curva com múltiplos picos (interação específica) e curva com um único pico (interação não-específica), como representado

no esquema da Figura 28A. Os formatos de interações específicas foram observados apenas nas medidas realizadas com a ponta de AFM funcionalizada com o peptídeo AQP4₆₁₋₇₀. Este fato pode ser observado na projeção interativa de documentos (IDMAP, do inglês *interactive document mapping*)¹⁷⁹ da Figura 28B, no qual há uma clara distinção dos dados das curvas de aproximação e de retração apenas das medidas com o peptídeo AQP4₆₁₋₇₀, não ocorrendo o mesmo com os demais peptídeos (AQP4₁₃₁₋₁₄₀, AQP4₁₄₁₋₁₅₀ e AQP4₂₀₁₋₂₁₀). Para realizar esta análise, cada curva foi transformada em um ponto: as curvas de aproximação estão representadas pelos pontos azuis e as curvas de retração, pelos pontos vermelhos. Esta análise é possível devido às curvas de aproximação e retração coincidirem em várias regiões da curva para as interações não-específicas, exceto por uma pequena região na qual há força atrativa não-nula; enquanto que para as curvas específicas, as diferenças entre a curva de aproximação e retração são grandes (Figura 28A). De fato, com interação específica, há estiramento ou desenovelamento de moléculas ao longo da linha de retração, em contraste com o descolamento acentuado de interações não-específicas¹⁸⁰.

Figura 28 – Reatividade do painel de peptídeos com o anti-AQP4. (A) Esquema do *Force Volume*, o qual contém curvas de retração não-específicas (vermelho) provenientes da formação de amida ou curvas de retração específicas (verde), das interações antígeno-anticorpo. A linha azul é a curva de aproximação. (B) IDMAP gerado a partir do *Force Volume* (imagens $40\ \mu\text{m} \times 40\ \mu\text{m}^2$; os pixels escuros indicam forças de adesão menores e os pixels claros, forças de adesão maiores), demonstrando a prevalência de curvas específicas somente para as medidas com o peptídeo AQP4₆₁₋₇₀. (C) *Boxplot* quantificando as forças de adesão da interação entre os peptídeos da AQP4 e o anti-AQP4; nenhuma diferença significativa foi encontrada entre: AQP4₁₃₁₋₁₄₀ e AQP4₁₄₁₋₁₅₀ ($p=0,68$); AQP4₁₃₁₋₁₄₀ e AQP4₂₀₁₋₂₁₀ ($p=0,79$); AQP4₁₄₁₋₁₅₀ e AQP4₂₀₁₋₂₁₀ ($p=0,57$). As interações foram estatisticamente diferentes entre o peptídeo AQP4₆₁₋₇₀ e os outros peptídeos (AQP4₁₃₁₋₁₄₀, $p=0,0009$; AQP4₁₄₁₋₁₅₀, $p=0,02$ e AQP4₂₀₁₋₂₁₀, $p=0,007$). Os formatos das curvas de adesão representativas estão apresentados na parte de cima do gráfico, mostrando as interações prevalentes em cada sistema. A região da força

de adesão está circulada na curva. A barra de escala para a força é de 200 pN.

Outra diferença entre curvas de força específicas e não-específicas é a amplitude da força de adesão. Para uma análise quantitativa destas forças foram selecionadas do *Force Volume* da Figura 28B cinquenta curvas medidas para cada peptídeo, das quais as medianas estão plotadas no gráfico da Figura 28C. As medianas das forças de adesão com o peptídeo AQP4₆₁₋₇₀ foram menores (85,5 pN; IQR 68,5–160,5), ao contrário das medianas dos demais peptídeos que foram 416,25 pN (301,60–591,25); 470,0 pN (138,5–503,5) e 489,1 pN (198,7–604,9) para AQP4₁₃₁₋₁₄₀, AQP4₁₄₁₋₁₅₀, e AQP4₂₀₁₋₂₁₀, respectivamente (todas as medianas das forças de adesão medidas neste trabalho podem ser consultadas no Apêndice B). As medianas das forças de adesão dos peptídeos AQP4₁₃₁₋₁₄₀, AQP4₁₄₁₋₁₅₀ e AQP4₂₀₁₋₂₁₀ são iguais ($p>0,05$), enquanto que as medianas da força de adesão do peptídeo AQP4₆₁₋₇₀ são estatisticamente diferentes comparadas com os demais peptídeos (AQP4₁₃₁₋₁₄₀, $p=0,0009$; AQP4₁₄₁₋₁₅₀, $p=0,02$, e AQP4₂₀₁₋₂₁₀, $p=0,007$).

As forças de adesão para as interações não-específicas se devem provavelmente às ligações covalentes na formação dos grupamentos amida¹⁷⁸, as quais não ocorrem nas medidas com o peptídeo AQP4₆₁₋₇₀ devido à bioafinidade na formação do complexo entre o peptídeo e o anti-AQP4^{181,182}.

Além disso, os valores de força de adesão medidos pelo peptídeo AQP4₆₁₋₇₀ estão de acordo com os valores reportados na literatura para interações antígeno-anticorpo utilizando o AFM¹⁸³. Para melhor compreendermos o fato de forças não-específicas terem sido maiores do que as forças específicas, realizamos uma série de experimento complementares de AFS, variando o pH do meio durante as medidas (Apêndice A). Os resultados do Apêndice A confirmam valores maiores de força de adesão para sistemas não-específicos e valores menores de força de adesão para interações específicas.

5.3 Aplicação do nanoimunossensor como ferramenta de diagnóstico

Após comprovada a eficácia do nanoimunossensor com o peptídeo AQP4₆₁₋₇₀ em reconhecer o anti-AQP4 nas amostras de pacientes de ENMO anti-AQP4+, foi

aplicado o sensor para testar sua potencialidade em ser utilizado como ferramenta de diagnóstico.

Foram utilizadas dezessete amostras de IgGs purificadas de soro: de cinco indivíduos saudáveis (controle), quatro pacientes de EM e oito pacientes de ENMO anti-AQP4⁻. As forças de adesão obtidas destas amostras foram comparadas com as obtidas das amostras de pacientes de ENMO anti-AQP4⁺.

O IDMAP plotado na Figura 29A obtido dos dados brutos das curvas de retração de todas as amostras apresenta uma clara separação entre os pacientes de ENMO anti-AQP4⁺ e os demais (controle, EM e ENMO anti-AQP4⁻). Esta separação é melhor visualizada nas medianas das forças de adesão mostrada na Figura 29B, as quais são 927 pN (IQR 672–937), 831,0 pN (650,5–877,5) e 605,0 pN (425,0–1055,7) para o controle, EM e ENMO anti-AQP4⁻, respectivamente, muito maiores do que a força de adesão obtida para os pacientes de ENMO anti-AQP4⁺ (85,5 pN; 68,5–160,5).

A especificidade do nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀ foi testada com a curva ROC para analisar a acurácia em distinguir o controle e pacientes de EM de pacientes de ENMO anti-AQP4⁺. A curva ROC da Figura 29C mostra a efetividade do nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀ em distinguir pacientes de ENMO anti-AQP4⁺ dos pacientes de EM e controle com o valor de AUC de 1,0 e $p < 0,0001$.

A sensibilidade do nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀ também foi testada com a curva ROC para verificar se os pacientes de ENMO anti-AQP4⁻ poderiam ser distinguidos de ENMO anti-AQP4⁺. A Figura 29D mostra a curva ROC com AUC de 0,82 e $p = 0,0078$, provando que esses grupos são distintos. O ponto de corte da força de adesão de 241,3 pN foi determinado pela curva ROC da Figura 29C, com 100% de especificidade (95%; IC 63,06–100,00). A sensibilidade do nanoimunossensor foi de 81,25% (95%; IC 56,50–99,43) (Figura 29D). Assim, as forças de adesão abaixo deste ponto de corte utilizando o nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀ indicam a presença do anti-AQP4.

Figura 29 – Desempenho e acurácia do nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀. (A) IDMAP das curvas de retração mostrando grupos distintos para as interações específicas em ENMO (anti-AQP4+, em verde) e não-específicas (saúáveis, em preto; EM, em vermelho; e anti-AQP4-, em marrom). (B) *Boxplot* quantificando as medianas das forças de adesão obtidas com o nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀. O nanoimunossensor foi efetivo em distinguir ENMO anti-AQP4+ de saúáveis, EM, ENMO anti-AQP4- e ENMO anti-AQP4+ (saúáveis, $p=0,004$; EM, $p=0,008$; ENMO anti-AQP4-, $p=0,0008$). Os formatos das curvas de adesão representativas estão apresentados na parte de cima do gráfico, mostrando as interações prevalentes em cada sistema. A região da força de adesão está circulada na curva. A barra de escala para a força é de 200 pN. (C) Curva ROC para a comparação entre ENMO anti-AQP4+ e amostras soronegativas para anti-AQP4 (saúáveis e EM) com AUC de 1,0 e $p=0,0001$, confirmando a alta especificidade do nanoimunossensor. O ponto de corte da força de adesão foi de 241,3 pN a 100% de especificidade (95%; IC 63,06–100,00). (D) Curva ROC para a comparação entre os pacientes ENMO anti-AQP4+ e ENMO anti-AQP4- com os saúáveis e

pacientes de EM com AUC de 0,82 e $p=0,0078$, resultando em 81,25% de sensibilidade (95%; IC 56,50–99,43) do nanoimunossensor.

Embora Kampylafka *et al.*⁵⁸ tenham encontrado maior reatividade do anti-AQP4 contra alças intracelulares da AQP4, estudos recentes relataram serem as alças extracelulares as reconhecidas pelo anti-AQP4 como epítomos específicos da doença^{71–73}. Essas alças externas são conhecidas na literatura como alças A, C e E, as quais em cada um dos estudos obtiveram níveis diferentes de reatividade contra o anti-AQP4.

A sequência peptídica utilizada neste trabalho, AQP4₆₁₋₇₀, está contida na alça A e demonstrou sua função como um epítomo da AQP4 devido sua alta reatividade contra o anti-AQP4. Este fato pode ser evidenciado pela alta especificidade do peptídeo AQP4₆₁₋₇₀ e sua capacidade em distinguir pacientes de ENMO anti-AQP4+ de indivíduos saudáveis, pacientes de EM e de ENMO anti-AQP4–. A sensibilidade do nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀ foi de 81,25% e especificidade de 100%. Esse nível de especificidade é igual ao alçado pelo teste CBA e a sensibilidade um pouco maior do que a alcançada por esse teste, considerado o padrão-ouro para diagnóstico do ENMO¹⁶. O nível de sensibilidade do CBA pode estar relacionado com a sensibilidade intrínseca do método ou à real ausência de anticorpos contra a sequência peptídica AQP4₆₁₋₇₀ no grupo de pacientes de ENMO anti-AQP4–. Contudo, uma vez que o nanoimunossensor foi desenvolvido com altos níveis de especificidade e sensibilidade, é possível expandir o painel de peptídeos para potencialmente identificar novos peptídeos da AQP4 para responder à questão: a sensibilidade do teste CBA pode ser melhorada, mapeando a AQP4 em busca do epítomo-específico para cada fenótipo do ENMO, ou o anti-AQP4 realmente está ausente neste grupo de pacientes de ENMO hoje categorizados como soronegativos para anti-AQP4?

Esta questão atrai a atenção dos pesquisadores pois a razão da ausência do anti-AQP4 ainda é desconhecida. A literatura apresenta a possibilidade de os pacientes do ENMO anti-AQP4– possuírem outros antígenos que implica em uma patologia diferente de EM ou ENMO anti-AQP4+, particularmente apontam o anti-MOG como candidato a ser o biomarcador neste grupo de pacientes. Atualmente, estudos apresentam uma porcentagem de pacientes de encefalomielite aguda (ADEM, do inglês *acute disseminated encephalomyelitis*) e ENMO anti-AQP4– que foram

positivos para anti-MOG¹⁸⁴. Apesar de cerca 20% de pacientes do ENMO anti-AQP4– terem sido soropositivos para anti-MOG¹⁸⁵ e ter a evidência de que este anticorpo está relacionado aos surtos¹⁸⁶, há outra hipótese sobre esta questão. Segundo Nakashima¹⁸⁷, seria inapropriado categorizar pacientes do ENMO anti-AQP4– e anti-AQP4+ como ENMO ou ADEM. Contudo, há evidências que nos levam a supor que o fenótipo ENMO anti-AQP4– está relacionado a outros antígenos-alvos ocasionando mecanismos distintos do fenótipo do ENMO anti-AQP4+¹⁸⁸. O que suporta esta afirmação é o que foi observado na miastenia gravis (MG), que é uma doença autoimune com o epítipo específico da doença definido pelo anticorpo anti-receptor acetilcolina (AChR, do inglês *acetylcholine receptor*) como principal biomarcador da doença. Atualmente, outros epítipos específicos são reconhecidos em diferentes fenótipos da MG, como a proteína quinase músculo-específica (MusK, do inglês *muscle-specific kinase*) e proteína 4 relacionada com o receptor da lipoproteína de baixa densidade (LRP4, do inglês *lipoprotein-related protein 4*). Anticorpos contra essas proteínas foram encontrados em pacientes de MG soronegativos para AChR¹⁸⁹. A mesma situação pode estar ocorrendo com os fenótipos do ENMO soronegativos para anti-AQP4, nos quais podem haver epítipos específicos distintos como ocorrência de fenótipos diferentes do ENMO, resultado de mecanismos diversos da mesma doença.

5.4 Relação entre a força de adesão e a titulação de anti-AQP4

Durante as análises com o nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀, nos questionamos se as variações no valor da força de adesão dentro do grupo anti-AQP4+ teria relação com a titulação de anti-AQP4 nessas amostras, uma vez que a interação foi comprovada ser entre o peptídeo AQP4₆₁₋₇₀ e o anti-AQP4. Embora todas as amostras medidas apresentaram valores de mediana compatíveis com a interação antígeno-anticorpo, não ultrapassando 241,3 pN (ponto de corte da força de adesão), houve variação, na qual a menor mediana foi de 58,5 pN (IQR 37,0–112,0) e a maior foi de 195,5 (111,0–309,0) pN (todas as medianas das forças de adesão medidas neste trabalho podem ser consultadas no Apêndice B).

Para responder a este questionamento, selecionamos nove novos pacientes anti-AQP4+, agora com a titulação conhecida (três com titulação baixa, três com

titulação intermediária e três com titulação alta), e medimos a força de adesão com o nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀. Neste ponto do estudo, as medidas foram feitas às cegas, ou seja, a categorização dos níveis de titulação das amostras era conhecida apenas pela Dra. Doralina, neurologista que acompanha esses pacientes, nas demais etapas de purificação das amostras, funcionalização das superfícies, medida da força de adesão por AFS e análise das medidas não se conhecia quais eram as titulações de anti-AQP4 das amostras.

O nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀ foi capaz de detectar o anti-AQP4 em todas as amostras, independentemente do nível de titulação, com valores de força de adesão abaixo do ponto de corte (241,3 pN) (Figura 30A). As medianas das forças de adesão foram plotadas ordenadas crescentemente, no entanto, respeitando uma tendência crescente de força de adesão, às cegas, sem serem conhecidos os valores de titulação (Figura 30B).

Figura 30 – Relação entre a titulação e a força de adesão. (A) *Boxplot* das medianas das forças de adesão medidas com nanoimunossensor nas amostras tituladas. (B) Correlação (R^2) de 90% entre a titulação de anti-AQP4 das amostras e a força de adesão medida pelo nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀. (Os valores das medianas e os IQR estão no Apêndice B). A linha tracejada marca o ponto de corte: 241,3 pN.

Os dados de força de adesão foram confrontados com a categorização dos níveis de titulação dos pacientes, como segue: (a) pacientes 26, 27 e 28 com alta titulação de anti-AQP4 (titulação de 100x); (b) pacientes 29, 30 e 31 com titulação intermediária (titulação 10x), e (c) pacientes 32, 33 e 34 com baixa titulação (titulação

1x). Todos os valores das forças de adesão estão no Apêndice B. Assim, obtivemos a resposta para o nosso questionamento: confirmou-se que quanto maior é a titulação, maior será a força de adesão, com 90% de correlação entre o nível de titulação e o valor da força de adesão.

Atualmente, o teste de ELISA apresenta 100% de especificidade para ENMO, enquanto a sensibilidade atinge cerca de 60%¹¹ e o teste CBA apresenta especificidade de 100% e sensibilidade de 76%¹⁹⁰. Como pode ser observado, existe uma deficiência importante no que diz respeito à sensibilidade dos testes utilizados para a detecção do anti-AQP4. Uma pequena diferença em proporção de testes de detecção pode significar uma alta relevância clínica¹⁹¹.

A sensibilidade do teste possui grande importância no que diz respeito à titulação de anti-AQP4 nas amostras dos pacientes, uma vez que a titulação tem relação direta com o progresso da doença. No estudo de Takahashi *et al.*¹⁹² pacientes acometidos por NO e com titulações altas, atingindo mediana de 1536x, apresentavam cegueira completa, e aqueles com titulações menores, cerca de 64x não apresentavam cegueira completa. Além disso, encontraram uma correlação positiva de cerca de 83% entre a titulação de anti-AQP4 e as lesões encontradas na RM: quanto maior a titulação, mais extensas eram as lesões. Esse estudo mostrou também que a partir da titulação pode-se inferir sobre o sucesso nas terapias com altas doses de corticoide e tratamento para prevenção de reincidência de surtos, o que diminui a titulação de anti-AQP4. Atualmente, no caso de tratamento de reincidência de surtos, a titulação do anti-AQP4 direciona a terapia¹⁹³.

Dessa maneira, o nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀ para diagnóstico do ENMO pode colaborar com os atuais métodos de detecção de anti-AQP4. Outro aspecto seria utilizar o teste para comprovar se o paciente está ou não em surto, uma vez que a titulação pode ser alta em pacientes em surto e menores em pacientes fora de surto¹⁹⁰ e o nanoimunossensor foi capaz de detectar o anti-AQP4 mesmo em baixas titulações (1x).

5.5 Abordagens computacionais

Os resultados obtidos neste trabalho foram comparados com os estudos de simulação computacional realizados pelos Drs. Adriano Moraes Amarante (processo

FAPESP n° 2014/12466-7) e Jéssica C. M. Ierich (Processo FAPESP 2014/12082-4), sendo eles: (a) simulação computacional da funcionalização e (b) medida da força teórica de adesão por dinâmica molecular direcionada (SMD, do inglês *Steered Molecular Dynamics*¹⁹⁴). Com os resultados obtidos pelo grupo de pesquisa teórica foi possível comparar os dados obtidos de ambas abordagens a fim de proporcionar uma interpretação mais clara dos resultados, tanto computacional como experimentalmente.

5.5.1 Simulação computacional da funcionalização do substrato e do nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀

A funcionalização das superfícies e a imobilização das biomoléculas no substrato e no nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀ foram modeladas computacionalmente, das quais é possível ter uma visualização geral da distribuição das moléculas (Figura 31).

Figura 31 – Funcionalização e imobilização. (Topo) Ponta de AFM de nitreto de silício (marrom) funcionalizada com APTES, espaçador PEG e peptídeo AQP4₆₁₋₇₀ (verde). (Base) Mica (marrom) funcionalizada com APTES, PtA e IgG imobilizada. (Elaborado pelo aluno Adriano Moraes Amarante).

A modelagem da funcionalização das superfícies é importante para o entendimento da funcionalização experimental, tanto com respeito à interação entre os componentes químicos e as biomoléculas envolvidas na montagem das camadas de funcionalização quanto o que diz respeito à interação peptídeo-anticorpo.

5.5.2 Comparação da força de adesão experimental com a força de adesão teórica

Com a predição computacional da estrutura do complexo antígeno-anticorpo (AQP4₆₁₋₇₀-IgG) foi possível realizar as simulações de SMD.

A SMD foi realizada durante 3ns. Para tal, o átomo C α dos resíduos ALA123 (cadeia leve) e ARG113 (cadeia pesada) da região Fab da IgG foram fixados para evitar deslocamento da IgG juntamente com a força externa aplicada para a retirada do peptídeo; o deslocamento da região Fab prejudica o resultado final, uma vez que impossibilita o desligamento do complexo. Esse procedimento simula o que ocorre na funcionalização das superfícies no método experimental, no qual as moléculas estão fixas por meio da funcionalização covalente. A força externa foi aplicada no átomo C α do resíduo MET10 do peptídeo AQP4₆₁₋₇₀ (Figura 32A). A simulação foi realizada usando a constante de mola (k) de 0,2 kcal (mol Å²)⁻¹ em velocidade constante de 0,00005 Å timestep⁻¹ (0,025 Å ps⁻¹). O valor de k foi escolhido visando aproximar as simulações computacionais dos experimentos de AFM realizados com o nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀.

Após a realização da simulação descrita (dinâmica de desligamento do peptídeo do complexo com o anticorpo) foi possível obter a força teórica de adesão de 224,0 pN que pode ser observada na Figura 32B, muito próxima à força de adesão obtida pelo nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀ (241,3 pN) (Figura 32C), associada ao ponto de corte das forças de adesão, abaixo do qual foram os valores de detecção que indicaram a presença do anti-AQP4.

Figura 32 – Desprendimento do peptídeo AQP4₆₁₋₇₀ em complexo com a IgG e força de adesão teórica medida por SMD. (A) Estrutura do complexo região Fab da IgG com o peptídeo, indicando os átomos fixados Cα dos resíduos ALA123 (cadeia leve) e ARG113 (cadeia pesada) da região Fab da IgG e o átomo Cα do resíduo MET10 do peptídeo no qual foi aplicada a força externa para o desligamento do complexo. (B) Força de adesão teórica, 224,0 pN. (C) Ponto de corte da força de adesão experimental, 241,3 pN.

A força de adesão teórica obtida com a SMD com parâmetros controlados e a força de adesão experimental apresentaram valores muito próximos, o que valida o resultado obtido pelo nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀. Ierich *et al.*¹⁹⁵ obtiveram resultados semelhantes ao medir a força de adesão teórica e experimental do complexo MOG e anti-MOG, moléculas estudadas como participantes da patogenia de doenças desmielinizantes.

Conclusão e perspectivas

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

No presente trabalho foi possível desenvolver o nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀, utilizando a AFM, com protocolos efetivos de funcionalização evidenciados pelas técnicas de caracterização topográfica (por AFM), química (por AFM-IR) e da montagem das camadas por meio da funcionalização covalente do nanoimunossensor e do substrato (por SPR). O desenvolvimento foi validado também pelas técnicas de simulação computacional, corroborando os valores de força de adesão obtidos pelo nanoimunossensor.

O teste aqui desenvolvido mostrou que o epítipo específico do fenótipo ENMO anti-AQP4⁺ é a sequência peptídica AQP4₆₁₋₇₀. Com esta sequência, o nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀ foi capaz de detectar o anti-AQP4, biomarcador do ENMO, em amostras de IgGs purificadas dos soros de pacientes com o fenótipo anti-AQP4⁺, com 100% de especificidade. Este teste se mostrou também altamente sensível, tendo distinguido pacientes do ENMO anti-AQP4⁺ dos demais indivíduos analisados (saúáveis, pacientes de EM e ENMO anti-AQP4⁻) com 81,25% de sensibilidade, mais sensível do que o CBA, atualmente considerado o teste padrão-ouro para diagnóstico do ENMO.

Os resultados obtidos neste trabalho com o nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀ e a alta acurácia evidenciada no desempenho deste teste para diagnosticar pacientes do ENMO AQP4⁺, demonstram seu grande potencial e a importância que o nanoimunossensor tem como ferramenta de diagnóstico não apenas do ENMO, mas podendo ser expandido para o diagnóstico de quaisquer doenças antígeno-específicas.

Por isso, a atual questão que nos chama a atenção quanto à ausência ou presença do anti-AQP4 nos diferentes fenótipos do ENMO emerge como perspectiva deste trabalho, o qual nos permite vislumbrar a necessidade de exploração de novas sequências da AQP4, principalmente, no fenótipo anti-AQP4⁻ do ENMO, bem como sequências peptídicas de outras proteínas, como a MOG, por exemplo, pois a não-deteção de anti-AQP4 no fenótipo anti-AQP4⁻ pode significar a real ausência do anti-AQP4 e estar relacionada à outras sequências peptídicas como epítipos exclusivos deste fenótipo.

Para melhor explorar esta lacuna, em consideração aos resultados obtidos neste trabalho, é necessário que o fenótipo do ENMO anti-AQP4– seja explorado com o nanoimunossensor, utilizando outras sequências peptídicas da proteína AQP4. Esgotadas as possibilidades de detecção com peptídeos da AQP4, vislumbra-se expandir a pesquisa com peptídeos de outras proteínas, como a MOG, por exemplo, pelas evidências encontradas na literatura da presença de anti-MOG em pacientes do ENMO anti-AQP4–, visto que ainda é necessária e urgente a exploração da participação desta proteína no fenótipo soronegativo do ENMO.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Bueno CC, Amarante AM, Oliveira GS, Deda DK, Teschke O, Franca EF, et al. Nanobiosensor for diclofop detection based on chemically modified AFM probes. *IEEE Sens J.* 2014 May;14(5):1467–75.
2. da Silva ACN, Deda DK, Bueno CC, Moraes AS, Da Roz AL, Yamaji FM, et al. Nanobiosensors exploiting specific interactions between an enzyme and herbicides in atomic force spectroscopy. *J Nanosci Nanotechnol.* 2014 Sep 1;14(9):6678–84.
3. Garcia PS, Moreau ALD, Ierich JCM, Vig ACA, Higa AM, Oliveira GS, et al. A nanobiosensor based on 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase enzyme for mesotrione detection. *IEEE Sens J.* 2014;15(4):2106–13.
4. Moraes AS, Pereira BBS, Moreau ALD, Hausen M, Garcia PS, Da Róz AL, et al. Evidências de detecção do herbicida atrazina por espectroscopia de força atômica: uma ferramenta promissora para sensoriamento ambiental. *Acta Microsc.* 2015;24(1):53–63.
5. Leite FL, Hausen M, Oliveira GS, Brum DG, Oliveira ON. Nanoneurobiophysics: new challenges for diagnosis and therapy of neurologic disorders. *Nanomed.* 2015 Nov 26;10(23):3417–9.
6. Wingerchuk DM, Hogancamp WF, O'Brien PC, Weinshenker BG. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology.* 1999 Jan 9;53(5):1107–1107.
7. Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, Pittock SJ, Weinshenker BG. The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol.* 2007 Sep;6(9):805–15.
8. 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 Dec;364(9451):2106–12.
9. Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology.* 2006 May 23;66(10):1485–9.
10. Waters P, Jarius S, Littleton E, Leite MI, Jacob S, Gray B, et al. Aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica and longitudinally extensive transverse myelitis. *Arch Neurol.* 2008 Jul;65(7):913–9.
11. Jarius S, Franciotta D, Bergamaschi R, Wright H, Littleton E, Palace J, et al. NMO-IgG in the diagnosis of neuromyelitis optica. *Neurology.* 2007 Mar 27;68(13):1076–7.
12. Waters PJ, McKeon A, Leite MI, Rajasekharan S, Lennon VA, Villalobos A, et al. Serologic diagnosis of NMO. *Neurology.* 2012 Feb 28;78(9):665–71.
13. Jarius S, Wildemann B. The history of neuromyelitis optica. *J Neuroinflammation.* 2013 Jan 15;10(1):8.

14. Iyer A, Elson L, Appleton R, Jacob A. A review of the current literature and a guide to the early diagnosis of autoimmune disorders associated with neuromyelitis optica. *Autoimmunity*. 2014 May 1;47(3):154–61.
15. Asgari N, Owens T, Frøkiær J, Stenager E, Lillevang ST, Kyvik KO. Neuromyelitis optica (NMO) – an autoimmune disease of the central nervous system (CNS). *Acta Neurol Scand*. 2011 Jun 1;123(6):369–84.
16. Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, Cabre P, Carroll W, Chitnis T, et al. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology*. 2015 Jul 14;85(2):177–89.
17. Bukhari W, Prain KM, Waters P, Woodhall M, O’Gorman CM, Clarke L, et al. Incidence and prevalence of NMOSD in Australia and New Zealand. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017 Aug;88(8):632–8.
18. Mori M, Kuwabara S, Paul F. Worldwide prevalence of neuromyelitis optica spectrum disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018 Feb 7;89(6):1–2.
19. Koduah P, Paul F, Dörr J-M. Vitamin D in the prevention, prediction and treatment of neurodegenerative and neuroinflammatory diseases. *EPMA J*. 2017 Nov 15;8(4):313–25.
20. Miyamoto K, Fujihara K, Kira JI, Kuriyama N, Matsui M, Tamakoshi A, et al. The prevalence and characteristics of neuromyelitis optica in Japan: A nationwide epidemiological study. *J Neurol Sci*. 2017 Oct 15;381:787.
21. Pittock SJ, Lennon VA, Krecke K, Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Brain abnormalities in neuromyelitis optica. *Arch Neurol*. 2006 Mar;63(3):390–6.
22. Ghezzi A, Bergamaschi R, Martinelli V, Trojano M, Tola MR, Merelli E, et al. Clinical characteristics, course and prognosis of relapsing Devic’s Neuromyelitis Optica. *J Neurol*. 2004 Jan;251(1):47–52.
23. Yamakawa K, Kuroda H, Fujihara K, Sato S, Nakashima I, Takeda A, et al. Familial neuromyelitis optica (Devic’s syndrome) with late onset in Japan. *Neurology*. 2000 Jul 25;55(2):318–20.
24. Matiello M, Schaefer-Klein JL, Hebrink DD, Kingsbury DJ, Atkinson EJ, Weinshenker BG, et al. Genetic analysis of aquaporin-4 in neuromyelitis optica. *Neurology*. 2011 Sep 20;77(12):1149–55.
25. Brum DG, Barreira AA, dos Santos AC, Kaimen-Maciel DR, Matiello M, Costa RM, et al. HLA-DRB association in neuromyelitis optica is different from that observed in multiple sclerosis. *Mult Scler J*. 2010 Jan;16(1):21–9.
26. Negro D, Cristina M, Marinho PBC, Papais-Alvarenga RM, Negro D, Cristina M, et al. Neuromyelitis optica: phenotypic characteristics in a Brazilian case series. *Arq Neuropsiquiatr*. 2017 Feb;75(2):81–6.
27. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis. *Neurology*. 1983 Nov 1;33(11):1444.

-
28. Sellner J., Boggild M., Clanet M., Hintzen R. Q., Illes Z., Montalban X., et al. EFNS guidelines on diagnosis and management of neuromyelitis optica. *Eur J Neurol*. 2010 Jul 13;17(8):1019–32.
 29. Suksuchano K, Aungsumart S, Apiwattanakul M. Prognostic factors for first relapse in Thai patients with neuromyelitis optica spectrum disorder. *J Neurol Sci*. 2017 Oct 15;381:1063–4.
 30. Li JTC, Cheung NYF, Ho CYT, Lo JWT, Chan CC, Chan SCH, et al. A case series of serum aquaporin-4 autoantibody positive neuromyelitis optica patients in Hong Kong. *J Neurol Sci*. 2017 Oct 15;381:451.
 31. Papais-Alvarenga RM, Miranda-Santos CM, Puccioni-Sohler M, de Almeida AMV, Oliveira S, Basilio De Oliveira CA, et al. Optic neuromyelitis syndrome in Brazilian patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002 Oct;73(4):429–35.
 32. Bichuetti DB, Lobato de Oliveira EM, Oliveira DM, Amorin de Souza N, Gabbai AA. Neuromyelitis optica treatment: analysis of 36 patients. *Arch Neurol*. 2010 Sep;67(9):1131–6.
 33. Frota ERC, Mendes MF, Vasconcelos CCF. Recomendações no tratamento da esclerose múltipla e neuromielite óptica. 2nd ed. São Paulo: Omnifarma; 2016. 232 p.
 34. Baghbanian SM, Asgari N, Sahraian MA, Moghadasi AN. A comparison of pediatric and adult neuromyelitis optica spectrum disorders: A review of clinical manifestation, diagnosis, and treatment. *J Neurol Sci*. 2018 May 15;388:222–31.
 35. Palace J, Leite MI, Nairne A, Vincent A. Interferon Beta treatment in neuromyelitis optica: increase in relapses and aquaporin 4 antibody titers. *Arch Neurol*. 2010 Aug;67(8):1016–7.
 36. Pellkofer HL, Krumbholz M, Berthele A, Hemmer B, Gerdes LA, Havla J, et al. Long-term follow-up of patients with neuromyelitis optica after repeated therapy with rituximab. *Neurology*. 2011 Apr 12;76(15):1310–5.
 37. Kowarik MC, Hoshi M, Hemmer B, Berthele A. Failure of alemtuzumab as a rescue in a NMOSD patient treated with rituximab. *Neurol - Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2016 Apr 1;3(2):e208.
 38. Ganesh A. Practice current: How do you treat neuromyelitis optica?, Practice current: How do you treat neuromyelitis optica? *Neurol Clin Pract Neurol Clin Pract*. 2017 Apr;7, 7(2, 2):170, 170–8.
 39. Bergamaschi R, Uggetti C, Toniatti S, Egitto MG, Cosi V. A case of relapsing neuromyelitis optica treated with glatiramer acetate. *J Neurol*. 2003 Mar;250(3):359–61.
 40. Gartzon K, Limmroth V, Putzki N. Relapsing neuromyelitis optica responsive to glatiramer acetate treatment. *Eur J Neurol*. 2007 Jun;14(6):e12-13.
 41. Paul F, Murphy O, Pardo S, Levy M. Investigational drugs in development to prevent neuromyelitis optica relapses. *Expert Opin Investig Drugs*. 2018 Mar 4;27(3):265–71.

42. Abboud H, Petrak A, Mealy M, Sasidharan S, Siddique L, Levy M. Treatment of acute relapses in neuromyelitis optica: Steroids alone versus steroids plus plasma exchange. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl*. 2016 Feb;22(2):185–92.
43. Kleiter I, Gahlen A, Borisow N, Fischer K, Wernecke K-D, Wegner B, et al. Neuromyelitis optica: Evaluation of 871 attacks and 1,153 treatment courses. *Ann Neurol*. 2016 Feb;79(2):206–16.
44. Kim S-H, Kim W, Huh S-Y, Lee KY, Jung IJ, Kim HJ. Clinical efficacy of plasmapheresis in patients with neuromyelitis optica spectrum disorder and effects on circulating anti-aquaporin-4 antibody levels. *J Clin Neurol Seoul Korea*. 2013 Jan;9(1):36–42.
45. Jarius S, Wildemann B. AQP4 antibodies in neuromyelitis optica: diagnostic and pathogenetic relevance. *Nat Rev Neurol*. 2010 Jul;6(7):383–92.
46. Weinshenker BG, Wingerchuk DM. Neuromyelitis spectrum disorders. *Mayo Clin Proc*. 2017 Apr 1;92(4):663–79.
47. Bennett JL. Finding NMO: The evolving diagnostic criteria of neuromyelitis optica. *J Neuro-Ophthalmol Off J North Am Neuro-Ophthalmol Soc*. 2016 Sep;36(3):238–45.
48. Bruscolini A, Sacchetti M, La Cava M, Gharbiya M, Ralli M, Lambiase A, et al. Diagnosis and management of neuromyelitis optica spectrum disorders - An update. *Autoimmun Rev*. 2018 Mar 1;17(3):195–200.
49. Kitley J, Waters P, Woodhall M, Leite MI, Murchison A, George J, et al. Neuromyelitis optica spectrum disorders with aquaporin-4 and myelin-oligodendrocyte glycoprotein antibodies: a comparative study. *JAMA Neurol*. 2014 Mar;71(3):276–83.
50. Sato DK, Callegaro D, Lana-Peixoto MA, Waters PJ, de Haidar Jorge FM, Takahashi T, et al. Distinction between MOG antibody-positive and AQP4 antibody-positive NMO spectrum disorders. *Neurology*. 2014 Feb 11;82(6):474–81.
51. Kitley J, Woodhall M, Waters P, Leite MI, Devenney E, Craig J, et al. Myelin-oligodendrocyte glycoprotein antibodies in adults with a neuromyelitis optica phenotype. *Neurology*. 2012 Sep 18;79(12):1273–7.
52. de Seze J. MOG-antibody neuromyelitis optica spectrum disorder: is it a separate disease? *Brain*. 2017 Dec 1;140(12):3072–5.
53. Kezuka T, Usui Y, Yamakawa N, Matsunaga Y, Matsuda R, Masuda M, et al. Relationship between NMO-antibody and anti-MOG antibody in optic neuritis. *J Neuro-Ophthalmol Off J North Am Neuro-Ophthalmol Soc*. 2012 Jun;32(2):107–10.
54. Jarius S, Ruprecht K, Kleiter I, Borisow N, Asgari N, Pitarokoili K, et al. MOG-IgG in NMO and related disorders: a multicenter study of 50 patients. Part 1: Frequency, syndrome specificity, influence of disease activity, long-term course, association with AQP4-IgG, and origin. *J Neuroinflammation*. 2016 Sep 26;13(1):279–95.
55. Weber MS, Hemmer B, Cepok S. The role of antibodies in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 2011 Feb 1;1812(2):239–45.

56. Jiao Y, Fryer JP, Lennon VA, Jenkins SM, Quek AML, Smith CY, et al. Updated estimate of AQP4-IgG serostatus and disability outcome in neuromyelitis optica. *Neurology*. 2013 Oct 1;81(14):1197–204.
57. Roemer SF, Parisi JE, Lennon VA, Benarroch EE, Lassmann H, Bruck W, et al. Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica from multiple sclerosis. *Brain J Neurol*. 2007 May;130(Pt 5):1194–205.
58. Kampylafka EI, Routsias JG, Alexopoulos H, Dalakas MC, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Fine specificity of antibodies against AQP4: epitope mapping reveals intracellular epitopes. *J Autoimmun*. 2011 May;36(3–4):221–7.
59. Tani T, Sakimura K, Tsujita M, Nakada T, Tanaka M, Nishizawa M, et al. Identification of binding sites for anti-aquaporin 4 antibodies in patients with neuromyelitis optica. *J Neuroimmunol*. 2009 Jun 25;211(1–2):110–3.
60. Lucchinetti CF, Mandler RN, McGavern D, Bruck W, Gleich G, Ransohoff RM, et al. A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain J Neurol*. 2002 Jul;125(Pt 7):1450–61.
61. Mirshafiey A, Kianiaslani M. Autoantigens and autoantibodies in multiple sclerosis. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2013 Dec;12(4):292–303.
62. Katsavos S, Anagnostouli M, Katsavos S, Anagnostouli M. Biomarkers in multiple sclerosis: an up-to-date overview. *Mult Scler Int Mult Scler Int*. 2013 Jan 22;2013, 2013:e340508.
63. Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, et al. Aquaporin water channels – from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol*. 2002 Jul 1;542(1):3–16.
64. Verkman AS, Phuan P-W, Asavapanumas N, Tradtrantip L. Biology of AQP4 and anti-AQP4 antibody: therapeutic implications for NMO. *Brain Pathol Zurich Switz*. 2013 Nov;23(6):684–95.
65. Ho JD, Yeh R, Sandstrom A, Chorny I, Harries WEC, Robbins RA, et al. Crystal structure of human aquaporin 4 at 1.8 Å and its mechanism of conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 May 5;106(18):7437–42.
66. Lu M, Lee MD, Smith BL, Jung JS, Agre P, Verdijk MA, et al. The human AQP4 gene: definition of the locus encoding two water channel polypeptides in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 1;93(20):10908–12.
67. Yang B, Ma T, Verkman AS. cDNA cloning, gene organization, and chromosomal localization of a human mercurial insensitive water channel evidence for distinct transcriptional units. *J Biol Chem*. 1995 Sep 29;270(39):22907–13.
68. Etchegaray A, Bueno CC, Teschke O. Identification of microcystin LR at the molecular level using atomic force microscopy. *Quím Nova*. 2010;33(9):1843–8.
69. Meng J, Paetzell E, Bogorad A, Soboyejo WO. Adhesion between peptides/antibodies and breast cancer cells. *J Appl Phys*. 2010 Jun 1;107(11):114301.

70. Kampylafka EI, Routsias JG, Alexopoulos H, Dalakas MC, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Fine specificity of antibodies against AQP4: epitope mapping reveals intracellular epitopes. *J Autoimmun.* 2011 May;36(3–4):221–7.
71. Son M, Kim D, Park KS, Hong S, Park TH. Detection of aquaporin-4 antibody using aquaporin-4 extracellular loop-based carbon nanotube biosensor for the diagnosis of neuromyelitis optica. *Biosens Bioelectron.* 2016 Apr 15;78:87–91.
72. Iorio R, Fryer JP, Hinson SR, Fallier-Becker P, Wolburg H, Pittock SJ, et al. Astrocytic autoantibody of neuromyelitis optica (NMO-IgG) binds to aquaporin-4 extracellular loops, monomers, tetramers and high order arrays. *J Autoimmun.* 2013 Feb;40:21–7.
73. Pisani F, Mastrototaro M, Rossi A, Nicchia GP, Tortorella C, Ruggieri M, et al. Identification of two major conformational aquaporin-4 epitopes for neuromyelitis optica autoantibody binding. *J Biol Chem.* 2011 Mar 18;286(11):9216–24.
74. Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. 8th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Health Sciences; 2014. 544 p.
75. Jarius S, Neumayer B, Wandinger KP, Hartmann M, Wildemann B. Anti-endothelial serum antibodies in a patient with Susac's syndrome. *J Neurol Sci.* 2009 Oct 15;285(1–2):259–61.
76. Mader S, Gredler V, Schanda K, Rostasy K, Dujmovic I, Pfaller K, et al. Complement activating antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein in neuromyelitis optica and related disorders. *J Neuroinflammation.* 2011;8:184.
77. Harris LJ, Skaletsky E, McPherson A. Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *J Mol Biol.* 1998 Feb 6;275(5):861–72.
78. Harris LJ, Larson SB, Hasel KW, McPherson A. Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody. *Biochemistry.* 1997 Feb 18;36(7):1581–97.
79. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 1;28(1):235–42.
80. da Silva ACN, Deda DK, da Róz AL, Prado RA, Carvalho CC, Viviani V, et al. Nanobiosensors based on chemically modified AFM probes: a useful tool for metsulfuron-methyl detection. *Sensors.* 2013 Jan 24;13(2):1477–89.
81. Deda DK, Bueno CC, Ribeiro GA, Moraes AS, Garcia PS, Leite FL. Atomic force microscopy-based molecular recognition: a promising alternative to environmental contaminants detection. In: Méndez-Villas A. *Current microscopy contributions to advances in science and technology*. Badajoz: Formatex Research Center; 2012. P. 1337–48.
82. Deda DK, Pereira BBS, Bueno CC, Silva AN da, Ribeiro GA, Amarante AM, et al. The use of functionalized AFM tips as molecular sensors in the detection of pesticides. *Mater Res.* 2013 Jun;16(3):683–7.
83. Zanette SI. *Introdução à microscopia de força atômica*. São Paulo: Livraria Da Física; 2010. 112 p.

-
84. Florin EL, Moy VT, Gaub HE. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science*. 1994 Apr 15;264(5157):415–7.
 85. Leite FL, Ziemath EC, Oliveira Jr. ON, Herrmann PSP. Adhesion forces for mica and silicon oxide surfaces studied by atomic force spectroscopy (AFS). *Microsc Microanal*. 2005 Dec;11(Supplement S03):130–133.
 86. Werf KO van der, Putman CAJ, Grooth BG de, Greve J. Adhesion force imaging in air and liquid by adhesion mode atomic force microscopy. *Appl Phys Lett*. 1994 Aug 29;65(9):1195–7.
 87. Leite FL, Herrmann PSP. Application of atomic force spectroscopy (AFS) to studies of adhesion phenomena: a review. *J Adhes Sci Technol*. 2005 Jan 1;19(3–5):365–405.
 88. Smith DA, Connell SD, Robinson C, Kirkham J. Chemical force microscopy: applications in surface characterisation of natural hydroxyapatite. *Anal Chim Acta*. 2003 Mar 5;479(1):39–57.
 89. Sato F, Okui H, Akiba U, Suga K, Fujihira M. A study of topographic effects on chemical force microscopy using adhesive force mapping. *Ultramicroscopy*. 2003 Oct;97(1–4):303–14.
 90. Weetall HH. Covalent coupling methods for inorganic support materials. *Methods Enzymol*. 1976;44:134–48.
 91. Kuhn M, Janovjak H, Hubain M, Müller DJ. Automated alignment and pattern recognition of single-molecule force spectroscopy data. *J Microsc*. 2005 May;218(Pt 2):125–32.
 92. Biggs S, Mulvaney P. Measurement of the forces between gold surfaces in water by atomic force microscopy. *J Am Chem Soc*. 1994;8501–5.
 93. Sinniah SK, Steel AB, Miller CJ, Reutt-Robey JE. Solvent exclusion and chemical contrast in scanning force microscopy. *J Am Chem Soc*. 1996 Jan 1;118(37):8925–31.
 94. Amarante AM, Oliveira GS, Bueno CC, Cunha RA, Ierich JCM, Freitas LCG, et al. Modeling the coverage of an AFM tip by enzymes and its application in nanobiosensors. *J Mol Graph Model*. 2014 Sep;53:100–4.
 95. Moraes AS, Moreau ALD, Hausen M, Rossi IT, Higa AM, Peroni LA, et al. Atrazine detection in liquid using a nanoimmunosensor based on chemically modified atomic force microscopy tips. *Sens Lett*. 2016 May 1;14(5):508–14.
 96. Berquand A, Xia N, Castner DG, Clare BH, Abbott NL, Dupres V, et al. Antigen binding forces of single antilysozyme Fv fragments explored by atomic force microscopy. *Langmuir ACS J Surf Colloids*. 2005 Jun 7;21(12):5517–23.
 97. Ebner A, Hinterdorfer P, Gruber HJ. Comparison of different aminofunctionalization strategies for attachment of single antibodies to AFM cantilevers. *Ultramicroscopy*. 2007 Oct;107(10–11):922–7.
 98. Sehgal D, Vijay IK. A method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation. *Anal Biochem*. 1994 Apr 1;218(1):87–91.

-
99. Lu B, Smyth MR, O’Kennedy R. Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors. *Analyst*. 1996 Mar;121(3):29R-32R.
 100. 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.
 101. Nilsson B, Moks T, Jansson B, Abrahmsén L, Elmblad A, Holmgren E, et al. A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A. *Protein Eng*. 1987 Jan 2;1(2):107–13.
 102. Babacan S, Pivarnik P, Letcher S, Rand AG. Evaluation of antibody immobilization methods for piezoelectric biosensor application. *Biosens Bioelectron*. 2000;15(11–12):615–21.
 103. Coen MC, Lehmann R, Gröning P, Biemann M, Galli C, Schlapbach L. Adsorption and bioactivity of protein A on silicon surfaces studied by AFM and XPS. *J Colloid Interface Sci*. 2001 Jan 15;233(2):180–9.
 104. Kausaite-Minkstiniene A, Ramanaviciene A, Kirlyte J, Ramanavicius A. Comparative study of random and oriented antibody immobilization techniques on the binding capacity of immunosensor. *Anal Chem*. 2010 Aug 1;82(15):6401–8.
 105. Forsgren A. Significance of Protein A production by staphylococci. *Infect Immun*. 1970 Nov;2(5):672–3.
 106. O’Seaghdha M, van Schooten CJ, Kerrigan SW, Emsley J, Silverman GJ, Cox D, et al. Staphylococcus aureus protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions. *FEBS J*. 2006 Nov;273(21):4831–41.
 107. Moks T, Abrahmsén L, Nilsson B, Hellman U, Sjöquist J, Uhlén M. Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. *Eur J Biochem FEBS*. 1986 May 2;156(3):637–43.
 108. Uhlén M, Guss B, Nilsson B, Gatenbeck S, Philipson L, Lindberg M. Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. *J Biol Chem*. 1984 Feb 10;259(3):1695–702.
 109. Sjö Dahl J. Structural studies on the four repetitive Fc-binding regions in protein A from Staphylococcus aureus. *Eur J Biochem FEBS*. 1977 Sep;78(2):471–90.
 110. Deis LN, Wu Q, Wang Y, Qi Y, Daniels KG, Zhou P, et al. Suppression of conformational heterogeneity at a protein-protein interface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jul 21;112(29):9028–33.
 111. Jansson B, Uhlén M, Nygren P-Å. All individual domains of staphylococcal protein A show Fab binding. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1998 Jan 1;20(1):69–78.
 112. Lund LN, Christensen T, Toone E, Houen G, Staby A, St Hilaire PM. Exploring variation in binding of Protein A and Protein G to immunoglobulin type G by isothermal titration calorimetry. *J Mol Recognit JMR*. 2011 Dec;24(6):945–52.

-
113. Scientific TF. Protein A [citado em 2015 Out 5]. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/21184>
114. Hoh JH, Cleveland JP, Prater CB, Revel JP, Hansma PK. Quantized adhesion detected with the atomic force microscope. *J Am Chem Soc.* 1992 Jun 1;114(12):4917–8.
115. Müller DJ, Helenius J, Alsteens D, Dufrêne YF. Force probing surfaces of living cells to molecular resolution. *Nat Chem Biol.* 2009 Jun;5(6):383–90.
116. Willemsen OH, Snel MM, van der Werf KO, de Grooth BG, Greve J, Hinterdorfer P, et al. Simultaneous height and adhesion imaging of antibody-antigen interactions by atomic force microscopy. *Biophys J.* 1998 Nov;75(5):2220–8.
117. Wang Q, Liu L, Yang X, Wang K, Chen N, Zhou C, et al. Evaluation of medicine effects on the interaction of myoglobin and its aptamer or antibody using atomic force microscopy. *Anal Chem.* 2015 Feb 17;87(4):2242–8.
118. Voss A, Dietz C, Stocker A, Stark RW. Quantitative measurement of the mechanical properties of human antibodies with sub-10-nm resolution in a liquid environment. *Nano Res.* 2015 Jun 1;8(6):1987–96.
119. 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 Oxf Engl* 1993. 2007;38(5):446–61.
120. 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 Jun 1;36(24):7457–63.
121. Butt H-J. Measuring electrostatic, van der Waals, and hydration forces in electrolyte solutions with an atomic force microscope. *Biophys J.* 1991 Dec 1;60(6):1438–44.
122. Grandbois M, Beyer M, Rief M, Clausen-Schaumann H, Gaub HE. How strong is a covalent bond? *Science.* 1999 Mar 12;283(5408):1727–30.
123. Alsteens D, Müller DJ, Dufrêne YF. Multiparametric atomic force microscopy imaging of biomolecular and cellular systems. *Acc Chem Res.* 2017 Apr 18;50(4):924–31.
124. Zlatanova J, Lindsay SM, Leuba SH. Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope. *Prog Biophys Mol Biol.* 2000 Jul;74(1–2):37–61.
125. Cappella B, Dietler G. Force-distance curves by atomic force microscopy. *Surf Sci Rep.* 1999 Jan 1;34(1):1–104.
126. Butt H-J, Cappella B, Kappl M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surf Sci Rep.* 2005 Oct;59(1–6):1–152.
127. Dammer U, Popescu O, Wagner P, Anselmetti D, Guntherodt HJ, Misevic GN. Binding strength between cell adhesion proteoglycans measured by atomic force microscopy. *Science.* 1995 Feb 24;267(5201):1173–5.

128. Li M, Dang D, Liu L, Xi N, Wang Y. Imaging and force recognition of single molecular behaviors using atomic force microscopy. *Sensors*. 2017 Jan 22;17(1).
129. Harada Y, Kuroda M, Ishida A. Specific and quantized antigen–antibody interaction measured by atomic force microscopy. *Langmuir*. 2000 Jan 1;16(2):708–15.
130. Ott W, Jobst MA, Schoeler C, Gaub HE, Nash MA. Single-molecule force spectroscopy on polypeptides and receptor–ligand complexes: the current toolbox. *J Struct Biol*. 2017 Jan;197(1):3–12.
131. Puchner EM, Gaub HE. Force and function: probing proteins with AFM-based force spectroscopy. *Curr Opin Struct Biol*. 2009 Oct;19(5):605–14.
132. Polyakov P, Soussen C, Duan J, Duval JFL, Brie D, Francius G. Automated force volume image processing for biological samples. *PLOS ONE*. 2011 Apr 29;6(4):e18887.
133. Heinz WF, A-Hassan E, Hoh JH. Applications of force volume imaging with atomic force microscopes. AN20 Veeco Instrum Inc. 2004;A1.
134. Medalsy I, Hensen U, Muller DJ. Imaging and quantifying chemical and physical properties of native proteins at molecular resolution by force-volume AFM. *Angew Chem Int Ed*. 2011 Dec 9;50(50):12103–8.
135. Heinz WF, Hoh JH. Relative surface charge density mapping with the atomic force microscope. *Biophys J*. 1999 Jan 1;76(1):528–38.
136. Lower BH, Yongsunthon R, Shi L, Wildling L, Gruber HJ, Wigginton NS, et al. Antibody recognition force microscopy shows that outer membrane cytochromes OmcA and MtrC are expressed on the exterior surface of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Jan 5;75(9):2931–5.
137. Kretschmann E. Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen. *Z Für Phys Hadrons Nucl*. 1971 Aug 1;241(4):313–24.
138. Hull JR, Shannon JJ, Tamura GS, Castner DG. Atomic force microscopy and surface plasmon resonance investigation of fibronectin interactions with group B streptococci. *Biointerphases*. 2007 Jun;2(2):64–72.
139. Säfsen P, Klakamp SL, Drake AW, Karlsson R, Myska DG. Screening antibody-antigen interactions in parallel using Biacore A100. *Anal Biochem*. 2006 Jun 15;353(2):181–90.
140. Malmqvist M. BIACORE: an affinity biosensor system for characterization of biomolecular interactions. *Biochem Soc Trans*. 1999 Feb;27(2):335–40.
141. Medina MB, Houten LV, Cooke PH, Tu SI. Real-time analysis of antibody binding interactions with immobilized *E. coli* O157:H7 cells using the Biacore. *Biotechnol Tech*. 1997 Mar 1;11(3):173–6.
142. Nylander C, Liedberg B, Lind T. Gas detection by means of surface plasmon resonance. *Sens Actuators*. 1982 Jan;3:79–88.

-
143. Liedberg B, Nylander C, Lundström I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sens Actuators*. 1983 Jan 1;4:299–304.
 144. Liedberg B, Nylander C, Lundström I. Biosensing with surface plasmon resonance--how it all started. *Biosens Bioelectron*. 1995;10(8):i–ix.
 145. Dutra RF, Mendes RK, Lins da Silva V, Kubota LT. Surface plasmon resonance immunosensor for human cardiac troponin T based on self-assembled monolayer. *J Pharm Biomed Anal*. 2007 Apr 11;43(5):1744–50.
 146. Dazzi A, Prater CB, Hu Q, Chase DB, Rabolt JF, Marcott C. AFM–IR: combining atomic force microscopy and infrared spectroscopy for nanoscale chemical characterization. *Appl Spectrosc*. 2012 Dec 1;66(12):1365–84.
 147. Dazzi A, Prater CB. AFM-IR: Technology and applications in nanoscale infrared spectroscopy and chemical imaging. *Chem Rev*. 2017 Apr 12;117(7):5146–73.
 148. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011 Feb;69(2):292–302.
 149. Etchegaray A, Bueno C de C, Teschke O. Identification of microcistin LR at the molecular level using atomic force microscopy. *Quím Nova*. 2010;33(9):1843–8.
 150. Hinterdorfer P, Dufrêne YF. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nat Methods*. 2006 May;3(5):347–55.
 151. Yang Z, Galloway JA, Yu H. protein interactions with poly(ethylene glycol) self-assembled monolayers on glass substrates: diffusion and adsorption. *Langmuir*. 1999 Nov 1;15(24):8405–11.
 152. Haselgruebler T, Amerstorfer A, Schindler H, Gruber HJ. Synthesis and applications of a new poly(ethylene glycol) derivative for the crosslinking of amines with thiols. *Bioconjug Chem*. 1995 May 1;6(3):242–8.
 153. Florkowski CM. Sensitivity, specificity, receiver-operating characteristic (ROC) curves and likelihood ratios: communicating the performance of diagnostic tests. *Clin Biochem Rev*. 2008 Aug;29(Suppl 1):S83–7.
 154. Fan J, Upadhye S, Worster A. Understanding receiver operating characteristic (ROC) curves. *Can J Emerg Med*. 2006 Jan;8(1):19–20.
 155. Kumar R, Indrayan A. Receiver operating characteristic (ROC) curve for medical researchers. *Indian Pediatr*. 2011 Apr 1;48(4):277–87.
 156. Hajian-Tilaki K. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for medical diagnostic test evaluation. *Casp J Intern Med*. 2013;4(2):627–35.
 157. Goodman SN. Toward evidence-based medical statistics. 1: the *p* value fallacy. *Ann Intern Med*. 1999;130:995–1004.

158. Prel J-B, Hommel G, Röhrig B, Blettner M. Confidence interval or *p*-value? *Dtsch Arztebl Int.* 2009;106(19):335-39.
159. Horcas I, Fernández R, Gómez-Rodríguez JM, Colchero J, Gómez-Herrero J, Baro AM. WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev Sci Instrum.* 2007 Jan 1;78(1):013705.
160. Wang S, Esfahani M, Gurkan UA, Inci F, Kuritzkes DR, Demirci U. Efficient on-chip isolation of HIV subtypes. *Lab Chip.* 2012 Apr 21;12(8):1508–15.
161. Bhushan B, Tokachichu DR, Keener MT, Lee SC. Morphology and adhesion of biomolecules on silicon-based surfaces. *Acta Biomater.* 2005 May 1;1(3):327–41.
162. Kim KS, Lee H-S, Yang J-A, Jo M-H, Hahn SK. The fabrication, characterization and application of aptamer-functionalized Si-nanowire FET biosensors. *Nanotechnology.* 2009 May;20(23):235501.
163. Maeda H, Ozaki Y, Tanaka M, Hayashi N, Kojima T. Near infrared spectroscopy and chemometrics studies of temperature-dependent spectral variations of water: relationship between spectral changes and hydrogen bonds. *J Infrared Spectrosc.* 1995 Oct 1;3(4):191–201.
164. Bakshi K, Liyanage MR, Volkin DB, Middaugh CR. Fourier transform infrared spectroscopy of peptides. In: Nixon A. *Therapeutic peptides: methods in molecular biology (methods and protocols)*. Totowa: Humana Press; 2014. p. 255–69.
165. Byler DM, Susi H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers.* 1986 Mar;25(3):469–87.
166. Paluszkiwicz C, Piergies N, Chaniecki P, Rękas M, Miszczyk J, Kwiatek WM. Differentiation of protein secondary structure in clear and opaque human lenses: AFM – IR studies. *J Pharm Biomed Anal.* 2017 May 30;139:125–32.
167. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg.* 2007 Sep 1;1767(9):1073–101.
168. Zhou C, Friedt J-M, Angelova A, Choi K-H, Laureyn W, Frederix F, et al. Human immunoglobulin adsorption investigated by means of quartz crystal microbalance dissipation, atomic force microscopy, surface acoustic wave, and surface plasmon resonance techniques. *Langmuir.* 2004 Jul 1;20(14):5870–8.
169. Haes AJ, Hall WP, Chang L, Klein WL, Van Duyne RP. A localized surface plasmon resonance biosensor: first steps toward an assay for Alzheimer's disease. *Nano Lett.* 2004 Jun 1;4(6):1029–34.
170. Green RJ, Davies J, Davies MC, Roberts CJ, Tendler SJB. Surface plasmon resonance for real time in situ analysis of protein adsorption to polymer surfaces. *Biomaterials.* 1997 Mar 1;18(5):405–13.
171. Erb E-M, Chen X, Allen S, Roberts CJ, Tendler SJB, Davies MC, et al. Characterization of the surfaces generated by liposome binding to the modified dextran matrix of a surface plasmon resonance sensor chip. *Anal Biochem.* 2000 Apr 10;280(1):29–35.

-
172. McGurk SL, Green RJ, Sanders GHW, Davies MC, Roberts CJ, Tendler SJB, et al. Molecular interactions of biomolecules with surface-engineered interfaces using atomic force microscopy and surface plasmon resonance. *Langmuir*. 1999 Jul 1;15(15):5136–40.
173. Wegner GJ, Wark AW, Lee HJ, Codner E, Saeki T, Fang S, et al. Real-time surface plasmon resonance imaging measurements for the multiplexed determination of protein adsorption/desorption kinetics and surface enzymatic reactions on peptide microarrays. *Anal Chem*. 2004 Oct 1;76(19):5677–84.
174. Nilebäck L, Hedin J, Widhe M, Floderus LS, Krona A, Bysell H, et al. Self-assembly of recombinant silk as a strategy for chemical-free formation of bioactive coatings: a real-time study. *Biomacromolecules*. 2017 Mar 13;18(3):846–54.
175. Janmanee R, Baba A, Phanichphant S, Sriwichai S, Shinbo K, Kato K, et al. In situ electrochemical-transmission surface plasmon resonance spectroscopy for poly(pyrrole-3-carboxylic acid) thin-film-based biosensor applications. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2012 Aug 22;4(8):4270–5.
176. Nanduri V, Bhunia AK, Tu S-I, Paoli GC, Brewster JD. SPR biosensor for the detection of *L. monocytogenes* using phage-displayed antibody. *Biosens Bioelectron*. 2007 Sep 30;23(2):248–52.
177. Toma M, Tawa K. Polydopamine Thin films as protein linker layer for sensitive detection of interleukin-6 by surface plasmon enhanced fluorescence spectroscopy. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016 Aug 31;8(34):22032–8.
178. Vergara D, Bianco M, Pagano R, Priore P, Lunetti P, Guerra F, et al. An SPR based immunoassay for the sensitive detection of the soluble epithelial marker E-cadherin. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 2018 Oct 1;14(7):1963–71.
179. Hoh JH, Cleveland JP, Prater CB, Revel JP, Hansma PK. Quantized adhesion detected with the atomic force microscope. *J Am Chem Soc*. 1992 Jun 1;114(12):4917–8.
180. Müller DJ, Helenius J, Alsteens D, Dufrêne YF. Force probing surfaces of living cells to molecular resolution. *Nat Chem Biol*. 2009 Jun;5(6):383–90.
181. Paulovich FV, Moraes ML, Maki RM, Ferreira M, Oliveira ON, de Oliveira MCF. Information visualization techniques for sensing and biosensing. *The Analyst*. 2011 Apr 7;136(7):1344–50.
182. Taubenberger A, Cisneros DA, Friedrichs J, Puech P-H, Muller DJ, Franz CM. Revealing Early Steps of $\alpha 2\beta 1$ Integrin-mediated Adhesion to Collagen Type I by Using Single-Cell Force Spectroscopy. *Mol Biol Cell*. 2007 May;18(5):1634–44.
183. Celik E, Moy VT. Nonspecific interactions in AFM force spectroscopy measurements. *J Mol Recognit*. 2012;25(1):53–6.
184. Zhang H, Williams PS, Zborowski M, Chalmers JJ. Binding affinities/avidities of antibody–antigen interactions: quantification and scale-up implications. *Biotechnol Bioeng*. 2006;95(5):812–29.

185. 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* 1993. 2007;38(5):446–61.
186. Reindl M, Jarius S, Rostasy K, Berger T. Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies: How clinically useful are they? *Curr Opin Neurol*. 2017 Jun;30(3):295.
187. Sato DK, Callegaro D, Lana-Peixoto MA, Waters PJ, Jorge FM de H, Takahashi T, et al. Distinction between MOG antibody-positive and AQP4 antibody-positive NMO spectrum disorders. *Neurology*. 2014 Feb 11;82(6):474–81.
188. Hyun J-W, Woodhall MR, Kim S-H, Jeong IH, Kong B, Kim G, et al. Longitudinal analysis of myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in CNS inflammatory diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017 Oct 1;88(10):811–7.
189. Nakashima I. Is MOG-IgG another biomarker for neuromyelitis optica? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017 Oct 1;88(10):807–807.
190. Weber MS, Derfuss T, Brück W. Anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated central nervous system demyelination: a novel disease entity? *JAMA Neurol*. 2018 Aug 1;75(8):909–10.
191. Vernino S. Unraveling the enigma of seronegative myasthenia gravis. *JAMA Neurol*. 2015 Jun 1;72(6):630–1.
192. Franciotta D, Gastaldi M, Sala A, Andreetta F, Rinaldi E, Ruggieri M, et al. Diagnostics of the neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD). *Neurol Sci*. 2017 Oct 1;38(2):231–6.
193. Waters PJ, Pittock SJ, Bennett JL, Jarius S, Weinshenker BG, Wingerchuk DM. Evaluation of aquaporin-4 antibody assays. *Clin Exp Neuroimmunol*. 2014 Oct;5(3):290–303.
194. Takahashi T, Fujihara K, Nakashima I, Misu T, Miyazawa I, Nakamura M, et al. Anti-aquaporin-4 antibody is involved in the pathogenesis of NMO: a study on antibody titre. *Brain*. 2007 May 1;130(5):1235–43.
195. Kessler RA, Mealy MA, Levy M. Treatment of Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder: Acute, Preventive, and Symptomatic. *Curr Treat Options Neurol*. 2016 Jan 1;18(1):2.
196. Izrailev S, Stepaniants S, Isralewitz B, Kosztin D, Lu H, Molnar F, et al. Steered Molecular Dynamics. In: Deuffhard P, Hermans J, Leimkuhler B, Mark AE, Reich S, Skeel RD. *Computational molecular dynamics: challenges, methods, ideas*. Heidelberg: Springer-Verlag; 1999. p. 39–65.
197. Ierich JCM, Brum DG, Moraes A de S, Higa AM, Garcia PS, Miyazaki CM, et al. Antibody-mediated biorecognition of myelin oligodendrocyte glycoprotein: computational evidence of demyelination-related epitopes. *Sci Rep*. 2019 Feb 14;9(1):2033.

-
198. Gu X, Zhou J, Zhou L, Xie S, Petti L, Wang S, et al. Specific binding of antigen-antibody in physiological environments: measurement, force characteristics and analysis. *Opt Tools Metrol Imaging Diagn*. 2018 May 1;104:252–8.
 199. Singer SJ, Eggman L, Campbell DH. Physical chemical studies of soluble antigen-antibody complexes. VI. The effect of pH on the reaction between ovalbumin and its rabbit antibodies. *J Am Chem Soc*. 1955 Sep 1;77(18):4855–7.
 200. Camilloni C, Bonetti D, Morrone A, Giri R, Dobson CM, Brunori M, et al. Towards a structural biology of the hydrophobic effect in protein folding. *Sci Rep*. 2016 Jul 27;6:28285.
 201. Lear S, Cobb SL. Pep-Calc.com: a set of web utilities for the calculation of peptide and peptoid properties and automatic mass spectral peak assignment. *J Comput Aided Mol Des*. 2016 Mar 1;30(3):271–7.
 202. Hoeben FJM, Jonkheijm P, Meijer EW, Schenning APHJ. About supramolecular assemblies of π -conjugated systems. *Chem Rev*. 2005 Apr 1;105(4):1491–546.
 203. Braden BC, Poljak RJ. Structural features of the reactions between antibodies and protein antigens. *FASEB J*. 1995 Jan 1;9(1):9–16.
 204. Guo S, Zhu X, Jańczewski D, Lee SSC, He T, Teo SLM, et al. Measuring protein isoelectric points by AFM-based force spectroscopy using trace amounts of sample. *Nat Nanotechnol*. 2016 Sep;11(9):817–23.
 205. Neurath Hans, Greenstein JP, Putnam FW, Erickson JA. The chemistry of protein denaturation. *Chem Rev*. 1944 Apr 1;34(2):157–265.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Experimentos complementares de AFS, variando o pH do meio durante as medidas

Forças químicas e eletrostáticas envolvidas nos sistemas específicos e não-específicos

Para a investigação de eventos moleculares nas medidas com o nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀, especialmente ao que se refere às baixas forças de adesão para as interações específicas (detecção do anti-AQP4 nas amostras anti-AQP4+) em comparação com as interações não-específicas (não-detecção do anti-AQP4 nas amostras anti-AQP4-), foram realizadas medidas adicionais em diferentes pHs por meio da AFS.

Materiais e métodos

A funcionalização dos substratos e pontas de AFM foi realizada como descrito na seção Materiais e métodos da tese. Para a realização de AFS em diferentes pHs, a ponta de AFM foi funcionalizada com peptídeo AQP4₆₁₋₇₀. Os substratos foram funcionalizados com amostra de IgGs purificadas do soro de pacientes de ENMO anti-AQP4+ e anti-AQP4-. As medidas foram realizadas em tampões fosfato com pHs 7,4; 2,0 e 11,0. Após as medidas nos pHs 2,0 e 11,0, as amostras foram novamente analisadas no pH 7,4 (como mostra a tabela A1).

Tabela A1 – Descrição dos sistemas analisados.

pH	Amostras	
2,0	Anti-AQP4+	Anti-AQP4-
7,4	Anti-AQP4+	Anti-AQP4-
11,0	Anti-AQP4+	Anti-AQP4-
7,4	Anti-AQP4+ (reanálise depois do pH 2,0)	Anti-AQP4- (reanálise depois do pH 11,0)

Os valores de ponto de corte da força de adesão foram calculados por meio da curva ROC. Os valores de p foram calculados com o teste U não-paramétrico de Mann-Whitney.

Resultados e discussão

Os experimentos em diferentes valores de pH resultaram em valores de força de adesão maiores ou menores para as interações não-específicas, comparadas às forças de adesão das interações específicas, dependendo das condições iônicas do meio.

Caso 1: as forças de adesão foram menores no sistema não-específico do que no sistema específico

No pH 7,4, a mediana das forças de adesão nos sistemas com anti-AQP4+ e anti-AQP4– foram 160,0 pN (IQR 116,6–223,5) e 926 pN (659–1180), respectivamente. No pH 2,0, as medianas das forças de adesão nos sistemas anti-AQP4+ e anti-AQP4– foram 47,0 pN (IQR 28,0–60,6) e 39,0 pN (17,9–57,0), respectivamente (Figura A1-A). No pH 2,0 o anticorpo está desnaturado¹⁹⁶ devido às quebras das ligações de hidrogênio¹⁹⁷, além do enovelamento e aglomeração que ocorre no peptídeo¹⁹⁸, uma vez que seu ponto isoelétrico é 3,93¹⁹⁹ (Figura A2). Assim, não ocorre a interação peptídeo-anticorpo, não sendo possível obter forças específicas, apenas forças menores, as quais resultaram das ligações de hidrogênios livres no sistema^{177,200} (Figura A2).

Caso 2: as forças de adesão são maiores no sistema não-específico do que no sistema específico

No pH 11,0, as medianas das forças de adesão nos sistemas anti-AQP4+ e anti-AQP4– foram 633,0 pN (559,5–692,0) e 898,0 pN (700,9–1071,0), respectivamente. Depois das medidas nos pHs 2,0 e 11,0, as amostras foram reanalisadas em pH 7,4 novamente, resultando em medianas das forças de adesão do sistema anti-AQP4+ de 840,0 pN (628,0–994,8) e 652,0 pN (518,7–955,0), respectivamente (Figura A1-A).

Os valores de pH 7,4 e 6,2 são ideais para as interações antígeno-anticorpo¹⁹⁶, então a ocorrência das interações específicas foram refletidas pelos valores intermediários de força de adesão, os quais são resultados das ligações de hidrogênio, eletrostáticas e de *van der Waals* intrínsecas do reconhecimento específico do antígeno pelo anticorpo²⁰¹ (Figura A1-A).

Quando as medidas de AFS foram realizadas com amostras que não continham o anticorpo específico, a interação antígeno-anticorpo não estava presente e outras forças prevaleceram, como ligações covalentes e interações eletrostáticas²⁰², principalmente, esta última pois em pH 7,4 e 11,0 o peptídeo AQP4₆₁₋₇₀ está negativamente carregado¹⁹⁹ e o anticorpo, positivamente carregado¹⁹⁶ (Figura A2). Além disso, em pH 7,4 (bem como em pH 6,2), as forças de adesão do sistema não-específico foram maiores do que no sistema específico (Figura A1-A), resultado das ligações covalentes das formações de amida²⁰² entre a amina I disponível do peptídeo e os grupos C-terminais do anticorpo (Figura A2). Em pH 11,0 não houveram interações antígeno-anticorpo (anticorpos estavam desnaturados)¹⁹⁶, e as forças de adesão maiores também foram resultado de ligações covalentes (Figura A1-A). Em pH 7,4, após as amostras terem sido analisadas nos pHs 2,0 e 11,0, ou seja, depois da desnaturação dos anticorpos, a perda da atividade biológica do peptídeo devido à hidrólise²⁰³ resultou em maiores forças (Figura A1-A) como consequência da formação de amida entre a amina I disponível do peptídeo e o grupo C-terminal do anticorpo (Figura A2). Além dos valores da força de adesão, as interações específicas e não-específicas podem ser vistas pelas curvas de força representativas de cada sistema, apresentadas pela Figura A1-B.

Figura A1 – Forças de adesão em diferentes pHs. (A) Os pontos de corte das forças de adesão (linhas tracejadas) calculadas pela curva ROC foram 84 pN (limite mínimo) e 339 pN (limite máximo). Em pH 7,4 as interações específicas foram distinguidas das interações não-específicas com $p < 0,001$. Em pH 2,0, as forças de adesão estão abaixo do limite mínimo, comparadas às forças específicas, diferentes entre si com $p < 0,05$. Em pH 11,0, as forças de adesão estão acima do limite máximo, comparadas com as interações específicas, com $p < 0,001$. Em pH 7,4, após a desnaturação do anticorpo nos pHs 2,0 e 11,0, as forças de adesão estão acima no limite máximo das interações específicas, distintas dessas com $p < 0,001$. (B) Em pH 7,4 o sistema anti-AQP4+ foi o único com formato de curvas de força de interações específicas. Para os demais sistemas, as curvas de força tiveram formatos típicos de interações fracas ou de interações fortes: em pH 2,0, as curvas de força foram típicas de interações fracas, mas quando reanalisadas em pH 7,4, podem ser observados formatos característicos de interações fortes.

Figura A2 – Comportamento das moléculas em diferentes pHs. Em pH 2,0, ocorre a desnaturação do anticorpo e mudanças estruturais devido à quebra nas ligações de hidrogênio. Além disso, os peptídeos se encontram agregados devido ao pH estar abaixo do seu ponto isoelétrico (que é 3,93). O pH ideal para interações antígeno-anticorpo é 7,4. No pH 11,0 não ocorre interação antígeno-anticorpo devido à desnaturação do anticorpo, então ligações covalentes prevalecem por meio da formação de amida.

Os experimentos mostraram que ocorreram mudanças estruturais nos anticorpos e nos peptídeos, gerando forças de adesão diferentes sob diferentes condições de pH, o que alterou a ocorrência das interações antígeno-anticorpo.

APÊNDICE B – Medianas das forças de adesão medidas pelo nanoimunossensor-AQP4₆₁₋₇₀ em amostras de IgGs purificadas de pacientes de ENMO anti-AQP4+, anti-AQP4-, EM, indivíduos saudáveis e anti-AQP4+ tituladas.

<i>Status sorológico do ENMO</i>	Indivíduos	Mediana das forças de adesão (pN) (IQR)
Anti-AQP4+	1	149,5 (94,0–239,0)
	2	83 (48–118)
	3	88 (55–160)
	4	60 (34–94)
	5	77 (57–107)
	6	58,5 (37,0–112,0)
	7	196,5 (111,0–309,0)
	8	171,5 (111,0–282,0)
Anti-AQP4–	9	511,5 (409,0–727,0)
	10	286 (221–422)
	11	1436 (491–2002)
	12	580,5 (439,0–1158,0)
	13	339 (243–533)
	14	1293 (755–1907)
	15	629,5 (389,0–1244,0)
	16	818,5 (488,0–1455,0)
EM	17	506,0 (205,5–1065,0)
	18	888 (728–990)
	19	795 (638–982)
	20	867 (738–1050)
Saudáveis	21	1181 (989–1305)
	22	672 (595–762)
	23	659 (498–835)
	24	939 (689–1065)
	25	927 (775–1059)
Anti-AQP4+ titulados	26	232 (151–348)
	27	134 (83–296)
<i>(Continua na próxima página)</i>		

<i>(Continuação da página anterior)</i>		
<i>Status sorológico do ENMO</i>	Indivíduos	Mediana das forças de adesão (pN) (IQR)
Anti-AQP4+ titulados	28	163,5 (112,0–282,0)
	29	76,0 (57,5–113,0)
	30	151,5 (90,0–223,0)
	31	96 (77–116)
	32	85 (40–177)
	33	65 (48–115)
	34	69,5 (51,5–122,5)

ANEXOS

ANEXO A – Termo de consentimento e livre esclarecimento (TCLE) do grupo portador.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR
CAMPUS SOROCABA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO
PORTADOR
(Resolução 466/2012 do CNS)

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa: Desenvolvimento de nanoimunossensor para estudo e detecção da Neuromielite Óptica

Pesquisador principal: Prof^o Dr. Fabio de Lima Leite (orientador)

Pesquisadores envolvidos: Prof^a Dra. Doralina Guimarães Brum Souza (co-orientadora) e Ariana de Souza Moraes (doutoranda)

Departamento/Instituto: Departamento de Física, Química e Matemática da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Sorocaba, SP.

Convidamos o sr.(a) a participar da pesquisa de “Desenvolvimento de nanoimunossensores para estudo e detecção da Neuromielite Óptica”. Nosso estudo tem o **objetivo** de desenvolver um sensor para detectar a Neuromielite Óptica e auxiliar no estudo desta doença. O sensor analisará amostra do sangue de participantes portadores da Neuromielite Óptica, no qual contém anticorpos específicos da doença e comparar com amostras de sangue de participantes não portadores desta doença, no qual não são encontrados o anticorpo específico. Vamos comparar esses dados e analisar se isso é o que realmente acontece e no que esse fato implica para os portadores da Neuromielite Óptica.

Para desenvolver esse sensor vamos coletar 10 mL de sangue de participantes pacientes maiores de 18 anos e legalmente capazes com diagnóstico de Neuromielite Óptica, que será o grupo experimental, atendidos no ambulatório de Neuroimunologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, supervisionados pelo Dr. Fernando Coronetti; essa coleta será realizada pela Prof^a Dra. Doralina Guimarães Brum Souza (neurologista). Para o grupo controle, também serão coletadas amostras de sangue de participantes pacientes maiores de 18 anos e legalmente capazes em investigação para Esclerose Múltipla ou participantes doadores de sangue, não portadores destas doenças, no hemocentro do **Hospital das Clínicas de Botucatu**.

Na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu, sob a responsabilidade da prof. Doralina G. Brum, as amostras de sangue serão armazenadas, em biorrepositório, ao longo da execução da pesquisa, ou seja, durante 4 anos, ao final do qual serão descartadas conforme normas vigentes dos órgãos técnicos competentes. Adicionalmente, as amostras serão submetidas a teste imunológico pela Dra. Doralina G. Brum para detecção de anticorpo anti-aquaporina 4.

Na Rheabiotech Desenvolvimento, Produção e Comercialização de Produtos de Biotecnologia Ltda (empresa localizada em Campinas, SP), será realizado o processo de purificação para obtenção de anticorpos das amostras pelo Dr. Luís Antonio Peroni, especialista na área de Imunologia.

No **Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP)** sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Teresa Machini serão produzidos peptídeos da proteína aquaporina 4, pois para realizar esse estudo é necessário utilizar a molécula que interage especificamente com o anticorpo presente no sangue, para isso pode ser feito um peptídeo que tem função parecida com a da proteína do organismo humano com a qual o anticorpo interage.

No **Laboratório Multidisciplinar** de Nanoneurobiofísica na **UFSCar de Sorocaba o sensor que será desenvolvido**. Por ser muito pequeno e por analisar moléculas igualmente pequenas pode ser chamado de nanométrico. Esse sensor medirá com o microscópio de força atômica o quão forte é a interação entre o anticorpo e o peptídeo. Essas análises serão feitas pela doutoranda Ariana de Souza Moraes, aluna do Instituto de Medicina Tropical da USP (IMTUSP) sob o Comitê de Ética em

Pesquisa da **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP)**, sob supervisão do Prof^o Dr. Fábio de Lima Leite.

O sr.(a), portador(a) de NMO foi selecionado ao acaso no ambulatório de Neuroimunologia do **Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu** para, se desejar, participar dessa pesquisa como voluntário.

Para completar a pesquisa iremos usar os resultados dos exames de sangue que normalmente já são colhidos para o seu tratamento. Esses exames foram indicados para o tratamento e não para a pesquisa. Não será solicitado nenhum exame a mais porque você entrou no estudo e não haverá compensação financeira pela sua participação nesse estudo.

A coleta de sangue será realizada em ambiente confortável e privativo, por profissional habilitado, em uma veia do braço usando luvas, máscara, agulha e seringa descartáveis, após serem tomados todos os cuidados de assepsia recomendados para este tipo de procedimento.

Ao colher o sangue você sentirá a dor da picada da agulha no braço. Algumas vezes pode ocorrer de escapar um pouco de sangue debaixo da pele e formar uma pequena mancha roxa (hematoma), que desaparece no máximo em sete dias. O sr.(a). poderá sentir tontura durante ou após o procedimento. Para minimizar esse acontecimento, o sr.(a) será orientado(a) a permanecer sentado(a) durante alguns minutos até que se sinta confortável para levantar.

Esta pesquisa não apresenta benefícios diretos aos voluntários; no entanto, os dados obtidos com esta pesquisa irão **contribuir com os métodos atuais de diagnóstico para a Neuromielite Óptica** ao utilizar uma quantidade ínfima de amostra e apresentar grande precisão e sensibilidade nas detecções. Adicionalmente, ao aprimorar o método de diagnóstico com nanoimunossensores abre-se um leque de aplicações para detecção de outras moléculas-chave de doenças desmielinizantes e autoimunes, contribuindo com o avanço da nanotecnologia aplicada ao sensoriamento, com o desenvolvimento de métodos diagnósticos precisos, além do diagnóstico diferencial entre essas doenças.

O sr.(a) terá a **disponibilidade de assistência no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu**, UNESP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

Todo o acompanhamento e assistência durante a pesquisa e após a pesquisa são de direito de todos que se voluntariarem, sendo possível contatar a **Profª. Dra. Doralina Guimarães Brum Souza** (Neurologista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Departamento de Neurologia, Psicologia e Psiquiatria, Campus Botucatu, Distrito de Rubião Júnior, 51030-480, Botucatu, SP, Brasil. Telefone: (14)3880-1235) em casos de decorrências médicas ou o **Profº Dr. Fabio de Lima Leite e Ariana de Souza Moraes** (Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Departamento de Física, Química e Matemática. Rodovia João Leme dos Santos (SP-264), Km 110, Itinga, Sorocaba, SP, 18052-780. Telefones: (15) 3229-8817 ou (15) 3229-8840) por eventuais dúvidas em decorrência da pesquisa, podendo contatar qualquer um dos três pesquisadores para ter acesso, em qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa.

O sr.(a) tem a **liberdade de decidir participar ou não** dessa pesquisa, além de ter a **liberdade de retirar seu consentimento de participação ou de guarda e utilização da amostra armazenada em biorrepósitório** a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo à continuidade de sua assistência. Garantimos o sigilo e a privacidade quanto às suas decisões e participação.

Uma via deste termo ficará com o sr.(a) e outra com a pesquisadora Ariana de Souza Moraes.

Garantimos que o sr.(a) **não terá gastos a mais** para participar da pesquisa nem danos referentes ao estudo. No entanto, caso o sr.(a) tenha gastos que tenham relação com a pesquisa ou se houver algum dano, **garantimos o ressarcimento integral e imediato por despesas** decorrentes da pesquisa e a indenização por eventuais danos decorrentes da pesquisa, de forma gratuita pela empresa patrocinadora Rheabiotec.

O soro obtido para esta pesquisa será armazenado de acordo com a resolução 441/2011.

Em caso de uso futuro das amostras de soro, como nova pesquisa, essa só será realizada com nova aprovação do sistema CEP-CONEP.

O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo **Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSCar** que funciona na Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos, localizada na Rodovia Washington Luiz, Km 235, Caixa Postal 676, CEP 13.565-905, São Carlos – SP, Brasil. Telefone: (16) 3351-8110. E-mail: cephumanos@ufscar.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com este Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

Em qualquer etapa do estudo, o sr.(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é o Prof^o Dr. Fabio de Lima Leite que pode ser encontrado no endereço: Rodovia João Leme dos Santos (SP-264), Km 110, Itinga, Sorocaba, SP, 18052-780. Telefones: (15) 3229-8817 ou (15) 3229-8840, e-mail: fabioleite@ufscar.br.

Declaro que fui suficientemente informado a respeito do estudo de “Desenvolvimento de nanoimunossensor para estudo e detecção da Neuromielite Óptica”.

Declaro também que discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável Prof^o Dr. Fabio de Lima Leite ou pessoas por ele delegadas, a Prof^a Dra. Doralina Guimarães Brum Souza e/ou a pesquisadora Ariana de Souza Moraes, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Nome do participante: _____

Assinatura do participante

Data / /

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador

Data / /

Anexo B – Termo de consentimento e livre esclarecimento (TCLE) do grupo controle.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR
CAMPUS SOROCABA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO
CONTROLE

(Resolução 466/2012 do CNS)

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa: Desenvolvimento de nanoimunossensor para estudo e detecção da Neuromielite Óptica

Pesquisador principal: Prof^o Dr. Fabio de Lima Leite (orientador)

Pesquisadores envolvidos: Prof^a Dra. Doralina Guimarães Brum Souza (co-orientadora) e Ariana de Souza Moraes (doutoranda)

Departamento/Instituto: Departamento de Física, Química e Matemática da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Sorocaba, SP.

Convidamos o sr.(a) a participar da pesquisa de “Desenvolvimento de nanoimunossensores para estudo e detecção da Neuromielite Óptica”. Nosso estudo tem o **objetivo** de desenvolver um sensor para detectar a Neuromielite Óptica e auxiliar no estudo desta doença. O sensor analisará amostra do sangue de participantes portadores da Neuromielite Óptica, no qual contém anticorpos específicos da doença e comparar com amostras de sangue de participantes não portadores desta doença, no qual não são encontrados o anticorpo específico. Vamos comparar esses dados e analisar se isso é o que realmente acontece e no que esse fato implica para os portadores da Neuromielite Óptica.

Para desenvolver esse sensor vamos coletar 10 mL de sangue de participantes pacientes maiores de 18 anos e legalmente capazes com diagnóstico de neuromielite óptica atendidos no ambulatório de Neuroimunologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, supervisionados pelo Dr. Fernando Coronetti. Essa coleta será realizada pela Prof^a Dra. Doralina Guimarães Brum Souza

(neurologista). Para o grupo controle, também serão coletadas amostras de sangue de participantes pacientes maiores de 18 anos e legalmente capazes em investigação para esclerose múltipla ou participantes doadores de sangue, não portadores destas doenças, no hemocentro do **Hospital das Clínicas de Botucatu**.

Na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu, sob a responsabilidade da prof. Doralina G. Brum, as amostras de sangue serão armazenadas, em biorrepositório, ao longo da execução da pesquisa, ou seja, durante 4 anos, ao final do qual serão descartadas conforme normas vigentes dos órgãos técnicos competentes. Adicionalmente, as amostras serão submetidas a teste imunológico pela Dra. Doralina G. Brum para detecção de anticorpo anti-aquaporina 4.

Na Rheabitech Desenvolvimento, Produção e Comercialização de Produtos de Biotecnologia Ltda (empresa localizada em Campinas, SP), será realizado o processo de purificação para obtenção de anticorpos das amostras pelo Dr. Luís Antonio Peroni, especialista na área de Imunologia.

No **Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP)** sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Teresa Machini serão produzidos peptídeos da proteína aquaporina 4, pois para realizar esse estudo é necessário utilizar a molécula que interage especificamente com o anticorpo presente no sangue, para isso pode ser feito um peptídeo que tem função parecida com a da proteína do organismo humano com a qual o anticorpo interage.

No **Laboratório Multidisciplinar** de Nanoneurobiofísica na **UFSCar de Sorocaba o sensor que será desenvolvido**. Por ser muito pequeno e por analisar moléculas igualmente pequenas pode ser chamado de nanométrico. Esse sensor medirá com o microscópio de força atômica o quão forte é a interação entre o anticorpo e o peptídeo. Essas análises serão feitas pela doutoranda Ariana de Souza Moraes, aluna do Instituto de Medicina Tropical da USP (IMTUSP) sob o Comitê de Ética em Pesquisa da **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP)**, sob supervisão do Profº Dr. Fábio de Lima Leite.

O sr.(a), que não é portador da NMO foi selecionado ao acaso no ambulatório de Neuroimunologia do **Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de**

Botucatu para, se desejar, participar dessa pesquisa como voluntário, para ajudar os portadores dessa doença.

Para completar a pesquisa iremos utilizar amostras de sangue que normalmente já são colhidos para o seu tratamento (se portador de EM) ou no ato da doação de sangue. Essas amostras foram colhidas para o tratamento (se portador de EM) ou para fins de doação de sangue e não para a pesquisa. Não será solicitado nenhum exame a mais porque você entrou no estudo e não haverá compensação financeira pela sua participação nesse estudo.

A coleta de sangue será realizada em ambiente confortável e privativo, por profissional habilitado, em uma veia do braço usando luvas, máscara, agulha e seringa descartáveis, após serem tomados todos os cuidados de assepsia recomendados para este tipo de procedimento.

Ao colher o sangue você sentirá a dor da picada da agulha no braço. Algumas vezes pode ocorrer de escapar um pouco de sangue debaixo da pele e formar uma pequena mancha roxa (hematoma), que desaparece no máximo em sete dias. O sr(a). poderá sentir tontura durante ou após o procedimento. Para minimizar esse acontecimento, o sr.(a) será orientado(a) a permanecer sentado(a) durante alguns minutos até que se sinta confortável para levantar.

Esta pesquisa não apresenta benefícios diretos aos voluntários; no entanto, os dados obtidos com esta pesquisa irão **contribuir com os métodos atuais de diagnóstico para a Neuromielite Óptica** ao utilizar uma quantidade ínfima de amostra e apresentar grande precisão e sensibilidade nas detecções. Adicionalmente, ao aprimorar o método de diagnóstico com nanoimunossensores abre-se um leque de aplicações para detecção de outras moléculas-chave de doenças desmielinizantes e autoimunes, contribuindo com o avanço da nanotecnologia aplicada ao sensoramento, com o desenvolvimento de métodos diagnósticos precisos, além do diagnóstico diferencial entre essas doenças.

O sr.(a) terá a **disponibilidade de assistência no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP**, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

Todo o acompanhamento e assistência durante a pesquisa e após a pesquisa são de direito de todos que se voluntariarem, sendo possível contatar a **Prof^a. Dra. Doralina Guimarães Brum Souza** (Neurologista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Departamento de Neurologia, Psicologia e Psiquiatria, Campus Botucatu, Distrito de Rubião Júnior, 51030-480, Botucatu, SP, Brasil. Telefone: (14)3880-1235) em casos de decorrências médicas ou o **Prof^o Dr. Fabio de Lima Leite e Ariana de Souza Moraes** (Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Departamento de Física, Química e Matemática. Rodovia João Leme dos Santos (SP-264), Km 110, Itinga, Sorocaba, SP, 18052-780. Telefones: (15) 3229-8817 ou (15) 3229-8840) por eventuais dúvidas em decorrência da pesquisa, podendo contatar qualquer um dos três pesquisadores para ter acesso, em qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa.

O sr.(a) tem a **liberdade de decidir participar ou não** dessa pesquisa, além de ter a **liberdade de retirar seu consentimento de participação ou de guarda e utilização da amostra armazenada em biorrepósitório** a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo à continuidade de sua assistência. Garantimos o sigilo e a privacidade quanto às suas decisões e participação.

Uma via deste termo ficará com o sr.(a) e outra com a pesquisadora Ariana de Souza Moraes.

Garantimos que o sr.(a) **não terá gastos a mais** para participar da pesquisa nem danos referentes ao estudo. No entanto, caso o sr.(a) tenha gastos que tenham relação com a pesquisa ou se houver algum dano, **garantimos o ressarcimento integral e imediato por despesas** decorrentes da pesquisa e a indenização por eventuais danos decorrentes da pesquisa, de forma gratuita pela empresa patrocinadora Rheabiotec.

O soro obtido para esta pesquisa será armazenado de acordo com a resolução 441/2011.

Em caso de uso futuro das amostras de soro, como nova pesquisa, essa só será realizada com nova aprovação do sistema CEP-CONEP.

O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo **Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSCar** que funciona na Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos, localizada na Rodovia Washington Luiz, Km 235, Caixa Postal 676, CEP 13.565-905, São Carlos – SP, Brasil. Telefone: (16) 3351-8110. E-mail: cephumanos@ufscar.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com este Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

Em qualquer etapa do estudo, o sr.(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é o Profº Dr. Fabio de Lima Leite que pode ser encontrado no endereço: Rodovia João Leme dos Santos (SP-264), Km 110, Itinga, Sorocaba, SP, 18052-780. Telefones: (15) 3229-8817 ou (15) 3229-8840, e-mail: fabioleite@ufscar.br.

Declaro que fui suficientemente informado a respeito do estudo de “Desenvolvimento de nanoimunossensor para estudo e detecção da Neuromielite Óptica”.

Declaro também que discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável Profº Dr. Fabio de Lima Leite ou pessoas por ele delegadas, a Profª Dra. Doralina Guimarães Brum Souza e/ou a pesquisadora Ariana de Souza Moraes, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Nome do participante: _____

Assinatura do participante

Data / /

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador

Data / /

Anexo C – Relação dos trabalhos publicados e atividades realizadas durante o período de Doutorado Direto

1 Artigos publicados desde o início das atividades

- 1.1 Oliveira, G. S.; Ierich, J. C. M.; **Moraes, A. S.**; Silva, G. B. R. F.; Liu, Y.; de S. Neto, L. R.; Faria, R. R.; Franca, E.; Freitas, L. G.; Briggs, J. M.; Leite, F. L. Immobilization and unbinding investigation of the antigen-antibody complex using theoretical and experimental techniques. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v. 86, p.219-227, 2019.
- 1.2 Ierich, J. C. M.; Brum, D. G.; **Moraes, A. S.**; Higa, A. M.; Garcia, P. S.; Miyazaki, C. M.; Ferreira, M.; Peroni, L. A.; Oliveira, G. S.; Franca, E. F.; Freitas, L. C. G.; Leite, F. L. Antibody-mediated biorecognition of myelin oligodendrocyte glycoprotein: computational evidence of demyelination-related epitopes. *Scientific Reports*, v. 9, p. 1-10, 2019.
- 1.3 Mendes, L. F.; **Moraes, A. S.**; Santos, J. S.; Leite, F. L.; Trivinho-Strixino, F. Investigation of roughness and specular quality of commercial aluminum (6061 alloy) for fabrication of nanoporous anodic alumina films. *Surface & Coatings Technology*, v. 310, p. 199-206, 2017.
- 1.4 Camargo-Mascarenhas, R. P.; Xavier, A. F.; Deda, D. K.; **Moraes, A. S.**; Rodrigues, L. F.; Ferreira, M.; Silva, G. B. R. F.; Leite, F. L. Development and characterization of liposomes containing glatiramer acetate for Multiple Sclerosis. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, v. 7, p. 303-313, 2016.
- 1.5 **Moraes, A. S.**; Moreau, A. L. D.; Hausen, M.; Rossi, I. T.; Higa, A. M.; Peroni, L. A.; Leite, F. L. Atrazine Detection in Liquid Using a Nanoimmunosensor Based on Chemically Modified Atomic Force Microscopy Tips. *Sensor Letters* (print), v. 14, p. 508-514, 2016.
- 1.6 **Moraes, A. S.**; Goes, T. S.; Hausen, M.; Morais, J. P. S.; Rosa, M. F.; Menezes, A. J.; Mattoso, L. H. C.; Leite, F. L. Caracterização morfológica de nanocristais de celulose por microscopia de força atômica. *Matéria* (UFRJ), v. 21, p. 532-540, 2016.
- 1.7 **Moraes, A. S.**; Brito, B.; Moreau, A. L. D.; Hausen, M.; Garcia, P. S.; Da Roz, A. L.; Leite, F. L. Evidências de detecção do herbicida atrazina por espectroscopia de força atômica: uma ferramenta promissora para o sensoriamento ambiental. *Acta Microscopica*, v. 24, p. 53-63, 2015.

- 1.8 Assis, P. M. S.; Prado-Junior, B. P. A.; Souza, A. S.; Bruder, R. C. S.; Souza, R. B.; Von Glehn, F.; Rocha, F. C. G.; Leite, F. L.; **Moraes, A. S.**; Barreira, A. A.; Donadi, E. A.; Brum, D. G. Plasmapheresis sessions do not alter sensitivity of standardized cell based immunofluorescence assay for anti-AQP4 antibody detection in neuromyelitis optica patients. *Multiple Sclerosis Journal*, v. 21, p. 638-639, 2015.

2 Resumos publicados em anais de congresso

Assis, A. S. J.; **Moraes, A. S.**; Leite, F. L. Estudo de interações antígeno-anticorpo por microscopia de força atômica para desenvolvimento de nanoimunossensores. In: XI Semana da Biologia, 2017, Sorocaba. Anais da Semana da Biologia UFSCar Sorocaba. Sorocaba: Universidade Federal de São Carlos - Campus Sorocaba, v. 1. p. 11-12, 2017.

3 Apresentações de trabalhos

- 3.1 Ierich, J. C. M.; Brum, D. G.; Moraes, A. S.; Higa, A. M.; Garcia, P. S.; Miyazaki, C. M.; Ferreira, M.; Peroni, L. A.; Oliveira, G. S.; Franca, E. F.; Freitas, L. C. G.; Leite, F. L. Computational insights on the biorecognition process of myelin oligodendrocyte glycoprotein by antibodies in demyelinating and neurodegenerative diseases. 2019.
- 3.2 Assis, A. S. J.; **Moraes, A. S.**; Leite, Fábio L. Estudo de interações antígeno-anticorpo por microscopia de força atômica para desenvolvimento de nanoimunossensores. 2017.
- 3.3 Rossi, I. T.; Hausen, M.; **Moraes, A. S.**; Leite, F. L. Functionalized atomic force microscopy characterization by confocal laser microscopy for use as nanobiosensors. 2015.
- 3.4 Mendes, Letícia F.; **Moraes, A. S.**; Santos, Janaina S.; Leite, F. L.; Trivinho-Strixino, Francisco. Study of eletropolishing parameters on aluminum samples and the influence on Porous Anodic Alumina (PAA) preparation. 2015.
- 3.5 Assis, P. M. S.; Prado-Junior, B. P. A.; Souza, A. S.; Bruder, R. C. S.; Souza, R. B.; Von Glehn, F.; Rocha, F. C. G.; Leite, F. L.; **Moraes, A. S.**; Barreira, A. A.; Donadi, E. A.; Brum, D. G. Plasmapheresis sessions do not alter sensitivity of standardized cell based immunofluorescence assay for anti-AQP4 antibody detection in neuromyelitis optica patients. 2015.

4 Artigos submetidos para publicação

- 4.1 **Moraes, A. S.**; Brum, D. G.; Ierich, J. C. M.; Higa, A. M.; Assis, A. S. J.; Miyazaki, C. M.; Shimizu, F. M.; Peroni, L. A.; Machini, M. T.; Barreira, A. A.; Ferreira, M.;

Oliveira Jr, O. N.; Leite, F. L. A highly specific and sensitive nanoimmunosensor for the diagnosis of neuromyelitis optica spectrum disorders. *Scientific Reports*.

- 4.2 Garcia, P. S.; Brum, D. G.; Oliveira Jr, O. N.; Higa, A. M.; Ierich, J. C. M.; **Moraes, A. S.**; Okuda-Shinagawa, N.; Peroni, L. A.; Gama, P. D.; Machini, M. T.; Leite, F. L. Nanoimmunosensor based on atomic force spectroscopy to detect anti-myelin basic protein related to early-stage multiple sclerosis. *Ultramicroscopy*.

5 Capítulo de livro submetido para publicação

Franca, E. F.; Oliveira, G. S.; Ierich, J. C. M.; Vig, A. A.; Brandini, C. P.; **Moraes, A. S.**; Leite, F. L. Desenvolvimento de nanodispositivos baseados em biomoléculas. In.: Luiz Carlos Gomide Freitas; Guedmiller Souza de Oliveira. (Org.). Aplicações de química teórica no estudo de materiais: métodos in silico para nanomateriais. 1ed. São Carlos: *EdUFSCar*, 2018, v. 1, p. 117-155.

6 Organização de eventos

- 6.1 Alves, T. C. L. S.; Rocha, D.; **Moraes, A. S.** I Fórum Setembro Azul: o que a Comunidade Surda espera da UFSCar Sorocaba? 2018.
- 6.2 Alves, T. C. L. S.; **Moraes, A. S.**; Silveira Jr, P. A. IV Encontro da UFSCar Campus Sorocaba com a Comunidade Surda: O olhar na Educação. 2017.
- 6.3 Alves, T. C. L. S.; **Moraes, A. S.**; Silveira Jr, P. A. III Encontro da UFSCar Campus Sorocaba com a Comunidade Surda: A importância da Associação dos Surdos. 2016.
- 6.4 Alves, T. C. L. S.; Vieira, C. R.; **Moraes, A. S.** II Encontro da UFSCar Campus Sorocaba com a Comunidade Surda: Direito à Educação. 2015.
- 6.5 **Moraes, A. S.**; Brandini, C. P.; Farias, A. S.; Leite, F. L. Curso de Imunologia para Futuros Cientistas: Princípios Básicos de Imunologia Celular e Molecular. 2015.

7 Coorientação de iniciação científica

- 7.1 Amanda Stefanie Jabur de Assis. Desenvolvimento de sensor de AFM utilizando antígeno e anticorpo envolvidos em doenças do espectro de neuromielite óptica. Início: 2018. CNPq.
- 7.2 Bruna dos Santos Zacarias. Nanoimunosensores para estudo de biomarcadores da esclerose múltipla. Início: 2018.

Anexo D – Certificado da aula ministrada na disciplina de Nanociência e Nanotecnologia do Programa de Pós-graduação em Ciências dos Materiais, 2017.

Professora responsável: Prof. Dra. Marystela Ferreira.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CCTS - CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS
PARA A SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS – PPGCM-So

Declaração

Declaro para os devidos fins que a **ARIANA DE SOUZA MORAES** ministrou a palestra intitulada **“ATOMIC FORCE MICROSCOPY (AFM): CONCEITOS BÁSICOS E APLICAÇÕES”**, na disciplina Nanociência e Nanotecnologia pelo Programa de Pós-graduação em Ciência dos Materiais – PPGCM-So, campus Sorocaba, na Universidade Federal de São Carlos, no dia 08/11/2017..

Sorocaba, 08 de novembro de 2017.

Marystela Ferreira

Profª. Drª. Marystela Ferreira
Docente da Disciplina

Anexo E – Certificado da aula ministrada na disciplina de Nanociência e Nanotecnologia do Programa de Pós-graduação em Ciências dos Materiais, 2018.

Professora responsável: Prof. Dra. Marystela Ferreira.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CCTS - CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS
PARA A SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS – PPGCM-So

Declaração

Declaro para os devidos fins que a **ARIANA DE SOUZA MORAES** ministrou a palestra intitulada **“ATOMIC FORCE MICROSCOPY (AFM): CONCEITOS BÁSICOS E APLICAÇÕES”**, na disciplina Nanociência e Nanotecnologia pelo Programa de Pós-graduação em Ciência dos Materiais – PPGCM-So, campus Sorocaba, na Universidade Federal de São Carlos, no dia 13/11/2018.

Sorocaba, 13 de novembro de 2018.

Profª. Drª. Marystela Ferreira
Docente da Disciplina

Anexo F – Certificado de participação do III Workshop de AFM do LNNano.

ARIANA DE SOUZA MORAES

participou do III AFM Workshop, realizado pelo Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), em 5 de dezembro de 2017.

Campinas, 5 de dezembro de 2017

Prof. Edson Roberto Leite

*Diretor Científico do Laboratório Nacional de Nanotecnologia
(LNNano/CNPEM)*

Prof. Adalberto Fazzio

*Diretor Científico do Laboratório Nacional de Nanotecnologia
(LNNano/CNPEM)*

Anexo G – Palestra ministrada pelo Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Junior,
intitulada “Escrita Científica em Inglês”.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CCTS - CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS
PARA A SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS – PPGCM-So

CERTIFICADO

Certificamos que **Ariana de Souza Moraes** participou da Palestra intitulada: **“Escrita Científica em Inglês”**, ministrada pelo Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Junior, da USP – Universidade de São Paulo, do IFSC – Instituto de Física de São Carlos, realizado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais – PPGCM, campus Sorocaba, na Universidade Federal de São Carlos, no dia 06/12/17.

Sorocaba, 06 de Dezembro de 2017.

Prof. Dr. Francisco Trivinho Strixino
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em “Ciência dos Materiais”

Anexo H – Certificado da equipe de organização do evento “Laboratório de portas abertas”, visita monitorada dos alunos do Programa Futuro Cientista (PFC) aos laboratórios da UFSCar, *campus* Sorocaba.

Certificado

Certificamos que **Ariana de Souza Moraes** participou da organização do evento “Laboratório de portas abertas”, visita monitorada dos alunos do Programa Futuro Cientista aos laboratórios da Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, em 15 de março de 2017, contabilizando 15 horas de atividade.

Sorocaba, 15 de Março de 2017.

Prof. Dr. Fábio de Lima Leite
Presidente do Programa Futuro Cientista

Anexo I – Certificado de conclusão do curso online “Docência no Ensino Superior:
uma primeira aproximação”.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CERTIFICADO DIGITAL

A Reitoria da Universidade de São Paulo
certifica que

Ariana de Souza Moraes

participou do Curso Docência no Ensino Superior:
Uma primeira Aproximação no período de 16/04/2018
a 17/06/2018, com carga horária de 8 horas

Assinatura manuscrita de Luiz Felipe Pinho Moreira.

Luiz Felipe Pinho Moreira

Coordenador - Grupo de Formação Didático Pedagógica

ANEXO J – Parecer consubstanciado do comitê de ética da UNESP, sob CAAE n°
51297215.3.3002.5411.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE NANOIMUNOSSENSORES PARA ESTUDO E DETECÇÃO DA NEUROMIELITE ÓPTICA

Pesquisador: Fabio de Lima Leite

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 51297215.3.3002.5411

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Carlos/UFSCar

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.852.185

Apresentação do Projeto:

Tratam os autos de Emenda enviada pelo Centro Coordenador do estudo, esclarecendo a alteração do cronograma de execução para início de atividades em 26/09/2016. Este CEP toma ciência.

Objetivo da Pesquisa:

Constante do Parecer 1.739.459

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Constante do Parecer 1.739.459

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Constante do Parecer 1.739.459

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Constante do Parecer 1.739.459. No presente caso apenas foi efetuada a alteração no cronograma de execução.

Recomendações:

Apresentar Relatório Final de Atividades

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugiro aprovação da mudança no cronograma de execução da presente pesquisa.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

CEP: 18.618-970

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 1.852.185

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP em reunião de 05/12/2016 aprova a presente emenda com objetivo de que seja alterado o cronograma de execução para início em 26/09/2016, sem necessidade de informar a CONEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_799912 E1.pdf	26/09/2016 15:27:50		Aceito
Cronograma	Emenda.pdf	26/09/2016 15:24:03	Fabio de Lima Leite	Aceito
Outros	Carta_resposta_pb.pdf	11/04/2016 14:55:12	Fabio de Lima Leite	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Ariana_PB_v_3.pdf	11/04/2016 14:52:02	Fabio de Lima Leite	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_PB_controle_v3.pdf	11/04/2016 14:51:15	Fabio de Lima Leite	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_PB_v3.pdf	11/04/2016 14:49:08	Fabio de Lima Leite	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	11/04/2016 14:42:24	Fabio de Lima Leite	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	carta_anuencia.pdf	05/02/2016 11:31:59	Fabio de Lima Leite	Aceito
Outros	documento_CEP_IMT.pdf	02/09/2015 11:04:09	Fabio de Lima Leite	Aceito
Outros	0451_0001.pdf	25/07/2015 18:13:34		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Chácara Butignolli, s/n
Bairro: Rubião Junior CEP: 18.618-970
UF: SP Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1608 E-mail: capellup@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 1.852.185

BOTUCATU, 06 de Dezembro de 2016

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignolli, s/n		CEP: 18.618-970
Bairro: Rubião Junior		
UF: SP	Município: BOTUCATU	
Telefone: (14)3880-1608	E-mail: capellup@fmb.unesp.br	

ANEXO K – Parecer consubstanciado do comitê de ética da FMUSP, sob CAAE nº
51297215.3.3001.0065.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE NANOIMUNOSSENSORES PARA ESTUDO E DETECÇÃO DA NEUROMIELITE ÓPTICA

Pesquisador: Fabio de Lima Leite

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 51297215.3.3001.0065

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Carlos/UFSCar

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.834.701

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de desenvolvimento de nonossensores elaborado por pesquisadores da Universidade Federal de São Carlos, com coparticipação de outras organizações, entre elas a FMUSP. O projeto está bem apresentado, o CEP da UFSCar sugeriu algumas correções importantes, que foram realizadas.

Objetivo da Pesquisa:

A pesquisa tem como objetivo desenvolver um nanoimunossensor, utilizando AFM, para detectar o biomarcador da NMO e auxiliar no estudo do mecanismo de ação da doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos e o benefício é alto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa importante na qual a participação da FMUSP é bem-vinda.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos estão anexados e o TCLE já foi muito bem revisto pelo CEP da UFSCar e devidamente corrigido e adaptado pela equipe de desenvolvimento do projeto.

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 1.834.701

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto muito bom. Sugiro que a participação da FMUSP seja aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_799912 E1.pdf	26/09/2016 15:27:50		Aceito
Cronograma	Emenda.pdf	26/09/2016 15:24:03	Fabio de Lima Leite	Aceito
Outros	Carta_resposta_pb.pdf	11/04/2016 14:55:12	Fabio de Lima Leite	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Ariana_PB_v_3.pdf	11/04/2016 14:52:02	Fabio de Lima Leite	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_PB_controle_v3.pdf	11/04/2016 14:51:15	Fabio de Lima Leite	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_PB_v3.pdf	11/04/2016 14:49:08	Fabio de Lima Leite	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	11/04/2016 14:42:24	Fabio de Lima Leite	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	carta_anuencia.pdf	05/02/2016 11:31:59	Fabio de Lima Leite	Aceito
Outros	documento_CEP_IMT.pdf	02/09/2015 11:04:09	Fabio de Lima Leite	Aceito
Outros	0451_0001.pdf	25/07/2015 18:13:34		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36**Bairro:** PACAEMBU**CEP:** 01.246-903**UF:** SP**Município:** SÃO PAULO**Telefone:** (11)3893-4401**E-mail:** cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 1.834.701

SAO PAULO, 24 de Novembro de 2016

Assinado por:
Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

ANEXO L – Parecer consubstanciado do comitê de ética da UFSCar, sob CAAE n°
51297215.3.0000.5504.UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS/UFSCAR **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA****Título da Pesquisa:** DESENVOLVIMENTO DE NANOIMUNOSSENSORES PARA ESTUDO E DETECÇÃO DA NEUROMIELITE ÓPTICA**Pesquisador:** Fabio de Lima Leite**Área Temática:****Versão:** 3**CAAE:** 51297215.3.0000.5504**Instituição Proponente:** Universidade Federal de São Carlos/UFSCar**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio**DADOS DO PARECER****Número do Parecer:** 1.526.432**Apresentação do Projeto:**

A Neuromielite Óptica (NMO) é uma doença desencadeada a partir do reconhecimento da Aquaporina 4 Homo sapiens (AQP4), proteína dos canais de água dos astrócitos, pelo anticorpo anti-Aquaporina 4 (anti-AQP4). A NMO, com seu quadro clínico de lesões no nervo óptico (neurite) e mielite transversa, exige estudos minuciosos pela gravidade da doença, uma vez que leva pacientes ao óbito e o errôneo diagnóstico desta doença pode levar ao diagnóstico equivocado de esclerose múltipla (EM). Desde 2004, vem-se utilizando o biomarcador anti-AQP4 para o diagnóstico diferencial entre NMO e EM, por intermédio da Imunofluorescência Indireta (IFI) e ELISA. Neste contexto, este projeto visa o desenvolvimento de nanoimunossensor com pontas de microscopia de força atômica (AFM) para o estudo e a detecção do biomarcador da NMO. O nanoimunossensor será construído a partir da modificação química de nanossuperfícies, ou seja, pontas de AFM e substrato (mica muscovita). Tais nanossuperfícies serão funcionalizadas com biomoléculas específicas: na ponta de AFM será imobilizado o peptídeo da AQP4 e na mica será imobilizado o anticorpo anti-AQP4, presente em amostras sorológicas de portadores de NMO. Os peptídeos de AQP4 e o anti-AQP4 serão submetidos à interação por meio da técnica de Espectroscopia de Força Atômica, a fim de medir as forças de interação intermoleculares. O caráter inovador deste

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235**Bairro:** JARDIM GUANABARA**CEP:** 13.565-905**UF:** SP**Município:** SÃO CARLOS**Telefone:** (16)3351-9683**E-mail:** cephumanos@ufscar.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS/UFSCAR

Continuação do Parecer: 1.526.432

projeto é o desenvolvimento de um novo método de detecção do biomarcador anti-AQP4, utilizando amostras sorológicas de portadores de NMO, de portadores de EM e de pacientes saudáveis, a fim de distinguir as amostras sorológicas pela presença do anti-AQP4, além de permitir um maior conhecimento com respeito ao mecanismo de ação desta doença.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral consiste em: Desenvolver um nanoimunossensor, utilizando microscopia de força atômica (AFM), para detectar o biomarcador da Neuronielite Óptica (NMO) e auxiliar no estudo do mecanismo de ação da doença. Os objetivos específicos são:

Objetivo Secundário:

1. Compreender, a partir de levantamento bibliográfico, o sistema de interação antígeno-anticorpo para o sistema peptídeo da AQP4 x anti-AQP4;
2. Comparar dados experimentais de funcionalização de superfícies com resultados teóricos;
3. Funcionalizar as nanossuperfícies com os peptídeos pré-selecionados da AQP4 (sequências de aminoácidos presentes nas alças localizadas no meio extracelular) e o biomarcador da NMO (anti-AQP4);
4. Realizar curvas de força pela AFS;
5. Avaliar e testar a afinidade dos peptídeos da AQP4 com o anti-AQP4;
6. Comparar os resultados obtidos em testes experimentais da interação AQP4 x anti-AQP4 com os resultados teóricos obtidos por simulações computacionais;
7. Detectar o biomarcador da NMO por meio do nanoimunossensor.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios foram bem ponderados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa de relevância científica e social. O pesquisador explicitou no projeto de pesquisa o modo de recrutamento dos participantes para assinatura dos TCLEs.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os TCLEs foram revistos, porém somente no TCLE do grupo portador não foram inseridos os dados sobre a quantidade do material biológico humano que será coletado e o seu tempo de armazenamento, de acordo com RESOLUÇÃO CNS N° 441, DE 12 DE MAIO DE 2011. O TCLE do grupo experimental está adequado, inclusive apontando a quantidade do material biológico humano que será coletado e o seu tempo de armazenamento.

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235**Bairro:** JARDIM GUANABARA**CEP:** 13.565-905**UF:** SP**Município:** SÃO CARLOS**Telefone:** (16)3351-9683**E-mail:** cephumanos@ufscar.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS/UFSCAR

Continuação do Parecer: 1.526.432

Os outros documentos estão de acordo com a Resolução 466/2012.

Recomendações:

Rever o TCLE do grupo portador, inserindo a quantidade do material biológico humano que será coletado e o seu tempo de armazenamento, de acordo com RESOLUÇÃO CNS N° 441, DE 12 DE MAIO DE 2011, conforme o TCLE do grupo experimental.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Rever o TCLE do grupo portador.

Considerações Finais a critério do CEP:**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_503418.pdf	11/04/2016 14:56:36		Aceito
Outros	Carta_resposta_pb.pdf	11/04/2016 14:55:12	Fabio de Lima Leite	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Ariana_PB_v_3.pdf	11/04/2016 14:52:02	Fabio de Lima Leite	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_PB_controle_v3.pdf	11/04/2016 14:51:15	Fabio de Lima Leite	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_PB_v3.pdf	11/04/2016 14:49:08	Fabio de Lima Leite	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	11/04/2016 14:42:24	Fabio de Lima Leite	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	carta_anuencia.pdf	05/02/2016 11:31:59	Fabio de Lima Leite	Aceito
Outros	documento_CEP_IMT.pdf	02/09/2015 11:04:09	Fabio de Lima Leite	Aceito
Outros	0451_0001.pdf	25/07/2015 18:13:34		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

CEP: 13.565-905

UF: SP

Município: SÃO CARLOS

Telefone: (16)3351-9683

E-mail: cephumanos@ufscar.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS/UFSCAR

Continuação do Parecer: 1.526.432

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO CARLOS, 03 de Maio de 2016

Assinado por:
Ricardo Carneiro Borra
(Coordenador)

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

UF: SP

Município: SAO CARLOS

CEP: 13.565-905

Telefone: (16)3351-9683

E-mail: cephumanos@ufscar.br

ANEXO M – Aprovação de emenda de correção de pendência solicitada pelo comitê de ética da UFSCar (CAAE nº 51297215.3.0000.5504).

UFSCAR - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SÃO CARLOS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE NANOIMUNOSENSORES PARA ESTUDO E DETECÇÃO DA NEUROMIELITE ÓPTICA

Pesquisador: Fabio de Lima Leite

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 51297215.3.0000.5504

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Carlos/UFSCar

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.790.215

Apresentação do Projeto:

Solicitação de Emenda 1 no projeto, relacionada à alteração do cronograma do documento de informações básicas do projeto na plataforma Brasil, sendo o início das atividades de pesquisa de agosto de 2016 para 26/09/2016, conforme solicitação de outros CEPs dos Centros envolvidos.

Objetivo da Pesquisa:

mantido

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

mantido

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Alteração do cronograma de início da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Encaminhada declaração de alteração do cronograma de início da pesquisa assinada pela pesquisadora Ariana de Souza Moraes, Doutoranda no Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

Recomendações:

Nada a acrescentar

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

UF: SP

Município: SAO CARLOS

CEP: 13.565-905

Telefone: (16)3351-9683

E-mail: cephumanos@ufscar.br

UFSCAR - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SÃO CARLOS

Continuação do Parecer: 1.790.215

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovada emenda 1.

Considerações Finais a critério do CEP:**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_799912 E1.pdf	26/09/2016 15:27:50		Aceito
Cronograma	Emenda.pdf	26/09/2016 15:24:03	Fabio de Lima Leite	Aceito
Outros	Carta_resposta_pb.pdf	11/04/2016 14:55:12	Fabio de Lima Leite	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Ariana_PB_v_3.pdf	11/04/2016 14:52:02	Fabio de Lima Leite	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_PB_controle_v3.pdf	11/04/2016 14:51:15	Fabio de Lima Leite	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_PB_v3.pdf	11/04/2016 14:49:08	Fabio de Lima Leite	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	11/04/2016 14:42:24	Fabio de Lima Leite	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	carta_anuencia.pdf	05/02/2016 11:31:59	Fabio de Lima Leite	Aceito
Outros	documento_CEP_IMT.pdf	02/09/2015 11:04:09	Fabio de Lima Leite	Aceito
Outros	0451_0001.pdf	25/07/2015 18:13:34		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235**Bairro:** JARDIM GUANABARA**CEP:** 13.565-905**UF:** SP**Município:** SAO CARLOS**Telefone:** (16)3351-9683**E-mail:** cephumanos@ufscar.br

UFSCAR - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SÃO CARLOS

Continuação do Parecer: 1.790.215

SAO CARLOS, 24 de Outubro de 2016

Assinado por:
Ricardo Carneiro Borra
(Coordenador)

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

CEP: 13.565-905

UF: SP

Município: SAO CARLOS

Telefone: (16)3351-9683

E-mail: cephumanos@ufscar.br

ANEXO N – Aprovação de relatório parcial enviado ao comitê de ética da UFSCar
(CAAE nº 51297215.3.0000.5504), via notificação 1.

UFSCAR - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SÃO CARLOS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE NANOIMUNOSSENSORES PARA ESTUDO E DETECÇÃO DA NEUROMIELITE ÓPTICA

Pesquisador: Fabio de Lima Leite

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 51297215.3.0000.5504

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Carlos/UFSCar

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa: Esta notificação diz respeito ao envio de relatório parcial semestral, relatando as

Data do Envio: 23/03/2017

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.110.233

Apresentação da Notificação:

Envio de relatório parcial

Objetivo da Notificação:

Apresentar o desenvolvimento das etapas propostas pelo projeto inicial enviado e aprovado, de acordo com o objetivos e metodologia inicial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Até o momento os riscos e benefícios estão sendo mantidos e respeitados.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

A pesquisadora aponta que em relação ao projeto proposto inicialmente e o que foi desenvolvido até agora, consistiu em estudo de levantamento bibliográfico, atualização quanto ao estado da

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

UF: SP

Município: SAO CARLOS

Telefone: (16)3351-9683

CEP: 13.565-905

E-mail: cephumanos@ufscar.br

UFSCAR - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SÃO CARLOS

Continuação do Parecer: 2.110.233

arte em métodos diagnósticos e em prognósticos da Neuromielite ótica (NMO) e Esclerose Múltipla (EM), desenvolvimento de sensores de microscopia de força atômica (AFM) e discussão com resultados teóricos computacionais; foi possível o cumprimento (AFM). A pesquisadora descreve como principais resultados parciais obtidos: a ampliação do conhecimento sobre os atuais métodos diagnósticos e o mecanismo humoral que desencadeia a NMO; obtenção de mais informações sobre o envolvimento do biomarcador da NMO, o anti-AQP4, e da proteína AQP4, enquanto biomoléculas envolvidas na imunopatologia, bem como sua estrutura e função no processo inflamatório e desmielinizante do SNC". Além disso: "alguns testes preliminares mostraram a necessidade de adequação de protocolos experimentais, uma vez que o desenvolvimento do nanoimunossensor prevê a utilização de biomoléculas com interações de alta sensibilidade e especificidade.

Os resultados de estudo teórico computacional e as perspectivas de desenvolvimento de protocolo para predição da estrutura do anti-AQP4, bem como SMD para medir a energia de interação antígeno-anticorpo, vem ao encontro da visualização de soluções para as limitações dos créditos obrigatórios em disciplinas para o curso de doutorado direto do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. A pesquisadora publicou três artigos e participou em eventos científicos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora acessou o próprio relatório parcial contendo os artigos advindos desta pesquisa; certificados de participação e organização de eventos científicos.

Recomendações:

Quando finalizar a pesquisa, providenciar o relatório final.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	relatorio_ano_1.pdf	23/03/2017 14:51:42	Fabio de Lima Leite	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235**Bairro:** JARDIM GUANABARA**CEP:** 13.565-905**UF:** SP**Município:** SAO CARLOS**Telefone:** (16)3351-9683**E-mail:** cephumanos@ufscar.br

UFSCAR - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SÃO CARLOS

Continuação do Parecer: 2.110.233

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO CARLOS, 09 de Junho de 2017

Assinado por:
Priscilla Hortense
(Coordenador)

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235
Bairro: JARDIM GUANABARA
UF: SP **Município:** SAO CARLOS
Telefone: (16)3351-9683 **CEP:** 13.565-905
E-mail: cephumanos@ufscar.br

ANEXO O – Aprovação de relatório parcial enviado ao comitê de ética da UFSCar
(CAAE nº 51297215.3.0000.5504), via notificação 2.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE NANOIMUNOSSENSORES PARA ESTUDO E DETECÇÃO DA NEUROMIELITE ÓPTICA

Pesquisador: Fabio de Lima Leite

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 51297215.3.0000.5504

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Carlos/UFSCar

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa: Notificação referente a envio de relatório parcial de projeto sob CAAE

Data do Envio: 06/11/2017

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.409.119

Apresentação da Notificação:

Este parecer está relacionado ao relatório parcial enviado pelo Pesquisador.

Objetivo da Notificação:

Relatar as etapas desenvolvidas até o momento conforme o projeto inicial enviado, de acordo com os objetivos e método proposto.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios estão sendo respeitados e mantidos.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

O pesquisador informa, conforme resumo do que foi realizado no período (26/09/16 a 10/17) a que se refere este relatório que:

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235
Bairro: JARDIM GUANABARA
UF: SP **Município:** SAO CARLOS
Telefone: (16)3351-9683 **CEP:** 13.565-905
E-mail: cephumanos@ufscar.br

Continuação do Parecer: 2.409.119

Foi realizado um minucioso estudo da literatura pertinente a este projeto, principalmente sobre Espectroscopia de Força Atômica, a fim de melhor esclarecer os gráficos de força de adesão (curvas de força) que podem ser obtidos durante as medidas no microscopia de força atômica (AFM). Observou-se que há dois fatores primordiais a serem levados em consideração: (a) o formato da curva de força e (b) o valor da força de adesão.

A partir destas observações, foi possível desenvolver um método eficiente e minucioso para desenvolvimento do nanoimunossensor e compreender as forças que atuam no sistema, distinguindo as forças interferentes das forças específicas, envolvidas no complexo antígeno-anticorpo. Os experimentos realizados evidenciaram que o nanoimunossensor que vem sendo desenvolvido neste trabalho pôde obter resultados semelhantes a testes imunológicos realizados previamente por meio do cell-based assay (CBA), com maior sensibilidade. Os resultados aqui descritos permitiram realizar uma triagem dos peptídeos mais adequados para as próximas etapas deste trabalho. Descreve também as próximas etapas para o desenvolvimento da pesquisa. Desta pesquisa derivou um artigo científico publicado em periódico; apresentação em evento científico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador anexou o relatório parcial contendo um artigo derivado da pesquisa; dois certificados, sendo um de participação e apresentação de trabalho em evento científico; outro sobre organização de evento científico.

Recomendações:

Encaminhar o relatório final quando finalizar a pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	2o_relatorio_parcial.pdf	06/11/2017 11:01:05	Fabio de Lima Leite	Postado

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235
Bairro: JARDIM GUANABARA CEP: 13.565-905
UF: SP Município: SAO CARLOS
Telefone: (16)3351-9683 E-mail: cephumanos@ufscar.br

Continuação do Parecer: 2.409.119

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO CARLOS, 01 de Dezembro de 2017

Assinado por:
Priscilla Hortense
(Coordenador)

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

CEP: 13.565-905

UF: SP

Município: SAO CARLOS

Telefone: (16)3351-9683

E-mail: cephumanos@ufscar.br

ANEXO P – Aprovação de relatório parcial enviado ao comitê de ética da UFSCar
(CAAE nº 51297215.3.0000.5504), via notificação 3.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE NANOIMUNOSSENSORES PARA ESTUDO E DETECÇÃO DA NEUROMIELITE ÓPTICA

Pesquisador: Fabio de Lima Leite

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 51297215.3.0000.5504

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Carlos/UFSCar

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa: Notificação referente a envio de relatório parcial de projeto sob CAAE

Data do Envio: 03/12/2018

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.194.278

Apresentação da Notificação:

Este parecer está relacionado ao relatório parcial enviado pelo pesquisador, referente ao período de 11/06/2017 a 10/06/2018.

Objetivo da Notificação:

Relatar as etapas desenvolvidas e os resultados obtidos até o momento conforme o projeto inicial enviado, de acordo com os objetivos e método proposto.

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235
Bairro: JARDIM GUANABARA
UF: SP **Município:** SAO CARLOS
Telefone: (16)3351-9683 **CEP:** 13.565-905
E-mail: cephumanos@ufscar.br

Continuação do Parecer: 3.194.278

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios estão sendo respeitados e mantidos. O pesquisador não salienta que houve danos ou evento adverso sério na pesquisa. Não houve pedido de indenização por danos causados por este estudo até no momento.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

O pesquisador informa, conforme resumo do que foi realizado no período de 11/06/2017 a 10/06/2018, a que se refere este relatório, que:

Foi realizado minucioso estudo na literatura sobre os avanços alcançados no diagnóstico da ENMO até agora, principalmente no que diz respeito às revisões do critério diagnóstico, sobre o qual se estabeleceu um consenso internacional do painel de diagnóstico de ENMO, em 2015. Isso é de extrema importância, uma vez que é necessário o correto diagnóstico para prosseguir com o tratamento de emergência em meio a um surto e tratamento de prevenção de novos surtos, para uma boa perspectiva no prognóstico. Com a escolha dos dois peptídeos da AQP4, que a etapa anterior deste projeto nos permitiu, sendo um reconhecido ser o mais reativo com anti-AQP4 e o outro menos reativo, para ser utilizado como referência, foi possível testar amostras de paciente de ENMO soronegativos para anti-AQP4, assim categorizados anteriormente por CBA. Estes experimentos permitiram comprovar que o nanoimunossensor foi desenvolvido com sucesso, distinguindo amostras de pacientes soropositivos daqueles soronegativos para anti-AQP4. Isto abriu a possibilidade de responder a um novo questionamento que surgiu, dentro dos objetivos deste projeto: a força de adesão obtida nas medidas das amostras anti-AQP4+ está relacionada à titulação de anti-AQP4 nas amostras? Essa pergunta foi respondida nesta etapa do trabalho e abre novas perspectivas para a aplicação do nanoimunossensor.

De acordo com o relatório, o número previsto era de 30 amostras de participantes no estudo e foram utilizadas amostras de soro de 25 pacientes, sendo 8 diagnosticados com ENMO, soropositivos para anti-AQP4 (anti-AQP4+), 8 com ENMO soronegativos para antiAQP4 (anti-AQP4-) e 9 ENMO também anti-AQP4+, contudo com titulação para este anticorpo. No processo da experimentação, os pesquisadores selecionaram mais 9 novos pacientes soropositivos para anti-AQP4.

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235
Bairro: JARDIM GUANABARA **CEP:** 13.565-905
UF: SP **Município:** SAO CARLOS
Telefone: (16)3351-9683 **E-mail:** cephumanos@ufscar.br

Continuação do Parecer: 3.194.278

A conclusão do estudo apontada pelo pesquisador, salientou que foi possível desenvolver um nanoimunossensor para detecção de anti-AQP4 em pacientes de ENMO, o que foi comprovado com (i) a distinção de pacientes soronegativos para anti-AQP4 dos pacientes soropositivos; (ii) a sensibilidade de 100% do nanoimunossensor para a detecção do anti-AQP4 após terem sido testado em pacientes de ENMO anti-AQP4-; (iii) a sensibilidade do nanoimunossensor que encontrou correlação entre o nível de titulação de anti-AQP4 e a força de adesão: quanto maior foi a titulação, maior foi também a força de adesão, com 91% de correlação, permitindo aplicar o nanoimunossensor para análise e distinção de pacientes em surtos e fora de surto, além de direcionar o tratamento.

O cronograma de execução do projeto tem correspondido ao enviado no projeto, apontando fases que foram realizadas antes do previsto.

A perspectiva deste trabalho para as etapas subsequentes consiste em testar a especificidade do nanoimunossensor no que diz respeito à detecção da doença.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador anexou o relatório parcial, bem como comprovantes de aprovação da qualificação de doutorado da pesquisadora responsável pelo estudo, ficha da aluna com a descrição de disciplinas cursadas pelo programa de pós-graduação e declarações de participação em eventos científicos e em palestras.

Recomendações:

Encaminhar o relatório final quando finalizar a pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Relatório aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	relatorio_ano3_v2_31_05_final.pdf	03/12/2018 13:50:34	Fabio de Lima Leite	Postado

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235
Bairro: JARDIM GUANABARA **CEP:** 13.565-905
UF: SP **Município:** SAO CARLOS
Telefone: (16)3351-9683 **E-mail:** cephumanos@ufscar.br

ANEXO Q – Manuscrito produzido com alguns resultados deste trabalho submetido
à *Scientific Reports*.

A highly specific and sensitive nanoimmunosensor for the diagnosis of neuromyelitis optica spectrum disorders

Ariana de Souza Moraes^{1,2,3}, Doralina Guimarães Brum^{3,4}, Jéssica Cristiane Magalhães Ierich^{1,2,3}, Akemi Martins Higa^{1,2,3}, Amanda Stefanie Jabur Assis^{2,3}, Celina Massumi Miyazaki², Flávio Makoto Shimizu⁵, Luís Antonio Peroni⁶, M. Teresa Machini⁷, Amilton Antunes Barreira^{8,*}, Marystela Ferreira², Osvaldo Novais Oliveira Jr⁵, and Fabio Lima Leite^{2,3*}

¹Institute of Tropical Medicine of São Paulo, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo 05403000, Brazil.

²Department of Physics, Chemistry and Mathematics, Federal University of São Carlos, Sorocaba, São Paulo 18052780, Brazil.

³Nanoneurobiophysics research group (GNN), Federal University of São Carlos, Sorocaba, São Paulo 18052780, Brazil.

⁴Department of Neurology, Psychology and Psychiatry, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo 18618687, Brazil.

⁵São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, São Carlos, São Paulo 13560970, Brazil.

⁶Rheabiotech Laboratory of Research and Development, Campinas, São Paulo 13084791, Brazil.

⁷Laboratory of Peptide Chemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo 05508000, Brazil.

⁸Department of Neurosciences and Behavioural Sciences, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

*fabioleite@ufscar.br.

*Deceased in November 14th, 2018.

ABSTRACT

A precise diagnosis for neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD) is crucial to improve patients' prognostic, which requires highly specific and sensitive tests. The cell-based assay with a sensitivity of 76% and specificity of 100% is the most recommended test to detect anti-aquaporin-4 antibodies (AQP4-Ab). Here, we tested four AQP4 external loop peptides (AQP4₆₁₋₇₀, AQP4₁₃₁₋₁₄₀, AQP4₁₄₁₋₁₅₀, and AQP4₂₀₁₋₂₁₀) with an atomic force microscopy nanoimmunosensor to develop a diagnostic assay. We obtained the highest reactivity with AQP4₆₁₋₇₀-nanoimmunosensor. This assay was effective in detecting AQP4-Ab in sera of NMOSD patients with 100% specificity (95% CI 63.06–100), determined by the cut-off adhesion force value of 241.3 pN. NMOSD patients were successfully discriminated from a set of healthy volunteers, patients with multiple sclerosis, and AQP4-Ab-negative patients. AQP4₆₁₋₇₀ sensitivity was 81.25% (95% CI 56.50–99.43), slightly higher than with the CBA method. The results with the AQP4₆₁₋₇₀-nanoimmunosensor indicate that the differences between NMOSD seropositive and seronegative phenotypes are related to disease-specific epitopes. The absence of AQP4-Ab in sera of NMOSD AQP4-Ab-negative patients may be interpreted by assuming the existence of another potential AQP4 peptide sequence or non-AQP4 antigens as the antibody target.

Introduction

Neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD) are inflammatory syndromes of the central nervous system (CNS), characterised by myelitis and optic neuritis events, which affect predominantly spinal cords and optic nerves¹. Neuromyelitis optica (NMO) was classified as a subtype of multiple sclerosis (MS) for decades^{2,3}, but it could be distinguished from MS after the NMO-IgG autoantibody was discovered in 2004, which was later identified as directed against the aquaporin-4 protein (AQP4)⁴. Lucchinetti et al.⁵ confirmed the pathological distinction among MS and NMO, and the role of autoantibodies against the aquaporin-4 protein (AQP4-Ab) in NMOSD immunopathology. The binding of AQP4-Ab to extracellular loops of AQP4 in astrocyte foot processes triggers a humoral immune response⁶, with the inflammation increasing the permeability of the blood-brain barrier and being likely to cause demyelination, axonal lesion, and necrosis⁷. The diagnosis of NMOSD has been based on clinical manifestations and magnetic resonance imaging at the optic nerve, spinal cord, brainstem, diencephalic and

cortical regions, in addition to detection of the AQP4 antibody (AQP4-Ab) as in the cell-based assay (CBA) recommended by the International Panel for NMO Diagnosis^{1,8}. CBA has an average sensitivity of 76% and specificity of 100%, thus failing to detect AQP4-Ab in 24% of the patients with NMOSD clinical manifestations⁸. This failure could be caused by: (i) undetectable serological levels of AQP4-Ab; (ii) reactivity with a different AQP4 sequence; or (iii) non-AQP4 antigen recognition^{9–12}. New approaches with more sensitive methods are therefore needed for NMOSD diagnosis, which may include nanoimmunosenors such as those developed for detecting a biomarker for demyelinating diseases^{13–17}. Indeed, sensors exploiting atomic force microscopy (AFM) may be sufficiently sensitive to diagnose patients for which AQP4-Ab is not detectable¹⁸. In this paper, we report an AFM nanoimmunosenor to detect interaction forces between samples of patients and AQP4 peptides, rather than with antigens as in the CBA method. Using peptides brings a series of advantages, mostly related to the simplicity in nanoimmunosenor assembly since it does not require protein expression on a cell surface. Also, the use of peptides allows for epitope mapping^{19,20}. These molecules including immunogenic AQP4 peptides located on the astrocyte surface, known as loop A, loop C, and loop E, in NMOSD-related nomenclature were explored to identify AQP4 epitopes^{20–22}. In order to verify which peptide would be specific for AQP4-Ab, we screened four AQP4 peptides from the extracellular loop (AQP4_{61–70}, AQP4_{131–140}, AQP4_{141–150}, and AQP4_{201–210}). These peptides were chosen because they are located in the extracellular regions of AQP4 protein⁶, where the interaction between AQP4-Ab and AQP4 protein is more likely to occur. The nanoimmunosenor assay permitted to identify AQP4_{61–70} as highly specific to distinguish NMOSD patients tested positive for AQP4-Ab from subjects, who were either seronegative for the AQP4-Ab or were not diagnosed with NMOSD.

Results

AFM screening of the peptide panel

The first objective was to verify with atomic force spectroscopy (AFS) measurements whether one (or more) of the peptides had a specific interaction with the serum samples of NMOSD AQP4-Ab-positive patients tested with CBA. By specific interaction we mean a kind of Ag-Ab interaction, in contrast to nonspecific interactions deriving from nonspecific bindings that may include weak forces (e.g. hydrogen bonds or van der Waals forces)²³ and covalent bonds in amide bond formation²⁴. In principle, two factors can be used to distinguish between the two types of interaction: the intensity of the adhesion force and the shape of the approach-retracting curves. The adhesion forces for eight NMOSD AQP4-Ab positive patients were mapped with Force Volume, i.e. images where each pixel contains an approach-retracting force curve (in a total of 256 force curves per image). Two distinct patterns of force curves were identified, which differ especially in the retracting curve, as shown schematically in Figure 1a: (i) retracting curves with only one slope are attributed to nonspecific interactions²⁵; (ii) retracting curves with multiple repeated slopes are typical of specific interactions such as the Ag-Ab complex formation owing to hydrogen bonds and van der Waals forces²⁶. Patterns of specific interaction were only observed when the AFM tip was coated with the AQP4_{61–70} peptide. This can be inferred from the interactive document mapping (IDMAP) plots²⁷ in Figure 1b, where a clear distinction between data for the retracting and approaching curves could be seen for AQP4_{61–70}, but not for the other peptides. In this analysis, each curve was transformed into a single data point, marked in blue for the approaching and red for the retracting curves. The reason for the difference is that the approaching and retracting curves almost coincide for the nonspecific interactions, apart from a small region where there is a nonzero attractive force, while the differences are larger for the force curves associated with specific interactions (see Figure 1a). Indeed, with specific interaction there is stretching or elongation of molecules throughout the retracting line, in contrast to the sharp detachment with nonspecific interactions. Another difference between the two types of force curves is in the intensity of the adhesion force. The Force Volume maps in Figure 1b indicate a smaller force for the specific interactions with AQP4_{61–70}. A more quantitative analysis was performed by selecting fifty spectra for each peptide, all of which had the overall behaviour for each class. This procedure of employing only part of the spectra was adopted because of the heterogeneity of the serum samples since not all the force curves presented the typical behaviour of their class. The boxplot graphs in Figure 1c show that the median adhesion forces are practically indistinguishable for the peptides AQP4_{131–140}, AQP4_{141–150} and AQP4_{201–210} peptides. In contrast, the median adhesion forces were significantly distinct for AQP4_{61–70} compared to the other peptides (AQP4_{131–140}, $p=0.0009$; AQP4_{141–150}, $p=0.02$, and AQP4_{201–210}, $p=0.007$). Note the smaller median adhesion force (85.50 pN; IQR 68.50–160.50) for the specific interaction with AQP4_{61–70}, to be contrasted with 416.25 pN (301.60–591.25), 470.00 pN (138.50–503.50), and 489.10 pN (198.70–604.90) for AQP4_{131–140}, AQP4_{141–150}, and AQP4_{201–210}, respectively. The larger forces for nonspecific interactions are mostly likely due to covalent bonds in amide formation²⁴, which are prevented by the Ag-Ab type of interaction due to bioaffinity of this complex (affinity and avidity)^{28,29} in the case of AQP4_{61–70}. Furthermore, the adhesion force values measured for AQP4_{61–70} are consistent with those reported between antigens and antibodies using the AFS technique¹⁸. Because a smaller adhesion force for a specific interaction seems counterintuitive, we performed a series of subsidiary AFS experiments at various pHs, whose results are given in the Supplementary Information. The analysis confirms the hypothesis above to explain the stronger adhesion forces for the peptides with nonspecific interactions.

Figure 1. AQP4 peptides panel reactivity towards AQP4-Ab. (a) Force Volume scheme, which contained a nonspecific retracting curve (red) from amide bond formation (nonspecific interaction) or specific retracting curve (green) from Ag-Ab interaction. The blue line is the approaching curve. (b) IDMAP from Force Volume maps illustrating the prevalence of specific curves only for AQP4₆₁₋₇₀. Images are 40x40 μm^2 . The dark colour of pixels indicates smaller adhesion forces, while larger forces are shown as bright pixels. (c) Boxplot count quantifying adhesion forces from interactions among AQP4 peptides and AQP4-Ab; no significant difference was found between: AQP4₁₃₁₋₁₄₀ and AQP4₁₄₁₋₁₅₀ ($p=0.68$); AQP4₁₃₁₋₁₄₀ and AQP4₂₀₁₋₂₁₀ ($p=0.79$); AQP4₁₄₁₋₁₅₀ and AQP4₂₀₁₋₂₁₀ ($p=0.57$). The interactions were significantly different among AQP4₆₁₋₇₀ and other peptides (AQP4₁₃₁₋₁₄₀, $p=0.0009$; AQP4₁₄₁₋₁₅₀, $p=0.02$; and AQP4₂₀₁₋₂₁₀, $p=0.007$). The shapes of the representative curves are shown on the upper part of the graph, illustrating the prevailing interactions in each system. The region corresponding to the adhesion force is circled. The scale bar for the force represents 200 pN.

Figure 2. Performance and accuracy of the AQP4₆₁₋₇₀-nanoimmunosenor. (a) IDMAP plot for the retracting curves showing distinct clusters for the specific and nonspecific interactions in NMOSD (AQP4-Ab-positive, in green) and negative control (healthy, in black)/MS (dark red)/AQP4-Ab-negative (brown). (b) Box plot quantifying median adhesion forces obtained with the AQP4₆₁₋₇₀-nanoimmunosenor for the samples of healthy control, MS, AQP4-Ab-negative, and AQP4-Ab-positive. The AQP4₆₁₋₇₀-nanoimmunosenor was effective in distinguishing AQP4-Ab-positive from other samples (healthy control, $p=0.004$; MS, $p=0.008$; AQP4-Ab-negative, $p=0.0009$). The shapes of the representative curves are shown on the upper part of the graph, illustrating the prevailing interactions in each system. The region corresponding to the adhesion force is circled. The scale bar for the force represents 200 pN. (c) ROC curve for the comparison between AQP4-Ab-positive and controls (healthy volunteers and MS), with the AUC value of 1.0, confirming the high specificity of the AQP4₆₁₋₇₀-nanoimmunosenor assay, with $p=0.0001$. The resulting cut-off was 241.3 pN at 100% of specificity (95% CI 63.06–100). (d) ROC curve for the comparison between AQP4-Ab-positive and -negative patients with healthy control and MS with AUC value of 0.82 with $p=0.0078$, resulting in 81.25% sensitivity (95% CI 56.50–99.43) for the AQP4₆₁₋₇₀-nanoimmunosenor assay.

AQP4₆₁₋₇₀-nanoimmunosensor as NMOSD diagnostic tool

The distinctive interaction between AQP4₆₁₋₇₀ and the serum samples of AQP4-Ab-positive patients in Figure 1 motivated us to test the nanoimmunosensor for diagnosis of NMOSD, which means being selective for AQP4 and without false positives when samples from non-NMOSD patients are considered. We used seventeen purified IgGs samples of the serum: five of healthy volunteers (negative control), four MS, and eight NMOSD AQP4-Ab-negative patient samples to compare with adhesion forces for NMOSD AQP4-Ab-positive patients. The IDMAP plot in Figure 2a obtained from the raw data for the retracting curves of all samples shows a clear separation between the NMOSD AQP4-Ab-positive patients and the other subjects. This separation is better seen in the median adhesion forces in Figure 2b, which are 927 pN (IQR 672–937), 831 pN (650.50–877.50) and 605 pN (425–1055.70), for the healthy control, MS, and AQP4-Ab-negative samples, respectively, much larger than the 85.50 pN (68.50–160.50) for the AQP4-Ab-positive samples. The specificity of the assay with the AQP4₆₁₋₇₀-nanoimmunosensor was tested with the receiver operating characteristic (ROC) curve to analyse the accuracy in distinguishing the healthy volunteers and MS patients from NMOSD AQP4-Ab-positive patients. Figure 2c presents the ROC curve in which the AQP4₆₁₋₇₀-nanoimmunosensor was effective in discriminating AQP4-Ab-positive from controls (healthy volunteers and MS) with an AUC value of 1.0, with $p < 0.0001$. The assay sensitivity was tested with ROC curve to verify if AQP4-Ab-negative would be distinguished from AQP4-Ab-positive NMOSD patients. Figure 2d displays the ROC curve resulting in an AUC value of 0.82, with $p = 0.0078$, which proved that these groups are distinct. The cut-off value of 241.3 pN was determined from the ROC curve in Figure 2c, at 100% of specificity (95% CI 63.06–100) with the AQP4₆₁₋₇₀-nanoimmunosensor assay. The sensitivity of this diagnostics assay was 81.25% (95% CI 56.50–99.43) (Figure 2d). Therefore, adhesion forces below this cut-off threshold using the AQP4₆₁₋₇₀-nanoimmunosensor indicate the presence of AQP4-Ab.

Discussion

The peptide sequence AQP4₆₁₋₇₀ (GTEKPLPVDV) from the extracellular loop of AQP4 was found to bind specifically to the serum samples of NMOSD patients tested positive for AQP4-Ab, which is in contrast to Kampylafka et al.²⁰ who reported major AQP4-Ab reactivity against AQP4 intracellular loops. However, this specific binding is consistent with recent studies where extracellular loops referred to as loop A, loop C, and loop E were found as disease-specific epitopes for NMOSD diagnosis^{19,21,22}. AQP4₆₁₋₇₀ is contained in loop A, thus demonstrating the role of this sequence as an epitope of AQP4 protein due to its high reactivity with AQP4-Ab. Although some studies with whole protein reported that AQP4 conformation can interfere in the recognition by AQP4-Ab^{30,31}, other approaches using peptides seem to be promising to understand the heterogeneity of NMOSD AQP4-Ab-negative patients with regard to which sequence of AQP4 or other non-AQP4 antigens is responsible for the pathology. The performance of the AQP4₆₁₋₇₀-nanoimmunosensor is higher than for most published sensors³², including those with the CBA assay. The sensitivity of CBA can be related to the intrinsic sensitivity of the method or to the AQP4-Ab absence against the AQP4₆₁₋₇₀ sequence in the NMOSD AQP4-Ab-negative patient group. With the nanoimmunosensor strategy reported here, it is possible to identify new AQP4 peptide sequences to expand the AQP4 peptide panel and address a crucial issue involving CBA: should the researchers try to improve the assay sensitivity or patients absolutely do not have AQP4-Ab? This issue has attracted interest because the meaning of the AQP4-Ab absence is still unknown. It is possible that AQP4-Ab-negative patients have an antigen typical of another pathology instead of MS or NMOSD, for example that could bind to the antibody against the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG-Ab). A percentage of acute disseminated encephalomyelitis (ADEM) and NMOSD AQP4-Ab-seronegative patients were seropositive to MOG-Ab³³. Though approximately 20% of NMOSD AQP4-Ab-negative were seropositive to MOG-Ab¹¹ and there was evidence that this antibody was related to relapses³⁴, there is another hypothesis, as follows. Based on Nakashima³⁵, it would be inappropriate to include AQP4-Ab-negative and MOG-Ab-positive patients in NMOSD or ADEM categories. Moreover, the NMOSD AQP4-Ab-negative phenotype may refer to other antigens targeted by a distinct mechanism³⁶, as observed in the autoimmune disorder myasthenia gravis (MG) for which the acetylcholine receptor (AChR) antibody was found to be the disease's biomarker. Other targets were found as disease-specific epitopes for distinct MG phenotypes, as the muscle-specific kinase (MuSK) protein and the lipoprotein-related protein 4 (LRP4). Antibodies against these proteins were identified in MG AChR-seronegative patients³⁷. The same may apply to AQP4-Ab-negative patients, i.e. different disease-specific targets might exist in the mechanisms responsible for NMOSD. One should also stress an implication of the findings here. Sequences of amino acids, e.g. peptides, can participate in autoimmune diseases as immunogenic sequences, with binding sites composed of linear epitopes³⁸.

Methods

Patients and samples

From August 30, 2015, to December 1, 2017, we enrolled in this study a total of twenty-five subjects (see Figure 3). A cohort of sixteen NMOSD patients was diagnosed according to the diagnostic criteria, convened by the International Panel for NMO Diagnosis¹. Patients 1 through 8 were AQP4-Ab-positive, and 9 through 16 were AQP4-Ab-negative based on

previous tests with CBA at the moment of their diagnosis. In addition, nine other subjects' samples were used: five from healthy volunteers and four from MS patients. All the experiments were performed in compliance with laws and institutional guidelines, and approved by: (a) Ethics Committee of University of São Paulo Medical School, Brazil, under the Certification of Ethical Presentation and Approval CAAE number 51297215.3.3001.0065; (b) Ethics Committee of Federal University of São Carlos, Brazil, under the Certification of Ethical Presentation and Approval CAAE number 51297215.3.0000.5504; (c) Ethics Committee in Research of Medical School of Botucatu, São Paulo State University, Brazil under the Certification of Ethical Presentation and Approval CAAE number 51297215.3.3002.5411. IgGs were purified from the patients' serum samples by Rheabiotech Development, Production and Commercialisation of Biotechnology Products, Ltd., Campinas, Brazil.

Figure 3. Trial profile

Surface functionalisation

AFM rectangular cantilevers of silicon nitride (AC40, Bruker, Nano Inc., Billerica, USA) were used with spring constant (k) of 0.02 N.m^{-1} and tip radius of 8 nm, suitable for force curve measurements³⁹, and mica sheets (TedPella Inc., Redding, USA) of $15 \times 15 \text{ mm}^2$ were cleaned in UV/Ozone radiation (ProCleaner™, UV.PC.220, Bioforce Nanosciences, Ames, USA) during 20 min. Both surfaces were aminated with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) and triethylamine (Sigma-Aldrich®), St. Louis, USA), following an established protocol^{13,40,41}.

Molecules immobilisation

Nanoimmunosensor AFM cantilevers were covered with a bifunctional PEG solution ($\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$, average Mn of 2000; $0.01 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) to provide carboxyl end groups on the surface followed by immobilisation of the peptide. Each of the four peptides (AQP4_{61-70} : GTEKPLPVD, $\text{AQP4}_{131-140}$: GILYLVTPPS, $\text{AQP4}_{141-150}$: VVGGLGVTMV, $\text{AQP4}_{201-210}$: SMNPARSFGP; $0.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Peptide Chemistry Laboratory of the Institute of Chemistry, São Paulo, Brazil, and Genscript, Piscataway, USA) was immobilised with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC, 0.4M) and N-hydroxysuccinimide (NHS, 0.1M) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) to activate PEG carboxyl end groups to interact with peptides primary amine end groups.

Substrate. Protein A solution ($30 \mu\text{L}$, $0.01 \mu\text{g.mL}^{-1}$) was dropped on mica sheets ($15 \times 15 \text{ mm}^2$, Ted Pella Inc, Redding, California, USA) to yield the immobilisation of suitably oriented IgGs⁴². Then, a solution with IgGs purified from the NMOSD patients' serum samples ($30 \mu\text{L}$, $56 \mu\text{g.mL}^{-1}$) was dropped on mica sheets. The samples were taken from eight patients with NMOSD AQP4-Ab-negative serologic status, eight patients with NMOSD AQP4-Ab-positive serologic status, four patients diagnosed with MS and five healthy volunteers.

Measurement acquisition

Force curves were obtained with a Bruker AFM, MultiMode V controller (Veeco Instruments Inc, Plainview, USA), and a Picoforce package. All measurements were performed in a fluid cell with Milli-Q® water using a loading rate of 184 nN.s^{-1} . Adhesion forces were extracted from the force curves to evaluate the interactions between each of four peptides (AQP4₆₁₋₇₀, AQP4₁₃₁₋₁₄₀, AQP4₁₄₁₋₁₅₀, and AQP4₂₀₁₋₂₁₀) and eight AQP4-Ab-positive serum samples from NMOSD patients.

Then, forces were measured using the nanoimmunosensor made with AQP4₆₁₋₇₀ peptide for eight AQP4-Ab-negative NMOSD patients, MS, and healthy volunteers. Measurements were analysed using Nanoscope Analysis 7.30 and Origin 8.0 software. The Force Volume technique was applied to obtain 256 measurements (figure S1; Supplementary Information) of each serum sample and then fifty measurements from specific interactions were selected to be analysed quantitatively.

Statistical analysis

Results were analysed with the boxplot graph due to the nonparametric characteristic of our data. The U-test Mann Whitney was applied to determine p values for assessing statistical differences. The nanoimmunosensor accuracy was analysed with the receiver operating characteristic (ROC) curve, which determines p value, cut-off, and area under the ROC curve (AUC).

In addition, ROC was used to analyse sensitivity and specificity of the nanoimmunosensor, i.e., the nanoimmunosensor efficiency in distinguishing typical NMOSD patients from a set of AQP4-Ab-negative, MS patients, and healthy volunteers (n=25 measured in triplicate), as well as the presence or absence of AQP4-Ab in the patients' serum samples.

Data treatment with Information Visualisation

Raw adhesion force (pN) vs. position (nm) spectra were analysed with multivariate data analysis using the PEX-Sensors software. The dissimilarities between the samples were converted to Euclidean distances. Because of the high dimensionality of the data (462 dimensions), they were reduced to a two-dimensional representation with the algorithm Fastmap and further improved with the Force Scheme algorithm using 500 iterations to recover some of the lost precision during data reduction. Mapping was performed with the Interactive Document Map (IDMAP) technique⁴³, which has been successful in the analysis of biosensing data⁴⁴⁻⁴⁶.

Surface plasmon resonance

Surface plasmon resonance (SPR) measurements were carried out via the BioNavis SPR Navi 200 system with a sensing device (50 nm-thick gold layer covered glass slides) previously cleaned in a mixture of $5\text{H}_2\text{O}:1\text{H}_2\text{O}_2:1\text{NH}_4\text{OH}$ (v/v) for 10 min at 85°C .

Glass slides were aminated with cysteamine (1.92 mg.mL^{-1}), and functionalised as follows: (i) PEG immobilisation, (ii) peptide immobilisation, and (iii) antibody detection. In each cycle the coated slides were washed extensively with Milli-Q® water. The wavelength used was 670 nm in a Kretschmann configuration⁴⁷.

Characterisation of AQP4₆₁₋₇₀-nanoimmunosensor

In subsidiary experiments we employed the SPR technique⁴⁸ to verify the molecular architecture assumed to be valid for the AFM AQP4₆₁₋₇₀-nanoimmunosensor, and confirm that a nanoimmunosensor can be made with another principle of detection. Two SPR channels were used for injections at the same time, which differ only in the last step: one with an injection of Milli-Q® water flow as the negative control (reference channel) and the other with antibodies flow (detection channel).

The sensorgram illustrates the resonance angle extracted from the kinetic parameters of the sensor assembly steps in real time (Figure 4a). The adsorption of the polyethylene glycol (PEG) crosslinker on the aminated surface with cysteamine is depicted in Figure 4b in which an angle shift $\Delta\theta$ of 0.09° was obtained in both the reference and detection channels. Adsorption of peptide molecules on the PEG layer led to an angle shift $\Delta\theta$ of 0.43° and 0.51° in reference and detection channels, respectively (Figure 4b).

By comparing with the results for the negative control (Milli-Q® water flow), one infers from Figure 4c and 4d that there is antigen (AQP4₆₁₋₇₀ peptide) recognition by AQP4-Ab, noticed by $\Delta\theta$ 0.01° and $\Delta\theta$ 0.26° , respectively. The changes in resonance angle are presented in Table 1.

The molecules persistence on the surface after washing with Milli-Q® water flow produce $\Delta\theta$ values^{49,50}, as observed here. According to Janmanee et al.⁵¹, each adsorption step occurs by covalent linkages. Here, in the first step adsorption was due to amide II formation between NH_2 group of Cys and COOH group of PEG. The same amide II group was formed between NH_2 of PEG and COOH of AQP4₆₁₋₇₀ peptide. The increase in the angle in the sensorgram when comparing $\Delta\theta$ of the reference channel with the detection channel pointed to AQP4-Ab binding to AQP4₆₁₋₇₀ peptide, as expected from other studies⁵²⁻⁵⁴.

Figure 4. Characterisation of the functionalisation process and AQP4-Ab detection by SPR. (a) SPR operation. (b) Adsorption kinetics for PEG and peptide injections. (c) and (d) Comparison between reference channel and sensor application (detection channel) with AQP4-Ab detection.

Steps	Reference channel			Detection channel		
	Initial	Final	$\Delta\theta$	Initial	Final	$\Delta\theta$
Au-Cys	0°	0°	—	0°	0°	—
Au-Cys-PEG	0°	0.09°	0.09°	0°	0.09°	0.09°
Au-Cys-PEG-Pep	0.09°	0.52°	0.43°	0.09°	0.60°	0.51°
Detection of AQP4-Ab	0.52°	0.53°	0.01°	0.60°	0.86°	0.26°

Table 1. Resonance angles in the functionalisation steps and AQP4-Ab detection.

Data Availability

All data that were generated or analysed during this study and that supports the reported findings are included in this paper and additionally provided as supplementary information .

References

- Wingerchuk, D. M. *et al.* International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology* **85**, 177–189, DOI: [10.1212/WNL.0000000000001729](https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001729) (2015).
- Barnett, M. H., Parratt, J. D. E., Pollard, J. D. & Prineas, J. W. MS: is it one disease? *Int MS J* **16**, 57–65 (2009).
- Wingerchuk, D. M., Hogancamp, W. F., O'Brien, P. C. & Weinshenker, B. G. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology* **53**, 1107–1107, DOI: [10.1212/WNL.53.5.1107](https://doi.org/10.1212/WNL.53.5.1107) (1999).

4. Lennon, V. A. *et al.* A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *The Lancet* **364**, 2106–2112, DOI: [10.1016/S0140-6736\(04\)17551-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17551-X) (2004).
5. Lucchinetti, C. F. *et al.* A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain* **125**, 1450–1461, DOI: [10.1093/brain/awf151](https://doi.org/10.1093/brain/awf151) (2002).
6. Verkman, A. S., Phuan, P.-W., Asavapanumas, N. & Tradtrantip, L. Biology of AQP4 and anti-AQP4 antibody: therapeutic implications for NMO. *Brain Pathol.* **23**, 684–695, DOI: [10.1111/bpa.12085](https://doi.org/10.1111/bpa.12085) (2013).
7. Kimura, A. *et al.* Protective role of aquaporin-4 water channels after contusion spinal cord injury. *Ann. Neurol.* **67**, 794–801, DOI: [10.1002/ana.22023](https://doi.org/10.1002/ana.22023) (2010).
8. Franciotta, D. *et al.* Diagnostics of the neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD). *Neurol. Sci.* **38**, 231–236, DOI: [10.1007/s10072-017-3027-1](https://doi.org/10.1007/s10072-017-3027-1) (2017).
9. de Seze, J. MOG-antibody neuromyelitis optica spectrum disorder: is it a separate disease? *Brain* **140**, 3072–3075, DOI: [10.1093/brain/awx292](https://doi.org/10.1093/brain/awx292) (2017).
10. Jarius, S. *et al.* MOG-IgG in NMO and related disorders: a multicenter study of 50 patients. Part 1: Frequency, syndrome specificity, influence of disease activity, long-term course, association with AQP4-IgG, and origin. *J. Neuroinflammation* **13**, 279, DOI: [10.1186/s12974-016-0717-1](https://doi.org/10.1186/s12974-016-0717-1) (2016).
11. Sato, D. K. *et al.* Distinction between MOG antibody-positive and AQP4 antibody-positive NMO spectrum disorders. *Neurology* **82**, 474–481, DOI: [10.1212/WNL.000000000000101](https://doi.org/10.1212/WNL.000000000000101) (2014).
12. Kezuka, T. *et al.* Relationship between NMO-antibody and Anti-MOG antibody in optic neuritis. *J. Neuro-Ophthalmology* **32**, 107–110, DOI: [10.1097/WNO.0b013e31823c9b6c](https://doi.org/10.1097/WNO.0b013e31823c9b6c) (2012).
13. Moraes, A. S. *et al.* Atrazine detection in liquid using a nanoimmunosensor based on chemically modified atomic force microscopy tips. *Sens. Lett.* **14**, 508–514, DOI: [10.1166/sl.2016.3642](https://doi.org/10.1166/sl.2016.3642) (2016).
14. de Luca, V. *et al.* Cross-reactivity between myelin oligodendrocyte glycoprotein and human endogenous retrovirus W protein: Nanotechnological evidence for the potential trigger of multiple sclerosis. *Micron* **120**, 66–73, DOI: [10.1016/j.micron.2019.02.005](https://doi.org/10.1016/j.micron.2019.02.005) (2019).
15. Ierich, J. C. M. *et al.* Antibody-mediated biorecognition of myelin oligodendrocyte glycoprotein: computational evidence of demyelination-related epitopes. *Sci. Reports* **9**, 2033, DOI: [10.1038/s41598-018-36578-8](https://doi.org/10.1038/s41598-018-36578-8) (2019).
16. Higa, A. M. *et al.* Peptide-conjugated silver nanoparticle for autoantibody recognition. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **19**, 1–10 (2019).
17. Leite, F. L., Hausen, M., Oliveira, G. S., Brum, D. G. & Oliveira, O. N. Nanoneurobiophysics: new challenges for diagnosis and therapy of neurologic disorders. *Nanomedicine* **10**, 3417–3419, DOI: [10.2217/nnm.15.164](https://doi.org/10.2217/nnm.15.164) (2015).
18. 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* **38**, 446–461, DOI: [10.1016/j.micron.2006.06.014](https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.06.014) (2007).
19. Son, M., Kim, D., Park, K. S., Hong, S. & Park, T. H. Detection of aquaporin-4 antibody using aquaporin-4 extracellular loop-based carbon nanotube biosensor for the diagnosis of neuromyelitis optica. *Biosens. Bioelectron.* **78**, 87–91, DOI: [10.1016/j.bios.2015.11.029](https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.11.029) (2016).
20. Kampylafka, E. I. *et al.* Fine specificity of antibodies against AQP4: epitope mapping reveals intracellular epitopes. *J. Autoimmun.* **36**, 221–227, DOI: [10.1016/j.jaut.2011.01.004](https://doi.org/10.1016/j.jaut.2011.01.004) (2011).
21. Iorio, R. *et al.* Astrocytic autoantibody of neuromyelitis optica (NMO-IgG) binds to aquaporin-4 extracellular loops, monomers, tetramers and high order arrays. *J. Autoimmun.* **40**, 21–27, DOI: [10.1016/j.jaut.2012.07.008](https://doi.org/10.1016/j.jaut.2012.07.008) (2013).
22. Pisani, F. *et al.* Identification of two major conformational aquaporin-4 epitopes for neuromyelitis optica autoantibody binding. *J. Biol. Chem.* **286**, 9216–9224, DOI: [10.1074/jbc.M110.123000](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.123000) (2011).
23. Hoh, J. H., Cleveland, J. P., Prater, C. B., Revel, J. P. & Hansma, P. K. Quantized adhesion detected with the atomic force microscope. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 4917–4918, DOI: [10.1021/ja00038a075](https://doi.org/10.1021/ja00038a075) (1992).
24. Müller, D. J., Helenius, J., Alsteens, D. & Dufrêne, Y. F. Force probing surfaces of living cells to molecular resolution. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 383–390, DOI: [10.1038/nchembio.181](https://doi.org/10.1038/nchembio.181) (2009).
25. Puchner, E. M. & Gaub, H. E. Force and function: probing proteins with AFM-based force spectroscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 605–614, DOI: [10.1016/j.sbi.2009.09.005](https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.09.005) (2009).
26. Braden, B. C. & Poljak, R. J. Structural features of the reactions between antibodies and protein antigens. *The FASEB J.* **9**, 9–16, DOI: [10.1096/fasebj.9.1.7821765](https://doi.org/10.1096/fasebj.9.1.7821765) (1995).

27. Paulovich, F. V. *et al.* Information visualization techniques for sensing and biosensing. *Analyst* **136**, 1344–1350, DOI: [10.1039/c0an00822b](https://doi.org/10.1039/c0an00822b) (2011).
28. Celik, E. & Moy, V. T. Nonspecific interactions in AFM force spectroscopy measurements. *J. Mol. Recognit.* **25**, 53–56, DOI: [10.1002/jmr.2152](https://doi.org/10.1002/jmr.2152) (2012).
29. Zhang, H., Williams, P. S., Zborowski, M. & Chalmers, J. J. Binding affinities/avidities of antibody–antigen interactions: Quantification and scale-up implications. *Biotechnol. Bioeng.* **95**, 812–829, DOI: [10.1002/bit.21024](https://doi.org/10.1002/bit.21024) (2006).
30. Marignier, R. *et al.* Aquaporin-4 antibody-negative neuromyelitis optica: distinct assay sensitivity-dependent entity. *Neurology* **80**, 2194–2200, DOI: [10.1212/WNL.0b013e318296e917](https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318296e917) (2013).
31. Mader, S. *et al.* Patterns of antibody binding to aquaporin-4 isoforms in neuromyelitis optica. *PLoS ONE* **5**, e10455, DOI: [10.1371/journal.pone.0010455](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010455) (2010).
32. Waters, P. *et al.* Serologic diagnosis of NMO. *Neurology* **78**, 665–671, DOI: [10.1212/WNL.0b013e318248dec1](https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318248dec1) (2012).
33. Reindl, M., Jarius, S., Rostasy, K. & Berger, T. Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies: How clinically useful are they? *Curr. Opin. Neurol.* **30**, 295, DOI: [10.1097/WCO.0000000000000446](https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000446) (2017).
34. Hyun, J.-W. *et al.* Longitudinal analysis of myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in CNS inflammatory diseases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **88**, 811–817, DOI: [10.1136/jnnp-2017-315998](https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-315998) (2017).
35. Nakashima, I. Is MOG-IgG another biomarker for neuromyelitis optica? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **88**, 807–807, DOI: [10.1136/jnnp-2017-316247](https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-316247) (2017).
36. Weber, M. S., Derfuss, T. & Brück, W. Anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated central nervous system demyelination—A novel disease entity? *JAMA Neurol.* **75**, 909–910, DOI: [10.1001/jamaneurol.2018.1055](https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.1055) (2018).
37. Vernino, S. Unraveling the enigma of seronegative myasthenia gravis. *JAMA Neurol.* **72**, 630–631, DOI: [10.1001/jamaneurol.2015.0205](https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.0205) (2015).
38. Robinson, W. H., Steinman, L. & Utz, P. J. Protein and peptide array analysis of autoimmune disease. *BioTechniques* **33**, S66–S69, DOI: [10.2144/dec02-robinson](https://doi.org/10.2144/dec02-robinson) (2002).
39. Butt, H.-J., Cappella, B. & Kappl, M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surf. Sci. Reports* **59**, 1–152, DOI: [10.1016/j.surfrep.2005.08.003](https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2005.08.003) (2005).
40. Etchegaray, A., Bueno, C. d. C. & Teschke, O. Identification of microcistin LR at the molecular level using atomic force microscopy. *Química Nova* **33**, 1843–1848, DOI: [10.1590/S0100-40422010000900004](https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000900004) (2010).
41. Rodrigues, L. F. *et al.* Nanomechanical cantilever-based sensor: An efficient tool to measure the binding between the herbicide mesotrione and 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *NANO* **12**, 1750079, DOI: [10.1142/S1793292017500795](https://doi.org/10.1142/S1793292017500795) (2017).
42. Coen, M. C. *et al.* Adsorption and bioactivity of protein A on silicon surfaces studied by AFM and XPS. *J. Colloid Interface Sci.* **233**, 180–189, DOI: [10.1006/jcis.2000.7240](https://doi.org/10.1006/jcis.2000.7240) (2001).
43. Minghim, R., Paulovich, F. V. & de Andrade Lopes, A. Content-based text mapping using multi-dimensional projections for exploration of document collections. 60600S (San Jose, CA, 2006).
44. Soares, A. C. *et al.* Controlled film architectures to detect a biomarker for pancreatic cancer using impedance spectroscopy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 25930–25937, DOI: [10.1021/acsami.5b08666](https://doi.org/10.1021/acsami.5b08666) (2015).
45. Ibáñez-Redín, G. *et al.* Screen-printed interdigitated electrodes modified with nanostructured carbon nano-onion films for detecting the cancer biomarker CA19-9. *Mater. Sci. Eng. C* **99**, 1502–1508, DOI: [10.1016/j.msec.2019.02.065](https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.02.065) (2019).
46. Daikuzono, C. M. *et al.* Information visualization and feature selection methods applied to detect gliadin in gluten-containing foodstuff with a microfluidic electronic tongue. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 19646–19652, DOI: [10.1021/acsami.7b04252](https://doi.org/10.1021/acsami.7b04252) (2017).
47. Kretschmann, E. & Raether, H. Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light. *Zeitschrift für Naturforschung A* **23**, 2135–2136, DOI: [10.1515/zna-1968-1247](https://doi.org/10.1515/zna-1968-1247) (1968).
48. Erb, E. M. *et al.* Characterization of the surfaces generated by liposome binding to the modified dextran matrix of a surface plasmon resonance sensor chip. *Anal. Biochem.* **280**, 29–35, DOI: [10.1006/abio.1999.4469](https://doi.org/10.1006/abio.1999.4469) (2000).
49. Wegner, G. J. *et al.* Real-time surface plasmon resonance imaging measurements for the multiplexed determination of protein adsorption/desorption kinetics and surface enzymatic reactions on peptide microarrays. *Anal. Chem.* **76**, 5677–5684, DOI: [10.1021/ac0494275](https://doi.org/10.1021/ac0494275) (2004).

50. Nilebäck, L. *et al.* Self-assembly of recombinant silk as a strategy for chemical-free formation of bioactive coatings: A real-time study. *Biomacromolecules* **18**, 846–854, DOI: [10.1021/acs.biomac.6b01721](https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01721) (2017).
51. Janmanee, R. *et al.* In situ electrochemical-transmission surface plasmon resonance spectroscopy for poly(pyrrole-3-carboxylic acid) thin-film-based biosensor applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **4**, 4270–4275, DOI: [10.1021/am300970m](https://doi.org/10.1021/am300970m) (2012).
52. Nanduri, V., Bhunia, A. K., Tu, S.-I., Paoli, G. C. & Brewster, J. D. SPR biosensor for the detection of L. monocytogenes using phage-displayed antibody. *Biosens. Bioelectron.* **23**, 248–252, DOI: [10.1016/j.bios.2007.04.007](https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.04.007) (2007).
53. Toma, M. & Tawa, K. Polydopamine thin films as protein linker layer for sensitive detection of interleukin-6 by surface plasmon enhanced fluorescence spectroscopy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 22032–22038, DOI: [10.1021/acsami.6b06917](https://doi.org/10.1021/acsami.6b06917) (2016).
54. Vergara, D. *et al.* An SPR based immunoassay for the sensitive detection of the soluble epithelial marker E-cadherin. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biol. Medicine* **14**, 1963–1971, DOI: [10.1016/j.nano.2018.05.018](https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.05.018) (2018).

Acknowledgements

We thank Dr. P. D. da Gama, MD, for providing three healthy volunteers serum samples. We thank the support of the São Paulo Research Foundation (FAPESP 2013/14262-7, 2015/05283-6, 2015/06847-0, 2014/12082-4, 2014/15093-7, 2016/19387-0, 2015/36143-2, 2015/14360-4, and 2012/50839-4), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES finance code 001), and Brazil National Council for Scientific and Technological Development (CNPq 305069/2016-0, 459768/2014-0, 308570/2018-9 and 308658/2015-9), and National Institute for Science and Technology on Organic Electronics - INEO (CNPq 465572/2014-6, FAPESP 2014/50869-6, and CAPES 23038.000776/201754). We also thank Dr. C.W. Liria and E.F.A. Souza for helping with the synthesis of peptides.

Author contributions statement

A.S.M., D.G.B., and A.S.J.A. designed the AFM nanoimmunosensor experiments. L.A.P. performed the serum samples purification. M.T.M. provided peptide molecules. A.A.B. provided NMOSD patient serum samples. C.M.M. and M.F. designed the SPR experiments. F.M.S. processed data with multivariate analysis. A.S.M., D.G.B., J.C.M.L., A.M.H., C.M.M., F.M.S., O.N.O., and F.L.L. discussed the results and wrote the manuscript. D.G.B., O.N.O., and F.L.L. supervised the project and manuscript preparation. All authors reviewed the manuscript.

Declaration of interests

The authors declare no competing interests.

ANEXO R – Página do sistema de submissão do manuscrito à *Scientific Reports*.

02/07/2019

Scientific Reports

manuscripttrackingssystem

SCIENTIFIC REPORTS

[tracking system home](#)[author instructions](#)[reviewer instructions](#)[help](#)[tips](#)[logout](#)[journal home](#)

Detailed Status Information

Manuscript #	SREP-19-25211
Current Revision #	0
Submission Date	2nd July 19
Current Stage	Manuscript Submitted
Title	A highly specific and sensitive nanoimmunosensor for the diagnosis of neuromyelitis optica spectrum disorders
Manuscript Type	Original Research
Collection	N/A
Manuscript Comment	Reviewer suggestions for consideration by Scientific Reports: Salvatore Cannistraro, Università della Tuscia, Viterbo, Italy, cannistr@unitus.it. This researcher is specialist in force spectroscopy; Anna Rita Bizarri, Università della Tuscia, Viterbo, Italy, bizarri@unitus.it. This researcher is specialist in force spectroscopy; Dean M. Wingerchuk, Department of Neurology, Mayo Clinic, Scottsdale, AZ, wingerchuk.dean@mayo.edu. This researcher works with autoantibodies in neuromyelitis spectrum disorders; Vanda A Lennon, Department of Neurology, Mayo Clinic, College of Medicine, Rochester, MN, lennon@mayo.edu. This researcher works with autoantibodies in neuromyelitis spectrum disorders; Brunero Cappella, Federal Institute for Material Research and Testing, brunero.cappella@bam.de. This researcher is specialist in force-distance curves by atomic force microscopy.
Corresponding Author	Prof. Fabio Leite (fabioleite@ufscar.br) (Federal University of São Carlos)
Contributing Authors	Mrs. Ariana Moraes , Prof. Doralina Brum , Dr. Jéssica Ierich , Miss Akemi Higa , Miss Amanda Assis , Dr. Celina Miyazaki , Dr. Flávio Shimizu , Luís Peroni , Prof. M. Teresa Machini , Prof. Amilton Barreira , Prof. Marystela Ferreira , Prof. Osvaldo Oliveira Jr
Authorship	Yes
Abstract	A precise diagnosis for neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD) is crucial to improve patients' prognostic, which requires highly specific and sensitive tests. The cell-based assay with a sensitivity of 76% and specificity of 100% is the most recommended test to detect anti-aquaporin-4 antibodies (AQP4-Ab). Here, we tested four AQP4 external loop peptides (AQP4 ₆₁₋₇₀ , AQP4 ₁₃₁₋₁₄₀ , AQP4 ₁₄₁₋₁₅₀ , and AQP4 ₂₀₁₋₂₁₀) with an atomic force microscopy nanoimmunosensor to develop a diagnostic assay. We obtained the highest reactivity with AQP4 ₆₁₋₇₀ -nanoimmunosensor. This assay was effective in detecting AQP4-Ab in sera of NMOSD patients with 100% specificity (95% CI 63.06–100), determined by the cut-off adhesion force value of 241.3 pN. NMOSD patients were successfully discriminated from a set of healthy volunteers, patients with multiple sclerosis, and AQP4-Ab-negative patients. AQP4 ₆₁₋₇₀ sensitivity was 81.25% (95% CI 56.50–99.43), slightly higher than with the CBA method. The results with the AQP4 ₆₁₋₇₀ -nanoimmunosensor indicate that the differences between NMOSD seropositive and seronegative phenotypes are related to disease-specific epitopes. The absence of AQP4-Ab in sera of NMOSD AQP4-Ab-negative patients may be interpreted by assuming the existence of another potential AQP4 peptide sequence or non-AQP4 antigens as the antibody target.
Techniques	Physical sciences techniques, Microscopy techniques [Atomic force microscopy]; Life sciences techniques, Protein techniques [Surface plasmon resonance];
Subject Terms	Health sciences/Biomarkers/Diagnostic markers Physical sciences/Nanoscience and technology/Nanobiotechnology/Biosensors
Competing Interests Policy	There is NO Competing Interest.
Applicable Funding Source	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2015/05283-6 [Moraes] Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2012/50839-4 [Brum] Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2014/12082-4 [Ierich] Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2015/06847-0 [Higa] Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research

https://mts-srep.nature.com/cgi-bin/main.plex?form_type=status_details&j_id=110&ms_id=289362&ms_rev_no=0&ms_id_key=ftdxsdrvDJJmu5F... 1/2

02/07/2019

Scientific Reports

	Foundation) - 2014/15093-7 [Miyazaki] Ministry of Science, Technology and Innovation Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (National Council for Scientific and Technological Development) - 308570/2018-9 [Shimizu] Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2015/36143-2 [Machini] Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2015/14360-4 [Machini] Ministry of Science, Technology and Innovation Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (National Council for Scientific and Technological Development) - 308658/2015-9 [Machini] Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2016/19387-0 [Ferreira] Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2013/14262-7 [Oliveira Jr] Ministry of Science, Technology and Innovation Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (National Council for Scientific and Technological Development) - 459768/2014-0 [Leite] Ministry of Science, Technology and Innovation Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (National Council for Scientific and Technological Development) - 305069/2016-0 [Leite]
--	--

Stage	Start Date	End Date	Approximate Duration
Manuscript Submitted	2nd July 19		
Quality Check Started	27th June 19		
Submission Not Complete	27th June 19		
Quality Check Started	24th June 19		
Submission Not Complete	24th June 19		
Quality Check Started	20th June 19		
Submission Not Complete	20th June 19		
Quality Check Started	18th June 19		
Submission Not Complete	18th June 19		
Quality Check Started	14th June 19		
Submission Not Complete	14th June 19

[tracking system home](#) | [author instructions](#) | [reviewer instructions](#) | [help](#) | [tips](#) | [logout](#) | [journal home](#) | [terms of use](#)
[privacy policy](#) | [cookie policy](#) | [manage cookies](#)

ANEXO S – Ficha do aluno.

28/06/2019 Janus

USP Universidade de São Paulo
Brasil

Login
Secretaria de Pós Graduação
Subperfl: Chefe de Serviço
Eliane Fernandes Araújo
NUSP: 5061710
Sair

Apresentação
• Apresentação
• Vídeos tutoriais
Fale conosco
• Fale conosco
+ Acesso público
+ Senha
+ Pessoa
+ Aluno regular
+ Aluno especial
+ Mobilidade EIE
+ Matrícula
+ Docente/Orientador
+ Programa
+ CPG
+ Disciplina
+ Memorial
+ Cartões USP
+ Diploma
• Avisos
• Mapa do site
• E-mails automáticos
• Quem São
• Portal Alumni

NUSP: 9521644 Nome: Ariana de Souza Moraes dos Santos [Fechar pessoa](#)

Ficha do Aluno

Curso	Área	Nº Sequencial	Situação	Visualizar
→ Doutorado Direto Doenças Tropicais e Saúde Internacional (99131)		1	Matrícula de Acompanhamento	

[Preparar para imprimir](#)

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
FICHA DO ALUNO

99131 - 9521644/1 - Ariana de Souza Moraes dos Santos

Email: ariana_sm@usp.br
Data de Nascimento: 03/07/1984
Cédula de Identidade: RG - 30.191.558-1 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharela em Ciências Biológicas - Universidade Federal de São Carlos - São Paulo - Brasil - 2014

Curso: Doutorado Direto
Programa: Medicina Tropical
Área: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Data de Matrícula: 02/07/2015
Início da Contagem de Prazo: 02/07/2015
Data Limite para o Depósito: 02/07/2019
Orientador: Prof(a). Dr(a). Fabio de Lima Leite - 02/07/2015 até o presente. Email: fabiolimaleite@gmail.com
Co-orientador: Prof(a). Dr(a). Doralina Guimarães Brum Souza - 13/11/2017 até o presente. Email: dbrum@fmb.unesp.br

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 02/07/2015
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 01/09/2017

Data do Depósito do Trabalho: 27/06/2019
Título do Trabalho: "Desenvolvimento do nanoinmunossensor-AQP461-70 para o diagnóstico altamente específico e sensível de doenças do espectro da neuromielite óptica em pacientes com fenótipo soropositivo"

Data Máxima para Aprovação da Banca: 12/08/2019
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2019
Impresso em: 28/06/2019 14:08:47

Eliane Fernandes Araújo
Secretária
NUSP 5061710
Chefe de Serviço de Pós-Graduação
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

<https://uspdigital.usp.br/janus/alunoGeral/ficha/listaDeFichasDoAluno.jsf> 1/2

28/06/2019

Janus

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
FICHA DO ALUNO

99131 - 9521644/1 - Ariana de Souza Moraes dos Santos

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
Atividade do Programa v.21,n.2,2015	artigo publicado: "Caracterização morfológica de nanocristais de celulose por microscopia de força atômica" Revista Matéria, v.21,n.2,2015	05/01/2015	05/01/2015	-	1	-	-	-	-
BMH5765-2/3	Fundamentos em Biologia do Desenvolvimento (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	04/08/2015	17/11/2015	225	15	92	A	N	Concluída
BMA5792-7/2	Metodologia Neuroanatômica (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	09/10/2015	12/11/2015	75	5	100	B	N	Concluída
ICB5742-1/2	Neuroimunologia da Resposta Inflamatória Sistêmica. (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	26/11/2015	23/12/2015	60	4	87	A	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos			Créditos obtidos
Para exame de qualificação			Para depósito de tese
Disciplinas:	12	24	25
Estágios:			
Total:	12	24	25

Créditos Atribuídos à Tese: 168

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2019
Impresso em: 28/06/2019 14:08:47| 2006-2011 - Pós-Graduação/USP | [Regimento da Pós-Graduação](#)Eliane Fernandes Araújo
Secretária
NUSP 5061710Chefe de Serviço de Pós-Graduação
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo