

AKEMI MARTINS HIGA

**Sensoriamento óptico do anticorpo AQP4-IgG utilizando nanobiossensores de nanopartículas de prata associados com epítomos da proteína AQP4**

**Versão Original**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo  
para obtenção do título de Doutor em  
Ciências

Programa de Medicina Tropical  
Área de concentração: Doenças Tropicais  
e Saúde Internacional  
Orientador: Prof. Dr. Fábio de Lima Leite

São Paulo  
2022

AKEMI MARTINS HIGA

**Sensoriamento óptico do anticorpo AQP4-IgG utilizando nanobiossensores de nanopartículas de prata associados com epítomos da proteína AQP4**

**Versão Original**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo  
para obtenção do título de Doutor em  
Ciências

Programa de Medicina Tropical  
Área de concentração: Doenças Tropicais  
e Saúde Internacional  
Orientador: Prof. Dr. Fábio de Lima Leite

São Paulo  
2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Higa, Akemi Martins  
Sensoriamento óptico do anticorpo AQP4-IgG  
utilizando nanobiossensores de nanopartículas de  
prata associados com epítopos da proteína AQP4 /  
Akemi Martins Higa. -- São Paulo, 2022.  
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Medicina Tropical. Área de  
Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.  
Orientador: Fábio de Lima Leite.

Descritores: 1.Nanopartículas 2.Nanotecnologia  
3.Imunoglobulinas 4.Peptídeos 5.Neuromielite óptica  
6.Sensores ópticos

USP/FM/DBD-161/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*Dedico este trabalho às pessoas que enfrentam diariamente o desafio de viver com esclerose múltipla e com as doenças do espectro da neuromielite óptica. A pesquisa científica nos instrumentaliza com informações técnicas muito valiosas, fruto do incansável esforço e dedicação de excelentes profissionais da saúde e cientistas. Mas, poucos têm a oportunidade de ouvir as histórias de bravos guerreiros e guerreiras, que vivenciam essas condições tão complexas, a começar pela saga até a conclusão do diagnóstico. Apesar de minha distância dessas histórias, foi pensando nelas que executei este trabalho.*

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador Prof. Dr. Fábio de Lima Leite, pois foi quem idealizou e organizou um grupo de pesquisa competente e comprometido com as questões da esclerose múltipla e das doenças do espectro da neuromielite óptica. Agradeço pela sensibilidade e olhar diferenciado para o tema, e por ter me confiado parte deste incrível trabalho, que uniu alunos, médicos e professores de áreas tão distintas, mas complementares. Obrigada pelos ensinamentos compartilhados com tanta paciência e respeito, desde 2012.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Doralina G. Brum Souza, primeiramente por ter acreditado que a nanociência e a nanotecnologia têm lugar na medicina e ter iniciado esse desafio juntamente com o Prof. Fabio. Agradeço também pelas incontáveis horas que passou comigo em vídeo-chamadas, me ensinando com toda paciência a como escrever e apresentar os resultados da melhor forma. Muito obrigada pelo incentivo, que me manteve esperançosa e consistente no trabalho.

Aos amigos que fizeram parte do Grupo de Pesquisa em Nanoneurobiofísica e que compartilharam suas experiências e conhecimentos comigo. Pra mim, é um privilégio ter a amizade e o companheirismo de jovens talentos tão comprometidos, generosos e que já estão fazendo diferença no mundo.

Aos colaboradores deste projeto, especialmente à Dra. Ariana de Souza Moraes, ao Dr. Flávio Makoto Shimizu, Dr. Luis Antônio Peroni e Prof. Dr. Osvaldo Novaes de Oliveira Jr., que participaram ativamente deste projeto e possibilitaram a publicação do trabalho. Muito obrigada por terem me ajudado com as análises dos resultados e com a escrita e revisão do artigo.

Às professoras Dra. Elisabete Alves Pereira, Dra. Marystela Ferreira e professores Dr. Francisco Trivinho Strixino e Dr. Giovanni Pimenta Mambrini da UFSCar de Sorocaba, por terem deixado seus laboratórios e equipamentos à minha disposição.

Aos professores e coordenadores do Instituto de Medicina Tropical (IMT), por terem aceito o desafio de um projeto tão diferente, mas semelhante em muitos sentidos. As aulas, o estágio, as bancas e os olhares diferenciados de especialistas de outras áreas enriqueceram o projeto e o meu repertório.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001 e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento desta pesquisa.

Aos voluntários que cederam suas amostras para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus pais, Newton Higa e Elisabete Martins da Silva Higa, pela dedicação à minha formação e por terem sido os maiores incentivadores do sonho de me tornar uma pesquisadora, mesmo sendo uma carreira tão distante do que conheciam, até então. Agradeço pela paciência com as minhas dificuldades e por terem suportado a saudade, com tantos anos morando longe. Obrigada por terem me ensinado no caminho do Senhor, do qual nunca me desviarei.

Ao meu namorado, Valdir de Campos Júnior, por ter me encontrado no momento certo. Obrigada por todo apoio, pela paciência, compreensão e por ser a melhor companhia para a vida. Melhor é serem dois do que um, porque se um cair, o outro levanta o seu companheiro. Agradeço por todas as vezes que você me levantou.

A Deus, pois sem Ele, nada posso fazer.

## Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVOS .....	6
	2.1 GERAL.....	6
	2.2 ESPECÍFICOS .....	6
	2.2.1. 1ª etapa: desenvolvimento do nanobiossensor.....	6
	2.2.1.1. Quantificação dos parâmetros de acurácia do nanobiossensor AgNPs-AQP4 <sub>61-70</sub> .....	6
	2.2.1.2. Caracterização das nanopartículas e do nanobiossensor AgNPs-AQP4 <sub>61-70</sub> .....	7
	2.2.2. 2ª etapa: triagem dos peptídeos .....	7
3.	REVISÃO DA LITERATURA.....	8
	3.1 DOENÇAS DO ESPECTRO DA NEUROMIELITE ÓPTICA .....	8
	3.1.1. Evolução do conceito de NMO e de doenças do ENMO .....	8
	3.1.2. Versões dos critérios diagnósticos .....	11
	3.1.3. Métodos de detecção do anticorpo AQP4-IgG.....	15
	3.1.4. Cursos das doenças do ENMO e suas características clínicas .....	16
	3.1.5. Epidemiologia .....	18
	3.1.6. Etiologia.....	19
	3.1.7. Proteína aquaporina-4 (AQP4) .....	20
	3.1.8. Autoanticorpo AQP4-IgG .....	23
	3.1.9. Interação entre o anticorpo AQP4-IgG e a proteína AQP4 .....	25
	3.1.10. Tratamentos .....	28
	3.1.11. Mapeamento de epítipo .....	30
	3.1.12. Prognóstico.....	31
	3.2 NANOPARTÍCULAS .....	31
	3.2.1. Histórico da nanotecnologia .....	31
	3.2.2. Nanobiotecnologia e nanomedicina .....	37
	3.2.3. Nanobiossensores .....	39
	3.2.4. Nanopartículas metálicas .....	40
	3.2.5. Propriedades ópticas das nanopartículas de prata .....	41
	3.2.6. Nanobiossensor de nanopartículas de prata.....	44
	3.2.7. Métodos de síntese de nanopartículas de prata .....	46
	3.2.8. Funcionalização das nanopartículas de prata .....	48
4.	MÉTODOS.....	52
	4.1 CASUÍSTICA .....	52

4.2	<i>OBTENÇÃO DOS PEPTÍDEOS E PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO</i> .....	53
4.3	<i>SÍNTESE, FUNCIONALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA</i> .....	54
4.4	<i>ENSAIOS DE INTERAÇÃO COM AS SOLUÇÕES DE IgGs PURIFICADAS DAS AMOSTRAS DE SORO</i> 56	
4.5	<i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i> .....	56
5.	<b>RESULTADOS</b> .....	57
5.1	<i>PARÂMETROS DE ANÁLISE DOS RESULTADOS</i> .....	57
5.2	<i>1ª ETAPA DO PROJETO: DESENVOLVIMENTO DO NANOBIOSENSOR</i> .....	59
5.2.1.	Ensaio com as soluções de IgGs derivadas de amostras de soro dos grupos controle: pacientes com EM e saudáveis .....	59
5.2.2.	Ensaio com as soluções de IgGs derivadas de amostras de soro dos pacientes ENMO	61
5.2.3.	Estudo da influência da concentração de IgGs totais na detecção do biomarcador pelos nanobiossensores nas amostras de pacientes ENMO AQP4-IgG soronegativos .....	64
5.3	<i>2ª ETAPA DO PROJETO: TRIAGEM DOS PEPTÍDEOS</i> .....	66
5.3.1.	Porção N-terminal e região intracelular inicial.....	66
5.3.2.	Epítomos adjacentes ao AQP4 <sub>61-70</sub> .....	68
5.3.3.	Região transmembrana AQP4 <sub>81-90</sub> ao AQP4 <sub>101-110</sub> .....	69
5.3.4.	Regiões adjacentes aos epítomos AQP4 <sub>131-140</sub> e AQP4 <sub>141-150</sub> .....	70
5.3.5.	Epítomo adjacente ao AQP4 <sub>201-210</sub> .....	71
5.3.6.	Alça extracelular E .....	72
5.3.7.	Região intracelular do epítomo AQP4 <sub>261-270</sub> ao AQP4 <sub>291-300</sub> .....	73
5.3.8.	Região C-terminal.....	75
5.4	<i>QUANTIFICAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO NANOBIOSENSOR AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub></i> .....	76
5.5	<i>QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AQP4-IgG</i> .....	77
5.6	<i>CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DO NANOBIOSENSOR</i> .....	81
5.6.1.	Síntese e caracterização das nanopartículas de prata .....	81
5.6.2.	Conjugação dos peptídeos da AQP4 às nanopartículas de prata .....	82
6.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	85
6.1	<i>ENSAIOS COM AS SOLUÇÕES DE IgGs DERIVADAS DE AMOSTRAS DE SORO DOS GRUPOS CONTROLE: PACIENTES COM EM E SAUDÁVEIS</i> .....	85
6.2	<i>ENSAIOS COM AS SOLUÇÕES DE IgGs DERIVADAS DE AMOSTRAS DE SORO DOS PACIENTES ENMO</i> 86	
6.2.1.	Nanobiossensor AgNPs-AQP4 <sub>61-70</sub> .....	86
6.2.2.	Nanobiossensor AgNPs-AQP4 <sub>201-210</sub> .....	88

6.2.3.	Nanobiossensores AgNPs-AQP4 <sub>131-140</sub> e AgNPs-AQP4 <sub>141-150</sub> .....	89
6.2.4.	Nanobiossensor AgNPs-AQP4 <sub>291-300</sub> .....	90
6.3	<i>ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE IgGs TOTAIS NA DETECÇÃO DO BIOMARCADOR PELOS NANOBIOSENSORES NAS AMOSTRAS DE PACIENTES ENMO AQP4-IgG SORONEGATIVOS</i> .....	91
6.4	<i>CONSIDERAÇÕES PARCIAIS DA 1ª ETAPA:</i> .....	93
6.5	<i>2ª ETAPA DO PROJETO: TRIAGEM DOS PEPTÍDEOS</i> .....	93
6.5.1.	Porção N-terminal e região intracelular inicial.....	93
6.5.2.	Epítomos adjacentes ao AQP4 <sub>61-70</sub> .....	95
6.5.3.	Região transmembrana AQP4 <sub>81-90</sub> ao AQP4 <sub>101-110</sub> .....	95
6.5.4.	Regiões adjacentes aos epítomos AQP4 <sub>131-140</sub> e AQP4 <sub>141-150</sub> .....	96
6.5.5.	Epítomo adjacente ao AQP4 <sub>201-210</sub> .....	96
6.5.6.	Alça extracelular E .....	97
6.5.7.	Região intracelular do epítomo AQP4 <sub>261-270</sub> ao AQP4 <sub>291-300</sub> .....	97
6.5.8.	Região C-terminal.....	99
6.6	<i>QUANTIFICAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ACURÁCIA DO NANOBIOSENSOR AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub></i> .....	99
6.6.1.	Quantificação da sensibilidade do nanobiossensor AgNPs-AQP4 <sub>61-70</sub> .....	99
6.6.2.	Quantificação da concentração de AQP4-IgG .....	100
6.7	<i>CONSIDERAÇÕES PARCIAIS DA 2ª ETAPA</i> .....	100
7.	CONCLUSÕES.....	103
8.	APÊNDICES.....	104
8.1	<i>APÊNDICE A: CONTROLES (AQP4<sub>1-80</sub>)</i> .....	104
8.2	<i>APÊNDICE B: CONTROLES (AQP4<sub>111-180</sub>)</i> .....	105
8.3	<i>APÊNDICE C: CONTROLES (AQP4<sub>281-300</sub>)</i> .....	106
9.	ANEXO – Parecer consubstanciado do CEP .....	107
10.	REFERÊNCIAS.....	110

## RESUMO

HIGA AM. Sensoriamento óptico do anticorpo AQP4-IgG utilizando nanobiossensores de nanopartículas de prata associados com epítomos da proteína AQP4 [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

As doenças do espectro da neuromielite óptica (ENMO) são classificadas como crônicas inflamatórias e autoimunes, e afetam o sistema nervoso central. Estas se caracterizam pela existência de um biomarcador, o autoanticorpo AQP4-IgG, que reconhece seletivamente a proteína Aquaporina-4 presente nos astrócitos. O biomarcador não é detectado em torno de 10-27% dos pacientes diagnosticados, que são classificados como ENMO soronegativos. A ausência do biomarcador dificulta o processo diagnóstico e a definição terapêutica desses pacientes. Sobre este grupo, discute-se a possibilidade de alguns representarem casos falso-negativos decorrentes da sensibilidade insuficiente dos testes aplicados ou da existência de outros alvos antigênicos nesses pacientes. O primeiro objetivo deste trabalho foi desenvolver um nanobiossensor de nanopartículas de prata (AgNPs) funcionalizadas com epítomos da AQP4, para separar os grupos clínicos ENMO, EM e saudáveis. A partir disso, investigar as hipóteses que permeiam esse grupo, quanto à detecção dependente da concentração dos anticorpos e do epítomo utilizado. Os nanobiossensores que melhor separaram os grupos clínicos foram os AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub> e AgNPs-AQP4<sub>201-210</sub>. Com o nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub> identificamos que a detecção do biomarcador é dependente da concentração e do epítomo conjugado à superfície do nanobiossensor. Visando aumentar a sensibilidade do método para detectar o biomarcador no grupo ENMO soronegativo, foi feita uma triagem dos peptídeos compreendendo toda a extensão da proteína, que contém 323 aminoácidos. A triagem foi feita com epítomos separados a cada 10 aminoácidos. Essa triagem mostrou que os seguintes epítomos: AgNPs-AQP4<sub>1-10</sub>, AgNPs-AQP4<sub>11-20</sub>, AgNPs-AQP4<sub>71-80</sub>, AgNPs-AQP4<sub>81-90</sub>, AgNPs-AQP4<sub>91-100</sub> e AgNPs-AQP4<sub>261-270</sub> são fortes candidatos para comporem sistemas de detecção para reteste de pacientes ENMO soronegativos. A sensibilidade do nanobiossensor melhor estudado neste projeto (AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub>) foi de 84,62%, superior aos métodos convencionais já registrados para a detecção do biomarcador, mas a especificidade foi inferior à deles (66,67%). Os dados obtidos da triagem dos peptídeos, somados ao aumento do número de amostras, pode aumentar a acurácia dos nanobiossensores desenvolvidos para testar aqueles pacientes com diagnóstico clínico de ENMO, mas sem confirmação laboratorial.

Palavras-chave: Nanopartículas. Nanotecnologia. Imunoglobulinas. Peptídeos. Neuromielite óptica. Sensores ópticos.

## ABSTRACT

HIGA AM. Optical sensing of AQP4-IgG antibody using AQP4 peptide conjugated-silver nanoparticle nanobiosensors [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders (NMOSD) are chronic, inflammatory, and autoimmune diseases that affect the central nervous system. The autoantibody AQP4-IgG is the diseases' biomarker and selectively recognizes the aquaporin-4 protein on the astrocytes. Around 10 to 27% of patients are NMOSD seronegative, in whom the autoantibody is not detected. The biomarker absence impairs the diagnostic process and the therapeutic definition of this group of patients. About this group, it is discussed the possibility that some represent false-negative cases due to insufficient sensitivity of the tests applied or the existence of other antigenic targets in these patients. The first objective of this work was to develop a silver nanoparticle (AgNPs) nanobiosensor functionalized with epitopes of AQP4 to separate NMOSD, MS, and healthy clinical groups. From this, investigate the hypotheses that permeate this group regarding the antibody concentration-dependent detection and the epitope used to build the sensor. The nanobiosensors that better separated the clinical groups were AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub> and AgNPs-AQP4<sub>201-210</sub>. Using the AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub>, we identified that biomarker detection depended on the antibody concentration and the epitope conjugated on the nanobiosensors' surfaces. To increase the methods' sensitivity in detecting the biomarker in the samples from the NMOSD seronegative patients, we performed a peptide screening comprising the whole protein, which contains 323 amino acids, separated in epitopes of ten residues. This screening showed that the following epitopes: AgNPs-AQP4<sub>1-10</sub>, AgNPs-AQP4<sub>11-20</sub>, AgNPs-AQP4<sub>71-80</sub>, AgNPs-AQP4<sub>81-90</sub>, AgNPs-AQP4<sub>91-100</sub>, and AgNPs-AQP4<sub>261-270</sub> are strong candidates to compose detection systems for retesting seronegative NMOSD patients. The sensitivity of the best-studied nanobiosensor in this project (AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub>) was 84.62%, higher than conventional methods already registered for the biomarker detection, but the specificity was lower than theirs (66.67%). The data obtained from peptide screening, coupled with a greater number of samples, may increase the accuracy of the nanobiosensors developed to test those patients with a clinical diagnosis of NMOSD but without laboratory confirmation.

Keywords: Nanoparticles. Nanotechnology. Immunoglobulins. Peptides. Neuromyelitis Optica. Optical sensors.

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças inseridas no espectro da neuromielite óptica (ENMO) acometem, principalmente, os nervos ópticos e a medula espinhal e são classificadas como inflamatória, crônica e autoimune (Chang e Chang 2019).

A primeira nomenclatura foi atribuída em 1895 pelo neurologista francês Eugène Devic, que descreveu um caso monofásico de mielite transversa (MT) e neurite óptica (NO) bilateral. Por isso, o neurologista nomeou a síndrome como neuromielite óptica (NMO), que também ficou conhecida como Doença de Devic (Prasad e Chen 2019).

Hoje, sabe-se que a maioria dos casos são recorrentes e podem envolver outras regiões do sistema nervoso central (SNC), além do nervo óptico e da medula espinhal, como o encéfalo, o tronco encefálico e a área postrema (Chang e Chang 2019).

As populações afro-americanas, asiáticas e das índias ocidentais apresentam maior incidência da doença, em comparação com as populações caucasianas. As doenças do ENMO são mais prevalentes em mulheres do que em homens (9-10:1) e a manifestação dos sintomas se dá em torno dos 39 anos de idade (Wingerchuk et al. 2007).

O ano de 2004 foi importante para os avanços no estudo dessa doença, pois foi quando Lennon e colaboradores descobriram um autoanticorpo, o NMO-IgG, que permitiu diferenciar a NMO da esclerose múltipla (EM), sendo que até esse momento, ela era considerada uma variante da EM (Lennon et al. 2004). O diagnóstico diferencial entre as duas é importante para a definição correta do tratamento e, conseqüentemente, para um melhor prognóstico do paciente (Palace et al. 2010; Kessler et al. 2016).

A descrição do antígeno-alvo do autoanticorpo ocorreu no ano seguinte, quando os mesmos pesquisadores identificaram a proteína de canal de água aquaporina-4 (AQP4), expressa nos podócitos dos astrócitos, que formam a barreira hematoencefálica (BHE) (Lennon et al. 2005). Por isso, o autoanticorpo também é descrito na literatura como AQP4-IgG, sendo reconhecido como o biomarcador da patologia (Chen et al. 2020).

O critério diagnóstico sofreu alterações desde sua primeira versão de 1999 (Wingerchuk et al. 1999). O critério foi revisto em 2006 por Wingerchuck e

colaboradores, que passaram a considerar os pacientes com outras lesões no SNC, além da MT e NO, e adicionaram a sorologia positiva para o autoanticorpo AQP4-IgG como suporte no diagnóstico (Wingerchuk et al. 2006).

A versão mais recente dos critérios diagnósticos foi definida em um consenso internacional e publicada em julho de 2015 pelo Painel Internacional para o Diagnóstico da NMO (IPND, do inglês *International Panel for NMO Diagnosis*), destacando a importância do *status* sorológico do AQP4-IgG para o diagnóstico e definiu o novo termo para designar a síndrome: doenças do ENMO (NMOSD, do inglês *Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders*). Assim, o espectro foi estratificado em soropositivo e negativo para o autoanticorpo AQP4-IgG (Wingerchuk et al. 2015).

Desde a identificação do biomarcador e da proteína alvo, diversos testes foram desenvolvidos para a detecção do AQP4-IgG em amostras de soro, buscando alta sensibilidade e especificidade (Ruiz-Gaviria et al. 2015). Dentre eles, destacam-se: a técnica de imunofluorescência indireta com tecidos (IFI, do inglês *Indirect Immunofluorescence*), o método ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) e o ensaio com base em células (CBA, *Cell-Based Assay*) (Waters et al. 2012, 2014). O alto valor preditivo (95%) associado à baixa taxa de falso-positivo tornou o teste CBA a ferramenta diagnóstica recomendada pelo IPND (Prasad e Chen 2019).

Na prática clínica, o critério diagnóstico de 2015 e o uso do CBA possibilitaram um diagnóstico mais precoce, pois pacientes com manifestações clínicas atípicas puderam ser encaminhados mais rapidamente ao tratamento, com a detecção do anticorpo no soro. Apesar da acurácia do teste, o biomarcador não é detectado em cerca de 10 a 27% dos pacientes ENMO, que são classificados como soronegativos ou com *status* sorológico indefinido. A ausência do biomarcador atrasa o diagnóstico e a definição terapêutica desse grupo (Wingerchuk et al. 2007; Prasad e Chen 2019).

Possivelmente, esses pacientes compõem um grupo heterogêneo, que incluem casos falso-negativos e pacientes que produzem anticorpos contra outros alvos, podendo ser epítomos distintos ou outros antígenos (Papadopoulos e Verkman 2012).

Atualmente, estuda-se o envolvimento da glicoproteína oligodendrocítica da mielina (MOG, do inglês *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*), o componente mais

externo da bainha de mielina no SNC (Hamid et al. 2017). Mas já se sabe que os mecanismos celulares e moleculares nos pacientes MOG-IgG soropositivos/AQP4-IgG soronegativos são diferentes dos AQP4-IgG soropositivos, levantando discussões acerca da categorização mais adequada desse grupo.

Nesse sentido, o estudo da proteína AQP4, com o objetivo de identificar os epítomos-alvo das células do sistema imune pode preencher algumas lacunas referentes ao mecanismo da doença dentro do espectro, contribuindo para o aprimoramento dos testes diagnósticos, no sentido de torná-los mais sensíveis ao biomarcador e acelerar a conclusão do diagnóstico. Além do aprimoramento diagnóstico, o conhecimento detalhado dos alvos envolvidos pode resultar no desenvolvimento de tratamentos epítomo-específicos (Sinmaz et al. 2016).

Em termos práticos, a identificação dos epítomos específicos aos autoanticorpos pode resultar na reclassificação de alguns pacientes e esclarecer as variações dos fenótipos clínicos que podem estar associados a epítomos-alvo distintos, um exemplo disso ocorreu na síndrome *Guillain-Barré*.

Aproximadamente 60% dos pacientes acometidos por essa síndrome apresentam anticorpos anti-gangliosídeos, dentre os quais as imunoglobulinas G (IgGs) reativas contra a GM1 são as mais frequentemente detectadas no soro dos pacientes. Entretanto, foi observado que fenótipos clínicos distintos podem estar relacionados com diferentes alvos antigênicos, envolvendo os autoanticorpos e outras formas de gangliosídeos. Essa descoberta possibilitou a detecção dos autoanticorpos e a reclassificação de uma parcela dos pacientes previamente diagnosticados como soronegativos (Kaida e Kusunoki 2008).

Recentemente, a nanotecnologia avançou no campo da medicina, principalmente no desenvolvimento de novos dispositivos para o diagnóstico e tratamento de doenças. As nanoestruturas ganharam espaço na medicina devido à alta biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*, compatibilidade de tamanho com as biomoléculas, capacidade de ultrapassar barreiras biológicas e de detectar interações moleculares com alta especificidade e sensibilidade (Sousa et al. 2018).

Apesar desse avanço, as nanopartículas ainda não foram exploradas no campo de pesquisa das doenças desmielinizantes, por isso, o objetivo deste projeto foi incluir as

nanopartículas nessa extensa e complexa investigação da interação do anticorpo AQP4-IgG com a proteína AQP4 nas doenças do ENMO. Neste contexto, nanobiossensores de nanopartículas foram desenvolvidos para a detecção do biomarcador, visando aproveitar as novas propriedades que a nanoescala produz.

Os nanobiossensores consistem em estruturas compostas de um elemento biológico, como enzimas, proteínas e DNA, associado a um nanossensor. A biomolécula associada à nanoestrutura deve se ligar ao seu alvo de maneira específica e sensível. O nanossensor é capaz de transformar a interação entre a molécula e seu alvo em um sinal detectável e mensurável (Hong et al. 2012).

As nanopartículas de prata (AgNPs) foram escolhidas para o desenvolvimento dos nanobiossensores, devido à sensibilidade de suas superfícies ao ambiente químico e biológico circundante, produzindo sinais ópticos observáveis e de fácil leitura e medição (Kvítek et al. 2013; Lizoń et al. 2019).

Quando um determinado peptídeo é conjugado às AgNPs para constituir o nanobiossensor e ocorre a ligação do anticorpo específico à essa sequência, as nanopartículas aproximam-se num processo denominado agregação, promovendo alterações nas propriedades ópticas das nanopartículas (Vilela et al. 2012; Yeo et al. 2015). Essas mudanças resultam em alterações perceptíveis de cor na suspensão de nanopartículas com deslocamento e a formação de novas bandas no espectro eletromagnético (Sabela et al. 2017). A construção desse tipo de nanobiossensor é versátil e envolve baixos custos.

Diante das propriedades das AgNPs e da necessidade de investigação dos epítomos-alvo do anticorpo AQP4-IgG, foram desenvolvidos nanobiossensores, genericamente denominados AgNPs-AQP4pep, para serem usados em ensaios com soluções de IgGs purificadas de amostras de soro de pacientes ENMO, EM e saudáveis, a fim de analisar a especificidade da técnica ao biomarcador-alvo e a sensibilidade na detecção do anticorpo em amostras previamente classificadas como soronegativas, com o objetivo de avaliar se há a ocorrência de interação epítomo-específica nesse grupo.

Em resumo, o trabalho foi dividido em duas etapas. Na primeira foram utilizadas apenas cinco sequências da proteína, a fim de padronizar a técnica para a detecção do

autoanticorpo AQP4-IgG, de modo a separar os grupos clínicos. Na segunda etapa, foram realizados ensaios com os outros epítomos da AQP4, para verificar possíveis diferenças na detecção do anticorpo, especialmente no fenótipo soronegativo, de acordo com os epítomos usados na construção do nanobiossensor.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Desenvolver nanobiossensores de AgNPs para detecção do anticorpo AQP4-IgG em soluções de IgGs purificadas de amostras de soro de pacientes ENMO, previamente classificados como soropositivos e negativos, de modo a diferenciá-los dos controles negativos: pacientes com EM e saudáveis. Além disso, investigar diferenças no reconhecimento epítipo-anticorpo ao longo da extensão da proteína AQP4, a fim de aumentar a sensibilidade do nanobiossensor com o uso de epítopos que possam identificar o biomarcador naquelas amostras previamente classificadas como soronegativas pelo CBA.

### 2.2 ESPECÍFICOS

#### 2.2.1. 1ª etapa: desenvolvimento do nanobiossensor

- i) Desenvolver nanobiossensores de AgNPs funcionalizadas com cinco epítopos (AQP4<sub>61-70</sub>, AQP4<sub>131-140</sub>, AQP4<sub>141-150</sub>, AQP4<sub>201-210</sub> e AQP4<sub>291-300</sub>) da proteína AQP4, para a separação dos fenótipos clínicos: ENMO AQP4-IgG soropositivo, soronegativo, EM e indivíduos saudáveis.
- ii) Investigar a influência da concentração das IgGs e dos epítopos da AQP4 conjugados ao nanobiossensor na detecção do biomarcador no fenótipo clínico soronegativo.

##### 2.2.1.1. Quantificação dos parâmetros de acurácia do nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub>

- iii) Quantificar a sensibilidade do nanobiossensor mais sensível e específico na detecção do biomarcador e diferenciação dos grupos clínicos.
- iv) Quantificar a concentração de IgGs em amostras tituladas, por meio da construção de uma curva de calibração.

2.2.1.2. Caracterização das nanopartículas e do nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub>

- v) Fazer a caracterização dos processos sintético e de funcionalização das AgNPs.

**2.2.2. 2ª etapa: triagem dos peptídeos**

- i) Investigar se ocorre detecção do autoanticorpo AQP4-IgG do tipo epítipo-específica no fenótipo soronegativo utilizando os outros epítipos da proteína AQP4.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 DOENÇAS DO ESPECTRO DA NEUROMIELITE ÓPTICA

##### 3.1.1. Evolução do conceito de NMO e de doenças do ENMO

O neurologista francês Eugène Devic foi o primeiro a utilizar o termo *neuro-miélite optique aiguë*, NMO, no final do século XIX, em 1895, para descrever uma nova síndrome caracterizada por MT e NO (Jarius e Wildemann 2013b).

A descrição clínica e anatômica foi realizada a partir do caso de uma mulher de 45 anos, que inicialmente apresentou fraqueza nas pernas e retenção urinária. Passados alguns dias, a paciente desenvolveu perda sensorial progressiva nas pernas e dos reflexos dos tendões. Algumas semanas depois, apresentou perda visual bilateral, com edema no disco óptico e pupilas não responsivas à luz (Prasad e Chen 2019).

Na autópsia, Devic descreveu lesões necróticas na medula espinhal e nos nervos ópticos. Com esta observação, ele nomeou a síndrome como NMO e salientou que o mecanismo da doença permanecia desconhecido. Ele observou que a síndrome acometia dois locais anatômicos distintos, sem estrutura de ligação entre eles. Porém, a causa era o mesmo processo que acontecia simultaneamente, ou com um curto intervalo de tempo entre o ataque ao nervo óptico e à medula espinhal. Na conclusão do artigo, ele deixou dois questionamentos: por que esses locais são afetados? Qual a natureza desse processo? (Prasad e Chen 2019).

Ao longo do século XX, o significado e a extensão do termo NMO mudaram várias vezes, juntamente com os critérios diagnósticos. Alguns critérios excluíram características que hoje são reconhecidas, por exemplo, a existência do curso recorrente da doença, um longo intervalo entre dois eventos sintomáticos, NO unilateral, lesões sintomáticas no encéfalo e tronco encefálico, síndrome de *Sjögren* ou lúpus eritematoso sistêmico coexistentes e lesões mais curtas do que a extensão de dois segmentos vertebrais (Jarius e Wildemann 2013b).

Atualmente, sabe-se que a NMO, na maioria dos casos, é uma doença recorrente e, além dos nervos ópticos e da medula espinhal, pode envolver o encéfalo. Alguns

pacientes, principalmente não caucasianos, têm o tronco encefálico e a área postrema afetados e, por isso, manifestam sintomas como vômito e soluço (Kremer et al. 2014).

Em 1930, Russel Brain fez uma revisão sobre a NMO e a EM, referida em seu artigo como esclerose disseminada, e concluiu que as diferenças nos aspectos clínicos e patológicos eram limitadas à intensidade dos surtos e que isso não justificava a separação das duas. Assim como ele, outros pesquisadores consideravam a NMO uma variante da EM (Brain 1930).

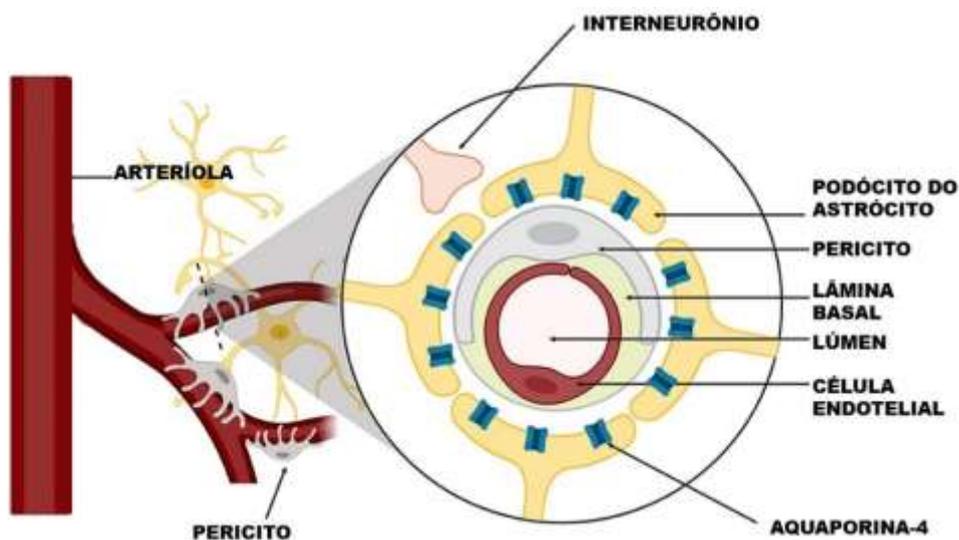
A descoberta do auto anticorpo NMO-IgG em 2004 foi importante para o reconhecimento da NMO como uma doença distinta de EM, evidenciando as singularidades patológicas e imunológicas. Essa descoberta foi feita por Lennon e colaboradores na Clínica *Mayo*, que detectaram o biomarcador NMO-IgG em, aproximadamente, 73% dos pacientes com NMO e constataram que esse anticorpo era praticamente ausente nas outras doenças (Lennon et al. 2004).

No ano seguinte, os pesquisadores descreveram o antígeno-alvo do anticorpo, que é a proteína AQP4, por isso, o autoanticorpo NMO-IgG é, atualmente, denominado AQP4-IgG, sendo a causa e o biomarcador da doença. (Lennon et al. 2005).

A AQP4 é uma proteína de canal de água expressa nos podócitos dos astrócitos, que fazem contato com o endotélio dos vasos sanguíneos, a lâmina basal e os pericitos, fazendo parte da composição da BHE. Nesta localização, os astrócitos desempenham importantes funções relacionadas à manutenção da homeostase cerebral e de suporte aos neurônios, cuidando do equilíbrio de íons, aminoácidos, água e neurotransmissores. Também é expressa nas células ependimárias, que revestem os ventrículos (Abbott et al. 2006; Mathiisen et al. 2010) (Figura 1).

Figura 1– Corte transversal de um capilar sanguíneo. Esquema mostrando a interação entre os podócitos dos astrócitos (em amarelo) com uma célula endotelial de um capilar sanguíneo,

compondo a BHE, juntamente com o pericito e a lâmina basal. Nos podócitos dos astrócitos estão representadas as proteínas de canal de água, aquaporina-4, em azul.



Fonte: Traduzido e modificado de Tice et al. (2020).

A descoberta desse autoanticorpo mudou a forma de caracterizar a NMO, pois as restrições que eram feitas nos critérios diagnósticos passados eram uma tentativa de separar a EM e a NMO com base em apresentações clínicas e radiológicas. Com o autoanticorpo, foi possível diferenciar as doenças com base em teste laboratorial e aceitar a existência de algumas sobreposições clínicas e radiológicas com outras doenças, culminando na ampliação do termo NMO (Jarius e Wildemann 2013b).

A diferenciação entre as duas é importante pois a imunoterapia usada para tratar os pacientes com EM incluem drogas como interferon beta, fingolimode, natalizumabe e alemtuzumabe que são ineficazes para as doenças do ENMO e podem, inclusive, exacerbar seus sintomas (Contentti e Correale 2021).

O termo doenças do ENMO foi introduzido para expandir a definição de NMO, incluindo outras manifestações clínicas, além da NMO típica (doença de *Devic*), caracterizada por NO aguda bilateral e MTLE. O termo inclui apresentações clínicas com ou sem o autoanticorpo, ou com *status* sorológico indefinido. Dessa forma, pacientes com manifestações atípicas como NO unilateral, MT isolada ou recorrente, ou lesões no cérebro, com ou sem anticorpo detectável, foram incluídos no espectro (Bruscolini et al. 2018).

### 3.1.2. Versões dos critérios diagnósticos

A evolução no entendimento da doença foi refletida nas versões dos critérios diagnósticos, desde a primeira versão de 1999, depois a revisão em 2006 e a mais recente publicada em julho de 2015 em um consenso internacional: o painel internacional para o diagnóstico da NMO ou IPND.

No ano de 1999, Wingerchuk e colaboradores fizeram a primeira avaliação sistemática de cursos monofásico e recorrente de NMO, quanto à demografia, apresentação clínica, imagem de ressonância magnética (IRM) e conteúdo do líquido cefalorraquidiano (LCR). A NMO estrita foi caracterizada pela apresentação de NO bilateral e MT ocorrendo em um intervalo de até 2 anos. A NMO não estrita incluía casos de NO unilateral ou eventos de desmielinização recorrentes em um período maior do que 2 anos (Wingerchuk et al. 1999).

Este critério incluía três requisitos absolutos: NO, MT e nenhuma outra doença desmielinizante no encéfalo. Para diagnosticar um paciente com NMO, os critérios absolutos deveriam ser atendidos, juntamente com um dos três critérios de apoio principal ou então dois dos critérios secundários (Tabela 1).

Tabela 1 – Critério diagnóstico de NMO de 1999

<b>Critérios absolutos</b>
NO MT
Nenhuma evidência clínica fora do nervo óptico ou da medula espinhal.
<b>Critérios principais (apoio)</b>
IRM no encéfalo sem lesões no início; IRM na medula com lesões estendidas por três ou mais segmentos vertebrais; Pleocitose no LCR superior a 50 leucócitos/mm <sup>3</sup> ou superior a 5 neutrófilos/mm <sup>3</sup> .
<b>Critérios secundários (apoio)</b>
NO nos dois olhos; NO grave com acuidade visual não variável, prejudicando mais do que 20/200, 80% de perda, em um dos olhos, pelo menos. Fraqueza acentuada, não variável e associada ao surto inflamatório acometendo um ou mais membros do corpo.

Fonte: Traduzido de Wingerchuk et al. (1999).

Nessa época, não era comum o diagnóstico de EM em países da Ásia e, por isso, aqueles pacientes que apresentavam NO recorrente ou mielite isoladas eram diagnosticados com EM óptico-espinhal e aqueles com sintomas neurológicos

envolvendo o encéfalo com ou sem manifestação de NO e MT eram diagnosticados como EM convencional (Fujihara 2019).

Em 2006, dois anos após a descoberta do biomarcador, Wingerchuk e colaboradores revisaram os critérios diagnósticos (Tabela 2). A NMO foi definida pelos seguintes critérios absolutos: ataques sequenciais ou simultâneos de NO e MT, e a presença de 2 ou 3 critérios de apoios: IRM de encéfalo inconsistente com EM, MTLE ou soro positivo para AQP4-IgG (Wingerchuk et al. 2006).

Tabela 2 – Critério diagnóstico de NMO revisado por Wingerchuk e colaboradores em 2006

<b>Critérios absolutos</b>
NO MT
<b>Critérios de apoio (ao menos, dois de três)</b>
IRM com lesão ligada à medula espinhal, se estendendo por três ou mais segmentos vertebrais (MTLE); IRM do encéfalo sem lesões com padrão de EM; Soro positivo para AQP4-IgG.

Fonte: Wingerchuk et al. (2006)

A inclusão do anticorpo como suporte no diagnóstico resultou no reconhecimento de pacientes soropositivos com apresentações clínicas atípicas ou espacialmente limitadas. Dessa forma, pacientes soropositivos com eventos monofásicos ou recorrentes de NO ou MT entraram no espectro da NMO. Outros pacientes apresentaram autoimunidade sistêmica ou anormalidades nas IRMs do encéfalo NMO-específicas (Bennett 2016).

Apresentações clínicas atípicas incluíram náuseas prolongadas, vômito, narcolepsia, encefalopatia e síndromes do tronco encefálico refletindo lesões na medula dorsal, na área postrema, hipotálamo, regiões límbicas, tronco encefálico e substância branca. Essas apresentações clínicas não estavam incluídas no critério revisado de 2006, mas foram consideradas *formes frustes* da doença, pois esses indivíduos geralmente desenvolviam NO ou MT subsequentemente (Bennett 2016).

Com a identificação do autoanticorpo, outro grupo de pacientes foi reconhecido. Entre 20 e 30% dos pacientes que atendiam aos critérios de 2006 para NMO, eram soronegativos para o anticorpo ou possuíam *status* sorológico indefinido (Contentti e

Correale 2021). Por isso, o critério diagnóstico revisado em 2015 (Tabela 3) estabeleceu diretrizes para o diagnóstico de casos soropositivos, negativos ou indefinidos, sendo que, nesses últimos, os critérios são uma mistura de características clínicas e radiológicas (Wingerchuk et al. 2015).

Tabela 3 – Critério diagnóstico elaborado pelo IPND no ano de 2015

<b>Critério para ENMO positivo para AQP4-IgG</b>
Apresentar, no mínimo, uma característica clínica principal*; Soro positivo para o anticorpo AQP4-IgG usando o CBA; Descartar diagnósticos alternativos sem o anticorpo AQP4-IgG;
<b>Critério para ENMO negativo ou <i>status</i> indeterminado para AQP4-IgG</b>
Apresentar, no mínimo, duas características clínicas principais*, como resultado de um ou mais episódios clínicos e que satisfaçam os seguintes critérios: Apresentar pelo menos uma característica clínica principal*: NO, MTLE ou síndrome da área postrema; Ocorrer a disseminação de lesões no espaço (duas ou mais características clínicas principais*); Preencher os requisitos adicionais de RM, quando for aplicável; Soro negativo para AQP4-IgG, usando o CBA ou resultado indeterminado; Afastamento de outros diagnósticos
<b>Requisitos adicionais de IRM para ENMO negativo ou indeterminado para AQP4-IgG</b>
NO grave demanda:
IRM do encéfalo normal ou com lesões não específicas na substância branca ou IRM 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), que se estende além de metade do nervo óptico ou que atinge o quiasma óptico.
MT grave demanda:
Lesão intramedular se estendendo para além de três segmentos vertebrais (MTLE) ou; atrofia focal da medula espinhal contínua para além de três segmentos vertebrais em pacientes com histórico prévio compatível com MT grave.
<b><i>Síndrome da área postrema:</i></b> demanda lesão na medula dorsal ou na área postrema
<b><i>Síndrome grave do tronco encefálico:</i></b> demanda lesão periependimária do tronco encefálico
<b>*Características clínicas principais</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. NO</li> <li>2. MT grave</li> <li>3. Síndrome da área postrema: episódios inexplicáveis de soluços, náuseas ou vômitos</li> <li>4. Síndrome grave do tronco encefálico</li> <li>5. Narcolepsia sintomática ou síndrome clínica diencefálica grave com lesões típicas de ENMO na IRM</li> <li>6. Síndrome encefálica sintomática com lesões típicas de ENMO na IRM</li> </ol>

Fonte: Traduzido de Wingerchuk et al. (2015)

Os pacientes soronegativos para o anticorpo AQP4-IgG devem apresentar um episódio de NO, MT ou síndrome da área postrema, e um segundo episódio envolvendo

esses locais ou outros no tronco encefálico, no diencéfalo ou outra síndrome encefálica. Quando o paciente é soropositivo para o AQP4-IgG, o diagnóstico pode ser definido com base em um único episódio clínico incluindo qualquer um dos seis critérios clínicos (Wingerchuk et al. 2015).

Na prática clínica, os novos critérios possibilitaram um diagnóstico mais precoce, pois não exigem a manifestação simultânea ou sequencial de NO e de MT. Além disso, pacientes com o acometimento do encéfalo e soropositivos para o anticorpo são incluídos no espectro, permitindo o encaminhamento destes para uma terapia profilática, visto que muitos desenvolvem NO ou MT, subsequentemente. Dessa forma, alguns sinais e sintomas atípicos e casos monossintomáticos podem levar o neurologista a investigar a presença do biomarcador, com o teste sorológico (Bennett 2016).

A incorporação do grupo soronegativo ao espectro da NMO dividiu opiniões durante as discussões do IPND, pois o espectro não teria uma identidade homogênea. Mas, esse grupo foi considerado como parte do espectro, levando-se em consideração que o diagnóstico da ENMO é clínico e, se o resultado positivo para o biomarcador se tornasse um critério absoluto, a doença poderia não ser diagnosticada em áreas nas quais os testes não são acessíveis. Além disso, casos de NMO típica e soronegativos para o anticorpo AQP4-IgG existem e não podem ser desconsiderados (Fujihara 2019).

Dentre os soronegativos, até 40% são soropositivos para o anticorpo MOG-IgG (Contentti e Correale 2021). Esses pacientes são tipicamente homens com NO e MT simultâneas e doença com curso monofásico. O início dos sintomas ocorre em torno dos 30 anos, a prevalência entre homens e mulheres segue uma razão de 1:1 e os sintomas tendem a ser mais brandos, comparado ao grupo positivo para o AQP4-IgG. O envolvimento do quiasma óptico raramente ocorre e a mielite costuma atingir a região lombossacral (Sato et al. 2014).

Os mecanismos celulares e moleculares desse perfil são diferentes. O ENMO com AQP4-IgG é uma astrocitopatia autoimune, já o grupo com MOG-IgG tem a bainha de mielina como alvo, ao invés dos astrócitos. Por isso discute-se a categorização desse fenótipo, se deveria estar no grupo doenças do ENMO ou seria um subgrupo da EM ou encefalomielite disseminada aguda (Kitley et al. 2014).

### 3.1.3. Métodos de detecção do anticorpo AQP4-IgG

Após a identificação da proteína alvo do autoanticorpo, diversos testes foram desenvolvidos e aprimorados com relação à acurácia (sensibilidade e especificidade), para a detecção do AQP4-IgG em amostras sorológicas de pacientes.

A técnica de imunofluorescência indireta com tecidos (Figura 2A) de camundongos, ratos ou primatas gera alta taxa de falso-positivo. Neste teste, o soro dos pacientes é adicionado a tecidos congelados e a detecção do AQP4-IgG se dá pela ligação de um anticorpo secundário fluorescente (Lennon et al. 2004).

O método ELISA (Figura 2D) é um teste mais sensível do que o anterior, pois utiliza a proteína AQP4 humana parcialmente purificada. Os tetrâmeros de AQP4 são fixados nos poços das placas, seguidos da adição dos soros dos pacientes contendo o AQP4-IgG. Uma reação entre tetrâmeros de AQP4 biotinizados e peroxidase marcada com estreptavidina resulta em respostas colorimétricas, permitindo a detecção e quantificação do AQP4-IgG nas amostras (Waters et al. 2012).

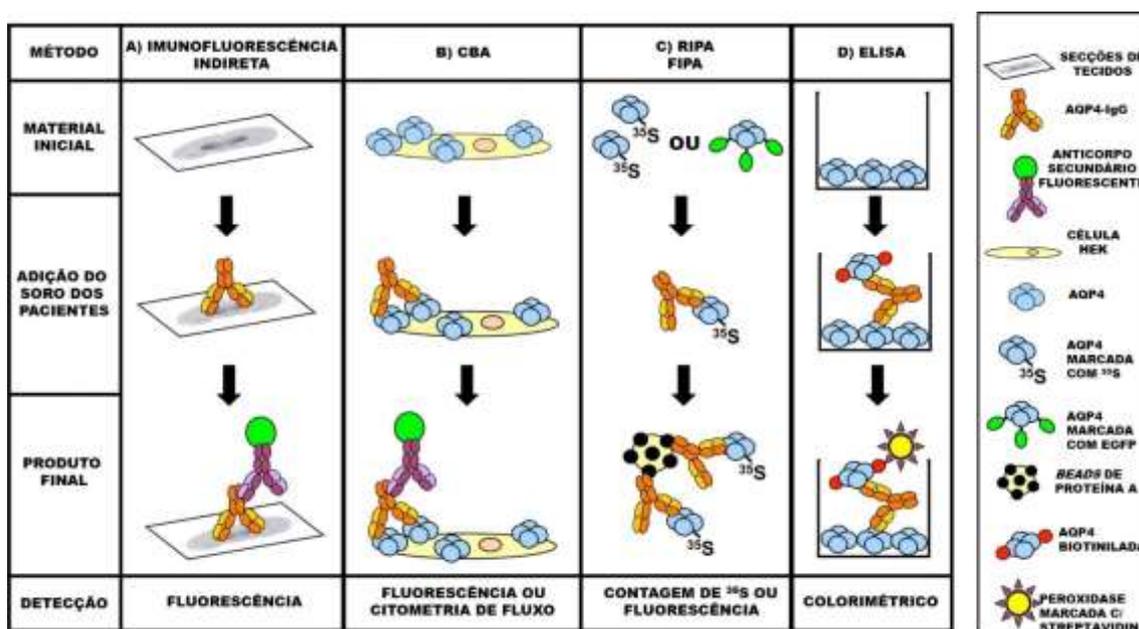
Os ensaios de radioimunoprecipitação e imunoprecipitação por fluorescência (Figura 2C) utilizam o mesmo princípio de ligação dos anticorpos AQP4-IgG aos tetrâmeros de AQP4 marcados com radioisótopo ou proteína fluorescente, respectivamente. Porém, esses métodos ainda apresentam a limitação de não permitir a mesma conformação estrutural da proteína, como ocorre nas membranas das células, o que diminui a sensibilidade e especificidade desses testes (Waters et al. 2012).

O CBA (Figura 2B) supera essa limitação, pois utiliza células renais embrionárias humanas transfectadas com um plasmídeo, para expressar os tetrâmeros de AQP4 em sua conformação nativa nas membranas das células. A detecção do AQP4-IgG é realizada por fluorescência com um anticorpo secundário fluorescente e quantificado por citometria de fluxo (Prasad e Chen 2019).

Dentre os testes mencionados, o CBA apresenta maior média de sensibilidade (76,5%), seguido pelo ELISA (61,8%) e pelos métodos de imunofixação em tecido (61,2%). Com relação à especificidade, o CBA apresenta 99,8%, seguido pelo ELISA (96,6%) e métodos de imunofixação em tecido (96,6%). O alto valor preditivo (95%)

associado à baixa taxa de falso-positivo tornou o teste CBA uma importante ferramenta diagnóstica (Waters et al. 2014).

Figura 2 – Técnicas usadas na detecção do anticorpo AQP4-IgG. O esquema é um resumo do fundamento básico de cada técnica: imunofluorescência indireta (A), *cell-based assay* (CBA) (B), imunoprecipitação por radio e imunofluorescência (RIPA e FIPA) (C) e por colorimetria com ELISA (D).



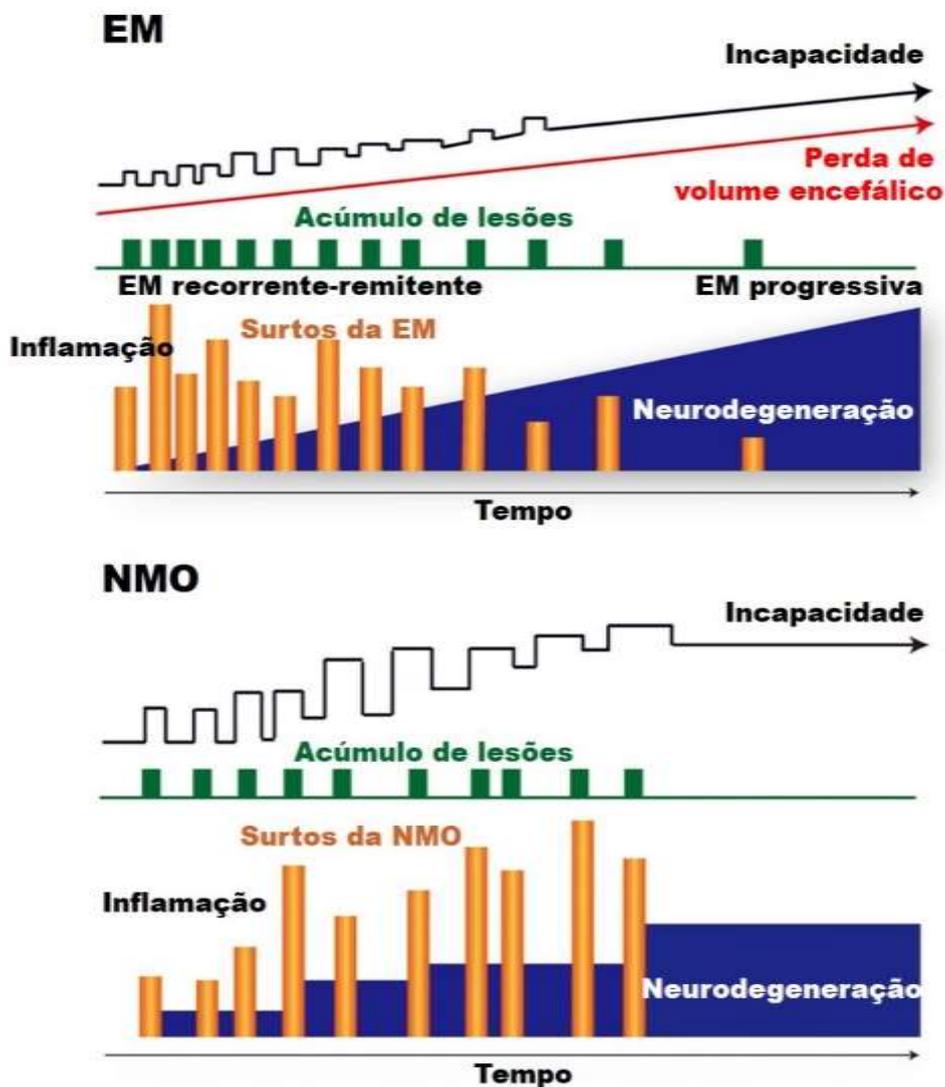
Fonte: Traduzido de Waters et al. (2014)

### 3.1.4. Cursos das doenças do ENMO e suas características clínicas

As doenças do ENMO são predominantemente recorrentes, com surtos inflamatórios agressivos, que resultam no acúmulo de lesões e sequelas por neurodegeneração. São raros os casos de curso progressivo e mais de 90% dos pacientes com curso recorrente são mulheres (Pittock et al. 2021). O curso recorrente pode levar à cegueira e paralisia, diferentemente dos pacientes com EM, que geralmente sofrem surtos mais brandos e apresentam boa recuperação (Figura 3). O tempo mediano para a primeira recidiva é de 5 a 12 meses, mas ela pode ocorrer até 10 anos depois, ou mais (Prasad e Chen 2019).

Figura 3 – Comparativo entre os cursos da EM e NMO. O curso recorrente-remittente é mais prevalente nas duas doenças, do que o progressivo. A neurodegeneração está presente desde os primeiros surtos da NMO, quando há exacerbação da atividade inflamatória, levando ao acúmulo de lesões e sequelas. Os surtos na

NMO tendem a ser mais severos do que na EM. Outros mecanismos, além dos surtos inflamatórios, parecem estar presentes na história natural de progressão da EM.



Fonte: Traduzido de Kawachi e Lassmann (2017).

No caso das gestantes, as recidivas aumentam no terceiro semestre e no período pós-parto, devido aos níveis elevados de estrogênio, o contrário ocorre na EM, em que o risco de recidiva diminui nesse período. Elas também apresentam um risco aumentado de desenvolverem complicações na gestação, como o aborto espontâneo e pré-eclâmpsia, levando à exacerbação da inflamação (Davoudi et al. 2016).

Os sintomas nas recidivas pioram ao longo dos dias e melhoram, gradativamente, nas semanas e meses após atingir a gravidade máxima. Porém, a recuperação é incompleta e as sequelas vão se acumulando a cada recidiva (Wingerchuk et al. 1999).

O consenso internacional, que estabeleceu os novos critérios diagnósticos, reconheceu algumas características clínicas particularmente sugestivas de ENMO: NO simultaneamente bilateral, envolvendo o quiasma óptico, que causa um defeito no campo visual altitudinal, ou perda visual severa, síndrome da medula espinhal completa, síndrome clínica da área postrema, consistindo em soluço não tratável, náusea e vômito (Wingerchuk et al. 2015).

Comumente, a NO resulta em dor ocular com perda visual, e a MT, em paraplegia, perda sensorial e disfunção da bexiga. Quando a mielite cervical se estende para o tronco encefálico, ela resulta em náuseas, soluços ou insuficiência respiratória neurogênica aguda. A desmielinização na medula espinhal causa espasmos tônicos paroxísticos dolorosos nos membros e no tronco, que duram de 20 a 45 segundos e o sintoma de *Lhermitte*, que é a sensação de choque na coluna cervical e lombar, que irradia para os membros inferiores, causado pela flexão do pescoço (Wingerchuk e Weinshenker 2003).

No início da NMO, as IRMs parecem normais, exceto pela apresentação de lesão no nervo óptico com realce ao gadolínio endovenoso durante um surto agudo de NO ou lesões na substância branca que não satisfazem todos os critérios de neuroimagem para diagnóstico de EM. As lesões no tronco encefálico podem ocorrer isoladamente ou como extensão da mielite cervical. Em cerca de 60% dos pacientes, as lesões no encéfalo aparecem mais tarde, em média 6 anos após o diagnóstico e, geralmente, não manifestam sintomas (De Seze et al. 2002; Pittock et al. 2006).

Durante os surtos de mielite, aparecem lesões medulares hiperintensas em T2, que são longitudinalmente extensas e acometem três ou mais segmentos vertebrais contíguos (De Seze et al. 2002).

### **3.1.5. Epidemiologia**

As doenças do ENMO são mais prevalentes entre as mulheres, em comparação com os homens, em uma proporção de 9-10:1 em soropositivos e 2:1 em soronegativos (Hor et al. 2020). A manifestação da doença ocorre mais tardiamente, quando comparada à EM, sendo aproximadamente aos 39 anos na ENMO e entre 25 e 29 anos na EM, mas pode atingir também crianças e idosos (Wingerchuk et al. 2007).

A prevalência das doenças do ENMO é de 0,37 a 4,4 a cada 100.000 indivíduos, com tendência crescente após os testes sorológicos do autoanticorpo AQP4-IgG. A maior incidência é registrada em Martinica (Caribe), com 10 diagnosticados a cada 100.000 indivíduos. A incidência também é maior nas populações afro-americanas, asiáticas e das índias ocidentais, em relação às populações caucasianas (Mori et al. 2018).

Diferentemente da EM, as doenças do ENMO são mais comuns em populações com menos interferência europeia na composição gênica. Entre os afro-brasileiros, 15% dos casos de doenças desmielinizantes são ENMO, nas índias ocidentais, 27%, no Japão, entre 20 e 30%, e no leste asiático, incluindo Hong Kong, 36% dos casos de doenças desmielinizantes são ENMO. Na Singapura, 48% são ENMO e, nas índias, de 10 a 23%. Nos Estados Unidos e na Europa, a prevalência de ENMO é 50 a 100 vezes menor do que a EM (Wingerchuk et al. 2007).

O panorama brasileiro revela que a epidemiologia de ENMO no Brasil segue o padrão mundial. Observa-se maior prevalência entre as mulheres, seguindo uma razão de 8:1. A idade média é de 40 anos, com maior incidência entre os indivíduos não-caucasianos (Del Negro et al. 2017).

### **3.1.6. Etiologia**

Como a doença é mais prevalente entre populações não-caucasianas, foi sugerida a existência de uma predisposição genética. A ocorrência de ENMO familiar também contribuiu para essa hipótese, mas apenas 3% dos casos possui histórico familiar envolvido (Matiello et al. 2010).

A presença do anticorpo AQP4-IgG foi associada aos haplótipos HLA-DRB1\*03 (DR3) em populações francesa e brasileira (Alvarenga et al. 2017), e o HLA-DPB1\*0501, em populações chinesa e japonesa (Wang et al. 2011). Esses haplótipos também estão associados com outras doenças autoimunes, como o lúpus eritematoso sistêmico e a miastenia grave (MG), que são mais comuns em membros familiares de pessoas diagnosticadas com ENMO (Matiello et al. 2010).

Infecções virais e bacterianas parecem ser gatilhos para a manifestação e recidiva de sintomas neurológicos, em pelo menos 15 a 35% dos casos de ENMO. Dentre as

infecções virais, o vírus varicela zoster (VZV) em combinação com o vírus HIV, o citomegalovírus (CMV), os vírus da dengue e hepatite A parecem preceder a ENMO. Infecções bacterianas por *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Treponema pallidum* também foram associadas com a ENMO (Sellner et al. 2010).

A patogenia da ENMO causada por uma infecção pode envolver um desses mecanismos: (i) ativação *bystander*, por danos às proteínas AQP4 de células epiteliais, que iniciam um processo de apresentação de antígenos às células T e ativam células B AQP4 específicas; (ii) mimetismo molecular, por similaridade entre as proteínas do patógeno e proteínas próprias, que levam ao direcionamento errado das células B contra as proteínas do próprio organismo e (iii) infecção sistêmica pode causar sintomas neurológicos ao produzir citocinas pró-inflamatórias capazes de causar danos aos astrócitos e células endoteliais (Libbey et al. 2007; Mackay et al. 2008).

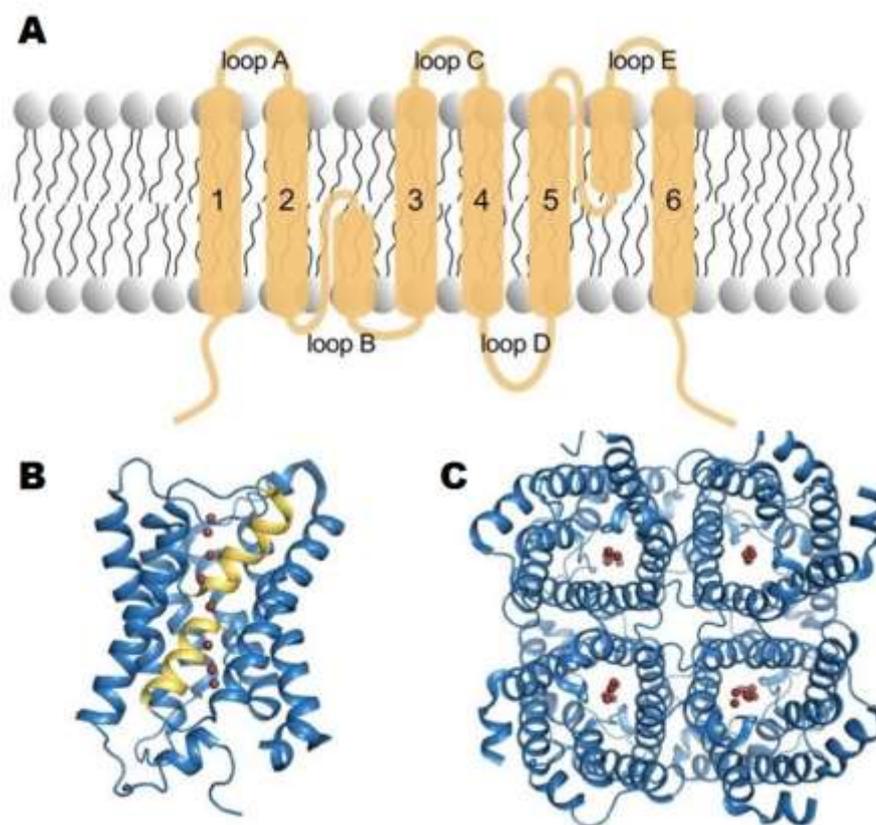
### 3.1.7. Proteína aquaporina-4 (AQP4)

A proteína AQP4 pertence à família das aquaporinas, que possui 13 membros (AQP0-12) identificados em células humanas. As aquaporinas são proteínas de canal de água, que permitem o fluxo bidirecional de água através da membrana, em resposta ao gradiente osmótico (Hasegawa et al. 1994).

Cada monômero possui seis segmentos helicoidais de membrana (1-6) e dois segmentos helicoidais menores, que formam um poro de água. Na estrutura, também há alças extracelulares que compõem os *loops* A, C e E, e *loops intracelulares*, B e D (Figuras 4A e B). Os monômeros se arranjam em tetrâmeros na membrana plasmática, por onde ocorre o movimento bidirecional de água (Figura 4C) (Ho et al. 2009).

Figura 4 – Estrutura da proteína AQP4. Representação esquemática da topologia da proteína AQP4, mostrando os segmentos helicoidais (1-6) e as alças extra e intracelulares (loops A-E) (A). Visão lateral do monômero da proteína AQP4 (B). Arranjo dos monômeros em tetrâmero na

membrana plasmática, cada um formando um poro por onde as moléculas de água, representadas em vermelho, passam de um lado a outro.

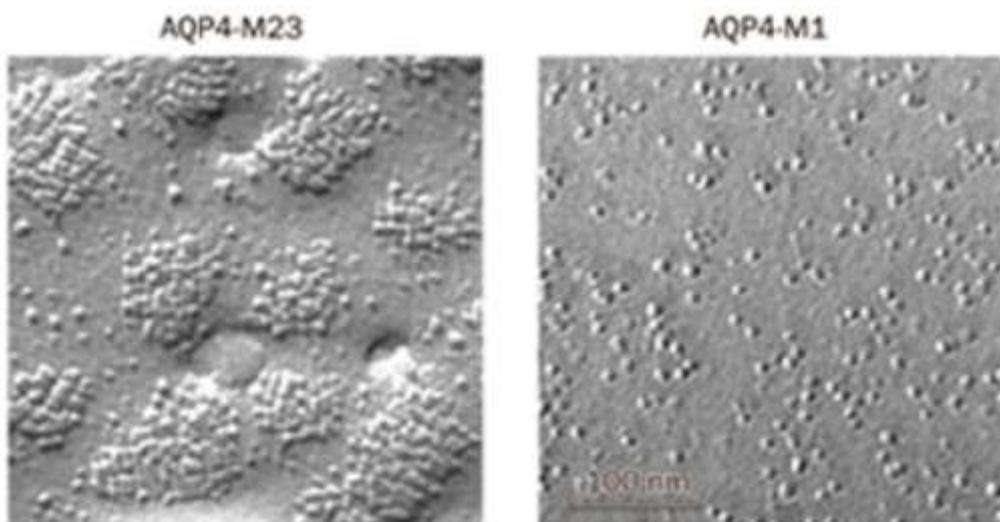


Fonte: Adaptado de Nesverova e Törnroth-Horsefield (2019)

Há duas isoformas principais em humanos que resultam de *splicing* alternativo, uma isoforma longa, na qual a tradução é iniciada na Met-1 (AQP4-M1) e a isoforma curta, com o início da tradução na Met-23 (AQP4-M23). Todas as células que expressam essa proteína, inclusive os astrócitos, apresentam as duas isoformas. Elas têm os mesmos resíduos nos ectodomínios, mas a AQP4-M1 possui 22 aminoácidos adicionais na região citoplasmática N-terminal (Papadopoulos e Verkman 2013).

Na membrana plasmática, os monômeros se arranjam em tetrâmetros, que depois se agregam e formam um complexo supramolecular, o arranjo ortogonal de partículas (OAP, do inglês *Orthogonal Array of Particles*). A isoforma AQP4-M1 limita o tamanho das OAPs, na interação com a isoforma AQP4-M23, que forma agregados maiores. Quanto maior for a expressão de AQP4-M23, maiores e mais aglomeradas serão as OAPs na membrana dos astrócitos (Figura 5) (Wolburg et al. 2011).

Figura 5 – Micrografias eletrônicas de células COS-7 expressando as isoformas AQP4-M23 (esquerda) e AQP4-M1 (direita) marcadas com Myc. A isoforma AQP4-M23 forma OAPs maiores e aglomeradas, enquanto que a isoforma AQP4-M1 se arranja em tetrâmeros menores e mais dispersos.



Fonte: Retirado de Verkman et al. (2011)

Essa estrutura é um dos principais sítios de ligação do AQP4-IgG, no qual o complexo C1q se liga e promove a citotoxicidade dependente de complemento. Esse padrão de aglomeração macroscópico é a causa da alta afinidade do auto anticorpo pelos sítios atacados nas doenças do ENMO (Phuan et al. 2012).

A função das aquaporinas é servir de via de transporte de água através dos compartimentos do encéfalo, do sistema circulatório e do líquido cefalorraquidiano. Outras funções da AQP4 são a migração dos astrócitos, a formação de cicatriz pelas células da glia, transdução de sinal neuronal e neuroinflamação. A expressão da AQP4 é mais evidente na medula espinhal e nos nervos ópticos, que são os tecidos mais afetados nas doenças do ENMO (Solenov et al. 2004).

Como há mais vasos sanguíneos na substância cinzenta do que na branca, há maior expressão de AQP4 na substância cinzenta, o que explica as diferenças entre as doenças do ENMO e a EM. No primeiro caso, a substância cinzenta da medula espinhal é mais afetada e, na EM, a substância branca no encéfalo é mais afetada (Popescu et al. 2013).

Devido à alta expressão de AQP4 nos astrócitos, estas células são as primeiras a serem degeneradas, podendo ser seguidas de danos à mielina e aos axônios. Assim, nas lesões iniciais das doenças do ENMO, observa-se uma redução na expressão de AQP4 e

de proteína ácida fibrilar glial (GFAP, do inglês *Glial Fibrillary Acidic Protein*) nas regiões perivasculares com deposição de proteínas do complemento e de imunoglobulinas (IgG e IgM).

Atualmente, sabe-se que esse ataque é mediado por um auto anticorpo contra a AQP4, envolvendo a imunidade humoral dos pacientes (Misu et al. 2007), e que tecidos que expressam a isoforma AQP4-M23 são mais suscetíveis à ação do auto anticorpo, devido à maior formação de OAPs (Matiello et al. 2013).

Apesar da proteína AQP4 também estar expressa em órgãos periféricos, como na membrana basolateral das células epiteliais dos rins, nos órgãos gastrointestinais, nas vias nasais e nos músculos esqueléticos, a patologia ocorre apenas no SNC, porque esses órgãos periféricos apresentam diferentes distribuições de isoformas de AQP4 e as células desses órgãos expressam proteínas reguladoras de complemento (CD46, CD55 e CD59) ligadas às suas membranas, o que confere proteção contra a ação das proteínas do complemento nessas células, pois inibe a ativação da cascata do sistema complemento (Saadoun e Papadopoulos 2015).

O estudo dessas proteínas reguladoras apresenta grande potencial na terapêutica dos pacientes soropositivos para o biomarcador, uma vez que o aumento na expressão dessas proteínas com atorvastatina reduziu a patologia em modelo experimental (Tradtrantip et al. 2019).

### **3.1.8. Autoanticorpo AQP4-IgG**

Estudos indicam que a síntese do autoanticorpo AQP4-IgG não é intratecal, e sim periférica. A correlação entre a recidiva aguda da doença juntamente com a disfunção da BHE e a detecção do anticorpo, indica que eles são produzidos periféricamente e atravessam a BHE na fase aguda da doença (Jarius et al. 2012).

Estudos apontam que os níveis de AQP4-IgG e dos plasmablastos produtores desse anticorpo estão associados com a atividade da doença e podem indicar futuros surtos. A concentração limite que indica a possível ocorrência de surto não foi estabelecida e os níveis parecem variar nos e entre os pacientes (Weinshenker et al. 2006; Papadopoulos e Verkman 2012).

Um estudo demonstrou, utilizando o teste CBA, que o AQP4-IgG foi detectado em 68% das amostras de LCR analisadas, mas não foi detectado em amostra soronegativa ou controle. Estas amostras foram colhidas durante o surto da doença (Jarius et al. 2010). Isso pode ser explicado pelo fato de que, além dos autoanticorpos, os plasmablastos periféricos também invadem o SNC, atravessando a BHE o que, consequentemente, contribui para essa síntese considerada intratecal (Pittock et al. 2021). Mas, também há evidências que indicam que a síntese intratecal possa ocorrer (Bennett et al. 2009).

A contribuição dos linfócitos B para a patogenia da ENMO pode estar além da produção de anticorpos. Essas células podem desempenhar um papel importante como apresentadoras de antígenos para o desenvolvimento de linfócitos T efetores, que por sua vez participam da diferenciação dos linfócitos B e mudança de isotipo de anticorpo, fechando um ciclo de *feedback* positivo na interação entre células T e B patogênicas (Molnarfi et al. 2013).

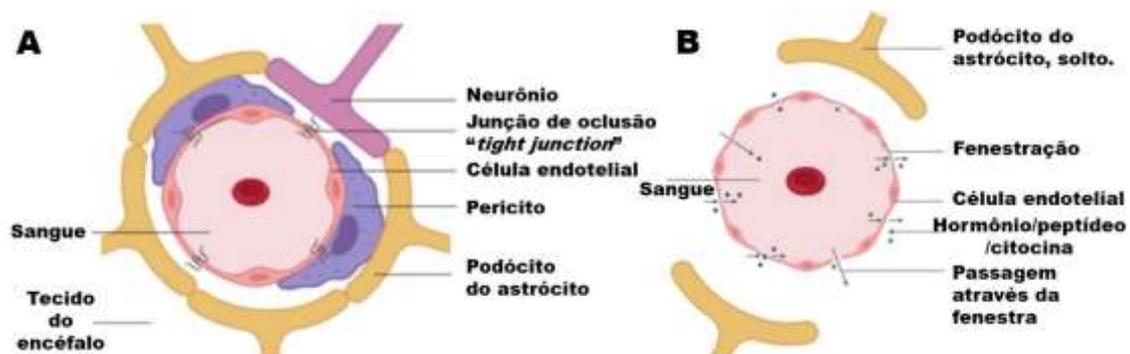
São as células plasmáticas que produzem o autoanticorpo AQP4-IgG na circulação periférica, após a diferenciação dos plasmablastos estimulada pela citocina interleucina-6 (IL-6), produzida por linfócitos auxiliares (T<sub>H</sub>17). Os anticorpos se originam de células B autorreativas ou polirreativas que estão presentes em pacientes com ENMO por causa de falhas em pontos de checagem central e periférica de tolerância imunológica (Pittock et al. 2021).

As células B de memória pró-inflamatórias secretam IL-6 que promovem a atividade da doença por meio da manutenção dos plasmablastos, estímulo à produção de AQP4-IgG, ruptura da integridade da BHE e promoção da diferenciação de células Th17 patogênicas. A redução do número de células B reguladoras prejudica a função ou diminui os níveis de IL-10, que piora a doença (Quan et al. 2013; Fujihara et al. 2020).

Alguns fatores, como infecções, podem enfraquecer ou romper as junções de oclusão da BHE na região da medula espinhal e dos nervos ópticos, permitindo a entrada do AQP4-IgG através das células endoteliais, por meio da endocitose (Figura 6A) (Chihara et al. 2013). Há hipóteses de que a ação dos anticorpos AQP4-IgG dependa de um ambiente inflamatório e da ruptura da BHE (Chihara et al. 2011).

Outras evidências sugerem que a inflamação pode não ser sempre necessária para a travessia dos anticorpos, pois eles poderiam entrar pelos capilares fenestrados dos órgãos circunventriculares (Figura 6B), ou através dos vasos sanguíneos nas meninges ou parênquima (Broadwell e Sofroniew 1993). Os anticorpos também poderiam danificar diretamente a BHE, pois os podócitos dos astrócitos compõem a sua estrutura (Asavapanumas et al. 2014).

Figura 6 – Secção transversal de um vaso sanguíneo de uma BHE normal (A) e secção transversal de um capilar com endotélio fenestrado de um órgão circunventricular (B). A falta de junções de oclusão cria fenestras por onde moléculas que estão no sistema circulatório podem acessar o SNC.



Fonte: Traduzido e adaptado de Verheggen et al. (2020)

Algumas regiões da medula espinhal e dos nervos ópticos apresentam-se mais vulneráveis, já que não têm a BHE completamente desenvolvida, o que permite o acesso do AQP4-IgG periférico. A área postrema é uma região que apresenta um endotélio fenestrado, ou seja, uma BHE incompleta, sendo assim investigada como uma possível via de entrada dos autoanticorpos (Wingerchuk et al. 2007; Matiello et al. 2013).

### 3.1.9. Interação entre o anticorpo AQP4-IgG e a proteína AQP4

Após a ligação do anticorpo AQP4-IgG às OAPs, dá-se início a uma série de eventos de imunidade celular e humoral, que podem incluir: modificação da função da proteína-alvo, internalização da proteína-alvo, redução da expressão da proteína na superfície, ativação do complemento para causar morte celular (citotoxicidade dependente do sistema complemento) (Lucchinetti et al. 2002), ativação de células efetoras, como as *natural killer* (NK), que também causam a morte celular (citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo) (Ratelade et al. 2012).

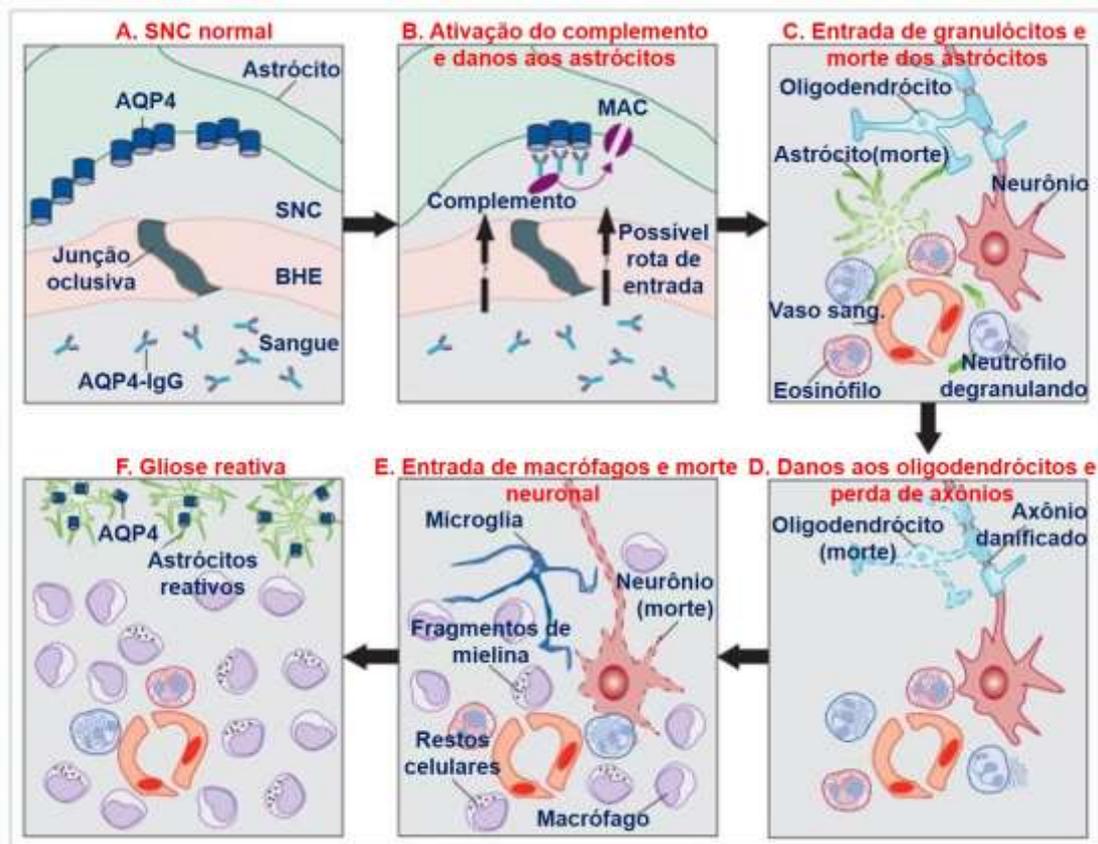
Nos astrócitos, a ativação do sistema complemento forma o complexo de ataque à membrana (MAC) (Figura 7B) e induz eventos transcricionais que promovem o recrutamento de granulócitos (eosinófilos e neutrófilos), macrófagos, produção de citocinas (IL-17, IL-8 e fator estimulador de colônia de granulócitos), quimiocinas e fatores relacionados ao estresse oxidativo.

Muitos neutrófilos são encontrados degranulados nas lesões, o que sugere que essas são as primeiras células responsáveis pelo início das lesões. Os eosinófilos são característicos de resposta alérgica e contra parasitas, e incomuns em doenças mediadas por anticorpos, mas também são encontrados nas lesões (Figura 7C). Sugere-se que essas células contribuam para a resposta imune produzindo citocinas do tipo 2 e liberam neurotoxinas que geram radicais livres. Os macrófagos eliminam os detritos celulares resultantes da ação dos granulócitos e da citotoxicidade nos astrócitos (Kawachi e Lassmann 2017).

Subsequentemente, essa resposta inflamatória atinge os oligodendrócitos adjacentes através das junções gap célula-célula, causando desmielinização com posterior dano axonal e, conseqüentemente, morte neuronal (Figura 7D-E). A ocorrência secundária de desmielinização depende da severidade da doença e afeta as substâncias branca e cinzenta, podendo causar necrose e cavitação, e hialinização com espessamento dos vasos (Figura 7F) (Wasseff e Scherer 2011).

Figura 7 – Possível mecanismo da doença nos pacientes soropositivos para o AQP4-IgG. Estado normal do SNC com a presença de AQP4-IgG na circulação periférica (A). Inicialmente, na formação da lesão, o anticorpo AQP4-IgG se liga à AQP4 expressa nos podócitos dos astrócitos, ativa o sistema complemento e causa a deposição do MAC (B). Citocinas recrutam neutrófilos e eosinófilos para o espaço perivascular. Os neutrófilos degranulam, causando a morte dos astrócitos. A perda dos astrócitos acarreta na morte dos oligodendrócitos, culminando na degeneração axonal (D), e morte do neurônio. A infiltração de macrófagos e, provavelmente, também de micróglia promove a fagocitose dos restos celulares e de mielina (E). As lesões

maduras se distinguem pela necrose completa do tecido, com a infiltração massiva de macrófagos; as proteínas AQP4 ficam confinadas em torno da lesão (F).



Fonte: Traduzido de Papadopoulos e Verkman (2012)

A consequência desses eventos inflamatórios é a formação de lesões caracterizadas por necrose das células do SNC, resultando em sequelas graves e, geralmente, com recuperação incompleta. Geralmente, pacientes que apresentam muitas recorrências sofrem com o acúmulo de sequelas. Mais de 50% dos pacientes ficam cegos de um ou ambos os olhos após cinco anos do início da doença. O prognóstico depende do número de surtos nos primeiros dois anos, da severidade do primeiro surto e da coexistência de alguma outra doença autoimune (Wingerchuk e Weinshenker 2003; Ghezzi et al. 2004).

O sistema complemento faz parte do sistema imune inato, ele complementa e aumenta a ação dos anticorpos e das células fagocíticas, promovendo, inclusive, a opsonização de patógenos. Fazem parte desse sistema as proteínas do complemento que atuam no início de uma infecção, ativando uma cascata de proteínas. Como o AQP4-IgG

é um anticorpo de isotipo IgG1, ele pode induzir a citotoxicidade via sistema complemento, iniciada pela ligação da proteína C1q ao anticorpo (Janeway e Medzhitov 2002).

A outra via de citotoxicidade possível é a mediada por células, na presença de células efectoras, como as NK. Essa via não depende da formação de OAP, podendo ocorrer em células que expressam ambas as isoformas (M1 e M23). O AQP4-IgG pode ligar tanto a proteína do complemento C1q, como todas as classes de receptores de células efectoras. A ligação de células NK à região Fc do anticorpo causa a degranulação das células NK, liberando perforinas e granzimas, que causam danos aos astrócitos (Ratelade et al. 2012).

Antes dos danos nos astrócitos, ocorre a perda de AQP4, visto que em algumas lesões, outros marcadores astrocíticos típicos, como a proteína GFAP e S-100 $\beta$  são identificáveis, indicando que a perda de AQP4 ocorre antes da perda dos astrócitos (Popescu e Lucchinetti 2012).

### **3.1.10. Tratamentos**

A descoberta do biomarcador não só possibilitou um diagnóstico mais precoce, como levou ao uso de imunoterapias para prevenir surtos e melhorar o prognóstico. Atualmente, as opções terapêuticas envolvem os episódios de surtos agudos, tratamento de sintomas isolados e a prevenção de recidivas em longo prazo. Os tratamentos mais comuns incluem azatioprina (AZA), micofenolato de mofetila (MMF) e rituximabe.

Nos últimos dois anos, quatro ensaios clínicos com anticorpos monoclonais expandiram o espectro de drogas para os pacientes ENMO. Estudos de fase 3 mostraram redução significativa de surtos em pacientes ENMO, principalmente os soropositivos, tratados com anticorpos monoclonais contra o receptor de IL-6 (satralizumabe) (Traboulsee et al. 2020), CD-19 presente em linfócitos B (inebilizumabe) e CD-20 (rituximabe) (Cree et al. 2019) e fração C5 do complemento (eculizumabe) (Pittock et al. 2019), em comparação aos placebos.

O padrão atual de tratamento dos surtos agudos envolve a administração intravenosa de metilprednisolona com plasmaferese simultânea. Este tratamento tem

como alvo a resposta imune humoral (Kim et al. 2013), assim como a terapia de depleção de células B, com o rituximabe (Tahara et al. 2020).

A presença do autoanticorpo AQP4-IgG em pacientes que tiveram um episódio de MTLE ou de NO está associada a um risco aumentado de ocorrerem recidivas. Por isso, eles eram submetidos, até 2019, a um regime de tratamento de longo prazo apenas com imunossupressor, geralmente o micofenolato de metila ou azatioprina (Pittock et al. 2021).

Pacientes soronegativos para o AQP4-IgG e soropositivos para MOG-IgG também se beneficiam do tratamento com imunossupressor. Apesar de ser uma doença distinta da ENMO positiva para o biomarcador, estudos mostraram que o tratamento para ENMO com imunossupressores por via oral e rituximabe são mais eficientes do que os tratamentos tradicionais para EM (Cobo-Calvo et al. 2019).

O rituximabe e o inebilizumabe são anticorpos monoclonais que têm como alvo os marcadores CD-20 e CD-19, respectivamente. Assim, eles depletam todas as linhagens de células B e plasmablastos, no caso do inebilizumabe, que expressam esses marcadores (Tedder 2009; Lee et al. 2020). As observações de que os benefícios terapêuticos não se correlacionam com a redução de títulos de AQP4-IgG indica que a patogenia possa não ser exclusivamente mediada pelo AQP4-IgG ou os títulos de anticorpos não refletem a patogenia em progresso no SNC (Pittock et al. 2021).

Dentre as várias citocinas, apenas a IL-6 está presente em maior quantidade no soro de pacientes ENMO do que em EM. O tocilizumabe é um anticorpo que bloqueia o receptor de IL-6. Atualmente, ensaios clínicos de outro anticorpo contra o receptor de IL-6 está em progresso, o satralizumabe (Traboulsee et al. 2020).

O anticorpo AQP4-IgG leva à ativação do sistema complemento, e uma etapa importante dessa via é a clivagem do C5 para produzir C5b e C5a. O primeiro gera o MAC, e o segundo é uma quimiotáxica para neutrófilos e eosinófilos. A clivagem do C5 pode ser prevenida com o anticorpo monoclonal eculizumabe (Pittock et al. 2019).

Outra estratégia terapêutica é o uso do anticorpo bloqueador. Neste caso, promove-se a ligação de anticorpos anti-peptídeo, com a região Fc modificada, para impedir a ativação do sistema complemento (Papadopoulos 2014). O anticorpo

bloqueador denominado *aquaporumab* tem as regiões Fc e Fab mutadas, para neutralizar as funções efectoras CDC e ADCC, e aumentar a afinidade de ligação à AQP4, respectivamente. A segurança e a eficácia do *aquaporumab* aguardam os testes clínicos (Tradtrantip et al. 2020).

### 3.1.11. Mapeamento de epítopo

O conhecimento dos epítos-alvo das células do sistema imune pode contribuir para o esclarecimento do mecanismo da doença, melhorar o diagnóstico com testes mais precisos e viabilizar o desenvolvimento de terapias epítopo-específicas.

Um exemplo desse tipo de terapia é o “*decoy antigen therapy*”, que funciona como um epítopo-isca solúvel que interage com anticorpo antes que ele se ligue ao antígeno-alvo e desencadeie a doença (Bloom et al. 2011). No caso da ENMO, a partir do conhecimento dos epítos-alvo do anticorpo, uma molécula peptidomimética poderia ser projetada para impedir a ligação do AQP4-IgG aos astrócitos.

Estudos de mapeamento de epítopo podem ser conduzidos por métodos variados, o que resulta em dados e conclusões diferentes. Atualmente, os autoantígenos têm sido estudados por meio de técnicas de subclonagem e mutação por deleção ou substituição (Sinmaz et al. 2016).

A escolha do método utilizado para analisar a sensibilidade e a especificidade da interação epítopo-anticorpo envolve diferenças na conformação do epítopo antigênico. Os epítos ficam dispostos em conformação nativa, quando expressos em células vivas, e são analisados por microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo. Nesse tipo de método, o antígeno perde a conformação se a célula for fixada ou impermeabilizada (Sinmaz et al. 2016).

Estratégias como ELISA (Kampylafka et al. 2011), Western Blot (Marnetto et al. 2009) e radioimunoensaio (Tzartos et al. 1988) também têm sido aplicadas no estudo dos epítos e são técnicas que envolvem desnaturação e configuração linear da proteína. Neste trabalho, foram utilizados nanobiossensores de AgNPs para estudar a interação dos anticorpos com os epítos da proteína AQP4.

### **3.1.12. Prognóstico**

Geralmente, o prognóstico das doenças do ENMO não é bom, com altos níveis de incapacidades associadas. Em um estudo conduzido com 185 pacientes ENMO, houve 871 episódios de surto da doença, dos quais apenas 22% se recuperaram completamente e 6% não se recuperaram. O prognóstico mais favorável foi associado com fatores independentes, que incluíram ausência de MT (NO isolada), idade mais jovem na primeira manifestação da doença, remissão completa após o primeiro surto e menor frequência de surtos durante o primeiro ano (Kleiter et al. 2016).

Aproximadamente metade dos pacientes apresentam deficiência visual severa no período de 5 anos, após o início da doença. A causa mais comum de mortalidade relacionada às doenças do ENMO é a insuficiência respiratória neurogênica, que apresenta taxa de 23-50% em estudos de coorte (Patterson e Goglin 2017).

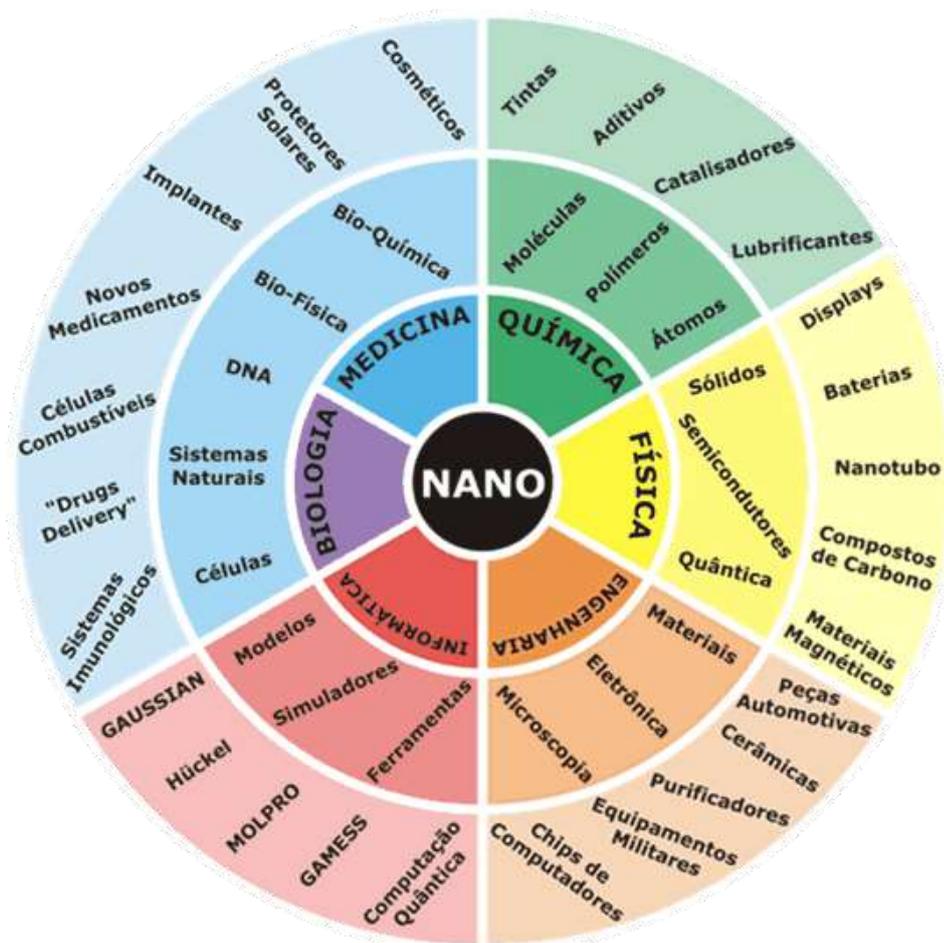
## **3.2 NANOPARTÍCULAS**

### **3.2.1. Histórico da nanotecnologia**

O prefixo “nano” vem grego *nánnos*, que significa excessivamente pequeno. No sistema métrico, um nanômetro (nm) é um metro dividido um bilhão de vezes, por isso, 1 nm é equivalente a  $10^{-9}$  m (0,000.000.001 metro). Um átomo possui diâmetro entre 0,1 e 0,4 nm, por isso, em uma molécula de 1 nm cabem, aproximadamente, 10 átomos (Mansoori e Soelaiman 2005).

A nanotecnologia é o campo científico que explora a manipulação de átomos e moléculas da matéria com estrutura entre 1 e 100 nm, em pelo menos uma dimensão, visando o desenvolvimento de produtos, e a nanociência estuda os princípios fundamentais das nanoestruturas. O campo de aplicação da nanotecnologia é vasto, desde as ciências naturais (física, química e biologia) à medicina e engenharias (Figura 8) (Devi et al. 2019).

Figura 8 – Campos do conhecimento em que a nanotecnologia pode ser aplicada, para o desenvolvimento de produtos com diversas funções e aplicações.



Fonte: [Redes & Servidores: Tecnologias e Tendências no Ciberespaço](#)

O uso da nanotecnologia é bastante antigo, o Cálice de Licurgo, feito de vidro dicroico (Figura 9) que está, atualmente, no Museu Britânico é um exemplo bastante expressivo da nanotecnologia sendo usada já na Idade Antiga, no século IV d.C. O objeto apresenta cor verde sob luz refletida, quando iluminado pela frente, e as cores vermelhas e roxa, quando a luz é transmitida (iluminado por trás) (Bayda et al. 2020).

Figura 9 – Cálice de Licurgo. O cálice de Licurgo apresenta a cor verde quando iluminado pela frente (luz refletida), e as cores vermelha e roxa, quando iluminado por trás (luz transmitida).

Nanopartículas de prata, ouro e cobre compõem o vidro e são responsáveis pelas cores observadas.

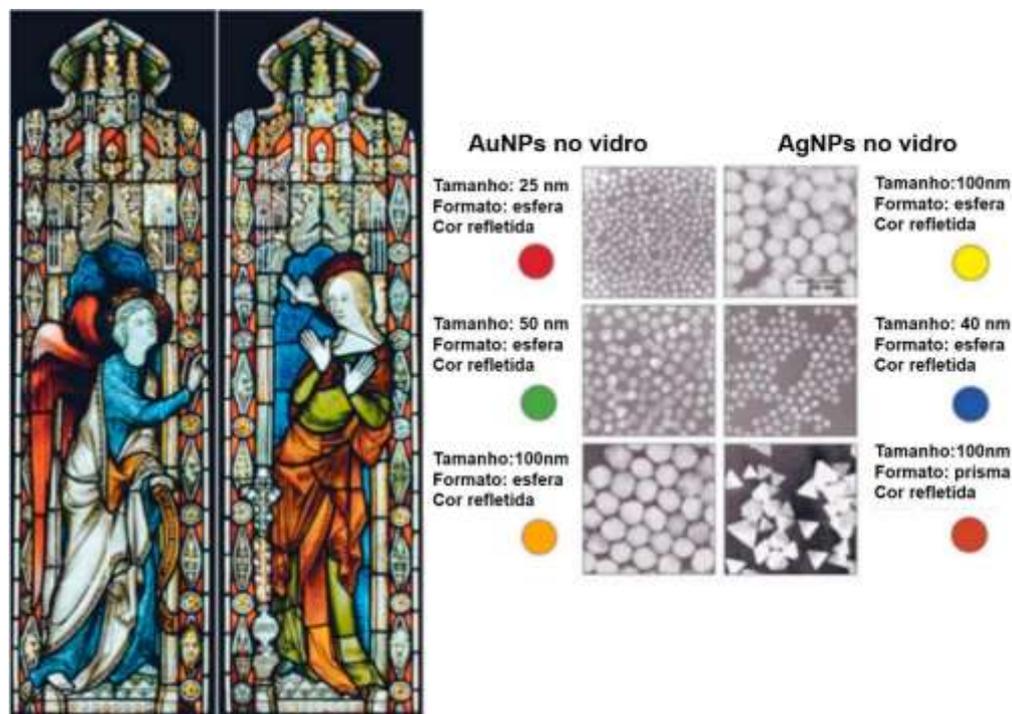


Fonte: [Coleção do Museu Britânico](#)

Esse efeito é decorrente da composição do vidro, que inclui nanopartículas de até 100 nm, de prata (66,2%), ouro (31,2%) e cobre (2,6%). O comprimento de onda absorvido pelas nanopartículas de ouro (AuNPs), em torno de 520 nm, resulta na apresentação da cor vermelha. A cor roxa é resultado da absorção de luz por AuNPs maiores e a cor verde provém da absorção de luz por AgNPs maiores do que 40 nm (Freestone et al. 2007).

Outro exemplo de nanomateriais sintéticos da Antiguidade são as janelas das igrejas medievais, cujas cores variavam de acordo com a composição, tamanho e formato das nanopartículas na matriz do vidro. De acordo com o tamanho e formato das AuNPs e AgNPs presentes no vidro, a luz era espalhada na faixa de comprimento de onda de várias cores, como vermelho, verde, laranja, amarelo e azul (Figura 10) (Bayda et al. 2020).

Figura 10 – Vitrais de uma igreja medieval. Diferentes cores apresentadas nos vitrais de igrejas medievais, de acordo com o tamanho e formato das nanopartículas metálicas presentes nos vidros.



Fonte: [The New York Times, 2015](#)

Os italianos, durante o Renascimento (século XVI), utilizaram nanofios de cementita (carboneto de ferro) e nanotubos de carbono para confeccionar as espadas de aço de Damasco. Os nanotubos de carbono em formato hexagonal conferiam, ao mesmo tempo, resistência e elasticidade à lâmina e circundavam a estrutura mais frágil dos nanofios de cementita, uma combinação de ferro e carbono (Reibold et al. 2006).

As causas desses efeitos só começaram a ser elucidadas quando o físico Michael Faraday, em 1857, sintetizou uma suspensão coloidal de AuNPs por redução química do ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ), e estudou as suas propriedades ópticas. A descrição da relação entre as condições de luz e a produção de diferentes cores nas suspensões coloidais foi um progresso expressivo no campo da nanotecnologia (Faraday 1857).

No início do século XX, o físico alemão Gustav Mie analisou a descrição feita por Faraday e fez uma avaliação quantitativa do fenômeno, explicando que a relação entre a luz e o tamanho das nanopartículas se dava pelo confinamento quântico dos elétrons, que oscilavam coletivamente diante da radiação eletromagnética incidente (Amendola et al. 2017).

O conceito de nanotecnologia foi introduzido pelo físico teórico norte americano e ganhador do prêmio *Nobel*, Richard Feynman, em 1959, em sua palestra “*There’s Plenty of Room at the Bottom*” apresentada no Instituto de Tecnologia da Califórnia (*Caltech*), no qual tratou do tema da manipulação da matéria em nível atômico (Feynman 1960).

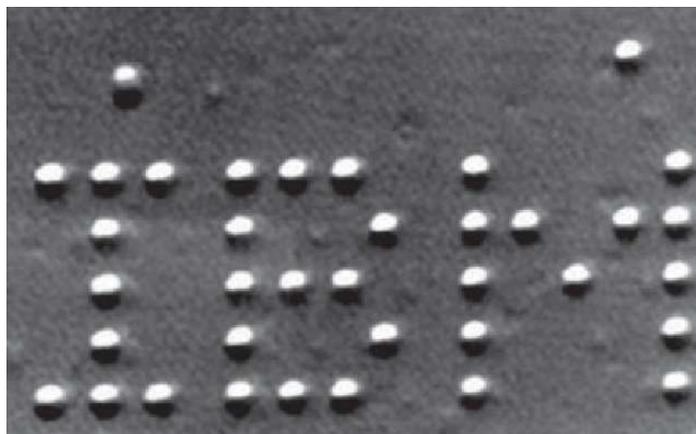
Nesta palestra, Feynman lançou o seguinte questionamento: “por que não podemos escrever todos os volumes da Enciclopédia Britânica na cabeça de um alfinete?”. As ideias de Feynman sobre o nível atômico e molecular provaram-se corretas e isso o fez ser reconhecido como o pai da nanotecnologia moderna (Hulla et al. 2015).

O termo nanotecnologia foi cunhado 15 anos após essa palestra, em 1974, pelo pesquisador Norio Taniguchi, que definiu a nanotecnologia como um conjunto de técnicas elaboradas para separar, consolidar e deformar materiais construídos átomo por átomo ou molécula por molécula (Bayda et al. 2020).

As ideias de Feynman inspiraram pesquisadores no campo da nanotecnologia e resultaram no desenvolvimento do microscópio de varredura por tunelamento (STM, *Scanning Tunneling Microscope*) pelos físicos Gerd Binnig e Heinrich Rohrer, em 1981, e rendeu o Prêmio *Nobel* de Física, em 1986. Este instrumento permite obter imagens em nível atômico, ou seja, de átomos e moléculas, pela técnica de tunelamento quântico, em que a corrente elétrica entre a ponta e a amostra forma uma imagem (Anderson et al. 1982).

Em 1990, o STM foi usado para manipular 35 átomos de xenônio em uma superfície de níquel, formando o logo da IBM Research (Figura 11) (Eigler e Schweizer 1990). Este é mais um exemplo do avanço da nanotecnologia, que possibilitou a manipulação de átomos e a indução e quebra de ligações químicas.

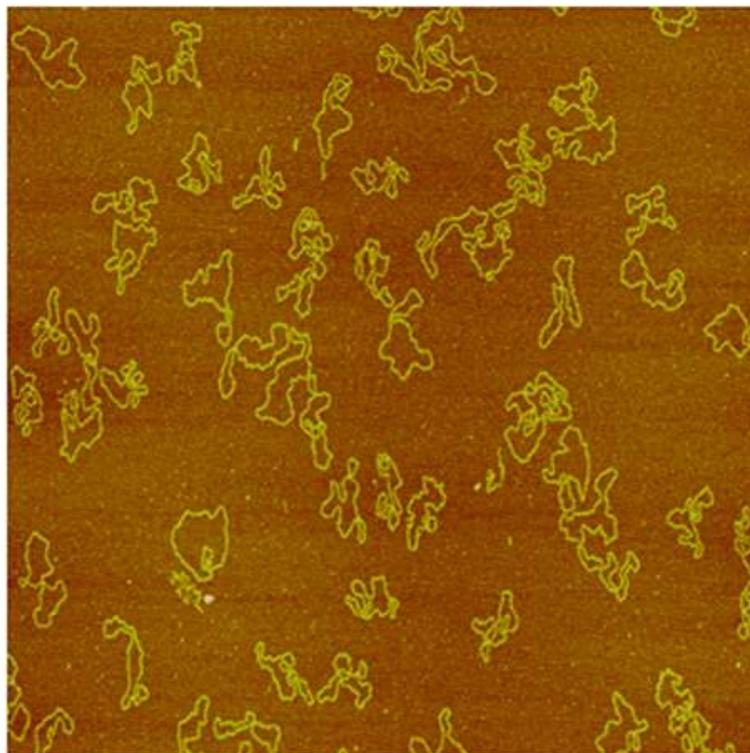
Figura 11 – Logotipo da IBM escrito por meio da manipulação de átomos de xenônio em uma superfície de níquel, utilizando um microscópio de varredura por tunelamento. Cada letra possui 50Å de altura.



Fonte: Retirado de Cross et al. (2015).

Logo após a invenção do STM em 1982, os pesquisadores Binnig, Quate e Gerber desenvolveram o microscópio de força atômica (AFM, *Atomic Force Microscope*), em 1986. O AFM, diferentemente do STM, não necessita de amostras condutoras, alcançando outras áreas além da física, como o campo dos polímeros e das ciências biológicas (Figura 12) (Binnig et al. 1986).

Figura 12 – Imagens de moléculas de DNA de plasmídeo puC19 feitas com AFM no modo contato intermitente. O tamanho da imagem é 2 x 2  $\mu\text{m}^2$ .



Fonte: Retirado de Pang et al. (2015)

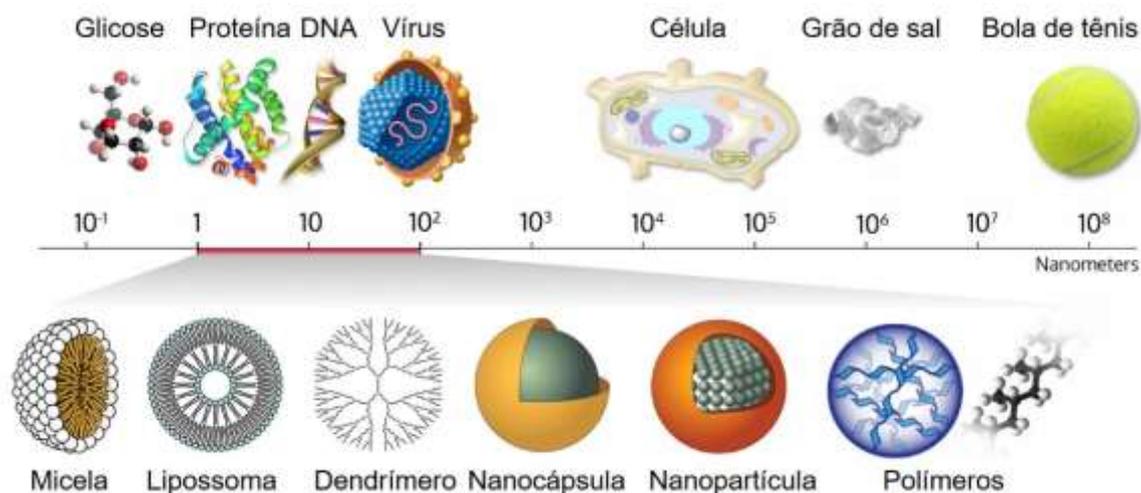
### 3.2.2. Nanobiotecnologia e nanomedicina

Recentemente, a nanotecnologia avançou no campo da medicina, principalmente no desenvolvimento de novos dispositivos para o diagnóstico e tratamento de doenças. A nanobiotecnologia transforma nanomateriais básicos em produtos de alto valor agregado.

As nanoestruturas ganharam espaço na medicina, devido aos efeitos alcançados em nanoescala, por exemplo alta biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*, capacidade de ultrapassar barreiras biológicas, possibilidade de não ativação do sistema imune, maior permanência no sistema circulatório e compatibilidade de tamanho entre as nanoestruturas e as biomoléculas (Sousa et al. 2018).

Além disso, nanoestruturas e biomoléculas apresentam dimensões compatíveis (Figura 13), o que possibilita a integração desses sistemas, constituindo os materiais híbridos, cuja tecnologia tem ampla aplicação (Cheng et al. 2016).

Figura 13 – Escala nanométrica mostrando a compatibilidade entre os tamanhos das principais biomoléculas e as nanoestruturas básicas, dentro do intervalo de 1 a 100 nm.



Fonte: Traduzido de [Wichlab](#).

Em 1991, o termo “nanomedicina” foi introduzido pelos pesquisadores Drexler, Peterson e Pergamit em seu livro intitulado “*Unbounding the Future: the Nanotechnology Revolution*”, no qual exploraram as potencialidades da nanobiotecnologia na medicina (Bayda et al. 2020).

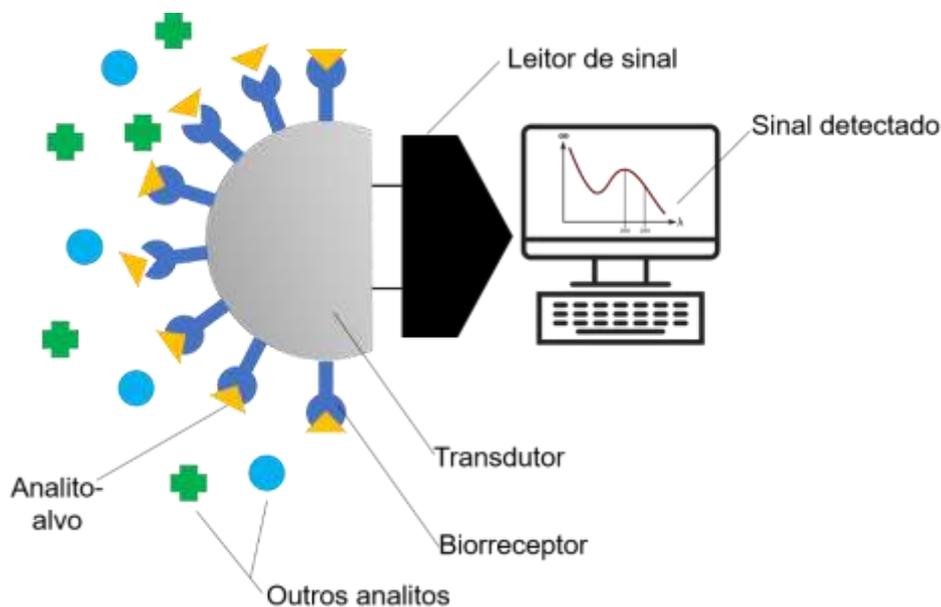
São exemplos de aplicação da nanobiotecnologia na medicina: nanodiagnóstico, nanobiossensores, nanoestruturas de liberação controlada de fármacos (nanofármacos), nanorobôs usados em cirurgias, entre outros. Esses produtos estão presentes em diversas áreas da medicina, que estão conhecidas como nano-oncologia, nanoneurologia, nanocardiologia, nano-ortopedia e nano-ofthalmologia. Essas ferramentas levam à maior integração entre diagnóstico e terapêutica, no sentido de torná-la mais personalizada (Jain 2008).

Dentro deste contexto, uma nova área de pesquisa denominada Nanoneurobiofísica (Leite et al. 2015) foi divulgada em 2015, e tem como foco desenvolver e aplicar nanobiossensores no campo das doenças desmielinizantes, como a EM e as doenças do ENMO. Os problemas contidos neste campo requerem esforços multidisciplinares, a interação dos conhecimentos das ciências naturais e clínicas, para que novos métodos diagnósticos possam ser desenvolvidos.

### 3.2.3. Nanobiossensores

Biossensores são dispositivos compostos de uma biomolécula (biorreceptor) ligada a um transdutor de sinal, que promove a conversão do sinal biológico, ou seja, da interação molecular com o analito-alvo, em um sinal físico detectável (Figura 14) (Bhalla et al. 2016). Nos nanobiossensores, o elemento de transdução de sinal é um nanomaterial.

Figura 14 – Estrutura básica de um nanobiossensor. Ele consiste em um transdutor de sinal nanométrico, com um biorreceptor ligado à sua superfície. Somente o analito-alvo é capaz de ligar ao nanobiossensor sendo, assim, específico. Os sinais produzidos pelo nanobiossensor são capturados e lidos em um equipamento de leitura.



Diversas moléculas biológicas podem ser utilizadas como biorreceptoras, por exemplo, uma enzima, uma molécula de DNA ou um antígeno. Essas moléculas devem ser especificamente sensíveis aos seus alvos que, nesses casos, seriam um substrato, uma fita complementar de DNA e um anticorpo, respectivamente (Liu et al. 2019).

Nanobiossensores que utilizam anticorpos e antígenos como biorreceptores são ideais para o diagnóstico clínico de diversas doenças, como neoplasias, doenças cardiovasculares e neurológicas. O reconhecimento biológico nesses sensores baseia-se na formação específica e sensível do complexo antígeno-anticorpo.

Diferentes mecanismos e técnicas são aplicados na detecção e quantificação do sinal. Os principais baseiam-se em métodos ópticos, eletroquímicos, piezoelétricos,

térmicos ou de massa. Dessa forma, os transdutores são categorizados com base no tipo de sinal produzido (Naresh e Lee 2021). Os nanobiossensores ópticos têm sido amplamente utilizados na medicina, para diagnóstico clínico.

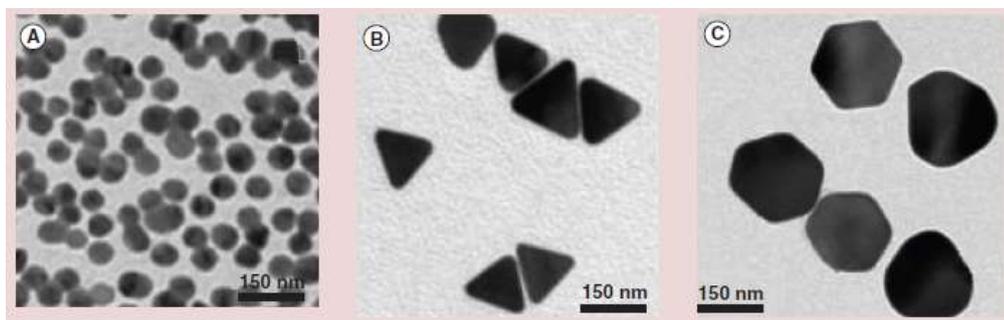
Dentro da categoria dos nanobiossensores ópticos, as nanopartículas metálicas, especialmente ouro e prata, despertam maior interesse, por apresentarem propriedades ópticas e colorimétricas que se alteram de acordo com as interações que ocorrem com as substâncias presentes na amostra em análise.

#### 3.2.4. Nanopartículas metálicas

As propriedades típicas dos metais em escala natural ocorrem devido às suas estruturas cristalinas e à presença de elétrons livres, por isso apresentam alta condutividade elétrica e térmica, alta refletividade e propriedades mecânicas. Ao modificar a estrutura, seja o tamanho ou a morfologia, os materiais adquirem novas propriedades, ainda que tenham a mesma composição química (Kvítek et al. 2013).

O termo nanopartícula define qualquer objeto com pelo menos uma das dimensões entre 1 e 100 nm e que se comporta como uma unidade, com suas propriedades (Sabela et al. 2017). O formato pode variar, não existem apenas nanopartículas esféricas (Figura 15), e a composição também é diversa, podendo ser um metal, um semicondutor, um polímero ou carbono (Vilela et al. 2012).

Figura 15 – Nanopartículas de ouro com formatos esférico (A), triangular (B) e hexagonal (C).



Fonte: Retirado de Tian et al. (2015)

Destacam-se, neste contexto, as AuNPs e AgNPs, devido às suas propriedades ópticas, que dependem do formato, tamanho, nível de aglomeração ou dispersão e da constante dielétrica. Levando-se em consideração apenas as propriedades ópticas, o sinal

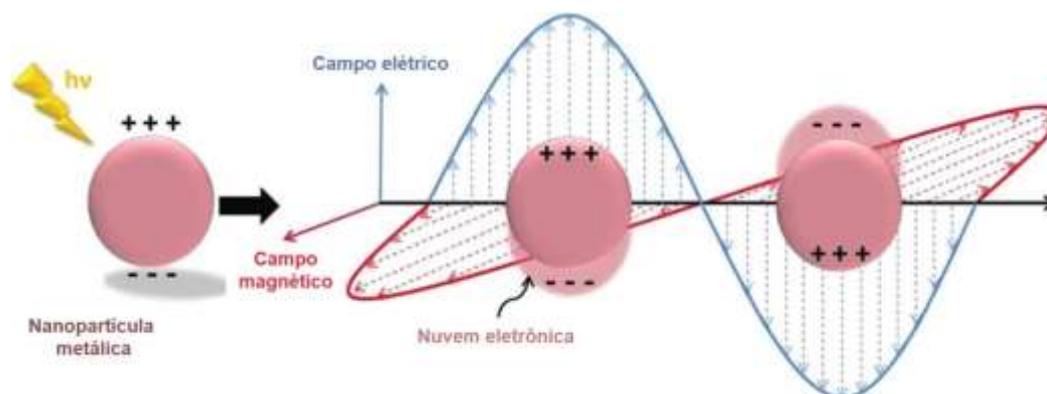
de ressonância plasmônica das AgNPs é cerca de 10 vezes maior do que o das AuNPs, e também apresentam maiores mudanças no espectro, em resposta à interação com o analito (Lismont e Dreesen 2012).

### 3.2.5. Propriedades ópticas das nanopartículas de prata

A origem das propriedades ópticas das AgNPs é a oscilação coletiva dos elétrons livres. O campo elétrico da radiação incidente acelera os elétrons da banda de condução, colocando-os em movimento. A oscilação dos elétrons promove uma polarização de cargas positivas e negativas na superfície da partícula (Lee e Jun 2019).

Como resultado dessa polarização, surge no polo oposto aos elétrons, uma força restauradora, que busca o retorno ao equilíbrio. Dessa forma, os elétrons ficam em movimento oscilatório, que acontece em uma frequência específica, chamada ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR, do inglês *Localized Surface Plasmon Resonance*) (Figura 16) (Petryayeva e Krull 2011).

Figura 16 – Ilustração esquemática da ressonância plasmônica de superfície localizada ocorrendo com a interação da radiação eletromagnética com a superfície da nanopartícula metálica.



Fonte: Traduzido de Peiris et al. (2016)

A eficiência do movimento oscilatório, em que há a menor dissipação de energia, acontece quando o tamanho da nanopartícula é menor em relação ao comprimento de onda da radiação eletromagnética incidente. Nesse caso, os elétrons se movem em fase e produzem um único pico estreito no espectro eletromagnético, refletindo a ocorrência de absorção do tipo dipolo (Kelly et al. 2003).

Conforme o tamanho da partícula aumenta, ocorre um retardo de fase, fazendo com que o campo elétrico na partícula seja não-uniforme. Isso faz com que a banda de

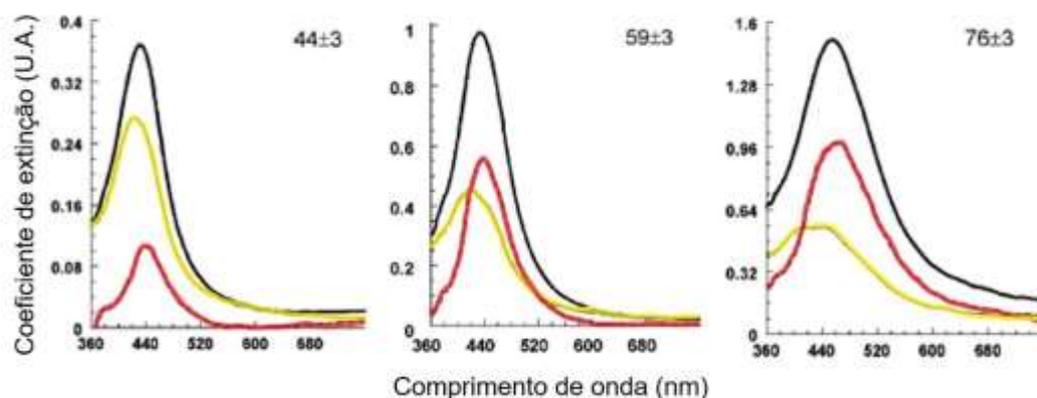
absorção fique alargada e, em alguns casos, aparecem outros picos referentes à excitação do tipo multipolos (Kelly et al. 2003).

Um dos fatores que promove a diminuição da eficiência de oscilação eletrônica, promovendo o alargamento de banda e aparecimento de novos picos é o aumento do espalhamento de luz, que se sobrepõe à absorção de luz (Evanoff e Chumanov 2005).

A absorção e o espalhamento são duas formas pelas quais o movimento dos elétrons é amortecido em razão da interação com a energia radiativa do feixe incidente. No processo de absorção, a energia radiativa é transformada em energia térmica. E, no processo de espalhamento, a energia radiativa é espalhada para outras direções (Evanoff e Chumanov 2005).

Em nanopartículas menores do que o comprimento de onda do feixe incidente, ocorre apenas o processo de absorção. Em nanopartículas maiores (>50 nm), os dois ocorrem e a contribuição relativa de cada um dependerá da dimensão da partícula. Quanto maior a partícula, maior será a contribuição do espalhamento de luz para o coeficiente de extinção, por se tratar de um processo que ocorre mais rapidamente, comparado à absorção (Figura 17) (Jain et al. 2006; Oliveira et al. 2015).

Figura 17 – Coeficiente de extinção total (linha preta), espalhamento (linha vermelha) e absorção (linha amarela), com o aumento da contribuição do espalhamento para o coeficiente de extinção, conforme o crescimento da partícula. O tamanho médio das nanopartículas está indicado no canto superior-direito dos gráficos.



Fonte: Traduzido e modificado de Evanoff e Chumanov (2005)

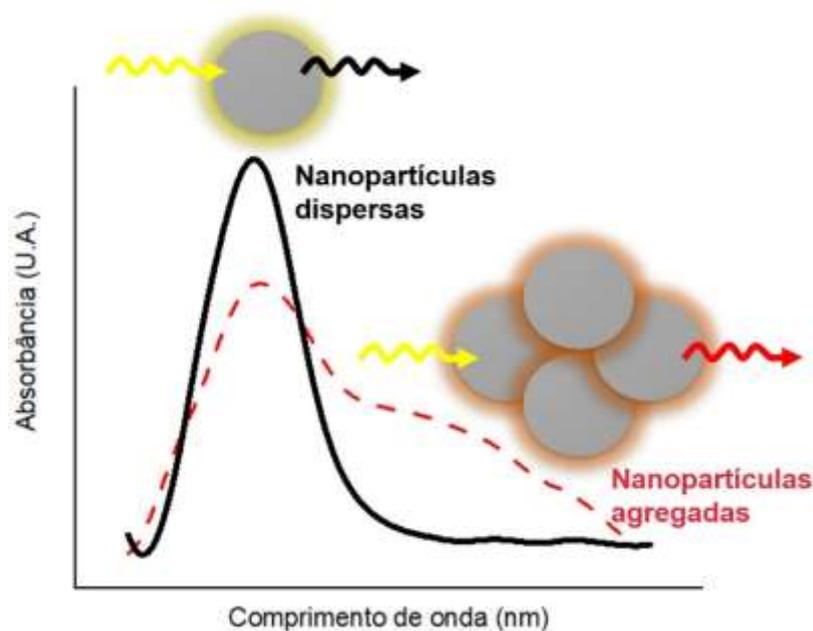
A secção transversal de extinção é a quantificação do quanto a luz incidente na nanopartícula foi extinguida. Em AgNPs, esse valor é maior do que a própria secção

transversal geométrica da partícula, o que significa que as AgNPs conseguem captar mais luz do que é fisicamente incidida sobre ela (Evanoff e Chumanov 2005).

A absorção é uma propriedade do metal em si, pois ela aumenta linearmente com a seção transversal geométrica da partícula, até o ponto em que o espalhamento de luz ainda não é relevante para a seção transversal de extinção (Khlebtsov e Dykman 2010).

Já o espalhamento de luz é uma propriedade da ressonância das partículas, ou seja, depende do volume das partículas e não da seção transversal geométrica real da partícula. Conforme mais elétrons de condução de partículas agregadas participam da ressonância, o espalhamento de luz compete com a absorção, aumentando consideravelmente em regiões de maior comprimento de onda (Figura 18) (Khlebtsov e Dykman 2010).

Figura 18 – Em preto, espectro de absorção no UV-Vis de nanopartículas dispersas, apresentando um único pico de absorção. Em vermelho, o espectro UV-Vis resultante da agregação de nanopartículas, refletida pelo aumento do espalhamento de luz em região de maior comprimento de onda.



O campo elétrico em torno das nanopartículas influencia a polarização de outras partículas ou moléculas que estão localizadas dentro da extensão desse campo. Da mesma forma, as moléculas presentes nesse campo alteram a oscilação dos elétrons, devido à força restauradora (Shanmuganathan et al. 2019).

A constante dielétrica do meio circundante das nanopartículas pode modular a posição do pico LSPR. O aumento ou redução na constante dielétrica, causa o deslocamento para regiões de menor e maior frequência, respectivamente (Shanmuganathan et al. 2019).

Quando aplicado ao sensoriamento, o aumento da concentração do analito na suspensão de nanopartículas causa o deslocamento do comprimento de onda, servindo como uma ferramenta de determinação de sua concentração em uma amostra (Krajczewski et al. 2017).

Para que ocorra uma oscilação eletrônica coerente entre partículas próximas, deve haver pouca distância entre as partículas e elas devem apresentar simetrias semelhantes. Assim, mesmo partículas muito pequenas, como as de 10 nm, podem apresentar outros formatos de oscilações eletrônicas, além do tipo dipolar. Oscilações quadrupolar e octupolar podem aparecer no espectro, se houver o acoplamento das oscilações eletrônicas das partículas (Evanoff e Chumanov 2005).

### **3.2.6. Nanobiossensor de nanopartículas de prata**

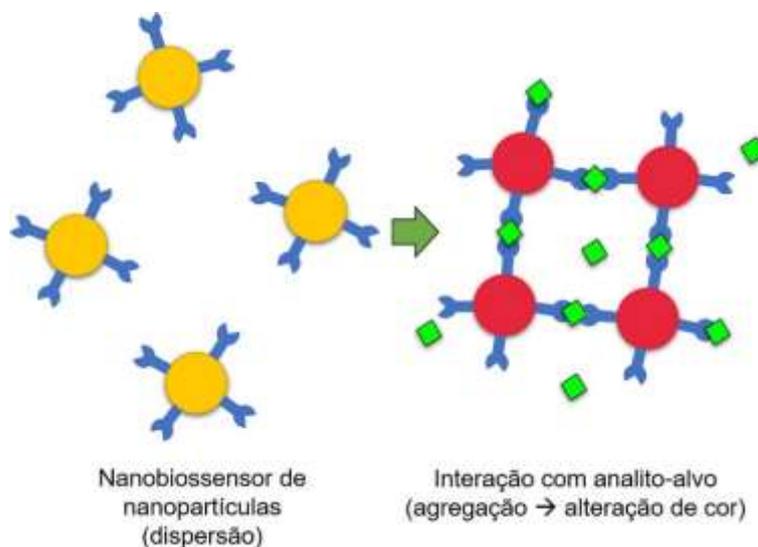
As mudanças no espectro eletromagnético decorrente da agregação das AgNPs são refletidas pela mudança de cor da suspensão, característica usada em aplicações de sensoriamento colorimétrico de analitos em solução ou em ensaios biológicos (Singh et al. 2021).

Os picos plasmônicos das AgNPs são emitidos na região visível e infravermelha do espectro eletromagnético. A modulação da cor complementar (observada) ocorre quando há um deslocamento do pico de absorção plasmônica dentro do intervalo de 400 a 750 nm (Sun e Xia 2003).

Por exemplo, nanopartículas esféricas com pico de absorção plasmônica em 400 nm absorvem a cor azul e apresentam a cor amarelo-alaranjado; quando ocorre um deslocamento do pico de absorção para 530 nm, as nanopartículas passam a absorver a cor verde e apresentam a cor complementar vermelho-arroxeadado (Figura 19). Esta é a base do sensoriamento colorimétrico utilizando nanopartículas.

Figura 19 – Ilustração esquemática representando nanopartículas funcionalizadas com biomoléculas, em estado disperso, apresentando a cor amarelo-alaranjada em suspensão. Após a

interação do nanobiossensor com o analito-alvo, as nanopartículas se agregam, causando a mudança de cor da suspensão para vermelho-arroxeadado, devido ao deslocamento do pico plasmônico no espectro eletromagnético.



Os ensaios colorimétricos, que são baseados na agregação das nanopartículas, não são interessantes apenas pelas respostas analíticas sensíveis e seletivas, mas pela simplicidade e baixo custo, por não necessitar de uma instrumentação complexa (Vilela et al. 2012).

A teoria de *Mie* explica a dependência da resposta óptica (mudança na frequência do LSPR) da parte real e imaginária da função dielétrica, ou seja, do quanto o campo elétrico incidente é absorvido e espalhado pelas nanopartículas (Kvítek et al. 2013).

A frequência é analisada com base na posição, largura e altura do pico LSPR, que também é influenciada pelas características morfológicas da partícula, como raio e formato (Kvítek et al. 2013).

O deslocamento do pico para regiões de menor frequência ocorre com o aumento do índice de refração do meio e por interações que ocorram na proximidade da superfície da partícula, devido à sensibilidade do campo elétrico, que vai diminuindo conforme a distância da superfície aumenta (Shankaran et al. 2007).

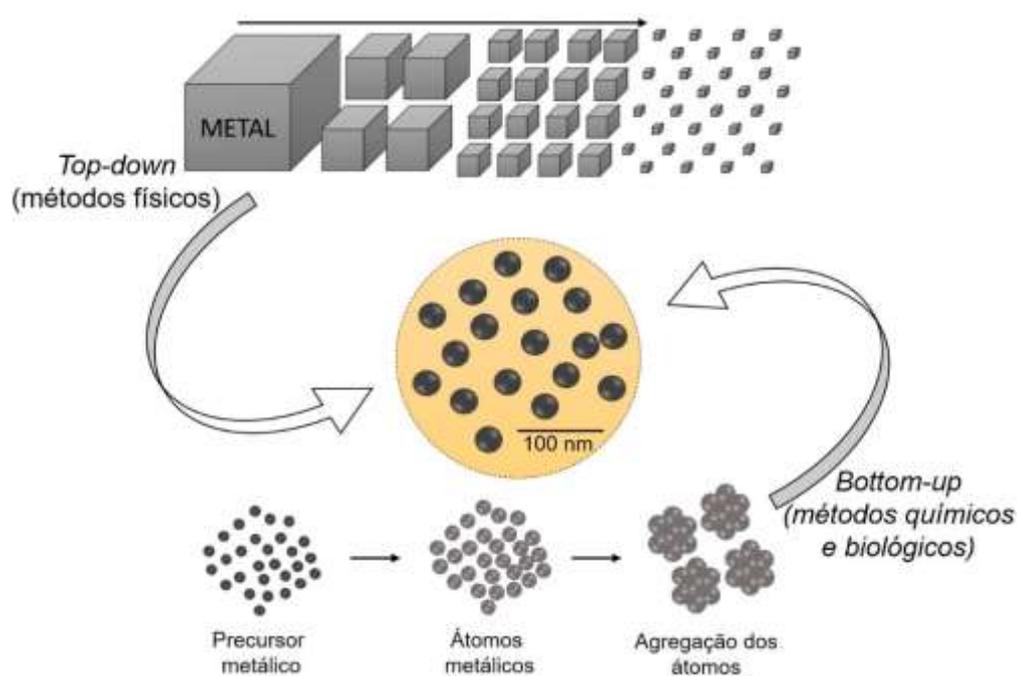
A precisão do sensoriamento depende da largura do pico. Após a funcionalização da superfície, o espectro resultante não pode ser largo, pois eles incluem excitações multipolares e espalhamento de luz (Sepúlveda et al. 2009).

### 3.2.7. Métodos de síntese de nanopartículas de prata

As AgNPs são versáteis, pois suas propriedades físico-químicas podem ser alteradas conforme o método de síntese e a escolha dos agentes redutores e estabilizantes, o que resulta em nanopartículas com tamanhos e formatos diferentes, que devem ser escolhidos conforme aplicação desejada (Shanmuganathan et al. 2019).

Existem dois tipos de métodos de síntese, denominados *top-down* e *bottom-up*. A primeira categoria consiste na desintegração de materiais em macroescala, para gerar nanoestruturas; a segunda abordagem consiste na organização de átomos, para compor as nanoestruturas (Figura 20). Dentro dessas duas abordagens, existem técnicas físicas, químicas e biológicas de síntese, que consistem em reações de redução física, química, fotoquímica, eletroquímica e radiólise (Lee e Jun 2019).

Figura 20 – Métodos de síntese de nanopartículas. Métodos que seguem a estratégia top-down partem de um material em macro ou microescala e as técnicas bottom-up sintetizam nanopartículas a partir de átomos precursores.



As técnicas de evaporação-condensação e ablação à laser são métodos físicos de síntese, que utilizam energia e radiação, resultando em suspensões coloidais com grande quantidade de nanopartículas de alta pureza, sem o uso de reagentes químicos tóxicos. As desvantagens incluem a tendência à aglomeração, pois não são usados agentes

estabilizantes, e a alta demanda de energia e tempo de síntese, associada à necessidade de equipamentos sofisticados, o que aumenta o custo de produção (Amendola e Meneghetti 2009; Iravani et al. 2014).

As técnicas aplicadas na síntese química de AgNPs são denominadas: síntese *Brust-Schiffrin*, que utiliza o borohidreto de sódio como agente redutor (Brust et al. 1994), e o método de *Turkevich*, em que o citrato de sódio é empregado como agente redutor e estabilizante (Turkevich 1985). Os processos sintéticos químicos consistem na redução de sais metálicos em uma solução aquosa ou em solvente orgânico.

De forma geral, a síntese química requer a definição de parâmetros da reação, como a escolha do agente redutor, do solvente, temperatura, pH, concentração do sal precursor, dos agentes redutores/estabilizantes e a razão molar entre esses reagentes (Mukherji et al. 2019).

A dissolução do nitrato de prata em solução aquosa libera íons  $\text{Ag}^+$ , que são reduzidos pelo citrato de sódio em  $\text{Ag}^0$ . Os núcleos de prata se aglomeram em agrupamentos oligoméricos (*clusters*), até formarem a nanopartícula de prata (Dong et al. 2009).

Um ponto essencial no processo sintético é a estabilização das nanopartículas formadas, por meio da qual o agente estabilizante previne a aglomeração e sedimentação na suspensão, por repulsão eletrostática ou estérica. No primeiro caso, são usados reagentes aniônicos que adsorvem ou interagem com a superfície das nanopartículas. Na estabilização estérica, as nanopartículas são estabilizadas com polímeros orgânicos ou com hidróxido de amônio (Pillai e Kamat 2004).

A otimização do processo sintético de acordo com a aplicação pretendida se dá pela alteração dos parâmetros de reação. O pH do meio influencia na distribuição de tamanho e formato das nanopartículas. Reações conduzidas em intervalo de pH alcalino resultam em nanopartículas menores, monodispersas e mais estáveis, devido à maior presença de cargas negativas que maximizam a repulsão eletrostática na etapa de nucleação e formação de *clusters* (Devi et al. 2019).

Em condição ácida, a falta desses grupos negativos provoca a formação de aglomerados maiores, que formam partículas com maior distribuição de tamanho. Assim,

o pH é inversamente proporcional ao tamanho das nanopartículas (Anigol et al. 2017; Devi et al. 2019).

Em pH alcalino há a predominância de uma mistura de partículas esféricas (pH 11) e com formato de bastonete (pH 8), enquanto que em pH ácido, os formatos predominantes são triangulares (pH 6) e poligonais (pH 5,7) (Loiseau et al. 2019).

A temperatura também influencia no resultado final (tamanho e formato), já que está relacionada com taxa de síntese, e deve ser definida de acordo com a concentração dos reagentes e tempo utilizados na reação. A formação das AgNPs em suspensão é identificada pela variação de cor, de uma solução incolor, para uma suspensão amarelada (Pillai e Kamat 2004).

Por fim, existem os métodos biogênicos de síntese de nanopartículas, que são técnicas enzimáticas de síntese intra e extracelular utilizando micro-organismos (bactérias e fungos) e extratos de plantas na biorredução dos íons  $\text{Ag}^+$ . A vantagem desses métodos é que não utilizam reagentes tóxicos, logo não geram subprodutos prejudiciais ao meio ambiente. Os extratos de plantas são acessíveis, não tóxicos e contém metabólitos úteis na síntese de nanopartículas. A síntese com fungos resulta em maior quantidade de nanopartículas, já que possuem maior quantidade de metabólitos secundários extracelulares (Rai et al. 2021).

### **3.2.8. Funcionalização das nanopartículas de prata**

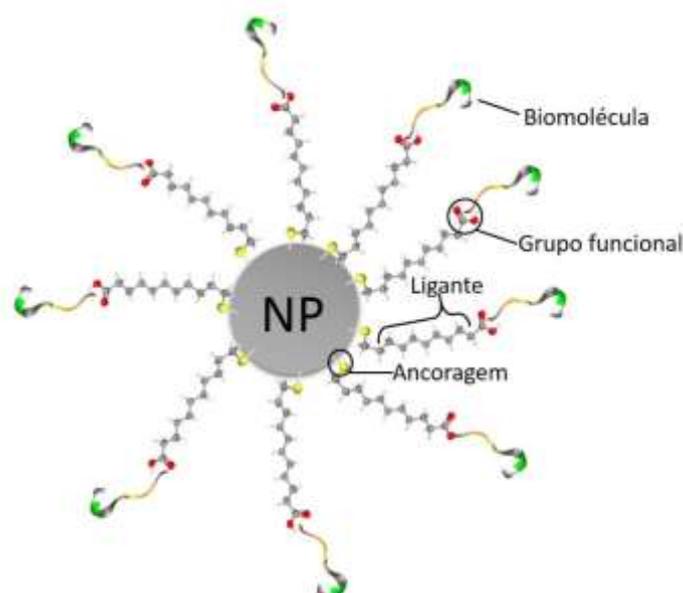
A funcionalização de maneira estratégica e controlada modifica a composição da superfície, a estrutura e a morfologia do nanomaterial. A funcionalização também controla a estabilidade das nanopartículas, pois reduz a energia das superfícies, prevenindo aglomerações (Thiruppathi et al. 2017).

A estrutura comum de uma molécula utilizada na modificação química contém três fragmentos, sendo o primeiro de ancoragem, um ligante e um grupo funcional. O primeiro fragmento liga-se fortemente à superfície da nanopartícula, devido à alta afinidade a metais, geralmente são usados grupos como  $-\text{SH}$ ,  $-\text{S}-\text{S}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{SH}$ ,  $-\text{C}(\text{S})\text{SH}$ . O ligante tem a função de aumentar a flexibilidade da molécula, que comumente

são cadeias de hidrocarbonetos. Por fim, o grupo funcional confere novas propriedades para a nanopartícula, modificando-a quimicamente (Figura 21) (Thanh e Green 2010).

Esses grupos funcionais devem estar livres, para que as biomoléculas possam se ligar à superfície da nanopartícula, promovendo a cobertura total num processo denominado bioconjugação. Este processo resulta em materiais híbridos, que são aplicáveis em interações específicas em sistemas biológicos, dado que combina as propriedades e funcionalidades de ambos os elementos (Sperling e Parak 2010).

Figura 21 – Ilustração esquemática dos componentes envolvidos na funcionalização da superfície de uma nanopartícula, mostrando a modificação química com uma molécula contendo um ponto de ancoragem e um grupo funcional, para ligação de uma biomolécula.



A ligação de biomoléculas à superfície de nanopartículas cria uma interface compatível com sistemas biológicos reais. Existem várias estratégias de funcionalização de nanopartículas, que compõem quatro classes principais (Ravindran et al. 2013):

- Quimissorção: ligação de um ligante à superfície metálica da nanopartícula por ligação covalente, geralmente usando grupo tiol;
- Interações eletrostáticas: ligação entre biomoléculas e superfície da partícula por cargas opostas;
- Ligação covalente: ligação que explora grupos funcionais das biomoléculas e das nanopartículas, por conjugação química;

- Ligação não covalente: ligação por sistema baseado em afinidade ligante-receptor.

É preciso escolher um grupo funcional adequado para cada biomolécula que se pretende ligar na partícula. Existem várias opções de moléculas com diferentes composições, tamanhos e complexidades. Dentre elas, destacam-se no grupo de moléculas pequenas, os lipídeos, vitaminas, açúcares e peptídeos. Há, também, os grandes polímeros naturais, como as proteínas, enzimas, DNA e RNA (Saallah e Lenggoro 2018).

Os grupos funcionais comumente encontrados em biomoléculas, como o ácido carboxílico, aminas primárias, álcool, fosfato e tiol, permitem a sua ligação às nanopartículas, tornando-as funcionais para diversas aplicações (Saallah e Lenggoro 2018).

Os ácidos carboxílicos e os aminoácidos contendo o grupo tiol conferem vantagens adicionais para as estratégias de funcionalização, pois as superfícies modificadas com ligantes desse tipo podem ser moduladas com o pH da solução, pela protonação e desprotonação dessas moléculas (Lawless et al. 2002).

A funcionalização das nanopartículas com aminoácidos, peptídeos e proteínas é uma estratégia eficaz para o aumento da especificidade de sistemas de sensoriamento e liberação controlada de fármacos. As proteínas são compostas por aminoácidos ligados por ligação amida, tendo nas extremidades um grupo carboxila e um grupo amina. Nas cadeias laterais, existem grupos funcionais, que conferem diferentes propriedades aos aminoácidos (Marco et al. 2010).

Várias estratégias podem ser usadas na ligação de proteínas às nanopartículas. Pode ocorrer por adsorção não específica, na qual as nanopartículas são incubadas com as proteínas, que são adsorvidas fisicamente à superfície por atração eletrostática (Ravindran et al. 2013).

Em outras estratégias, as nanopartículas e as proteínas podem ficar ligadas por forças de *van der Waals*, ligações de hidrogênio, ligação Ag-tiol ou por interações hidrofóbicas, ajustando o pH da solução próximo ao ponto isoelétrico (*pI*) da proteína (Ravindran et al. 2013).

Quando as nanopartículas são funcionalizadas com grupos amina, carboxílicos e tiois, as proteínas são conjugadas por ligação covalente, via ligação amida, dissulfeto e éster (Scheuer et al. 1999).

## 4. MÉTODOS

### 4.1 CASUÍSTICA

Esta etapa foi realizada pela co-orientadora deste trabalho, a professora Dra. Doralina G. Brum Souza, que recrutou pacientes no ambulatório de Neuroimunologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Os pacientes foram selecionados conforme os critérios diagnósticos propostos pelo IPND para as doenças do ENMO (Wingerchuk et al. 2015) e critérios de McDonald para EM (Polman et al. 2011), aplicados para definição clínico-radiológica dos pacientes.

O critério de elegibilidade aplicado nesta fase foi o de incluir pacientes de qualquer idade e de ambos os sexos. Depois da aprovação do projeto pelo comitê de ética da UFSCar, via Plataforma Brasil (CAAE: 90748018.0.0000.5504 – Anexo) e do preenchimento dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, os soros foram coletados pela professora Doralina e submetidos à avaliação laboratorial para os autoanticorpos AQP4-IgG, que permitiram a seleção dos pacientes ENMO AQP4-IgG soropositivos e negativos. As amostras para controle negativo foram obtidas de pacientes em investigação para outras doenças e indivíduos doadores de sangue no hemocentro do Hospital das Clínicas de Botucatu recrutados pela Profa. Dra. Doralina.

Foram utilizadas 8 amostras soropositivas e 14 amostras soronegativas para AQP4-IgG (2 amostras sorológicas de não portadores de doenças neurológicas, 4 amostras sorológicas de portadores de EM e 8 amostras sorológicas de pacientes diagnosticados com ENMO soronegativos). Também foram inclusas neste trabalho amostras de 9 pacientes ENMO soropositivos enumerados de 26-34, com titulação conhecida. A titulação dos anticorpos AQP4-IgG das amostras foi realizada na Clínica Mayo, sob supervisão do Dr. Sean Pittock.

Amostras de três pessoas saudáveis foram coletadas pelo Prof. Dr. Paulo Diniz da Gama, juntamente com a Dra. Pâmela Soto Garcia. Essa amostragem foi aleatória estratificada dentro dos perfis clínicos: desordens do ENMO AQP4-IgG soropositivos, negativos, EM e controles não portadores de doenças neurológicas.

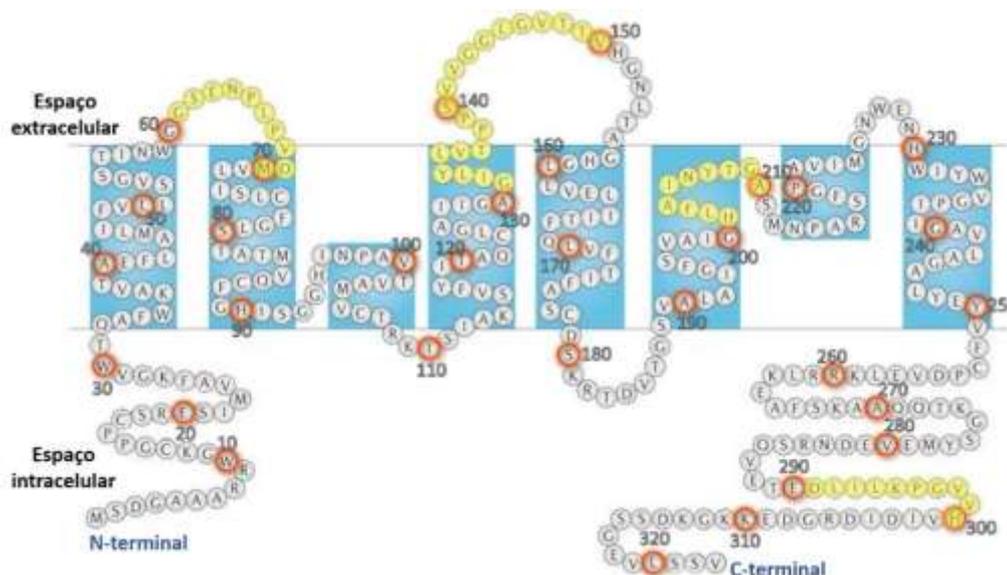
## 4.2 OBTENÇÃO DOS PEPTÍDEOS E PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO

A identificação dos peptídeos mais e menos reativos e específicos ao reconhecimento pelo anticorpo AQP4-IgG presente no soro de pacientes com desordens do ENMO constituiu uma etapa realizada pela Profa. Dra. Doralina em projeto FAPESP anterior (2012/50839-4).

O método ELISA foi usado para identificação dos peptídeos da isoforma M1 da proteína AQP4 humana, que é composta por 323 aminoácidos e foi dividida em 33 peptídeos, compostos por sequências de 10 aminoácidos em 32 peptídeos e 3 no último. Os peptídeos que apresentaram maior potencial de reatividade com o soro dos pacientes, AQP4<sub>61-70</sub> e AQP4<sub>201-210</sub>, e os com menor potencial de reatividade, as sequências AQP4<sub>131-140</sub> e AQP4<sub>141-150</sub>, foram selecionados para a primeira etapa do projeto. Adicionalmente, a sequência peptídica AQP4<sub>291-300</sub>, localizada no domínio intracelular da proteína compôs os sistemas desta primeira etapa (marcados em amarelo na Figura 22). Os demais peptídeos foram utilizados na segunda etapa do projeto. A síntese dos peptídeos foi realizada pela empresa Genemed.

Figura 22 – Diagrama esquemático da proteína AQP4. O diagrama apresenta as localizações extra e intracelulares dos epítomos da AQP4 utilizados na funcionalização das AgNPs, para construção dos nanobiossensores. Os epítomos utilizados na primeira etapa do projeto estão marcados em

amarelo. Os demais foram aplicados na segunda etapa. Os epítomos foram sintetizados a cada 10 aminoácidos, circulos em vermelho.



Fonte: Modificado de Papadopoulos e Verkman (2013)

Para a obtenção das IgGs purificadas e retirada dos demais componentes sorológicos do soro dos pacientes, foi aplicado um protocolo de cromatografia de afinidade conjugada com proteína G (*Protein G-Sepharose*, GE Healthcare) e quantificação pelo método de *Bradford*. Essa etapa foi realizada pelo colaborador do trabalho, o Dr. Luís A. Peroni, um especialista na área de imunologia com ênfase em anticorpos monoclonais. Ele também é sócio-diretor da RheabioTech Desenvolvimento, Produção e Comercialização de Produtos de Biotecnologia Ltda, na cidade de Campinas-SP.

#### 4.3 SÍNTESE, FUNCIONALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

O método de Turkevich (Turkevich et al. 1951) foi aplicado na síntese das AgNPs, que emprega o citrato trissódico como agente redutor do nitrato de prata, precursor das AgNPs. O nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ , 99%, Labsynth, Diadema, São Paulo) e o citrato trissódico ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ , 99%, Labsynth, Diadema, São Paulo) foram usados da maneira como foram recebidos e as soluções foram preparadas utilizando água *Milli-Q*.

Uma solução de 100 mL de  $\text{AgNO}_3$  com concentração de 0,001 mol/L foi preparada e aquecida até 90°C, sob agitação. Atingida a temperatura especificada, foi adicionada à reação uma solução de 1mL de citrato trissódico, 0,3 mol/L. Tipicamente, a solução incolor passa a apresentar a cor amarela após 10 min da adição do agente redutor, indicando a formação das AgNPs em suspensão. Para a estabilização do sistema, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução de hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ , 28%  $\text{NH}_3$  em  $\text{H}_2\text{O}$ , Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA) e a reação foi mantida por mais 2 min. Após esse tempo, a reação foi finalizada e resfriada, para armazenamento ao abrigo da luz à 4°C, até o uso no processo de funcionalização (Gorup et al. 2011).

Cada sistema AgNPs-peptídeo é constituído por um volume total de 3 mL de AgNPs. Primeiramente, modifica-se quimicamente a superfície das AgNPs com 350  $\mu\text{L}$  de uma solução etanólica de 0,025 mmol/L de ácido 11-mercaptoundecanoico (11-MUA, 95% Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA). Essa solução é mantida em reação sob agitação, em temperatura ambiente e protegida da luz. Após essa etapa, uma mistura de 325  $\mu\text{L}$  de 0,04 mmol/L de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC,  $\geq 97\%$  Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA) e 325  $\mu\text{L}$  de 0,3 mmol/L de N-Hidroxisuccinimida (NHS, 98% Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA) foi adicionada à reação, que durou 40 min, nas mesmas condições da primeira etapa. Após esse processo, 1 mL de solução peptídica (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi adicionado à suspensão de AgNPs funcionalizadas, que ficaram em reação sob agitação por 2h em temperatura ambiente e, por fim, mantidas à 4°C por 12 h (Tang et al. 2010).

As nanopartículas sintetizadas e conjugadas com peptídeo foram caracterizadas, para análise da morfologia, diâmetro, dispersão e distribuição de tamanho das nanopartículas utilizando a técnica de microscopia de força atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*).

O microscópio de força atômica SOLVER Nano-NT-MDT foi operado em modo contato intermitente, para obtenção das imagens. As pontas de AFM que foram utilizadas eram de nitreto de silício, com as seguintes especificações: constante de mola de 1.7 N/m, raio  $\sim 10$  nm, frequência de ressonância de 90 kHz, superfície reflexiva de ouro, modelo AN-NSG03, NT-MDT. O substrato de mica muscovita de 15x15  $\text{mm}^2$  (Ted Pella Inc., Redding, California, USA) foi clivado e esterilizado durante 20 min em um equipamento

de emissão de ozônio e luz UV (ProCleaner™ modelo UV.PC.220 Plus - BIOFORCE Nanosciences, Ames, Iowa, USA). Após a limpeza, 50 µL de suspensão de AgNPs foi depositada sobre o substrato, mantido em um dessecador até a secagem completa. As análises das imagens foram realizadas com os *software* Nova-Px 3.2.5-NT-MDT, *Gwyddion* e *ImageJ*.

#### 4.4 ENSAIOS DE INTERAÇÃO COM AS SOLUÇÕES DE IgGs PURIFICADAS DAS AMOSTRAS DE SORO

Após a conjugação do peptídeo da AQP4 na superfície das AgNPs, foram adicionados 200 µL de solução de IgGs purificadas das amostras de soro dos quatro grupos de pacientes analisados neste trabalho. Os ensaios de interação com as amostras de soro foram incubados à 37°C durante 1h (Lismont e Dreesen 2012). As medidas de absorvância foram conduzidas em um espectrofotômetro Shimadzu UV-Vis-NIR 3600 no intervalo de comprimento de onda de 300 a 800 nm, com leitura de 1 nm.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para facilitar a visualização do grande conjunto de informações obtidas na espectrofotometria UV-Vis, foram aplicadas técnicas multidimensionais, utilizando o *software* PEx-Sensors. Para a tarefa de reconhecimento de padrões, técnicas multivariadas não linear (IDMAP, do inglês *Interactive Document Mapping*) e linear (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) foram testadas. O espectro inteiro (300-800 nm) de todas as amostras foram dimensionalmente reduzidos (de 167 a 2 dimensões), por algoritmos PCA e Fastmap, e as dissimilaridades entre as amostras foram convertidas em distâncias Euclidianas. Os dados de projeção multivariada foram aprimorados com o algoritmo *Force Scheme* usando 500 iterações para minimizar a perda de informações durante o processo de redução. Ainda, foram calculados os coeficientes de silhuetas das projeções multivariadas, para avaliar a capacidade de discriminação de cada peptídeo. A avaliação quantitativa da acurácia do nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub> foi realizada com uma Curva Característica de Operação do Receptor (Curva ROC, do inglês *Receiver Operating Characteristic curve*).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 PARÂMETROS DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

A formação do conjugado AgNP-AQP4pep e a sua interação com o anticorpo AQP4-IgG é verificada por meio das bandas que se formam no espectro UV-Vis. A mudança no padrão dos espectros após a interação com o anticorpo é analisada a partir de um referencial, que é o padrão do conjugado AgNP-AQP4pep.

Essas mudanças espectrais, juntamente com as alterações de cor das suspensões ocorrem pelo aumento do espalhamento de luz e acoplamento dos *plasmons* de superfície entre as nanopartículas agregadas (Evanoff e Chumanov 2005).

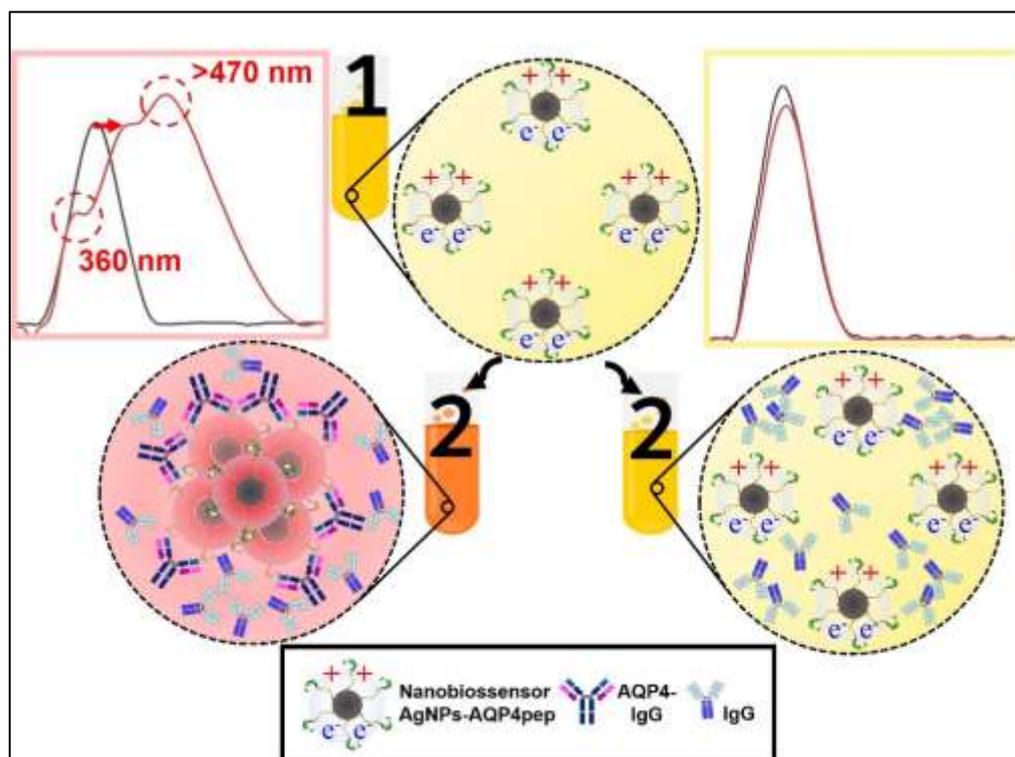
Para ilustrar as mudanças no espectro em resposta às interações entre o AQP4-IgG e o nanobiossensor, foi elaborado um diagrama esquemático (Figura 23). No momento 1, os conjugados AgNP-AQP4pep encontram-se dispersos resultando em uma suspensão de cor amarela. Por estarem dispersos, os campos plasmônicos não se acoplam, produzindo um espectro com uma única banda LSPR (espectro em preto) (Kelly et al. 2003). No momento 2, existem duas situações: do lado esquerdo, uma amostra de anticorpos contendo o AQP4-IgG é adicionada à suspensão e, do lado direito, uma amostra com outras IgGs é adicionada à outra suspensão.

No primeiro caso, a interação do anticorpo com o peptídeo imobilizado na superfície das AgNPs promove a aproximação das nanopartículas vizinhas, alterando o padrão de absorção e espalhamento de luz. Por isso, ocorre no espectro em vermelho, a formação de duas bandas adicionais com picos máximos em 360 e acima de 470 nm, e deslocamento do pico referencial para a direita, indicado pela seta (Clarkson et al. 2011).

No segundo caso, como as IgGs não interagem com o peptídeo da AQP4 na superfície do nanobiossensor, os conjugados AgNP-AQP4pep permanecem dispersos, a única mudança é o aumento do índice de refração causado pelas biomoléculas em suspensão (Shankaran et al. 2007). Consequentemente, não há mudanças significativas no padrão do espectro UV-Vis.

Figura 23 – Diagrama esquemático do mecanismo de sensoriamento com o nanobiossensor de nanopartículas de prata conjugadas a um peptídeo da AQP4. O espectro que representa o sensor está apresentado em preto e reflete um sistema coloidal não aglomerado, ou seja, com

nanopartículas bem dispersas (momento 1). Quando há interação, mediante reconhecimento do peptídeo pelo anticorpo AQP4-IgG, ocorre a agregação das nanopartículas, resultando no deslocamento e formação de novas bandas no espectro, representado em vermelho (momento 2, esquerda). Quando outras IgGs são adicionadas à suspensão, o reconhecimento não ocorre e nem as mudanças no espectro, que se mantém similar ao referencial.



Em resumo, foram considerados os seguintes aspectos para a classificação de uma amostra como positiva para o anticorpo AQP4-IgG, usando o nanobiossensor de AgNPs:

- Deslocamento da banda referencial (espectro do conjugado AgNP-AQP4pep), com deslocamento do pico máximo ( $\lambda_{\max}$ ) para regiões de maior comprimento de onda, ao vermelho (*redshift*);
- Aparecimento de novas bandas no espectro em regiões de maior comprimento de onda (> 470nm) e em aproximadamente 360 nm, devido ao acoplamento dipolar entre as nanopartículas agregadas.

Deslocamentos de 6 a 7 nm no pico referencial não foram considerados como parâmetro para classificar a amostra como positiva para o anticorpo AQP4-IgG, pois refletem adsorção não específica ou apenas um aumento no índice de refração do meio (Shanmuganathan et al. 2019).

Amostras de soro provenientes de pacientes diagnosticados com EM foram usadas como controle negativo, juntamente com as amostras de indivíduos saudáveis, pois sabe-se que não apresentam o autoanticorpo AQP4-IgG circulante (Smith et al. 2009).

## 5.2 1ª ETAPA DO PROJETO: DESENVOLVIMENTO DO NANOBIOSSENSOR

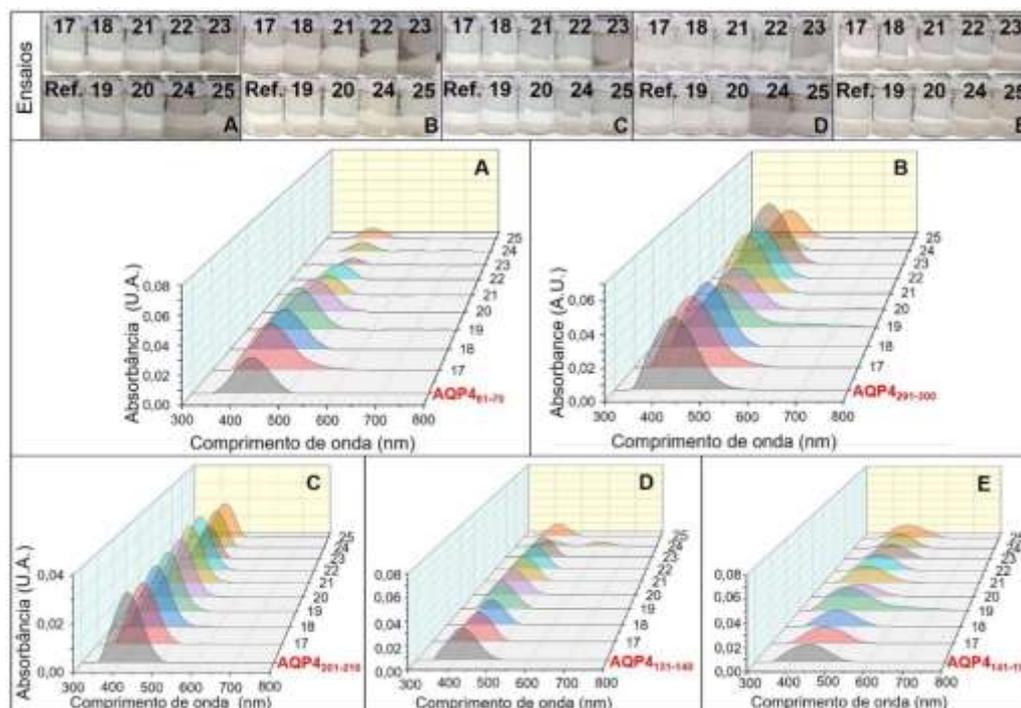
Os resultados da primeira etapa do projeto foram publicados na Revista *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* da Science Direct: Higa AM, Moraes AS, Shimizu FM, Bueno RG, Peroni LA, Strixino FT, Sousa NAC, Deffune E, Bovolato ALC, Oliveira ON Jr, Brum DG, Leite FL. Anti-aquaporin-4 immunoglobulin G colorimetric detection by silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2022 Apr;41:102531. doi: 10.1016/j.nano.2022.102531. Epub 2022 Jan 31. PMID: 35114406.

### 5.2.1. Ensaios com as soluções de IgGs derivadas de amostras de soro dos grupos controle: pacientes com EM e saudáveis

Os nanobiossensores construídos com os cinco epítomos: AQP4<sub>61-70</sub>, AQP4<sub>291-300</sub>, AQP4<sub>201-210</sub>, AQP4<sub>131-140</sub> e AQP4<sub>141-150</sub> não detectaram o anticorpo AQP4-IgG nas soluções de IgGs provenientes de amostras sorológicas de pacientes com EM e saudáveis (pacientes 17–25), como mostrado na figura 24.

Figura 24 – Espectros resultantes da interação das amostras de IgGs que foram purificadas do soro de pacientes com EM (17-20) e indivíduos saudáveis (21-25) com os nanobiossensores de AgNPs conjugadas aos epítomos AQP4<sub>61-70</sub> (A), AQP4<sub>291-300</sub> (B), AQP4<sub>201-210</sub> (C), AQP4<sub>131-140</sub> (D) e AQP4<sub>141-150</sub> (E). Os espectros em cinza são referentes aos nanobiossensores antes da interação com os anticorpos. As fotografias acima dos gráficos mostram as cores das suspensões nos ensaios

com os cinco nanobiossensores, sendo “Ref.” a cor referencial da solução do nanobiossensor antes da interação.



Em quase todos os casos, o padrão do espectro de absorção apresentou uma única banda, como no espectro referencial de cada conjugado AgNP-AQP4pep, sem formação de bandas em regiões de maior comprimento de onda ou um novo pico em 360 nm. Houve algumas exceções que não comprometeram a conclusão final.

Nos ensaios de interação com os nanobiossensores compostos com os epítopos AQP4<sub>291-300</sub> e AQP4<sub>141-150</sub>, houve aumento no espalhamento de luz nos espectros referentes ao paciente 19 (EM), mas a cor das suspensões se manteve amarela, como na referência.

Houve um caso falso-positivo no ensaio realizado com o epítipo AQP4<sub>131-140</sub> na interação com a amostra referente ao indivíduo 24 (saudável), evidenciado pela formação de uma segunda banda no espectro de absorção, em região de maior comprimento de onda, combinada com a mudança de cor da suspensão, que ficou mais escura.

### **5.2.2. Ensaio com as soluções de IgGs derivadas de amostras de soro dos pacientes ENMO**

As soluções de IgGs purificadas de amostras soropositivas para o AQP4-IgG, testadas previamente com o ensaio CBA (Tabela 4: pacientes 1-8) foram todas positivas nos ensaios com os nanobiossensores desenvolvidos com os peptídeos da AQP4, com exceção do conjugado AgNPs-AQP4<sub>291-300</sub>. Após todas as análises, o nanobiossensor composto com o epítipo AQP4<sub>61-70</sub> foi o mais sensível e específico na detecção do anticorpo AQP4-IgG.

Já nas análises feitas com amostras soronegativas testadas com o CBA, de pacientes ENMO (Tabela 4: pacientes 9-16), o anticorpo AQP4-IgG foi detectado em cinco, combinando as respostas dos cinco nanobiossensores. Usando o nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub> em ensaios com soluções de IgGs totais com concentração de 100µg/mL, o anticorpo AQP4-IgG foi detectado em quatro amostras, dos pacientes 9, 10, 11 e 14. O anticorpo também foi detectado na amostra do paciente 12, utilizando os nanobiossensores AgNPs-AQP4<sub>141-150</sub> e AgNPs-AQP4<sub>201-210</sub>. O resumo destes resultados está mostrado na Tabela 4 e serão discutidos no tópico 5.2.3.

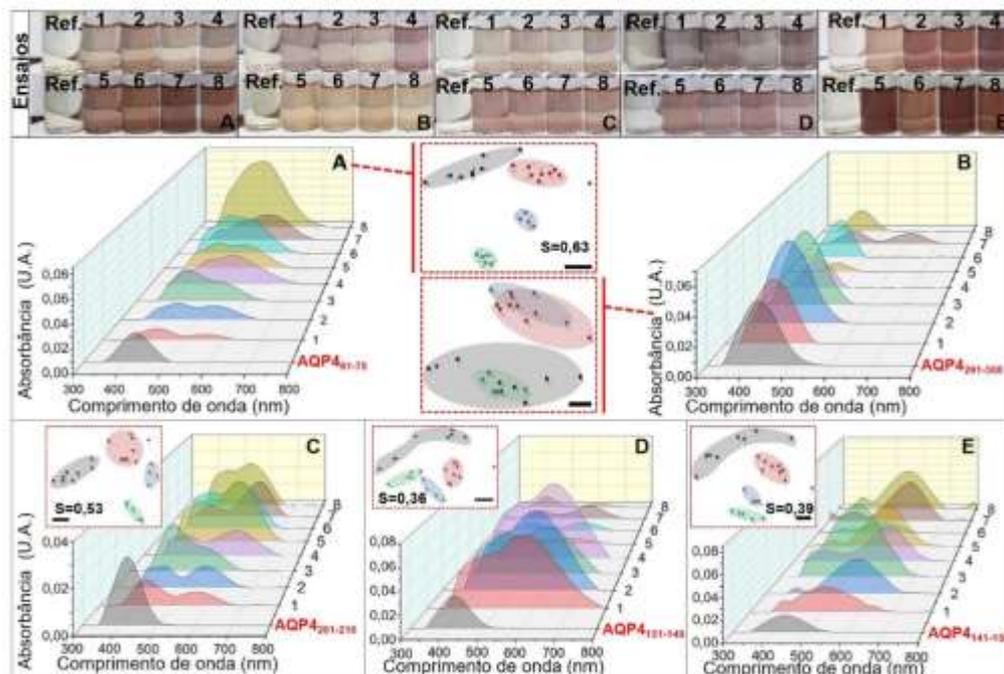
Tabela 4 – Comparação entre os ensaios realizados com os nanobiossensores de AgNPs-AQP4<sub>pep</sub> e o CBA nas análises realizadas com as amostras de IgGs que foram purificadas do soro de pacientes classificados como ENMO soropositivos (1-8) e soronegativos (9-16) usando a concentração padrão (56µg/mL) de IgGs totais. Para um dos nanobiossensores, os ensaios foram feitos com a concentração de 100µg/mL. A sensibilidade do sensoriamento é classificada de acordo com as características das bandas no espectro de absorção: formação de uma nova banda LSPR (+); formação de uma nova banda LSPR e deslocamento do pico principal (++); formação de uma nova banda LSPR, deslocamento do pico principal e novo pico em ~360 nm (+++).

PACIENTES	CBA	NANOBIOSSENSORES DE AgNPs-AQP4 <sub>pep</sub> .					
		56 µg/mL					100 µg/mL
		AQP4 61-70	AQP4 291-300	AQP4 201-210	AQP4 131-140	AQP4 141-150	AQP4 61-70
1	Positivo	+++	-	++	+++	+	
2		+++	-	+++	+++	+	
3		++	-	++	+++	+	
4		+++	-	+++	+++	+	
5		+++	-	+++	+	+	
6		+++	-	+++	+	+	
7		+++	+	+++	+	+	
8		+++	-	+++	+	+	
9	Negativo	-	-	+	-	+	+
10		-	-	-	-	-	+
11		-	-	-	-	+	+
12		-	-	+	-	+	-
13		-	-	-	-	-	-
14		+	+	+	-	-	+
15		-	-	-	-	-	-
16		-	-	-	-	-	-

Os dados dos pacientes ENMO soropositivos (1-8) estão apresentados na Figura 25, para os nanobiossensores de AgNPs conjugados com os epítomos AQP4<sub>61-70</sub> (Figura 25A), AQP4<sub>291-300</sub> (Figura 25B), AQP4<sub>201-210</sub> (Figura 25C), AQP4<sub>131-140</sub> (Figura 25D) e AQP4<sub>141-150</sub> (Figura 25E). Foram destacados os resultados dos dois nanobiossensores com reatividades contrastantes: AQP4<sub>61-70</sub> e AQP4<sub>291-300</sub> (Figura 25A e 25B).

Figura 25 – Espectros resultantes da interação das amostras de IgGs que foram purificadas do soro de pacientes diagnosticados como ENMO soropositivos para o autoanticorpo AQP4-IgG (1-8) com os nanobiossensores de AgNPs conjugadas aos epítomos AQP4<sub>61-70</sub> (A), AQP4<sub>291-300</sub> (B), AQP4<sub>201-210</sub> (C), AQP4<sub>131-140</sub> (D) e AQP4<sub>141-150</sub> (E). Os espectros em cinza são referentes aos nanobiossensores antes da interação com os anticorpos. As fotografias acima dos gráficos mostram as cores das suspensões nos ensaios com os cinco nanobiossensores, sendo “Ref.” a cor referencial da solução do nanobiossensor antes da interação. Os insertos nas figuras são resultados

da plotagem IDMAP do espectro bruto dos soropositivos (1-8, preto), soronegativos (9-16, vermelho), pacientes com EM (17-20, azul) e saudáveis (21-25, verde).



O nanobiossensor mais sensível, desenvolvido com o epítipo AQP4<sub>61-70</sub>, apresentou  $\lambda_{\max}$  de 424 nm e deslocamento médio  $\Delta\lambda$  de 37,7 nm, após a interação com as soluções de IgGs das amostras de soro, que ficaram incubadas por 60 min. Além do deslocamento do pico referencial, foi observada uma banda mais larga entre 500 e 600 nm no espectro eletromagnético, e a formação de um novo pico em ~360 nm.

Contrastando com a resposta deste nanobiossensor, o conjugado AgNPs-AQP4<sub>291-300</sub> detectou o anticorpo apenas na amostra purificada do paciente 7, como apresentado na Figura 25B. Como ficou claro na Tabela 4, esse epítipo não é adequado para ser usado em ensaios de detecção do biomarcador AQP4-IgG.

Para comparar a capacidade de cada nanobiossensor de discriminar os sinais das amostras dos pacientes soropositivos dos controles, todo o espectro UV-Vis foi tratado com uma técnica de projeção multidimensional, o IDMAP. Esta técnica transformou todos os espectros UV-Vis em pontos, formando os mapas que estão apresentados nos insertos da Figura 25.

Pode-se observar que a melhor discriminação foi obtida com o peptídeo AQP4<sub>61-70</sub> (Figura 25A), cujo coeficiente de silhueta é  $S = 0,63$ , seguido do peptídeo AQP4<sub>201-210</sub>

( $S = 0,53$ , Figura 25D), no qual, de acordo com a interpretação de Rousseeuw (Rousseeuw 1987), é moderada. Embora ainda seja possível diferenciar todos os *clusters*, uma fraca discriminação foi calculada para AQP4<sub>131-140</sub> ( $S = 0,36$ , Figura 25B) e AQP4<sub>141-150</sub> ( $S = 0,39$ , Figura 25C) e nenhuma informação substancial pode ser extraída da Figura 25E.

O nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>201-210</sub> resultou no segundo sistema mais sensível ao anticorpo AQP4-IgG com respostas ópticas similares ao sistema conjugado ao epítipo AQP4<sub>61-70</sub>. Foi observado que as modulações das propriedades ópticas não foram pronunciadas em todos os parâmetros, como foram nos espectros do nanobiossensor conjugado ao epítipo AQP4<sub>61-70</sub> mas, ainda assim, nos permitiu discriminar entre amostras soropositivas e negativas para o biomarcador.

A capacidade de discriminação dos nanobiossensores contendo os epítipos presentes na alça extracelular C, AQP4<sub>131-140</sub> e AQP4<sub>141-150</sub>, foi fraca. O nanobiossensor de AgNPs-AQP4<sub>291-300</sub> foi o menos sensível e específico no ensaio de detecção do anticorpo AQP4-IgG e isso pode ser devido à localização desse epítipo na proteína, que é no domínio intracelular C-terminal.

### **5.2.3. Estudo da influência da concentração de IgGs totais na detecção do biomarcador pelos nanobiossensores nas amostras de pacientes ENMO AQP4-IgG soronegativos**

No grupo dos pacientes ENMO soronegativos, pelo CBA-AQP4, a falha na detecção do anticorpo pode estar relacionada com o limite de detecção do método ou os anticorpos presentes nas amostras desses pacientes são reativos a outros antígenos. Aqui, o foco foi investigar a reatividade diferenciada dos anticorpos contra os epítipos da AQP4 e a influência da concentração de IgGs das amostras, levando em consideração que ela poderia estar abaixo do limite de detecção.

Para avaliar a influência da concentração da solução de IgGs totais na detecção do biomarcador das doenças do ENMO, o nanobiossensor desenvolvido com o epítipo mais reativo, o AQP4<sub>61-70</sub>, foi escolhido para os ensaios com soluções de IgGs mais concentradas, 100 $\mu$ g/mL.

Nesta concentração, o anticorpo AQP4-IgG foi detectado nas amostras de quatro pacientes (9, 10, 11 e 14), não detectados previamente com a concentração padrão de 56 $\mu$ g/mL, exceto o paciente 14 (ver Tabela 4).

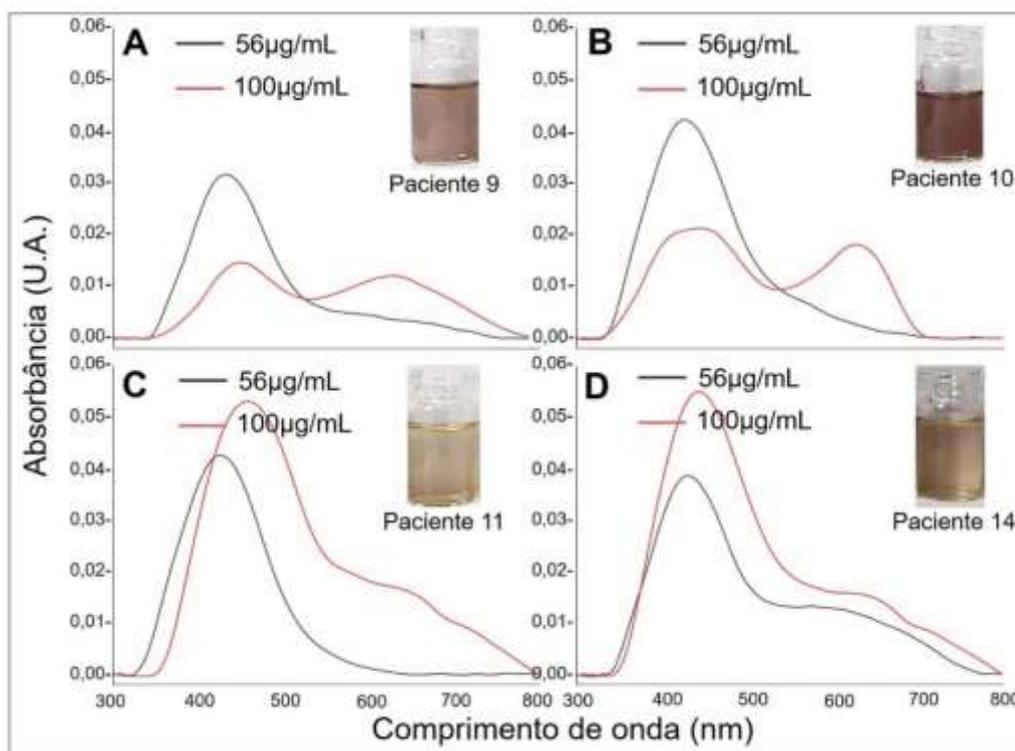
Os espectros desses pacientes estão mostrados na Figura 26. Um pronunciado deslocamento à direita foi observado no espectro de absorção dos pacientes 9,  $\lambda_{\text{máx}} = 444 \pm 7$  nm e  $\Delta\lambda = 20$  nm (Figura 26A) e 10,  $\lambda_{\text{máx}} = 456,5 \pm 13,4$  nm e  $\Delta\lambda = 32,5$  nm (Figura 26B), usando o valor referencial de  $\lambda_{\text{máx}} = 424$  nm do nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub>. Além do deslocamento do pico referencial, houve formação de uma nova banda em aproximadamente 600 nm, ausente nos espectros resultantes dos ensaios com soluções de IgGs com concentração de 56 $\mu$ g/mL, demonstrando que a detecção de AQP4-IgG (soropositividade) foi dependente da concentração.

Também foi observado um forte deslocamento de  $\Delta\lambda = 24$  nm e  $\lambda_{\text{máx}} = 448 \pm 14,1$  nm no espectro de absorção do paciente 11 e uma larga banda em 655 nm (Figura 26C) e, no ensaio do paciente 14,  $\lambda_{\text{máx}} = 444 \pm 0,7$  com  $\Delta\lambda = 20,5$  nm (Figura 26D), com uma banda em ~630 nm.

Não foi possível confirmar a soropositividade do paciente 12 usando o nanobiossensor AgNPs- AQP4<sub>61-70</sub> nessa condição de alta concentração. Mas, a detecção do biomarcador nesse paciente foi possível com outros nanobiossensores (AgNPs-AQP4<sub>141-150</sub> e AgNPs-AQP4<sub>201-210</sub>) nos ensaios com concentração padrão, por isso pode-se inferir que a reatividade também foi dependente do epítipo.

Figura 26 – Espectros UV-Vis de pacientes ENMO soronegativos indicados pelos números (9, 10, 11 e 12) no sistema do nanobiossensor de AgNPs conjugadas ao epítipo AQP4<sub>61-70</sub>. A linha vermelha corresponde ao espectro de absorção do soro pouco diluído, ou seja, com concentração total de IgGs alta (100 $\mu$ g/mL), e a linha preta é correspondente à alta diluição da solução de IgGs, com concentração total mais baixa (56

$\mu\text{g/mL}$ ). As fotografias nos insertos mostram a cor resultante da suspensão após interação com as amostras de IgGs mais concentradas.



### 5.3 2ª ETAPA DO PROJETO: TRIAGEM DOS PEPTÍDEOS

Para acompanhar a localização dos epítomos mencionados neste tópico, pode-se consultar a Figura 22, do tópico 4.2.

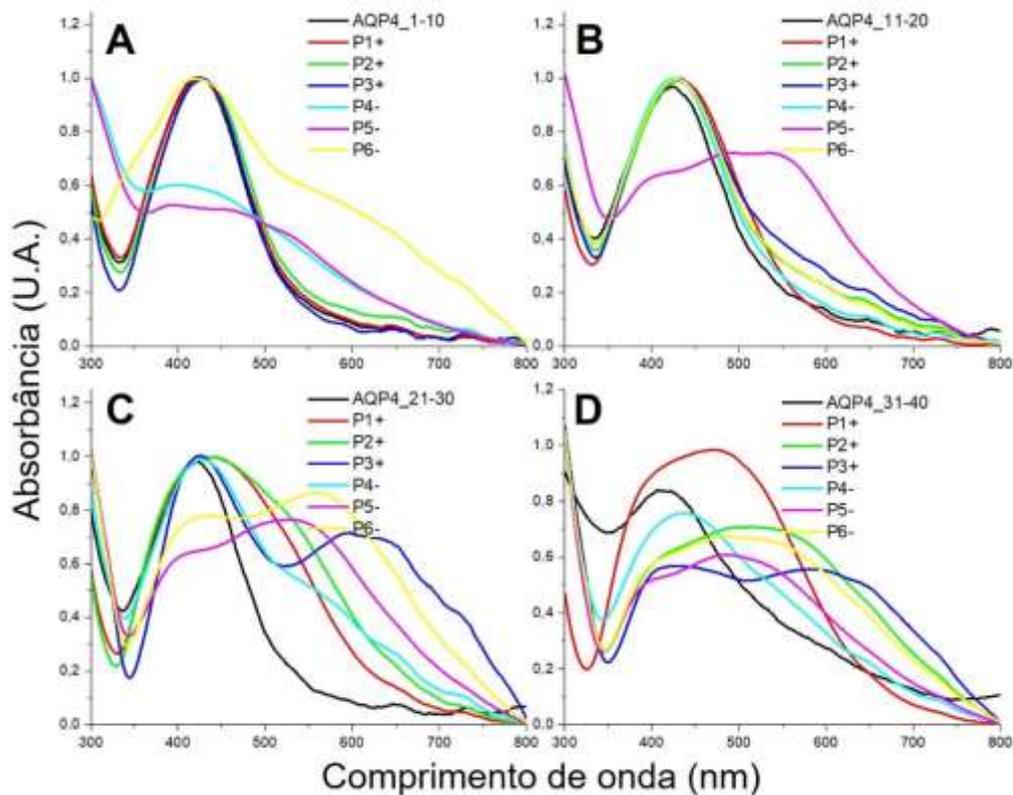
#### 5.3.1. Porção N-terminal e região intracelular inicial

Os nanobiossensores desenvolvidos com os epítomos AQP4<sub>1-10</sub> (Figura 27A) e AQP4<sub>11-20</sub> (Figura 27B) não detectaram o anticorpo nas amostras dos pacientes soropositivos (P1+, P2+ e P3+), mantendo o mesmo padrão dos espectros referenciais (linha preta), que são a assinatura do conjugado AgNPs-AQP4<sub>pep</sub>. No entanto, o nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>1-10</sub> detectou o anticorpo nas amostras de todos os pacientes ENMO soronegativos testados (P4-, P5- e P6-) e o nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>11-20</sub> detectou o anticorpo em uma dessas amostras (P5-). Ambos foram específicos às doenças do ENMO, não detectando o anticorpo nas amostras controle (Apêndice A: A e B).

Analisando os espectros do nanobiossensor construído com o epítipo AQP4<sub>21-30</sub> (Figura 27C), foi observado que em duas amostras soropositivas (P1+ e P2+), a interação foi mediana, sem formação de banda em região de maior comprimento de onda, apenas um deslocamento à direita e alargamento da banda referencial. Já nos outros pacientes soronegativos (P4-, P5- e P6-) e soropositivo (P3+), as mudanças espectrais foram mais pronunciadas, com formação de uma nova banda. Com o nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>31-40</sub> (Figura 27D) houve maior interação com as amostras soropositivas (P1+, P2+ e P3+) e com duas soronegativas (P5- e P6-), não detectando o anticorpo em uma amostra soronegativa. Ambos foram específicos às doenças do ENMO, não detectando o anticorpo nas amostras controle (Apêndice A: C e D).

Figura 27 – Espectros resultantes da interação das amostras de IgGs que foram purificadas do soro de pacientes diagnosticados como ENMO soropositivos (P1+, P2+ e P3+) e soronegativos para o biomarcador (P4-, P5- e P6-) com os nanobiossensores de AgNPs conjugadas aos epítipos

AQP4<sub>1-10</sub> (A), AQP4<sub>11-20</sub> (B), AQP4<sub>21-30</sub> (C) e AQP4<sub>31-40</sub> (D). Os espectros em preto são referentes aos nanobiossensores antes da interação com os anticorpos.

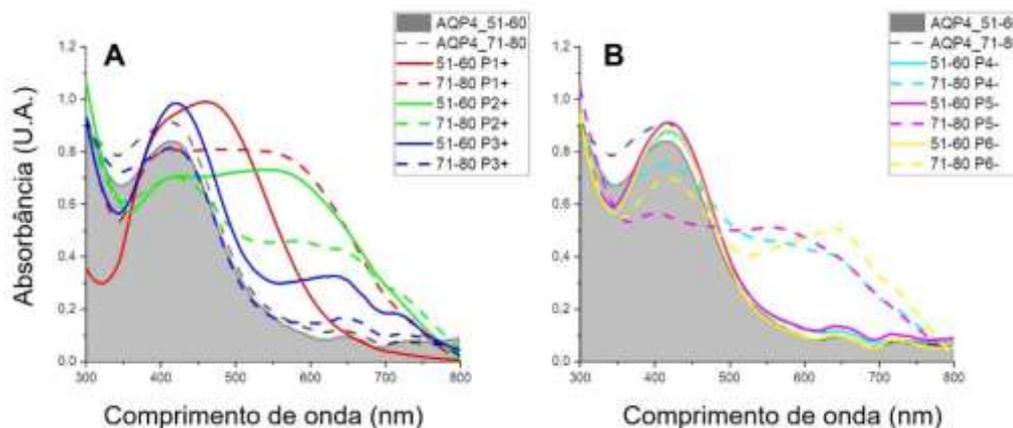


### 5.3.2. Epítos adjacentes ao AQP4<sub>61-70</sub>

Os resultados mostraram que o nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>51-60</sub> detectou o anticorpo nas amostras dos pacientes ENMO soropositivos (Figura 28A – linhas contínuas) e o contrário foi obtido com as amostras dos pacientes ENMO soronegativos (Figura 28B – linhas contínuas) e controles (Apêndice A: E). Já com o nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>71-80</sub>, o anticorpo foi detectado em todas as amostras dos pacientes ENMO soronegativos (Figura 28B – linhas tracejadas) e em uma amostra derivada de um paciente EM (EM3), constituindo um resultado falso-positivo (Apêndice A: F).

Figura 28 – Espectros resultantes da interação das amostras de IgGs que foram purificadas do soro de pacientes diagnosticados como ENMO soropositivos (P1+, P2+ e P3+) (A) e soronegativos para o biomarcador (P4-, P5- e P6-) (B) com os nanobiossensores de AgNPs

conjugadas aos epítomos AQP4<sub>51-60</sub> (linhas contínuas) e AQP4<sub>71-80</sub> (linhas tracejadas). Os espectros em cinza são referentes aos nanobiossensores antes da interação com os anticorpos.

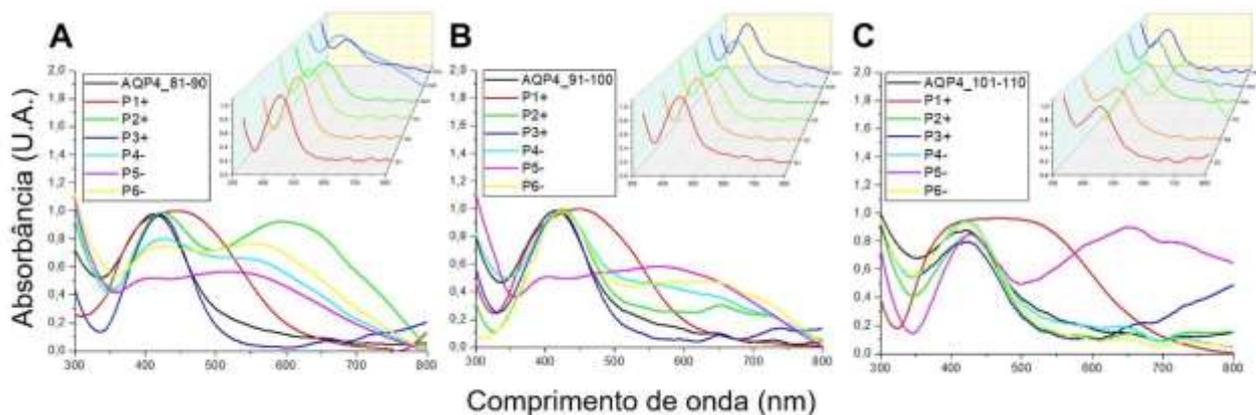


### 5.3.3. Região transmembrana AQP4<sub>81-90</sub> ao AQP4<sub>101-110</sub>

Os nanobiossensores AgNPs-AQP4<sub>81-90</sub> (Figura 29A) e AgNPs-AQP4<sub>91-100</sub> (Figura 29B) apresentaram resultados iguais. Ambos detectaram o anticorpo nas mesmas amostras de pacientes ENMO soropositivos e negativos e não detectaram na mesma amostra de paciente ENMO soropositivo (P3+), mas o primeiro nanobiossensor resultou em um falso-positivo (EM2). Já o nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>101-110</sub> (Figura 29C) foi menos reativo com as amostras de ambos os grupos, detectando o anticorpo em apenas uma amostra de cada grupo (P1+ e P5+), e em um indivíduo saudável (S3).

Figura 29 – Espectros resultantes da interação das amostras de IgGs que foram purificadas do soro de pacientes diagnosticados como ENMO soropositivos (P1+, P2+ e P3+) e soronegativos para o biomarcador (P4-, P5- e P6-) com os nanobiossensores de AgNPs conjugadas aos epítomos AQP4<sub>81-90</sub> (A), AQP4<sub>91-100</sub> (B) e AQP4<sub>101-110</sub>. Os espectros em preto são referentes aos

nanobiossensores antes da interação com os anticorpos. Os gráficos nos insertos são referentes à interação com os grupos controle, EM1-EM3 e S1-S3.

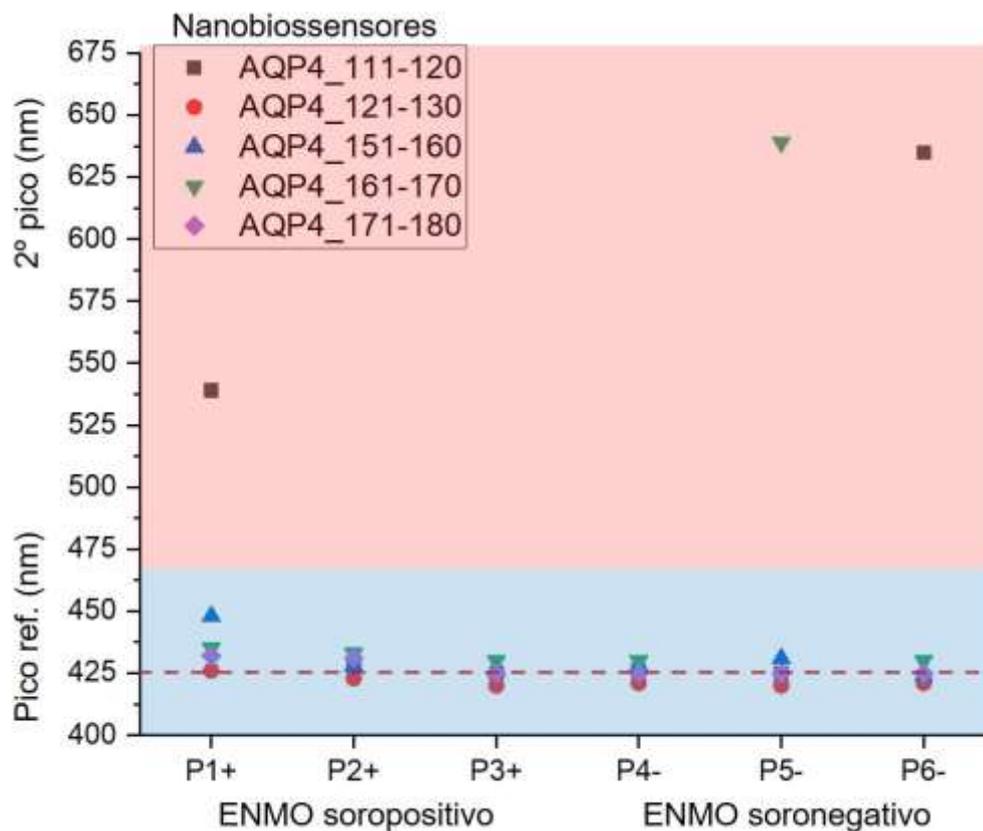


#### 5.3.4. Regiões adjacentes aos epítomos AQP4<sub>131-140</sub> e AQP4<sub>141-150</sub>

Os nanobiossensores desenvolvidos com os epítomos adjacentes aos peptídeos AQP4<sub>131-140</sub> (peptídeo 14) e AQP4<sub>141-150</sub> (peptídeo 15) discutidos no tópico 5.2.2, os aa111-120 (Figura 30: quadrado preto), aa121-130 (Figura 30: círculo vermelho), aa151-160 (Figura 30: triângulo azul), aa161-170 (Figura 30: triângulo verde) e aa171-180 (Figura 30: losango roxo) não detectaram o anticorpo nas amostras dos pacientes ENMO soropositivos e negativos, com poucas exceções, nas amostras dos pacientes P1+ e P6- com o nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>111-120</sub> e do paciente P5- com o nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>161-170</sub>, em cujos espectros de absorção foi observada a formação de uma nova banda em regiões de maior comprimento de onda. Também houve alguns resultados falso-positivos, com os nanobiossensores AgNPs-AQP4<sub>111-120</sub> (Apêndice B: A-EM3) e AgNPs-AQP4<sub>151-160</sub> (Apêndice B: C-S3).

Figura 30 – Valores do pico máximo referencial (parte azul) e do segundo pico (parte rosa), referente à formação da nova banda após interação dos nanobiossensores (representados pelas

formas geométricas) com as amostras de IgGs purificadas do soro de pacientes ENMO soropositivos e negativos.

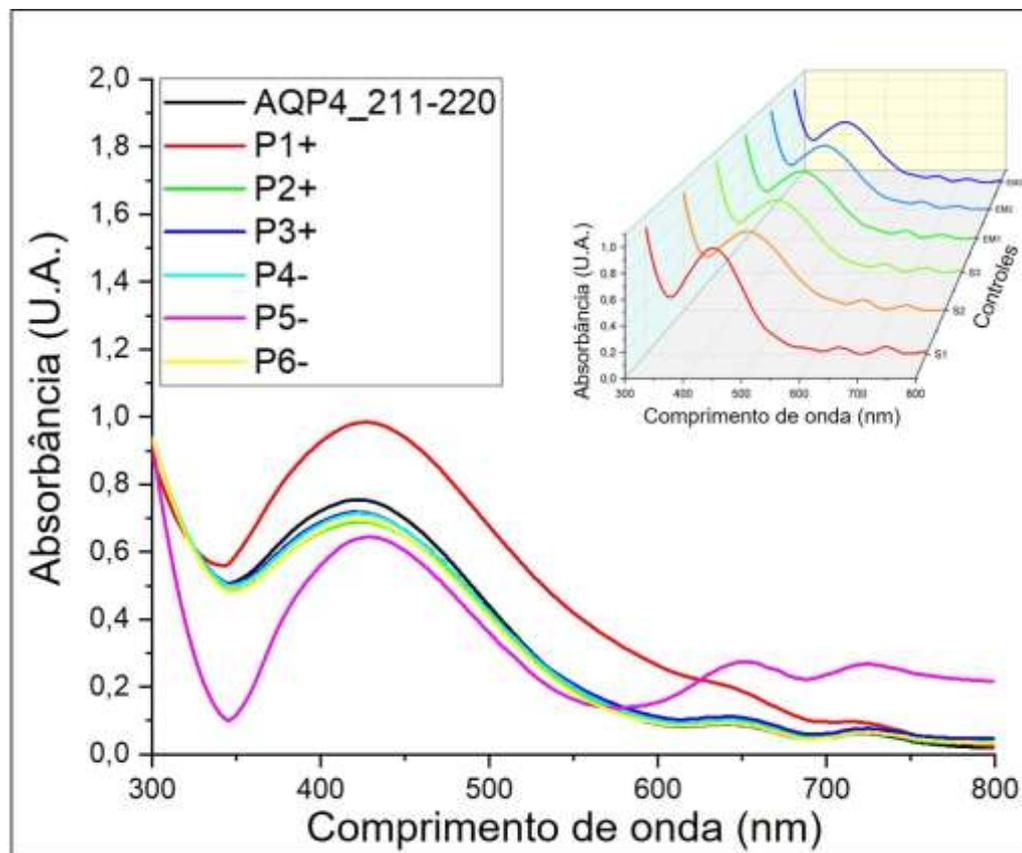


### 5.3.5. Epítipo adjacente ao AQP4<sub>201-210</sub>

Comparando os nanobiossensores desenvolvidos com os epítipos AQP4<sub>201-210</sub> e AQP4<sub>211-220</sub>, foi observado que o primeiro detectou o anticorpo nas amostras dos pacientes ENMO soropositivos (Tabela 4 – pacientes 1-8) e em três amostras de soronegativos (Tabela 4 – pacientes 9, 12 e 14) e o segundo não detectou o anticorpo nem nas amostras provenientes de pacientes soropositivos, nem de soronegativos (Figura 31), mantendo o mesmo padrão de espectro referencial do nanobiossensor e dos controles negativos (inserto da figura 31).

Figura 31– Espectros resultantes da interação das amostras de IgGs que foram purificadas do soro de pacientes diagnosticados como ENMO soropositivos (P1+, P2+ e P3+) e soronegativos para o biomarcador (P4-, P5- e P6-) com o nanobiossensor de AgNPs conjugadas ao epítipo AQP4<sub>211-</sub>

220. Os espectros apresentados no inserto da figura são referentes à interação dos nanobiossensores com as amostras do grupo controle (S1-S3 e EM1-EM3).

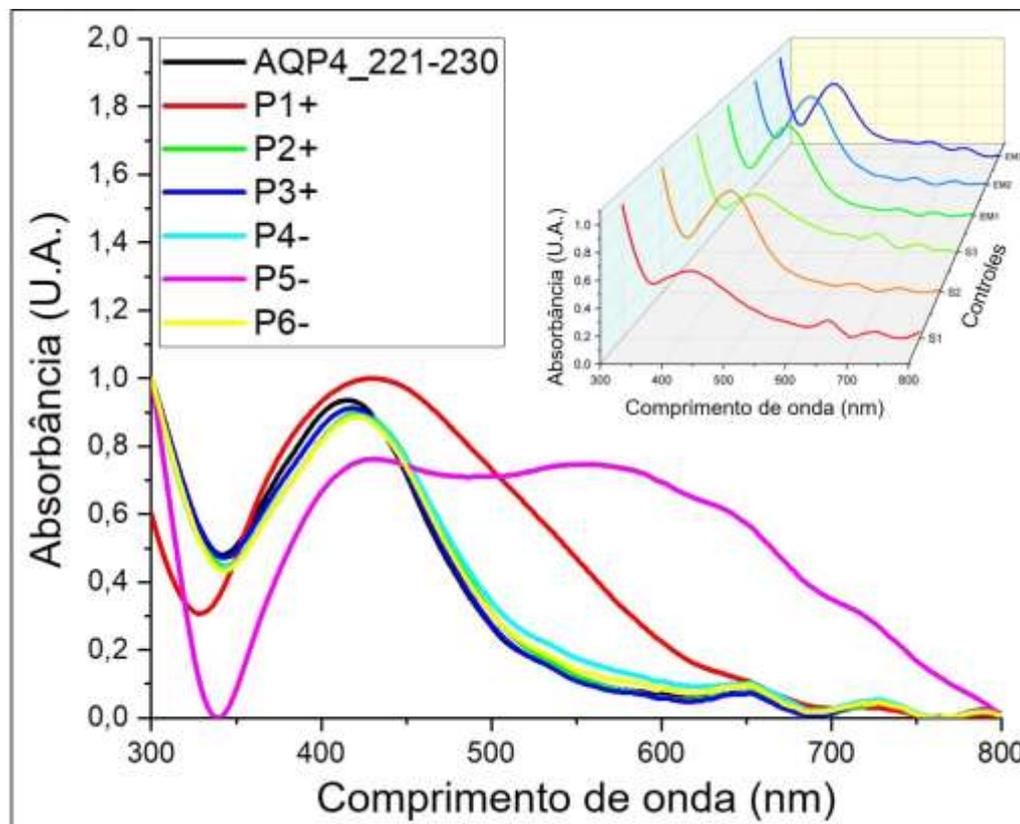


### 5.3.6. Alça extracelular E

A última alça extracelular da proteína AQP4 é denominada de *loop E* e é composta pela sequência de aminoácidos 226-229. O epítipo de trabalho que corresponde à essa porção da proteína é o 23 (AQP4<sub>221-230</sub>). Os resultados obtidos com o nanobiossensor mostram que o epítipo não foi bem reconhecido pelos anticorpos presentes nas amostras dos pacientes ENMO soropositivos. O nanobiossensor apresentou apenas um resultado de interação bastante expressivo, no ensaio com a amostra de um paciente ENMO soronegativo, o P5- (Figura 32).

Figura 32 – Espectros resultantes da interação das amostras de IgGs que foram purificadas do soro de pacientes diagnosticados como ENMO soropositivos (P1+, P2+ e P3+) e soronegativos para o biomarcador (P4-, P5- e P6-) com o nanobiossensor de AgNPs conjugadas ao epítipo

AQP4<sub>221-230</sub>. Os espectros apresentados no inserto da figura são referentes à interação dos nanobiossensores com as amostras do grupo controle (S1-S3 e EM1-EM3).

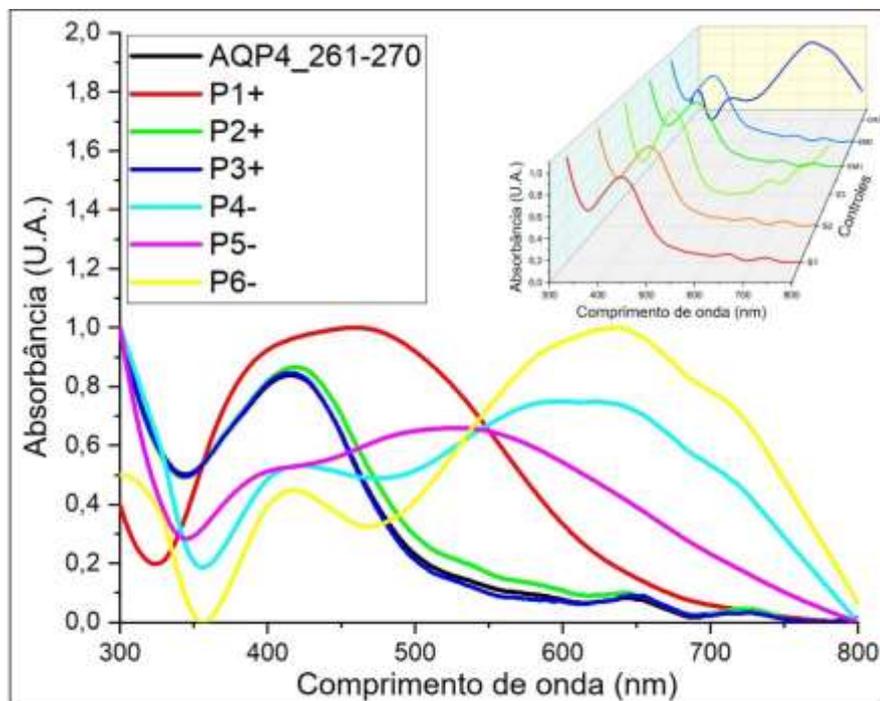


### 5.3.7. Região intracelular do epítipo AQP4<sub>261-270</sub> ao AQP4<sub>291-300</sub>

Os sistemas funcionalizados com os peptídeos AQP4<sub>261-270</sub> e AQP4<sub>271-280</sub>, contidos na sequência aa269-283, também não apresentaram altos níveis de sensibilidade ao biomarcador nas amostras de pacientes soropositivos. O nanobiossensor desenvolvido com o epítipo AQP4<sub>261-270</sub> (Figura 33) detectou o anticorpo em apenas uma amostra de paciente ENMO soropositivo (P1+), enquanto que o nanobiossensor composto com o epítipo AQP4<sub>271-280</sub> não detectou o anticorpo nas amostras de pacientes ENMO soropositivos e nem de soronegativos. Comparando os dois nanobiossensores com o dado da literatura, observa-se que o epítipo AQP4<sub>261-270</sub> foi mais sensível ao anticorpo AQP4-IgG, especificamente de pacientes ENMO soronegativos (P4-, P5- e P6-). Este sensor também gerou um resultado falso-positivo em uma amostra de paciente EM (EM3).

Figura 33 – Espectros resultantes da interação das amostras de IgGs que foram purificadas do soro de pacientes diagnosticados como ENMO soropositivos (P1+, P2+ e P3+) e soronegativos para o biomarcador (P4-, P5- e P6-) com o nanobiossensor de AgNPs conjugadas ao epítipo

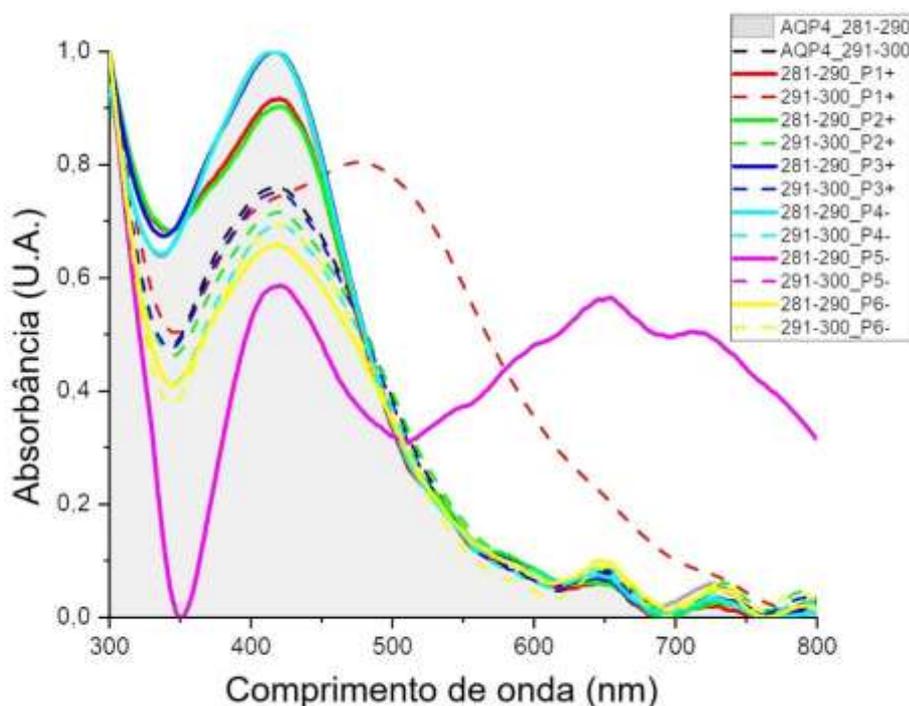
AQP4<sub>261-270</sub>. Os espectros apresentados no inserto da figura são referentes à interação dos nanobiossensores com as amostras do grupo controle (S1-S3 e EM1-EM3).



Nos resultados com os nanobiossensores desenvolvidos com os epítomos AQP4<sub>281-290</sub> e AQP4<sub>291-300</sub>, também foi observada pouca interação com os anticorpos, que ocorreu apenas em uma amostra de paciente soronegativo (P5-) com o nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>281-290</sub> (Figura 34 – linha contínua) e em uma amostra soropositiva com o nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>291-300</sub> (Figura 34 – linha tracejada). Ambos não detectaram o anticorpo nas amostras controle (Apêndice C).

Figura 34– Espectros resultantes da interação das amostras de IgGs que foram purificadas do soro de pacientes diagnosticados como ENMO soropositivos (P1+, P2+ e P3+) e soronegativos para o biomarcador (P4-, P5- e P6-) com os nanobiossensores de AgNPs conjugadas aos epítomos

AQP4<sub>281-290</sub> (linhas contínuas) e AQP4<sub>291-300</sub> (linhas tracejadas). Os espectros em cinza são referentes aos nanobiossensores antes da interação com os anticorpos.

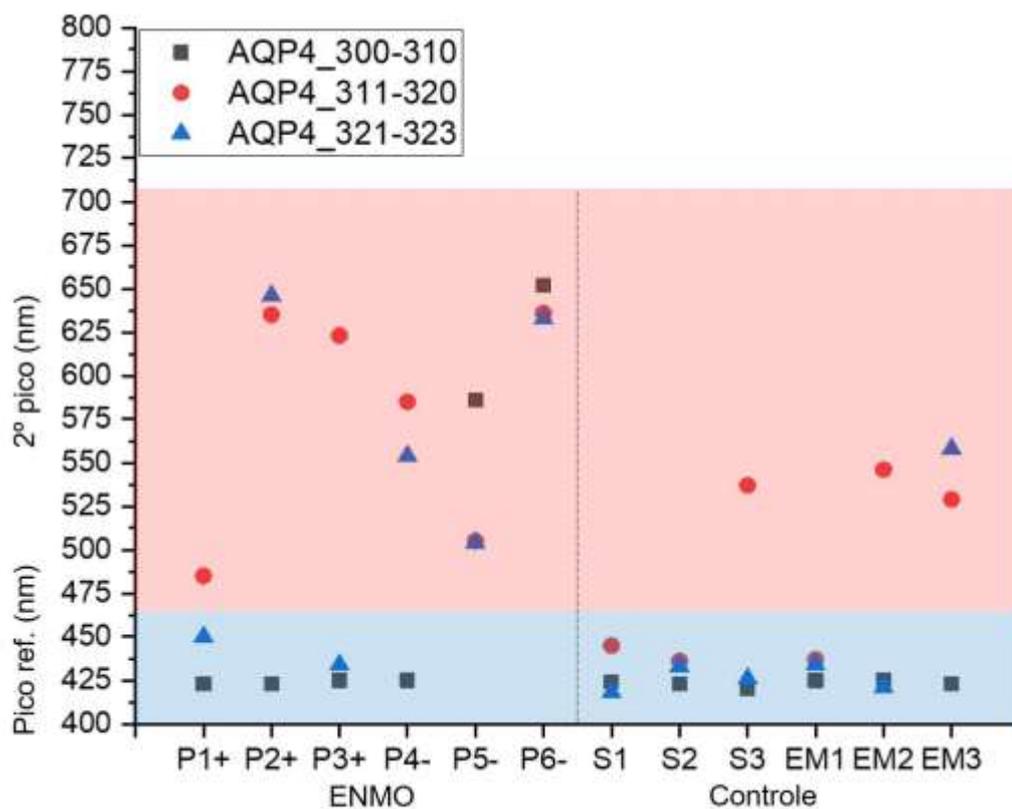


### 5.3.8. Região C-terminal

Quanto aos três últimos epítomos da região C-terminal, AQP4<sub>300-310</sub>, AQP4<sub>311-320</sub> e AQP4<sub>321-323</sub>, utilizados no desenvolvimento dos nanobiossensores, foram observadas diferenças de reatividade com os anticorpos dos pacientes ENMO e com os controles.

O nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>300-310</sub> não detectou o anticorpo nas amostras dos pacientes ENMO soropositivos, detectando apenas em duas amostras de pacientes ENMO soronegativos (Figura 35: quadrado cinza, P5- e P6-). Já o nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>311-320</sub> foi bem mais sensível aos anticorpos presentes nas amostras de pacientes ENMO soropositivos e negativos (Figura 35: círculo vermelho). Mas, ao mesmo tempo, apresentou pouca especificidade ao gerar resultados falso-positivos com duas amostras de pacientes EM (EM2 e EM3) e uma de indivíduo saudável (S3). O nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>321-323</sub> (Figura 35: triângulo azul) detectou o anticorpo em quatro amostras de pacientes ENMO, três soronegativos e um soropositivo, mas também gerou um falso-positivo com uma amostra de paciente EM (EM3).

Figura 35– Valores do pico máximo referencial (parte azul) e do segundo pico (parte rosa), referente à formação da nova banda após interação dos nanobiossensores (representados pelas formas geométricas) com as amostras de IgGs que foram purificadas do soro de pacientes classificados ENMO soropositivos e negativos, e controles (saudáveis e EM).



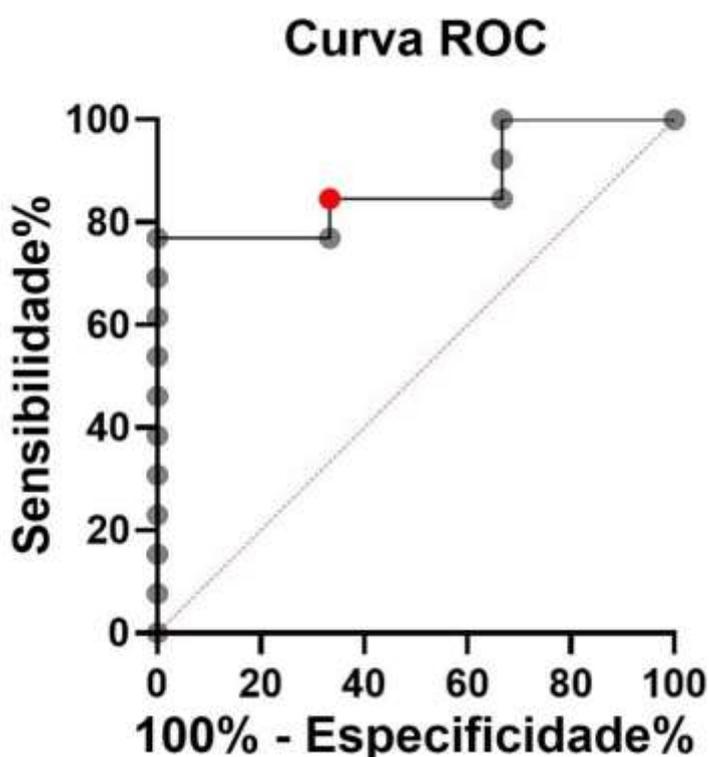
#### 5.4 QUANTIFICAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO NANOBIOSENSOR AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub>

Dentre os 16 pacientes clinicamente diagnosticados como ENMO, o teste CBA detectou o anticorpo em 8 amostras. Assim, para avaliar a acurácia do nanobiossensor mais sensível, o AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub>, foi aplicada a curva ROC, para saber com qual especificidade e sensibilidade o sensor detectava o anticorpo nas amostras de pacientes ENMO.

Entre especificidade e sensibilidade, o foco foi direcionado para o último parâmetro, pois o objetivo deste projeto foi aumentar a sensibilidade de detecção do biomarcador naqueles pacientes com diagnóstico clínico de ENMO, mas AQP4-IgG soronegativos pelo teste CBA, que apresenta uma especificidade substancial de 99,8% e sensibilidade de 76,5%.

A figura 36 apresenta a curva ROC do nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub> com nível de especificidade de 66,67% e sensibilidade de 84,2% (95% CI 57.77%–97.27%), confirmando que o nanobiossensor é mais sensível ao anticorpo presente nas amostras dos pacientes ENMO. Essa acurácia foi obtida com um AUC de 87%.

Figura 36 – Curva ROC mostrando o ponto de corte (ponto vermelho) para a qual os valores de sensibilidade e especificidade são 84,62% e 66,67%, respectivamente. Essa análise foi realizada com AUC de 87%.



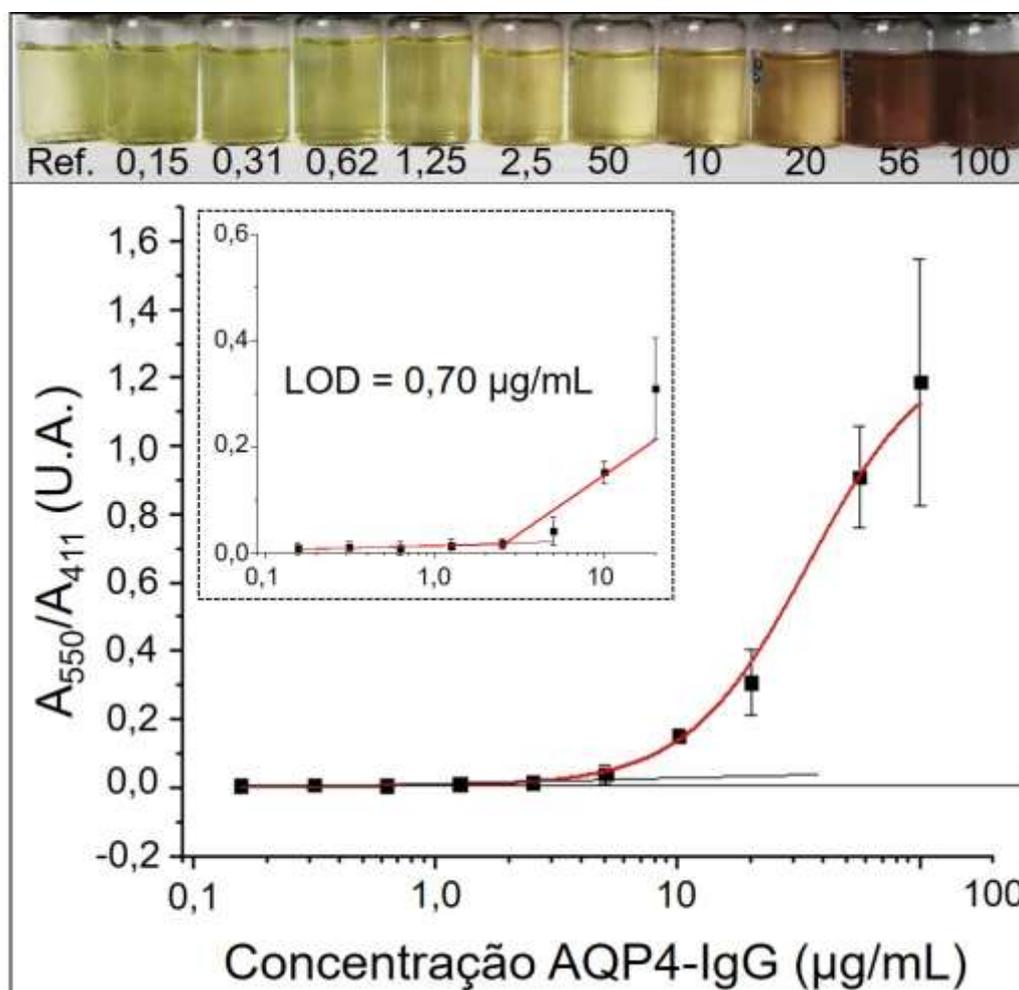
## 5.5 QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AQP4-IgG

O nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub> também foi utilizado na construção de uma curva de calibração, para estimar a concentração do biomarcador nas amostras. Para isso, foi utilizado um anticorpo policlonal de coelho nos ensaios. A curva foi construída a partir da razão entre os valores de absorvância em 500 nm, correspondente ao acoplamento dipolo-dipolo que aparece após a interação, e em 411 nm referente ao pico LSPR de primeira ordem, da banda referencial.

A razão da absorvância ( $A_{550}/A_{411}$ ) variou com a concentração do anticorpo AQP4-IgG de acordo com a equação de Hill–Langmuir Eq. (1), com um valor de  $R^2$  de 0,98365. O melhor ajuste mostrado na figura 37 foi obtido com um  $K=34,3\pm 7,39$ . A partir da resposta linear referente à faixa de concentração entre 2,5 e 20  $\mu\text{g/mL}$ , o limite de detecção foi de 0,7  $\mu\text{g/mL}$  (inserto da figura 37). Um aumento marcante da extensão da agregação foi observado entre as concentrações de 20 a 100  $\mu\text{g/mL}$ .

Quanto às cores das suspensões nas fotografias da figura 37, a adição de AQP4-IgG induziu uma mudança gradual de amarelo-esverdeado (156 ng/mL, 312 ng/mL, 625 ng/mL e 1,25  $\mu\text{g/mL}$ ), amarelo-alaranjado (2,5  $\mu\text{g/mL}$ , 5  $\mu\text{g/mL}$  e 10  $\mu\text{g/mL}$ ) e laranja (20  $\mu\text{g/mL}$ ), para vermelho (56  $\mu\text{g/mL}$  e 100  $\mu\text{g/mL}$ ). A mudança de amarelo para laranja na concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$  ocorre devido à larga banda de absorção em uma região de maior comprimento de onda, que indica aumento da agregação no sistema coloidal, decorrente de um reconhecimento entre o epítipo conjugado e o anticorpo-alvo.

Figura 37– Curva da razão de absorvância ( $A_{550}/A_{411}$ ) versus os dados de concentração do anticorpo AQP4-IgG de 0,15 a 100  $\mu\text{g/mL}$  ajustada com a equação de Hill-Langmuir (linha vermelha). O inserto corresponde ao intervalo linear da curva de Hill-Langmuir com uma indicação do limite de detecção (LOD, limit of detection). As fotografias mostram a cor resultante das suspensões após a interação com cada diluição da solução de AQP4-IgG.



Essa curva foi usada para determinar a concentração do anticorpo AQP4-IgG nas amostras de outros pacientes ENMO soropositivos, numerados de 26-34, que não foram incluídos nas análises apresentadas na Tabela 4. Na equação da curva, o  $\Delta A$  é o índice de agregação (A.U.) do ensaio de interação na concentração  $c$ , o  $\Delta A_{\max}$  é o índice de agregação no ponto de saturação,  $c$  é a concentração de AQP4-IgG na solução de IgGs das amostras de soro com titulação conhecida e  $K$  é uma constante (Pesavento et al. 2019):

$$\text{Eq. (1): } \Delta A = \Delta A_{\max} \frac{c}{K + c}$$

Os parâmetros usados na equação de Hill-Langmuir e os valores de concentração estão descritos na Tabela 5 e os espectros apresentados na Figura 38.

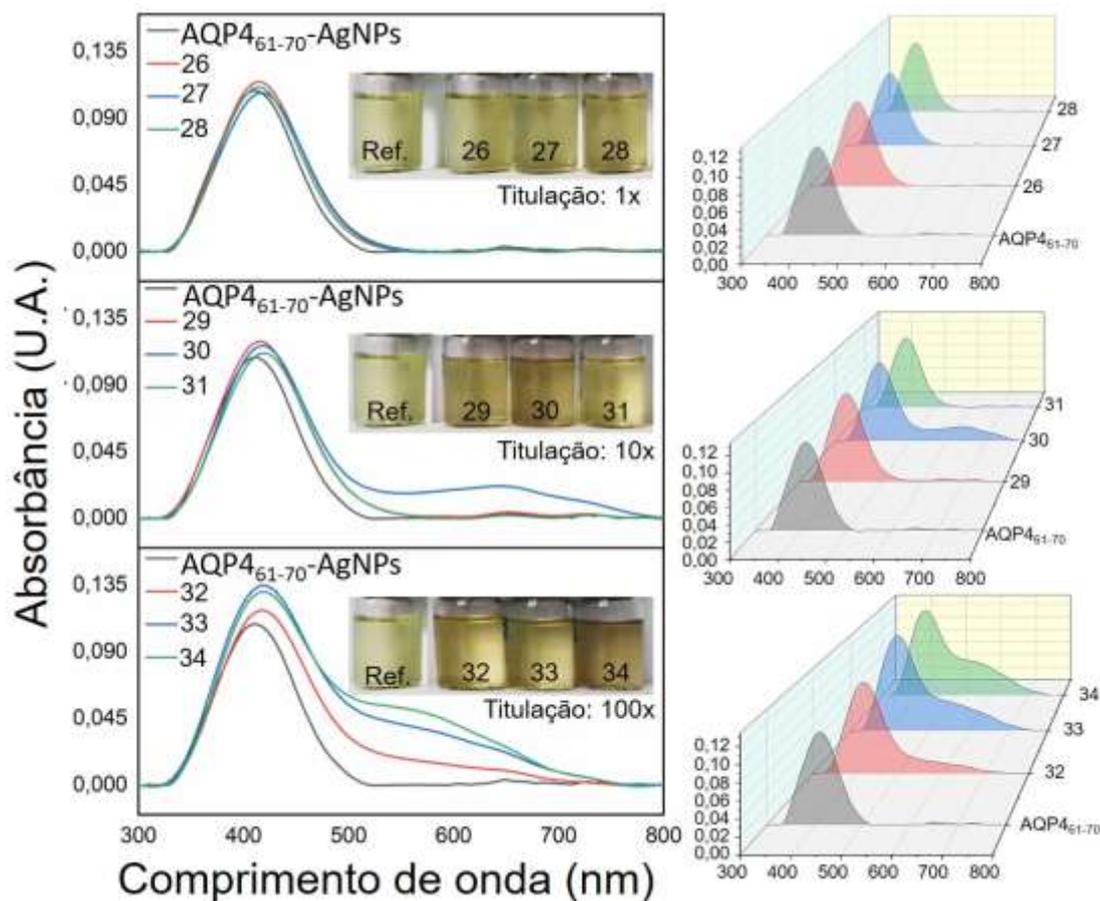
Tabela 5 – Parâmetros de Hill da detecção de AQP4-IgG nas soluções de IgGs das amostras de soro de pacientes ENMO soropositivos (26-34) com titulação conhecida (1x, 10x e 100x) e a

descrição da concentração de AQP4-IgG e a titulação. O  $\Delta A$  é o índice de agregação, o  $\Delta A_{\max}$  é o índice de agregação no ponto de saturação, o DP é o desvio padrão dos valores e K é o valor de constante.

$\Delta A$ (U.A.)		$\Delta A_{\max}$ (U.A.)		K		Solução de IgGs do soro		
Valor	DP	Valor	DP	Valor	DP	Paciente	Titulação	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )
0,02734	0,030169	0,186858	0,063431	34,33126	7,39322	26	1x	0,88
0,012864	0,00201	0,186858	0,063431	34,33126	7,39322	27	1x	0,29
0,021374	0,027753	0,186858	0,063431	34,33126	7,39322	28	1x	0,59
0,011135	0,014062	0,186858	0,063431	34,33126	7,39322	29	10x	0,29
0,186858	0,063431	0,186858	0,063431	34,33126	7,39322	30	10x	6,53
0,021789	0,000241	0,186858	0,063431	34,33126	7,39322	31	10x	0,65
0,170917	0,032949	0,186858	0,063431	34,33126	7,39322	32	100x	5,73
0,221926	0,108217	0,186858	0,063431	34,33126	7,39322	33	100x	7,83
0,452247	0,086325	0,186858	0,063431	34,33126	7,39322	34	100x	21,0

Figura 38 – Espectro UV-Vis (2D – esquerda e 3D – direita) dos pacientes ENMO soropositivos indicados pelos números 26-28 (baixa titulação: 1x), 29-31 (titulação intermediária: 10x) e 32-34 (alta titulação: 100x) após interação com o nanobiossensor desenvolvido com o epítipo AQP4<sub>61-70</sub>. As fotografias digitais nos insertos mostram as cores resultantes das suspensões coloidais após interação com as soluções de IgGs das amostras de pacientes ENMO soropositivos. As amostras indicadas como “Ref.” correspondem à cor referencial da suspensão do nanobiossensor de

AQP4<sub>61-70</sub> antes da interação com as soluções de IgGs, que estão identificadas pelos números dos pacientes e a informação de titulação.



A sensibilidade das AgNPs conjugadas ao AQP4<sub>61-70</sub> possibilitou a detecção do anticorpo AQP4-IgG em amostras com titulação de 10x (concentração mínima para detecção do anticorpo) e 100x de anticorpos.

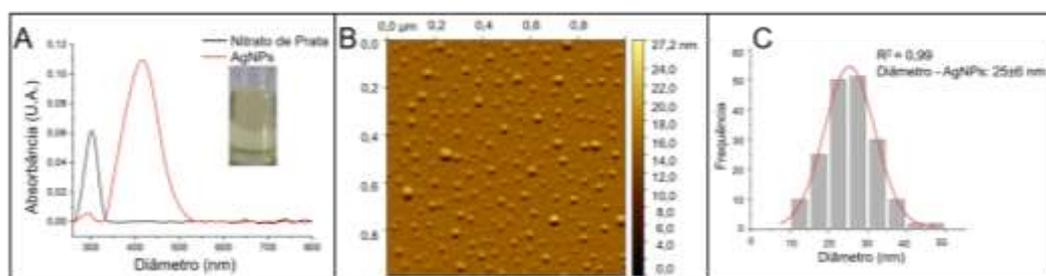
## 5.6 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DO NANOBIOSENSOR

### 5.6.1. Síntese e caracterização das nanopartículas de prata

A formação das AgNPs foi indicada pela mudança gradual de cor da suspensão, de incolor para amarela (inserto da Figura 39A), com estabilização em aproximadamente 12 min de redução química, por meio da qual os íons de prata foram convertidos em AgNPs (Hebeish et al. 2010). Foi observado um pico característico em ~300 nm no espectro de absorção UV-Vis (linha preta – Figura 39A) da solução de 1mM de AgNO<sub>3</sub>

(Sherly Arputha Kiruba et al. 2015). Finalizada a síntese, uma banda em formato de sino formou-se em  $\lambda_{\text{max}}$  de  $417\pm 3$  nm (linha vermelha – Figura 39A), que é atribuída à ressonância plasmônica das AgNPs correspondente a nanopartículas com diâmetro médio de 30 nm (Rivas e Garcı 2001). O método aplicado resultou na síntese de AgNPs esféricas e monodispersas em suspensão (Figura 39B), com diâmetro médio de  $25\pm 6$  nm (Figura 39C) observado com a técnica de AFM. A morfologia esférica e o diâmetro obtidos estão de acordo com a apresentação de apenas uma banda simétrica no espectro de absorção. Além disso, o valor de largura à meia altura do pico (FWHM, do inglês *Full Width at Half Maximum*) de  $94\pm 4$  nm corresponde ao registrado para nanopartículas preparadas em pH 10, com pico de absorbância em 415 nm e FWHM de 90 nm, no qual os autores reportaram o diâmetro médio de  $30\pm 3,9$  nm (Qin et al. 2010).

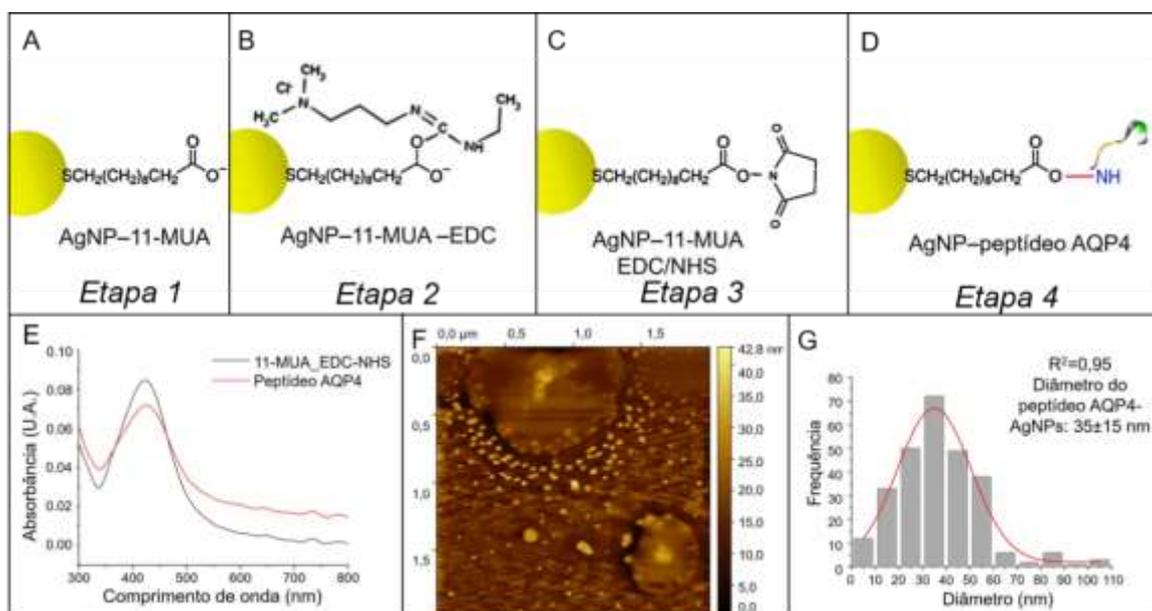
Figura 39 – Caracterização de tamanho e morfologia das AgNPs. (A) Espectro UV-Vis do nitrato de prata (linha preta) e AgNPs (linha vermelha). Fotografia digital mostrando a cor típica da suspensão coloidal de AgNPs (inserto). (B) Imagem de altura 2D obtida com a técnica de AFM das AgNPs sobre um substrato de mica; área de varredura  $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$  e barra de escala de 27,2 nm. (C) Histograma com distribuição de tamanho e ajuste Gaussiana das AgNPs.



### 5.6.2. Conjugação dos peptídeos da AQP4 às nanopartículas de prata

Após a síntese, as AgNPs foram funcionalizadas com um modificador químico (11-MUA), para prover um grupo funcional no qual o peptídeo da AQP4 foi ancorado. O 11-MUA é um composto organossulfúrico que possui um grupo funcional  $-\text{SH}$ , que apresenta alta afinidade por átomos de metais (Fig. 40A – Etapa 1) (Olenin 2019). A banda de absorção plasmônica das AgNPs desloca-se para comprimentos de onda maiores (*redshift*), de  $417\pm 3$  nm para  $424\pm 1.8$  nm, indicando aglomeração das nanopartículas após a modificação química da superfície, provocada pela substituição dos íons citrato por grupos tiolados (Tripathy e Yu 2009). Em pH alcalino, os grupos carboxílicos de 11-MUA estão desprotonados (Fig. 40A – Etapa 1), causando repulsão eletrostática e estabilidade coloidal (Ansar et al. 2018).

Figura 40 – Conjugação do peptídeo da AQP4 à superfície das AgNPs (A) Esquema da reação de modificação química da superfície das AgNPs com uma monocamada auto-montada de 11-MUA. (B) Os grupos de ácidos carboxílicos do composto 11-MUA em reação com o carbodiimida, EDC, (C) e então com NHS para formar o éster NHS intermediário. (D) Por fim, a reação entre o intermediário com os grupos  $-NH_2$  do peptídeo da AQP4 resultando na ligação dos peptídeos à superfície das AgNPs, por meio de ligação amida. E-F referem-se à etapa 4: (E) Espectro UV-Vis das AgNPs quimicamente modificadas (linha preta) e das AgNPs funcionalizadas com os peptídeos da AQP4 (linha vermelha). (F) Imagem de altura obtida com a técnica de AFM das AgNPs funcionalizadas com os epítopos da AQP4; área de varredura de  $2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$  e barra de escala de 42,8 nm. (G) Histograma com distribuição de tamanho e ajuste da Gaussiana das AgNPs funcionalizadas com o peptídeo da AQP4.



A ativação do grupo carboxila ligado à superfície das AgNPs ocorre via ligação cruzada com o complexo EDC/NHS, que formam um éster NHS intermediário (Fig. 40B e 40C – Etapas 2 e 3). Dessa forma, a bioconjugação de peptídeos aos grupos carboxila funcionais é realizada após a hidrólise do intermediário, quando os grupos  $-NH_2$  livres dos peptídeos da AQP4 podem ser covalentemente ligados (ligação amida) à superfície das AgNPs (Fig. 40D – Etapa 4) (Li et al. 2010; Bartczak e Kanaras 2011). Comparada às nanopartículas funcionalizadas (linha preta – Fig. 40E), a bioconjugação com o peptídeo da AQP4 causou um curto deslocamento *redshift* e promoveu um decréscimo na intensidade de absorvância, associado ao alargamento da banda de absorção (linha vermelha – Fig. 40E), indicando a formação de corona de proteína na superfície das AgNPs (Lizoń et al. 2019). As mudanças observadas no espectro (Fig. 40E) são decorrentes das modificações no índice de refração local ao redor das AgNPs (Lismont e Dreesen 2012), e da consequente aglomeração das nanopartículas (Almaquer et al. 2019),

que estavam originalmente monodispersas (Fig. 40B). A diferença no estado de agregação na suspensão é notável na imagem bidimensional obtida com a técnica de AFM (Fig. 40F). A redução visível na distância entre as partículas promoveu a formação de complexos com diferentes e maiores tamanhos ( $35\pm 15$  nm) (Fig. 40G), caracterizando uma suspensão polidispersa.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 ENSAIOS COM AS SOLUÇÕES DE IgGs DERIVADAS DE AMOSTRAS DE SORO DOS GRUPOS CONTROLE: PACIENTES COM EM E SAUDÁVEIS

Nas análises das amostras controle (EM e saudáveis), a frequência de falso-positivo que aqui é identificada com a formação de um segundo pico, somada à alteração de cor da suspensão, foi baixa. Em um artigo de revisão sobre ensaios sorológicos para detecção do anticorpo AQP4-IgG, os autores mencionaram que o ensaio de imunofluorescência indireta poderia gerar resultados falsos-positivos, pois pacientes com outras doenças neurológicas e até saudáveis podem apresentar anticorpos que mimetizam o padrão de ligação do anticorpo AQP4-IgG, como é o caso dos anticorpos anti-endoteliais (Jarius e Wildemann 2013a).

Em um estudo em que os pesquisadores testaram amostras de soro de uma população predominantemente branca não hispânica, como coorte representativa de pacientes com EM, os ensaios ELISA e CBA foram comparados por serem os mais utilizados nas clínicas dos EUA, para verificarem a taxa de falso-positivo para o AQP4-IgG em pacientes com EM. O estudo mostrou que, na prática, quase não há erros no diagnóstico entre EM e ENMO (0,2%), sendo que o CBA apresentou uma taxa de 0,1% e o ELISA de 0,5% de falso-positivos. Os autores chamaram a atenção para a superioridade do ensaio CBA, em comparação ao ELISA (Pittock et al. 2014).

Esse dado indica que os testes atuais já apresentam um nível de especificidade adequado para detecção do anticorpo AQP4-IgG e que os esforços devem se concentrar em aumentar a sensibilidade do teste, especialmente para confirmação diagnóstica dos pacientes com diagnóstico clínico de ENMO.

## 6.2 ENSAIOS COM AS SOLUÇÕES DE IgGs DERIVADAS DE AMOSTRAS DE SORO DOS PACIENTES ENMO

### 6.2.1. Nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub>

O valor médio de deslocamento de 37,7 nm obtido com o nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub> foi maior do que o observado com um sensor desenvolvido com AgNPs conjugadas a moléculas de biotina, para detecção de avidina, complexo conhecido por apresentar alta afinidade. Nos ensaios de Lismont e Dreesen, os pesquisadores observaram mudanças no espectro das AgNPs-biotina, assim que adicionaram avidina, que foram se tornando mais pronunciadas com o tempo, até a estabilização em 140 min, resultando em  $\Delta\lambda$  máximo de 26 nm (Lismont e Dreesen 2012). Tendo este sistema padrão como referência, o deslocamento observado com o nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub> reflete a ocorrência de interações específicas entre os anticorpos AQP4-IgGs e o epítipo AQP4<sub>61-70</sub>.

Além do deslocamento no pico referencial, uma banda mais larga entre 500 e 600 nm se formou no espectro eletromagnético, juntamente com um novo pico em ~360 nm. O aparecimento de uma nova banda em regiões de maior comprimento de onda é considerado uma evidência qualitativa de agregação das nanopartículas, podendo ser usada, também, para quantificar a taxa de agregação (Ezra et al. 2020).

Em um estudo matemático e de simulação, os autores encontraram que quando se formam pares de nanopartículas durante a agregação, há a formação de um pico além do referencial (~470 nm), em comprimento de onda menor, em torno de 360 nm (Clarkson et al. 2011), que foi o pico observado nos espectros após a interação com as IgGs, especialmente com o nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub>, expresso como (+++) na Tabela 4.

A combinação dos seguintes elementos: aparecimento de uma nova banda em uma região de maior comprimento de onda (>470 nm), deslocamento do pico referencial, aparecimento de um novo pico em ~360 nm e mudança visível de cor configura as respostas do nanobiossensor mais sensível e específico deste trabalho.

Dentre os cinco epítomos testados nesta primeira etapa, era esperado que o conjugado AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub> fosse o nanobiossensor mais sensível ao anticorpo AQP4-IgG, como observado em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa. Nesse estudo, quatro epítomos da AQP4: AQP4<sub>61-70</sub>, AQP4<sub>201-210</sub>, AQP4<sub>131-140</sub> e AQP4<sub>141-150</sub> foram imobilizados em sondas nanométricas, e os ensaios com as soluções de IgGs foram realizados com espectroscopia de força atômica, uma técnica nanotecnológica muito sensível. Com este método, os autores identificaram o epítomo AQP4<sub>61-70</sub> como o mais reativo aos anticorpos AQP4-IgG em amostras de pacientes ENMO soropositivos (Moraes et al. 2019).

Iorio e colaboradores investigaram a localização molecular dos epítomos da AQP4, testando não só a proteína em sua conformação nativa e expressa em membranas celulares, mas também tetrâmeros, monômeros e sequências peptídicas lineares das alças extracelulares. Para este último caso, os autores usaram o método ELISA. Um dos achados deste estudo foi a existência de epítomos ENMO-específicos na alça extracelular A, representada pela sequência de aa56-71 (Iorio et al. 2013), onde está contido o epítomo de trabalho que se mostrou mais sensível aos anticorpos (AQP4<sub>61-70</sub>).

Nesse estudo, os autores observaram que o anticorpo AQP4-IgG é policlonal, quanto à sua especificidade à AQP4 e liga-se com mais avidéz às alças conformacionais em estruturas tetraméricas e em arranjos supramoleculares. Apesar disso, o anticorpo reconheceu, em 68% dos casos, os epítomos lineares, que é a forma usada na imobilização no nanobiossensor.

Em um estudo de dinâmica molecular, Alberga e colaboradores analisaram o efeito de três mutações de substituições de aminoácidos nas alças extracelulares. Um dos resultados obtidos mostrou a importância dos aa62-65 para a ligação do anticorpo, visto que mutações na posição N<sup>153</sup>Q causaram o fechamento da alça extracelular A incluindo esses resíduos, o que causou a redução na ligação do anticorpo. Este é mais um estudo que mostra a importância da sequência estudada aqui, como um epítomo específico da doença. Os autores desse estudo também chamam atenção para a aplicação deste conhecimento em ferramentas terapêuticas que trabalhem mimetizando o efeito dessas mutações, para impedir que o anticorpo AQP4-IgG se ligue à proteína e inicie a resposta imunológica (Alberga et al. 2017).

Em outro estudo, Owens e colaboradores estudaram a ligação do anticorpo AQP4-IgG à proteína AQP4 por meio de análises com mutações em série de 4 a 6 aminoácidos e pontuais nas alças extracelulares, utilizando imunofluorescência quantitativa. Eles observaram que os aminoácidos nas posições 63 a 65 eram importantes para a ligação do anticorpo, assim como o resíduo na posição 69 (Owens et al. 2015). Este já havia sido descoberto por Pisani e colaboradores, que observaram a redução da ligação do anticorpo em 85,7% das amostras dos pacientes após a substituição do aminoácido asparagina por histidina (D<sup>69</sup>H) (Pisani et al. 2014).

Pisani e colaboradores, em estudo anterior, partiram do conhecimento de que os anticorpos AQP4-IgG não se ligam a outras aquaporinas formadoras de OAPs, como a AQP0 e a AQPcic. Para identificarem as regiões da AQP4 específicas de ligação do anticorpo, os pesquisadores alinharam as sequências de AQP0, AQPcic e sequências de aminoácidos primários de camundongos, ratos e humanos. Essas análises mostraram que há uma sequência específica na alça extracelular A (aa61-64), que está ausente na AQP0, AQPcic e em outras AQPs humanas. Quando eles fizeram uma proteína mutante, com deleção dessa sequência, houve quase completa ausência de sinal de fluorescência nas análises dos soros dos pacientes ENMO (Pisani et al. 2011).

Em conjunto, esses estudos mostram a importância dos resíduos contidos na alça extracelular A, principalmente envolvendo os resíduos 61-65 e 69, para a ligação do anticorpo e dão embasamento para o nosso achado referente à maior sensibilidade do nanobiossensor de AgNPs conjugado ao epítipo AQP4<sub>61-70</sub>.

### **6.2.2. Nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>201-210</sub>**

Diferentemente do epítipo AQP4<sub>61-70</sub>, não há tantos registros na literatura a respeito do epítipo AQP4<sub>201-210</sub>, mas um estudo conseguiu demonstrar com a sequência aa201-220, a interação entre as respostas celular e humoral da patogenia da ENMO. Sabe-se que o anticorpo AQP4-IgG é uma IgG1, que é dependente de células T para as suas atividades, por isso, entender a respostas das células T aos epítipos de trabalho também é relevante.

Dois epítomos da AQP4, aa135-153 e aa201-220, foram identificados como patogênicos, quando foram usados para imunizar camundongos C57BL/6 deficientes em AQP4 (AQP4<sup>-/-</sup>), indicando que a reatividade das células T a esses epítomos é controlada por seleção negativa no timo. A ligação desses epítomos ao MHC II gerou proliferação de células T CD4<sup>+</sup>. As células Th17 epítomo-específicas foram transferidas para camundongos selvagens e induziram paralisia e neurite óptica, com infiltração óptico-espinhal de células T, B e monócitos (Sagan et al. 2017).

Após esse estudo, outro grupo identificou que a sequência AQP4<sub>201-210</sub> é o principal epítomo dentro daquela sequência maior, sendo naturalmente processada e com potencial encefalitogênico. Apesar desse potencial, essas células só induzem lesões no SNC na presença de anticorpos AQP4-IgGs. Dessa forma, os resultados indicam que as células T AQP4<sub>201-210</sub> induzam uma resposta sérica de AQP4-IgG em repertórios de células B, cuja tolerância também deve falhar em pessoas com ENMO (Vogel et al. 2017).

Os resultados promissores obtidos com esse epítomo, aliado aos poucos registros na literatura indicam que se trata de um alvo antigênico importante de ser estudado, pois apresenta potencial terapêutico e pode ajudar na compreensão mais detalhada da imunopatologia da doença, principalmente com relação à tolerância imunológica.

### **6.2.3. Nanobiossensores AgNPs-AQP4<sub>131-140</sub> e AgNPs-AQP4<sub>141-150</sub>**

A capacidade de discriminação dos nanobiossensores contendo os epítomos presentes na alça extracelular C, AQP4<sub>131-140</sub> e AQP4<sub>141-150</sub>, foi fraca. Um estudo já citado aqui de mutagênese dos domínios extracelulares da proteína AQP4 mostrou que o reconhecimento da proteína pelos anticorpos AQP4-IgG dependeu da conservação dos aminoácidos <sup>137</sup>TP<sup>138</sup>. Quando os pesquisadores fizeram substituições por alanina nessas posições, a proteína perdeu a conformação na alça extracelular C, o que aboliu a ligação dos anticorpos em todas as amostras testadas por imunofluorescência quantitativa. A ligação dos anticorpos também foi reduzida quando os aminoácidos Val<sup>141</sup> e Val<sup>150</sup> foram substituído pela alanina ou glicina (Owens et al. 2015).

Esses resultados mostram que, apesar do anticorpo AQP4-IgG reconhecer a forma linear de alguns epítomos, como foi no caso do AQP4<sub>61-70</sub>, outros epítomos como esses

presentes na alça extracelular C ( $^{137}\text{TP}^{138}$ ) dependem estritamente da conformação nativa, para serem reconhecidos pelos anticorpos patogênicos. Outros, ainda são reconhecidos, mas com menor afinidade, como aconteceu com as substituições nos aminoácidos Val<sup>141</sup> e Val<sup>150</sup>. A maior dependência do arranjo conformacional dos epítomos presentes na alça extracelular C podem explicar a menor sensibilidade dos nanobiossensores desenvolvidos com os epítomos AQP4<sub>131-140</sub> e AQP4<sub>141-150</sub>.

Outro grupo chegou à mesma conclusão, analisando a interação de anticorpos AQP4-IgGs com um peptídeo sintético referente aos aa137-157, utilizando o método ELISA. O que os pesquisadores observaram foi que a alça extracelular C contém epítomos ENMO-específicos e que os resíduos aa146-150, que ficam bem na ponta da alça, é o principal epítomo reconhecido pelos anticorpos, mas depende estritamente da conformação em OAPs (Iorio et al. 2013).

#### **6.2.4. Nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>291-300</sub>**

O nanobiossensor de AgNPs-AQP4<sub>291-300</sub> foi o menos sensível e específico no ensaio de detecção do anticorpo AQP4-IgG e isso pode ser devido à localização desse epítomo na proteína, que é no domínio intracelular C-terminal.

Em um interessante estudo que se propôs a investigar a existência de reatividade à proteína AQP4 em pacientes EM, os autores encontraram uma sequência intracelular importante, que inclui o nosso epítomo de trabalho, o aa281-300 e também destacou o epítomo adjacente a ele, o aa252-275.

Nesse estudo, Alexopoulos e colaboradores utilizaram três peptídeos lineares da AQP4 e encontraram reatividade em 8/45 amostras de pacientes EM contra o epítomo aa252-275. Eles concluíram que pode haver um subgrupo de pacientes EMRR com anticorpos contra a porção C-terminal da AQP4. Esses pacientes apresentavam maior similaridade clínica com ENMO do que com EM típica e respondiam melhor ao tratamento com imunossupressor, do que com imunomodulador. Eles encontraram que esse epítomo, aa252-275, é um epítomo linear de células B, adjacente ao 281-300, que é um epítomo linear de células T. Não está claro como esses epítomos lineares contribuem para a patogênese da ENMO e nem da EM. É possível que, nos dois casos, os astrócitos

afetados liberem epítomos crípticos que são, então, reconhecidos pelo sistema imune (Alexopoulos et al. 2013).

A partir disso, pode ser que os pacientes das amostras analisadas não tenham montado uma resposta imune contra o epítomo intracelular AQP4<sub>291-300</sub>, que só é exposto, provavelmente, após danos aos astrócitos e, por isso, o nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>291-300</sub> não detectou o anticorpo AQP4-IgG nas amostras.

### 6.3 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE IgGs TOTAIS NA DETECÇÃO DO BIOMARCADOR PELOS NANOBIOSENSORES NAS AMOSTRAS DE PACIENTES ENMO AQP4-IgG SORONEGATIVOS

Utilizando os nanobiossensores, alguns pacientes antes classificados como soronegativos foram reclassificados como soropositivos, como resultado de duas variáveis, uma é a concentração da amostra. Por exemplo, o nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub> não havia detectado o anticorpo nas amostras dos pacientes 9, 10 e 11, porque a concentração de anticorpos estava abaixo do limite de detecção do nanobiossensor, visto que passou a detectar o biomarcador, quando as amostras foram menos diluídas para os ensaios.

A outra variável é o método usado na detecção do anticorpo, seja a técnica em si ou a sequência do antígeno utilizada. Foram observadas diferenças nesses dois aspectos, o primeiro refere-se à comparação do ensaio CBA com o de AgNPs. Neste ponto, utilizando as AgNPs, foi possível reclassificar 5/8 amostras soronegativas, segundo o CBA. Também foram verificadas diferenças dentro do nosso método, ao trocar as sequências de peptídeos utilizadas nos ensaios de detecção. Por exemplo, o anticorpo AQP4-IgG não foi detectado na amostra do paciente 12, mesmo utilizando uma concentração maior com o nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub>, mas foi detectado, mesmo com quase o dobro de diluição, utilizando os nanobiossensores AgNPs-AQP4<sub>141-150</sub> e AgNPs-AQP4<sub>201-210</sub>. Essa observação nos levou à segunda etapa do projeto, que foi investigar os outros epítomos da AQP4.

Outros pesquisadores já observaram o impacto de técnicas diferentes na reclassificação de pacientes ENMO. Num estudo realizado na Clínica *Mayo*, os pesquisadores analisaram os registros de 2005 a 2011 e identificaram 163 pacientes com NMO. Destes, 110 (67%) eram soropositivos por imunofluorescência indireta e 53 (33%) foram classificados como soronegativos. Das amostras dos pacientes soronegativos, 49 estavam armazenadas e disponíveis. Eles testaram essas amostras com outras técnicas, ELISA, CBA e triagem celular ativada por fluorescência (FACS, do inglês *fluorescence-activated cell sorting*). Eles obtiveram 30/49 (61%) de reclassificação como soropositivos. Como conclusão, os autores relataram que a frequência de soronegativos pode ser muito menor do que é registrado, chamando atenção para a necessidade de aprimorar as técnicas de detecção (Jiao et al. 2013).

Nas considerações sobre a sorologia de AQP4-IgG do critério diagnóstico mais recente recomenda-se o uso do ensaio celular CBA, com detecção baseada em microscopia ou citometria de fluxo (Wingerchuk et al. 2015), por ser o teste com maior especificidade (99,8%) e sensibilidade (76,7%) (Waters et al. 2014). Utilizando esse teste juntamente com o critério diagnóstico mais recente, entre 73 e 90% dos pacientes são classificados como soropositivos para o biomarcador. Assim, mesmo utilizando o teste diagnóstico mais específico e sensível, ainda ficam 10-27% com *status* sorológico negativo ou desconhecido (Hamid et al. 2017).

A hipótese trabalhada aqui é a de que, como os anticorpos AQP4-IgG são policlonais, alguns devem reconhecer e se ligar com mais afinidade a epítopos lineares, além dos conformacionais, como estão dispostos nos ensaios CBA, o que pode explicar algumas discordâncias de imunorreatividade observadas na comparação de ensaios de detecção.

Marnetto e colaboradores estudaram a ligação dos anticorpos AQP4-IgGs a epítopos lineares, utilizando ensaios de *Western blotting* (WB). Eles observaram que após a desnaturação da proteína AQP4, os epítopos lineares ainda eram capazes de ligar os anticorpos séricos, que reconheciam a proteína conformacional. Os pesquisadores não defendem que deva haver uma substituição de técnicas, mas uma combinação de métodos, pois assim a acurácia do teste poderia ser aumentada, visto que em alguns ensaios os anticorpos se ligaram com mais afinidade aos epítopos lineares (Marnetto et al. 2009).

## 6.4 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS DA 1ª ETAPA:

Em conjunto, os resultados da primeira etapa de trabalho, somados aos registros na literatura chamaram atenção para alguns aspectos importantes da interação dos anticorpos AQP4-IgG com a proteína AQP4: (i) A detecção do biomarcador pelo nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub> foi dependente da concentração, o que indica que alguns pacientes podem ser classificados como soronegativos por causa do limite de detecção da técnica utilizada. e (ii) A detecção do biomarcador também foi dependente do epítipo conjugado ao nanobiossensor. Isso aponta para a existência de uma interação epítipo-específica, que pode explicar as classificações diferentes dentro do grupo ENMO, quando se utiliza uma técnica que expõe apenas sequência peptídicas extracelulares, como é o caso do CBA.

Dessa forma, entendemos a importância de se estudar os outros epítopos da AQP4, para analisar se há outras sequências que podem aumentar a sensibilidade do teste dentro do grupo soronegativo. Esse tipo de investigação mais detalhada pode abrir caminhos para aumentar a sensibilidade do diagnóstico e construir ferramentas terapêuticas mais precisas, epítipo-específicas.

## 6.5 2ª ETAPA DO PROJETO: TRIAGEM DOS PEPTÍDEOS

### 6.5.1. Porção N-terminal e região intracelular inicial

Os nossos resultados são comparáveis, em parte, com a literatura, visto que os estudos que utilizaram a porção N-terminal registraram resultados discordantes entre si e utilizaram apenas amostras de pacientes ENMO soropositivos. Aqui, foi observada uma maior reatividade dos anticorpos de pacientes ENMO soronegativos contra esses epítopos da porção N-terminal, presente apenas na isoforma M1.

Em um estudo dedicado a buscar a localização molecular dos epítopos da AQP4, utilizando diferentes configurações da proteína: monômeros lineares, tetrâmeros e OAPs, os autores analisaram sequências presentes nas alças extracelulares e nas regiões intracelulares da proteína AQP4. Neste último caso, os autores analisaram, entre outras, a sequência aa1-22 da região N-terminal, utilizando a técnica de ELISA (Iorio et al. 2013).

A conclusão que eles chegaram acerca dessa sequência é a de que ela não apresenta especificidade às doenças do ENMO porque, apesar das IgGs de 28% das amostras de pacientes terem se ligado à sequência, a interação também foi observada em algumas amostras do grupo controle, que eram de indivíduos saudáveis e diagnosticados com outras doenças.

Um resultado bem diferente foi obtido em um estudo de mapeamento de epítomos (Kampylafka et al. 2011), no qual os pesquisadores analisaram a reatividade dos anticorpos de pacientes ENMO soropositivos, indivíduos saudáveis, com lúpus e síndrome de *Sjögren* contra onze peptídeos da AQP4. No trabalho deles, os peptídeos nomeados como AQPpep1 e AQPpep2 cobriram as sequências aa1-22 e aa23-36, respectivamente.

As sequências intracelulares AQPpep1 e AQPpep2 estão entre os cinco peptídeos identificados como os mais reativos. O peptídeo AQPpep1 correspondente à porção N-terminal presente apenas na isoforma M1 da AQP4 foi reconhecido por 42,9% das amostras de pacientes ENMO soropositivos. Esse peptídeo também foi reconhecido por 8,7% das amostras controle de pacientes com síndrome de *Sjögren* e por 13% das amostras controle de pacientes com lúpus. Os autores consideram mínima essa reatividade, refletindo apenas a polirreatividade humoral comumente observada no soro de pacientes com doenças autoimunes.

Diferentemente desse trabalho que detectou maior reatividade dos anticorpos com o AQPpep1, comparáveis aos nossos nanobiossensores AgNPs-AQP4<sub>1-10</sub> e AgNPs-AQP4<sub>11-20</sub>, nós observamos maior reatividade dos anticorpos de pacientes ENMO soropositivos e negativos com os nanobiossensores desenvolvidos com os epítomos AQP4<sub>21-30</sub> e AQP4<sub>31-40</sub>.

É interessante observar a diferença de reatividade entre pacientes ENMO soronegativos e soropositivos, principalmente utilizando os nanobiossensores AgNPs-AQP4<sub>1-10</sub> e AgNPs-AQP4<sub>11-20</sub>, que apontam para a presença de clones diferentes de anticorpos nos soronegativos, dirigidos contra os epítomos da porção N-terminal e, com o avanço para a região comum à isoforma M23, utilizando os epítomos AQP4<sub>21-30</sub> e AQP4<sub>31-40</sub>, a diferença entre reatividade desses dois grupos é diminuída.

Juntos, esses resultados concordam com a conclusão feita no estudo de Kampylafka e colaboradores (2011), de que a isoforma M1 possa ser importante para o mecanismo da ENMO, principalmente por estar expressa preferencialmente no nervo óptico e na medula espinhal. Geralmente, os ensaios que utilizam a proteína na conformação nativa, usam a isoforma M23, por formarem OAPs. A isoforma M23 aumenta a avidéz de ligação do autoanticorpo, como foi visto com os nanobiossensores AgNPs-AQP4<sub>21-30</sub> e AgNPs-AQP4<sub>31-40</sub>, o que pode ser uma vantagem para o diagnóstico, porém isso não significa que todos os clones se ligam exclusivamente a essa isoforma.

### **6.5.2. Epítapos adjacentes ao AQP4<sub>61-70</sub>**

Nas buscas mais recentes, não foram encontrados estudos envolvendo os peptídeos 6 (AQP4<sub>51-60</sub>) e 8 (AQP4<sub>71-80</sub>), adjacentes ao epítapo que resultou no nanobiossensor mais sensível e específico deste trabalho, o AQP4<sub>61-70</sub>.

Os dados obtidos aqui apontam que a grande sequência aa51-70 (epítapos 6 e 7) é melhor reconhecida pelos anticorpos de pacientes soropositivos. Enquanto que, a partir do resíduo 71, a interação é maior com os anticorpos dos pacientes soronegativos. Assim, o epítapo AQP4<sub>71-80</sub> poderia ser pensado como uma boa alternativa para re-teste de pacientes soronegativos testados com o epítapo adjacente a ele, o AQP4<sub>61-70</sub>, ou com o CBA, que expõe essa porção da proteína na superfície da célula.

### **6.5.3. Região transmembrana AQP4<sub>81-90</sub> ao AQP4<sub>101-110</sub>**

No estudo já citado de mapeamento de epítapos realizado por Kampylafka e colaboradores (2011), os autores também identificaram um sequência peptídica intracelular a qual denominaram AQPpep4, composta pelos aa88-113 que, assim como o AQPpep1 e AQPpep2, foi bem reconhecida pelos anticorpos presentes nas amostras de 33,3% dos pacientes ENMO soropositivos e foi pouco reativa com o soro dos pacientes com lúpus (4,3%) e síndrome de *Sjögren* (4,3%). Nossos peptídeos de trabalho AQP4<sub>81-90</sub>, AQP4<sub>91-100</sub> e AQP4<sub>101-110</sub> são comparáveis ao AQPpep4 do estudo.

Assim, comparando com o estudo anterior, podemos dizer que dentro da sequência maior AQPpep4 (aa88-113) utilizada pelos autores, identificamos que o fragmento 81-100, que contém sete aminoácidos anteriores, foi mais reativa do que o

sensor composto com a sequência AQP4<sub>101-110</sub>, que está completamente inserida no AQP<sub>pep4</sub>, mas carece de alguns aminoácidos anteriores.

Os epítomos AQP4<sub>91-100</sub> e AQP4<sub>101-110</sub> também foram descritos em dois estudos, um envolvendo a hipótese da reatividade cruzada e outro a reatividade de células T AQP4 específicas. No primeiro, os autores descobriram que a bactéria *Clostridium bolteae* estava presente em pacientes ENMO e ausentes nos indivíduos saudáveis. Eles fizeram análises de homologia e descobriram que a sequência peptídica 59-71 de *C. bolteae* era alinhada com o peptídeo 92-104 da AQP4 (Pandit et al. 2021). Em um estudo anterior, outros pesquisadores encontraram que a sequência 91-110 da AQP4 era alvo de células T patogênicas (Matsuya et al. 2011).

Diante disso, os registros apontam que esses epítomos intracelulares possam estar envolvidos na patogênese da doença, cuja resposta poderia ser iniciada devido à memória imunológica adquirida em infecção passada com patógenos que compartilham similaridade molecular com a AQP4 e envolve interação de células T patogênicas e células B, visto que os anticorpos AQP4-IgGs pertencem à subclasse IgG1, que é dependente de células T. Mais uma vez, esses resultados mostram a importância de se estudar os domínios intracelulares da proteína, pois contêm epítomos de células T e B, cujo mecanismo de reconhecimento ainda não está claro.

#### **6.5.4. Regiões adjacentes aos epítomos AQP4<sub>131-140</sub> e AQP4<sub>141-150</sub>**

Os epítomos AQP4<sub>111-120</sub>, AQP4<sub>121-130</sub>, AQP4<sub>151-160</sub>, AQP4<sub>161-170</sub> e AQP4<sub>171-180</sub> estão presentes em regiões transmembranas da proteína AQP4, exceto o AQP4<sub>151-160</sub>, que é uma continuação da alça extracelular C. O fato dessas sequências não apresentarem sensibilidade ao biomarcador pode explicar a falta de dados sobre elas na literatura. Desse modo, a falta de dados na literatura e a baixa reatividade com as amostras de anticorpos de pacientes sugerem que não estas sejam sequências úteis para o sensoriamento do biomarcador.

#### **6.5.5. Epítipo adjacente ao AQP4<sub>201-210</sub>**

Em um estudo citado na primeira etapa referente ao epítipo AQP4<sub>201-210</sub>, os autores encontraram que a sequência aa201-220 induzia a reatividade de células T,

quando usada para imunizar camundongos C57BL/6 deficientes em AQP4 (Sagan et al. 2017). Um outro estudo identificou que, dentro desta sequência maior aa201-220, o principal epítipo era a sequência aa201-210, naturalmente processada e com potencial encefalitogênico (Vogel et al. 2017). Assim, analisando os resultados dos dois nanobiossensores (AgNPs-AQP4<sub>201-210</sub> e AgNPs-AQP4<sub>211-220</sub>), identificamos que a sequência aa201-210 é reconhecida pelos anticorpos dos pacientes ENMO, ao contrário da sequência 211-220.

#### **6.5.6. Alça extracelular E**

Dois estudos de mutação mostraram que mudanças nos *loops* C e E provocam redução e até eliminação da ligação do anticorpo à proteína, demonstrando uma grande importância da conformação dessas alças para a interação antígeno-anticorpo (Pisani et al. 2011; Owens et al. 2015). Outro estudo mostrou que há proliferação de células T em resposta ao epítipo aa217-231 (Vaknin-Dembinsky et al. 2016). A literatura mostra que esse epítipo é um alvo dos anticorpos AQP4-IgG, mas destacam a importância de sua conformação nativa para a ocorrência da ligação. Dessa forma, não é inesperado que no nosso sistema nós observássemos uma interação reduzida do AQP4<sub>221-230</sub> com os anticorpos.

#### **6.5.7. Região intracelular do epítipo AQP4<sub>261-270</sub> ao AQP4<sub>291-300</sub>**

Há dados na literatura que mencionam o uso de sequências peptídicas correspondentes aos nossos epítipos de trabalho, presentes na porção C-terminal da proteína: AQP4<sub>261-270</sub>, AQP4<sub>271-280</sub>, AQP4<sub>281-290</sub> e AQP4<sub>291-300</sub>.

Há registros de dois epítipos com cerca de 20 aminoácidos cada na região C-terminal da proteína AQP4, sendo um deles alvo de células B (aa252-275) e o outro, de células T, o aa281-300. Ainda não há evidências de que esses epítipos contribuam para a patogênese da doença, mas ressalta, mais uma vez, a importância de se estudar os epítipos intracelulares.

Um estudo já citado aqui destacou uma sequência peptídica que corresponde à sobreposição das duas (aa252-275 e aa281-300), o aa269-283. Neste estudo, os autores avaliaram a resposta proliferativa de células T a peptídeos da AQP4. O peptídeo aa269-

283 foi o que apresentou menor sensibilidade, mas foi o mais específico (Matsuya et al. 2011).

Os sistemas funcionalizados com os peptídeos AQP4<sub>261-270</sub> e AQP4<sub>271-280</sub>, contidos na sequência aa269-283, também não apresentaram altos níveis de sensibilidade ao biomarcador nas amostras de pacientes soropositivos. Comparando os dois nanobiossensores com o dado da literatura, nós observamos que o epítipo AQP4<sub>261-270</sub> foi mais sensível ao anticorpo AQP4-IgG, especificamente de pacientes ENMO soronegativos.

Este sensor também gerou um resultado falso-positivo em uma amostra de paciente EM. No estudo de Alexopoulos e colaboradores, os pesquisadores encontraram que um subgrupo de pacientes EMRR apresentam anticorpos contra a sequência 252-275. Eles explicam que esta reatividade pode estar relacionada com uma sobreposição imunológica entre as duas doenças. Uma explicação para esta sobreposição é a liberação de epítopos crípticos em astrocitopatias. Como o perfil dos anticorpos muda com o curso da doença, pode ser que ocorram liberações periódicas de epítopos intracelulares seguindo danos astrocíticos (Alexopoulos et al. 2013).

Nos nossos resultados com os nanobiossensores desenvolvidos com os epítopos AQP4<sub>281-290</sub> e AQP4<sub>291-300</sub>, também observamos pouca interação com os anticorpos, que ocorreu apenas em uma amostra de paciente soronegativo com o nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>281-290</sub> e em uma amostra soropositiva com o nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>291-300</sub>.

Células de linfonodos e de baço de camundongos imunizados com a proteína AQP4 humana (hAQP4) completa foram cultivadas *in vitro* com peptídeos sintéticos de 20 aminoácidos, com sobreposição de 10 aminoácidos, cobrindo toda a proteína AQP4, para testar as respostas de células T. Eles analisaram a frequência de interferon  $\gamma$ , interleucina (IL) 17, fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos e células T CD4<sup>+</sup> secretoras de IL-5 por ELISA. Eles encontraram que o peptídeo AQP4<sub>281-300</sub> gerou mais respostas T<sub>H1</sub> e T<sub>H17</sub> do que qualquer outro. Mas, quando avaliaram se esse epítipo ligava o anticorpo anti-hAQP4, por microscopia de imunofluorescência quantitativa, eles observaram que o epítipo não interferia na interação do anticorpo com a proteína expressa (Arellano et al. 2016).

Dessa forma, essas sequências parecem gerar maior proliferação de células T aos epítomos, do que reconhecimento por anticorpos.

#### **6.5.8. Região C-terminal**

A região final da porção C-terminal da proteína não apresenta epítomos que geram sensibilidade e especificidade adequadas para a detecção do biomarcador da doença. Também, até o momento, não foram encontrados registros na literatura do uso dos epítomos dessa porção da proteína em estudos de mutação, diagnóstico ou terapia.

### **6.6 QUANTIFICAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ACURÁCIA DO NANOBIOSENSOR AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub>**

#### **6.6.1. Quantificação da sensibilidade do nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub>**

Como já foi mencionado, o CBA detecta os anticorpos que reconhecem os epítomos conformacionais da AQP4, mas há muitos estudos que mostraram que há clones de anticorpos que se ligam a epítomos lineares. Por exemplo, no estudo de Marnetto e colaboradores (2009), os autores fizeram análises de *Western blot* (WB) para detectar anticorpos AQP4-IgG contra epítomos lineares de ambas isoformas, M1 e M23. Eles encontraram níveis de acurácia diferentes para as isoformas: 81% de sensibilidade e 97% de especificidade (isoforma M1) e 12,5% de sensibilidade e 91% de especificidade (isoforma M23).

Em nosso trabalho, utilizamos a isoforma M1, que é diferente da M23 pelos primeiros 22 aminoácidos na região N-terminal da proteína. É interessante observar que os epítomos lineares dessa porção renderam bons resultados aos nanobiossensores desenvolvidos na segunda etapa do projeto. Juntos, esses dados indicam que essa região contém epítomos lineares que são reconhecidos por alguns clones de anticorpos e podem aumentar a sensibilidade do diagnóstico, ao ampliar as regiões-alvo da proteína, para além dos epítomos conformacionais presentes em OAPs formadas com a isoforma M23.

O valor de sensibilidade (84,2%) que obtivemos com o nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub> está acima do obtido com alguns métodos convencionais, como ELISA (71% de sensibilidade e 98% de especificidade) (Hayakawa et al. 2008), imunofluorescência

indireta (IFI, sensibilidade de 58%-76% e especificidade de 85%-99%) (Lennon et al. 2004; Jarius et al. 2007), ensaio de fluoroimunoprecipitação (FIPA, sensibilidade de 76% e especificidade de 100%) (Waters e Vincent 2008) e ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA, sensibilidade de 57% e especificidade de 98%) (Paul et al. 2007).

Esses métodos são mais específicos, mas, com a especificidade do CBA, é possível separar ENMO dos grupos controle com bastante acurácia. A demanda atual é que dentro do grupo ENMO, aqueles indivíduos com diagnóstico clínico possam ter confirmação laboratorial mais rápida, com o uso de um sensor mais sensível ao biomarcador.

#### **6.6.2. Quantificação da concentração de AQP4-IgG**

Em nossas análises, a sensibilidade das AgNPs conjugadas ao AQP4<sub>61-70</sub> possibilitou a detecção do anticorpo AQP4-IgG em amostras com titulação de 10x (concentração mínima para detecção do anticorpo) e 100x de anticorpos. Em um estudo desenvolvido por Takahashi e colaboradores (2006), os autores usaram linhagens celulares humanas para expressar a AQP4 e usaram-nas para detectar o biomarcador e fazer uma titulação dos anticorpos no soro de pacientes com um ensaio de imunofluorescência. A titulação de anticorpos (diluição máxima para marcação positiva) variou de 64x a 16.384x. Nesta comparação, o sistema desenvolvido com as nanopartículas e o epítopo mais sensível e específico deste trabalho apresentou maior sensibilidade do que o ensaio com a proteína em conformação nativa.

### **6.7 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS DA 2ª ETAPA**

- Os nanobiossensores AgNPs-AQP4<sub>1-10</sub> e AgNPs-AQP4<sub>11-20</sub> destacam a diferença de reatividade dos anticorpos presentes nas amostras dos pacientes soronegativos, em relação aos soropositivos, indicando que esses apresentam clones diferentes de anticorpos. Os dados apontam para uma maior reatividade dos soronegativos à isoforma M1 da proteína, representada aqui pelos primeiros 20 aminoácidos.
- Analisando os epítomos adjacentes ao AQP4<sub>61-70</sub>, tem-se que a sequência anterior (AQP4<sub>51-60</sub>) compartilha o mesmo padrão que a primeira, visto

detecta o biomarcador nas amostras dos pacientes soropositivos. Da mesma forma, a sequência seguinte AQP4<sub>71-80</sub> detecta o biomarcador nos soropositivos, mas se destaca por ser reconhecida pelos anticorpos dos pacientes soronegativos, diferentemente do epítipo AQP4<sub>51-60</sub>. Por isso, esta sequência (AQP4<sub>71-80</sub>) poderia ser agregada a um sistema para re-teste dos pacientes soronegativos.

- Os nanobiossensores AQP4<sub>81-90</sub> e AQP4<sub>91-100</sub> detectaram o anticorpo em quase todas as amostras do grupo ENMO, mas não foram muito explorados nos ensaios de detecção já publicados, por se tratarem de epítopos intracelulares. Mas, os resultados e a literatura estão mostrando a importância dos epítopos intracelulares tanto para a detecção do biomarcador em fenótipos diferentes da doença, quanto para a compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença. Esses epítopos, especialmente, parecem ter relação com um mecanismo de mimetismo molecular, envolvendo uma bactéria presente no grupo ENMO e ausente nos saudáveis.
- Apesar da literatura e deste projeto ter demonstrado ser possível utilizar sequências lineares para detecção do biomarcador, vimos que a interação dos anticorpos com toda a região da alça extracelular C e E é estritamente dependente da conformação, não sendo adequadas para este método de detecção.
- Como foi observado na primeira etapa, o nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>201-210</sub> rendeu bons resultados, juntamente com o AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub>. Já a sequência adjacente (AQP4<sub>211-220</sub>) não detectou o anticorpo nas amostras do grupo ENMO, indicando que apenas a porção AQP4<sub>201-210</sub>, que é naturalmente processada pelas células do sistema imune, é uma boa escolha para compor o sistema de sensoriamento.
- Por fim, os epítopos da região C-terminal da proteína não compuseram sistemas de detecção com as AgNPs que resultaram em significativas alterações ópticas, indicando que é uma região que não deve compor um sistema de sensoriamento do biomarcador. Entretanto, o nanobiossensor

AgNPs-AQP4<sub>261-270</sub> destacou-se por detectar o anticorpo nas amostras do grupo ENMO soronegativo e interagir com uma amostra de paciente EM. O objetivo não foi usar amostras de pacientes diagnosticados com EM, para estudar uma possível interação com epítomos da AQP4, mas apenas como um controle negativo. Porém, literatura aponta para uma possível sobreposição imunológica entre as duas doenças envolvendo essa região da proteína, que teria relação com a liberação de epítomos crípticos em astrocitopatias, sendo um bom marcador de danos aos astrócitos.

- Esta etapa consistiu em uma triagem dos peptídeos, dado que a proteína AQP4 é bastante extensa, com muitos epítomos para serem testados. Por isso, são necessários mais testes envolvendo os epítomos citados nesta lista de considerações parciais, com um maior número de amostras.
- O valor de sensibilidade obtido com o nanobiossensor melhor estudado neste projeto, o AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub>, é superior aos dos métodos convencionais que são usados na detecção do anticorpo AQP4-IgG, porém mostrou-se menos específico. A perspectiva é que, com os dados obtidos da triagem dos peptídeos, somados ao aumento do número de amostras, a acurácia dos nanobiossensores aumente, em sensibilidade e especificidade.

## 7. CONCLUSÕES

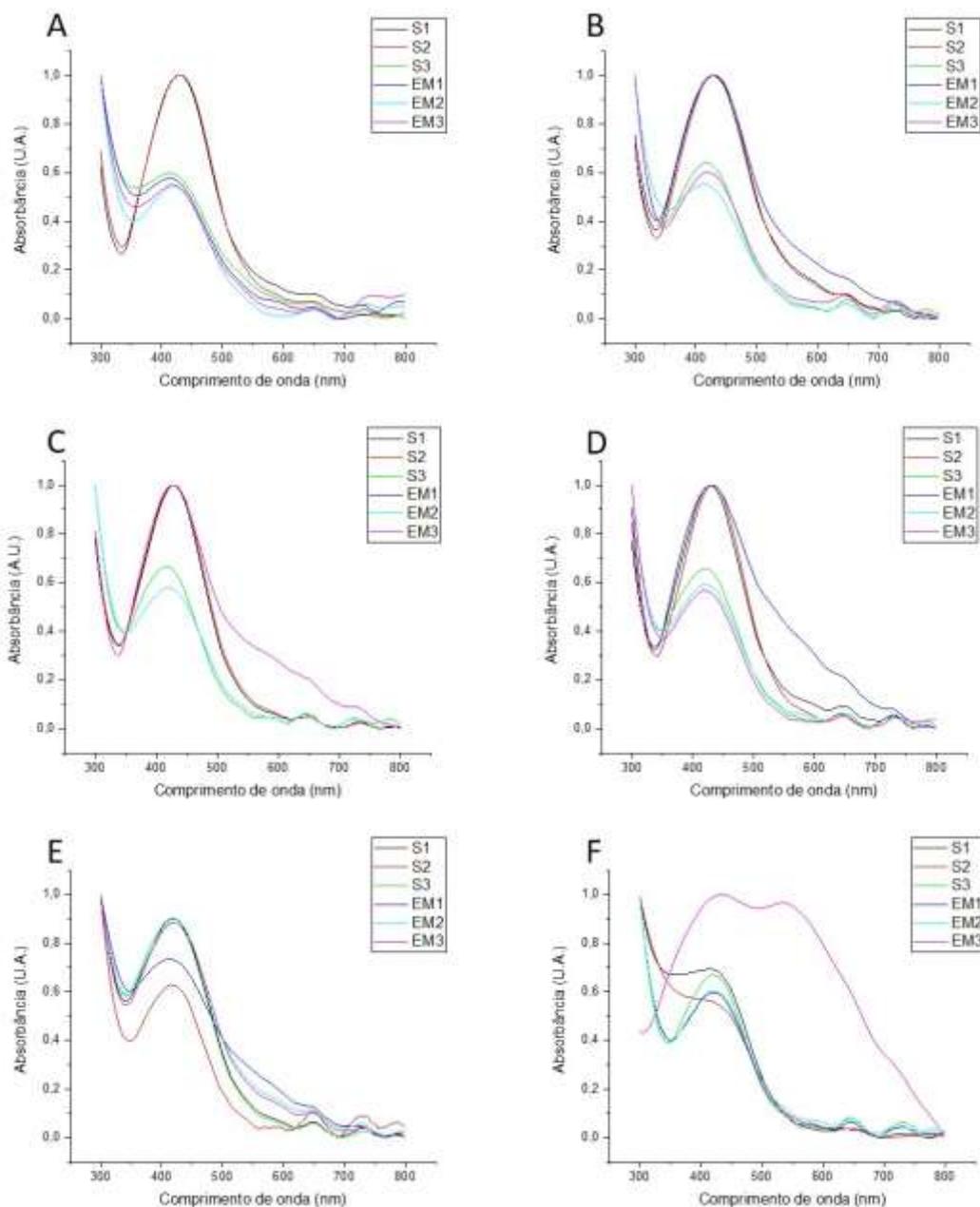
Os nanobiossensores desenvolvidos na primeira etapa (AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub> e AgNPs-AQP4<sub>201-210</sub>) separaram os grupos clínicos: ENMO, EM e saudáveis com alta e moderada capacidade de discriminação, respectivamente. Utilizando os cinco nanobiossensores desenvolvidos nesta etapa, foi possível verificar a ocorrência de interação epítipo-específica dentro do grupo ENMO, o que levou à segunda etapa do projeto. Também foi verificado que a detecção do anticorpo é dependente da concentração, visto que algumas amostras soronegativas foram reclassificadas como soropositivas, ao aumentar a concentração de IgGs totais nos ensaios.

A sensibilidade de 84,62% do nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>61-70</sub> é superior aos métodos convencionais (CBA, ELISA e imunofluorescência indireta) já registrados para a detecção do biomarcador, mas a especificidade de 66,67% é inferior à deles. O objetivo foi obter um valor de sensibilidade superior com a técnica de AgNPs, para o re-teste de pacientes com diagnóstico clínico de ENMO sem confirmação laboratorial. A curva de concentração obtida permitiu a quantificação do biomarcador em amostras previamente tituladas, confirmando a sensibilidade do sensor ao detectar o anticorpo em uma amostra com titulação de 10x.

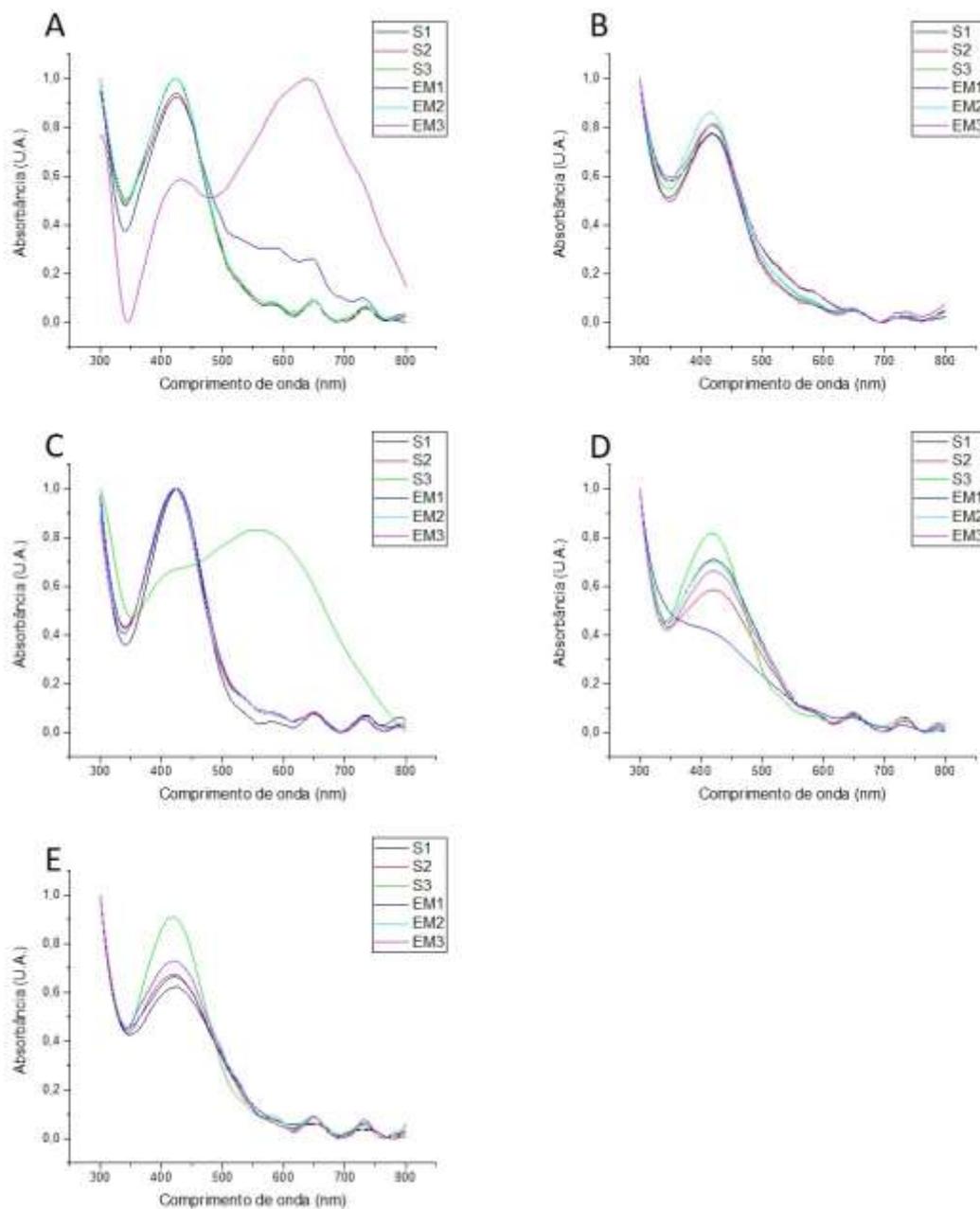
A triagem dos peptídeos feita na segunda etapa mostrou que os seguintes epítopos: AgNPs-AQP4<sub>1-10</sub>, AgNPs-AQP4<sub>11-20</sub>, AgNPs-AQP4<sub>71-80</sub>, AgNPs-AQP4<sub>81-90</sub>, AgNPs-AQP4<sub>91-100</sub> e AgNPs-AQP4<sub>261-270</sub> são fortes candidatos para comporem sistemas de detecção para re-teste de pacientes ENMO soronegativos, já que se destacaram por detectar o anticorpo neste grupo. Os epítopos da região C-terminal e os das alças extracelulares C e E não renderam bons resultados com o método de AgNPs.

## 8. APÊNDICES

### 8.1 APÊNDICE A: CONTROLES (AQP4<sub>1-80</sub>)

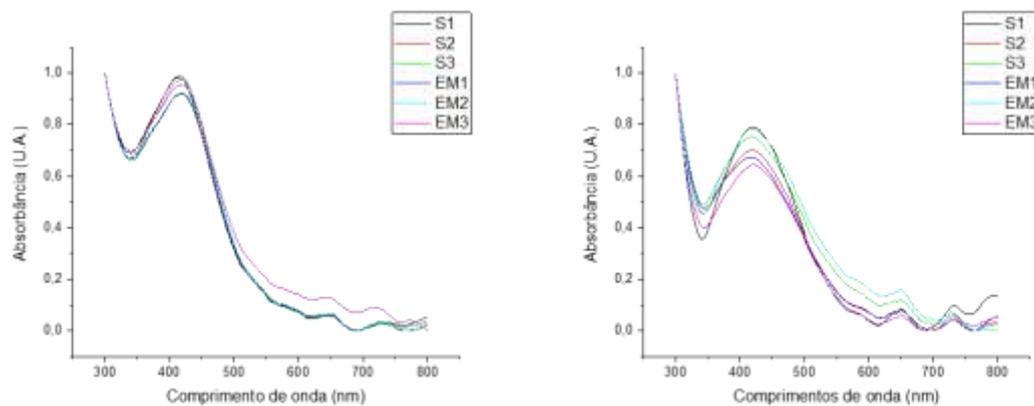


Apêndice A – Espectros resultantes da interação das amostras de IgGs que foram purificadas do soro de pessoas saudáveis (S1-S3) e pacientes diagnosticados com EM (EM1-EM3) (A) nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>1-10</sub>; (B) nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>11-20</sub>; (C) nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>21-30</sub>; (D) nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>31-40</sub>; (E) nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>51-60</sub> e (F) nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>71-80</sub>.

8.2 APÊNDICE B: CONTROLES (AQP4<sub>111-180</sub>)

Apêndice B – Espectros resultantes da interação das amostras de IgGs que foram purificadas do soro de pessoas saudáveis (S1-S3) e pacientes diagnosticados com EM (EM1-EM3) (A) nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>111-120</sub>; (B) nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>121-130</sub>; (C) nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>151-160</sub>; (D) nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>161-170</sub> e (E) nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>171-180</sub>.

### 8.3 APÊNDICE C: CONTROLES (AQP4<sub>281-300</sub>)



Apêndice C – Espectros resultantes da interação das amostras de IgGs que foram purificadas do soro de pessoas saudáveis (S1-S3) e pacientes diagnosticados com EM (EM1-EM3) (A) nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>281-290</sub> e (B) nanobiossensor AgNPs-AQP4<sub>291-300</sub>.

## 9. ANEXO – Parecer consubstanciado do CEP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS COMO SENSOR DIAGNÓSTICO DE ANTICORPOS NAS DESORDENS DO ESPECTRO DA NEUROMIELITE ÓPTICA

**Pesquisador:** Fabio de Lima Leite

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 90748018.0.0000.5504

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de São Carlos/UFSCar

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.740.664

#### Apresentação do Projeto:

Estudo transversal. Um total de 40 voluntários, dentre eles haverá pacientes portadores de neuromielite óptica (n=10), esclerose múltipla (n=10) além de doadores de sangue (n=20), serão convidados a participarem da pesquisa. Serão coletadas amostras de sangue dos voluntários para análises específicas.

#### Objetivo da Pesquisa:

O pesquisador aponta como objetivo primário desenvolver sistemas de sensoriamento com nanopartículas metálicas, para serem aplicadas como sensores diagnósticos de anticorpos nas desordens do neuromielite óptica. Em relação aos objetivos secundários, aponta os seguintes: desenvolver nanopartículas metálicas funcionalizadas com o peptídeo imunodominante da molécula AQP4 (Peptí-AQP4), desenvolver sistema de nariz químico com nanopartículas metálicas; e aplicar os sistemas de sensoriamento com nanopartículas metálicas na detecção de anticorpos anti-AQP4 e anti MOG.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O pesquisador aponta risco inerente a coleta de sangue como formação de hematoma e também informa que será utilizada a coleta de informações do prontuário clínico, dados presentes no TCLE apresentado. Quanto aos benefícios, informa ausência de benefício direto, mas afirma que o estudo visa melhorar o processo diagnóstico das doenças do espectro da neuromielite óptica

**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: 2.740.964

(informações também presentes no TCLE).

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto de pesquisa possui relevância à área em questão. O cronograma aponta que o início da coleta teria ocorrido no neste mês.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

A folha de rosto foi anexada. Apresentou TCLE, conforme determina a Resolução CNS 466/12. Não apresentou termo de ciência / concordância por parte do local onde serão recrutados os pacientes e realizada a coleta das amostras sanguíneas. Entretanto, entende-se que este projeto também deverá ser avaliado pelo local, por se tratar de centro co-participante.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto aprovado, considerando que o projeto foi apresentado no mês de maio a este CEP e que o Centro Coparticipante deverá também realizar a avaliação deste projeto.

**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_DO_PROJETO_1115173.pdf	18/05/2018 15:53:58		Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_PB_assinada.pdf	18/05/2018 15:53:15	Fabio de Lima Leite	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Manifestacao.pdf	10/05/2018 10:50:14	Fabio de Lima Leite	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura.pdf	10/05/2018 10:41:06	Fabio de Lima Leite	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Akemi_Doutorado.pdf	05/05/2018 11:25:42	Fabio de Lima Leite	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	QUESTIONARIO_doador_de_sangue.pdf	05/05/2018 11:18:19	Fabio de Lima Leite	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PACIENTE_E_CONTROLES.pdf	05/05/2018 11:17:22	Fabio de Lima Leite	Aceito

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: 2.740.664

Declaração de Pesquisadores	Cartas_colaboradores.pdf	05/05/2018 11:02:07	Fabio de Lima Leite	Aceito
-----------------------------	--------------------------	------------------------	---------------------	--------

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO CARLOS, 27 de Junho de 2018

---

**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

## 10.REFERÊNCIAS

- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(1):41–53.
- Alberga D, Trisciuzzi D, Lattanzi G, Bennett JL, Verkman AS, Mangiatordi GF, et al. Comparative molecular dynamics study of neuromyelitis optica-immunoglobulin G binding to aquaporin-4 extracellular domains. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2017;1859(8):1326–34.
- Alexopoulos H, Kampylafka EI, Chatzi I, Travasarou M, Karageorgiou KE, Dalakas MC, et al. Reactivity to AQP4 epitopes in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2013;260(1–2):117–20.
- Almaquer FEP, Ricacho JSY, Ronquillo RLG. Simple and rapid colorimetric sensing of Ni(II) ions in tap water based on aggregation of citrate-stabilized silver nanoparticles. *Sustain Environ Res.* 2019;1(1):1–10.
- Alvarenga MP, Fernandez O, Leyva L, Campanella L, Vasconcelos CF, Alvarenga M, et al. The HLA DRB1\*03:01 allele is associated with NMO regardless of the NMO-IgG status in Brazilian patients from Rio de Janeiro. *J Neuroimmunol.* 2017;310:1–7.
- Amendola V, Meneghetti M. Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles. *Phys Chem Chem Phys.* 2009;11(20):3805–21.
- Amendola V, Pilot R, Frascioni M, Maragò OM, Iatì MA. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review. *J Phys Condens Matter.* 2017;29(20):1–49.
- Anderson AC, Malinowski ME, Rev P, Cotts EJ, Miliotis DM, Northrop GA, et al. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. *Phys Rev Lett.* 1982;49(1):57.
- Anigol LB, Charantimath JS, Gurubasavaraj PM. Effect of Concentration and pH on the Size of Silver Nanoparticles Synthesized by Green Chemistry. *Org Med Chem II.* 2017;3(5):1–5.
- Ansar SM, Chakraborty S, Kitchens CL. pH-responsive mercaptoundecanoic acid functionalized gold nanoparticles and applications in catalysis. *Nanomaterials.*

2018;8(5):1–12.

Arellano B, Hussain R, Zacharias T, Yoon J, David C, Zein S, et al. Human Aquaporin 4281–300 Is the Immunodominant Linear Determinant in the Context of HLA-DRB1\*03:01: Relevance for Diagnosing and Monitoring Patients With Neuromyelitis Optica. *Arch Neurol*. 2016;69(9):1125–31.

Asavapanumas N, Ratelade J, Verkman AS. Unique neuromyelitis optica pathology produced in naïve rats by intracerebral administration of NMO-IgG. *Acta Neuropathol*. 2014;127(4):539–51.

Bartczak D, Kanaras AG. Preparation of Peptide-Functionalized Gold Nanoparticles Using One Pot EDC/Sulfo-NHS Coupling. *Langmuir*. 2011;27(16):10119–23.

Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. *Molecules*. 2020;25(1):1–15.

Bennett JL. Finding NMO: The Evolving Diagnostic Criteria of Neuromyelitis Optica. *J Neuroophthalmol*. 2016;36(3):238.

Bennett JL, Lam C, Kalluri SR, Saikali P, Bautista K, Dupree C, et al. Intrathecal pathogenic anti-aquaporin-4 antibodies in early neuromyelitis optica. *Ann Neurol*. 2009;66(5):617–29.

Bhalla N, Jolly P, Formisano N, Estrela P. Introduction to biosensors. *Essays Biochem*. 2016;60(1):1–8.

Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*. 1986;56(9):930–3.

Bloom O, Cheng KF, He M, Papatheodorou A, Volpe BT, Diamond B, et al. Generation of a unique small molecule peptidomimetic that neutralizes lupus autoantibody activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(25):10255–9.

Brain WR. Critical Review: Disseminated Sclerosis. *QJM An Int J Med*. 1930;23(91):343–91.

Broadwell RD, Sofroniew M V. Serum proteins bypass the blood-brain fluid barriers for

- extracellular entry to the central nervous system. *Exp Neurol*. 1993;120(2):245–63.
- 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;17(3):195–200.
- Brust M, Walker M, Bethell D, Schiffrin DJ, Whyman R. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid–Liquid system. *J Chem Soc Chem Commun*. 1994;(7):801–2.
- Chang VTW, Chang HM. Review: Recent advances in the understanding of the pathophysiology of neuromyelitis optica spectrum disorder. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2019;46(3):1–20.
- Chen JJ, Pittock SJ, Flanagan EP, Lennon VA, Bhatti MT. Optic neuritis in the era of biomarkers. *Surv Ophthalmol*. 2020;65(1):12–7.
- Cheng HN, Doemeny LJ, Geraci CL, Schmidt DG, Boulevard REL, Orleans N, et al. Nanotechnology Overview : Opportunities and Challenges. *Am Chem Soc*. 2016;1:1–12.
- Chihara N, Aranami T, Oki S, Matsuoka T, Nakamura M, Kishida H, et al. Plasmablasts as migratory IgG-producing cells in the pathogenesis of neuromyelitis optica. *PLoS One*. 2013;8(12):1–11.
- Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, et al. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(9):3701–6.
- Clarkson JP, Winans J, Fauchet PM. On the scaling behavior of dipole and quadrupole modes in coupled plasmonic nanoparticle pairs. *Opt Mater Express*. 2011;1(5):970–9.
- Cobo-Calvo A, Sepúlveda M, Rollot F, Armangué T, Ruiz A, Maillart E, et al. Evaluation of treatment response in adults with relapsing MOG-Ab-associated disease. *J Neuroinflammation*. 2019;16(134):1–12.
- Contentti EC, Correale J. Neuromyelitis optica spectrum disorders: from pathophysiology to therapeutic strategies. *J Neuroinflammation*. 2021;18(1):1–18.

- Cree BAC, Bennett JL, Kim HJ, Weinshenker BG, Pittock SJ, Wingerchuk DM, et al. Inebilizumab for the treatment of neuromyelitis optica spectrum disorder (N-MOMentum): a double-blind, randomised placebo-controlled phase 2/3 trial. *Lancet* (London, England). 2019;394(10206):1352–63.
- Cross JO, Opila RL, Boyd IW, Kaufmann EN. Materials characterization and the evolution of materials. *MRS Bull.* 27 de novembro de 2015;40(12):1019–33.
- Davoudi V, Keyhanian K, Bove RM, Chitnis T. Immunology of neuromyelitis optica during pregnancy. *Neurol Neuroimmunol neuroinflammation.* 2016;3(6):1–11.
- Devi GK, Suruthi P, Veerakumar R, Vinoth S, Subbaiya R, Chozhavendhan S. A review on metallic gold and silver nanoparticles. *Res J Pharm Technol.* 2019;12(2):935–43.
- Dong X, Ji X, Wu H, Zhao L, Li J, Yang W. Shape Control of Silver Nanoparticles by Stepwise Citrate Reduction Shape Control of Silver Nanoparticles by Stepwise Citrate Reduction. 2009;113(March):6573–6.
- Eigler DM, Schweizer EK. Positioning single atoms with a scanning tunnelling microscope. *Nat* 1990 3446266. 1990;344(6266):524–6.
- Evanoff DD, Chumanov G. Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays. *ChemPhysChem.* 2005;6(7):1221–31.
- Ezra L, O’Dell ZJ, Hui J, Riley KR. Emerging investigator series: quantifying silver nanoparticle aggregation kinetics in real-time using particle impact voltammetry coupled with UV-vis spectroscopy. *Environ Sci Nano.* 2020;7(9):2509–21.
- Faraday M. X. The Bakerian Lecture. —Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Philos Trans R Soc London.* 1857;147:145–81.
- Feynman RP. There’s Plenty of Room at the Bottom. *Calif Inst Technol.* 1960;23(5):22–36.
- Freestone I, Meeks N, Sax M, Higgitt C. The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology. *Gold Bull* 2007 404. 2007;40(4):270–7.
- Fujihara K. Neuromyelitis optica spectrum disorders: Still evolving and broadening. *Curr Opin Neurol.* 2019;32(3):385–94.

- Fujihara K, Bennett JL, de Seze J, Haramura M, Kleiter I, Weinshenker BG, et al. Interleukin-6 in neuromyelitis optica spectrum disorder pathophysiology. *Neurol Neuroimmunol neuroinflammation*. 2020;7(5):1–11.
- 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;251(1):47–52.
- Gorup LF, Longo E, Leite ER, Camargo ER. Moderating effect of ammonia on particle growth and stability of quasi-monodisperse silver nanoparticles synthesized by the Turkevich method. *J Colloid Interface Sci*. 2011;360(2):355–8.
- Hamid SHM, Whittam D, Mutch K, Linaker S, Solomon T, Das K, et al. What proportion of AQP4-IgG-negative NMO spectrum disorder patients are MOG-IgG positive? A cross sectional study of 132 patients. *J Neurol*. 2017;264(10):2088–94.
- Hasegawa H, Ma T, Skach W, Matthay MA, Verkman AS. Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *J Biol Chem*. 1994;269(8):5497–500.
- Hayakawa S, Mori M, Okuta A, Kamegawa A, Fujiyoshi Y, Yoshiyama Y, et al. Neuromyelitis optica and anti-aquaporin-4 antibodies measured by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Neuroimmunol*. 2008;196(1–2):181–7.
- Hebeish AA, El-Rafie MH, Abdel-Mohdy FA, Abdel-Halim ES, Emam HE. Carboxymethyl cellulose for green synthesis and stabilization of silver nanoparticles. *Carbohydr Polym*. 2010;82(3):933–41.
- 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*. 2009;106(18):7437–42.
- Hong Y, Huh YM, Yoon DS, Yang J. Nanobiosensors based on localized surface plasmon resonance for biomarker detection. *J Nanomater*. 2012;2012(1):1–13.
- Hor JY, Asgari N, Nakashima I, Broadley SA, Leite MI, Kissani N, et al. Epidemiology of Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder and Its Prevalence and Incidence Worldwide. *Front Neurol*. 2020;11:501.

- Hulla JE, Sahu SC, Hayes AW. Nanotechnology: History and future. *Hum Exp Toxicol*. 2015;34(12):1318–21.
- 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;40(1):21–7.
- Iravani S, Korbekandi H, Mirmohammadi S V, Zolfaghari B. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Res Pharm Sci*. 2014;9(6):385–406.
- Jain KK. Nanomedicine: Application of nanobiotechnology in medical practice. *Med Princ Pract*. 2008;17(2):89–101.
- Jain PK, Lee KS, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *J Phys Chem B*. 2006;110(14):7238–48.
- Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197–216.
- Jarius S, Franciotta D, Bergamaschi R, Wright H, Littleton E, Palace J, et al. NMO-IgG in the diagnosis of neuromyelitis optica. *Neurology*. 2007;68(13):1076–7.
- Jarius S, Franciotta D, Paul F, Ruprecht K, Bergamaschi R, Rommer PS, et al. Cerebrospinal fluid antibodies to aquaporin-4 in neuromyelitis optica and related disorders: frequency, origin, and diagnostic relevance. *J Neuroinflammation*. 2010;7(52):1–8.
- Jarius S, Ruprecht K, Wildemann B, Kuempfel T, Ringelstein M, Geis C, et al. Contrasting disease patterns in seropositive and seronegative neuromyelitis optica: A multicentre study of 175 patients. *J Neuroinflammation*. 2012;9(14):1–17.
- Jarius S, Wildemann B. Aquaporin-4 antibodies (NMO-IgG) as a serological marker of neuromyelitis optica: a critical review of the literature. *Brain Pathol*. 2013a;23(6):661–83.
- Jarius S, Wildemann B. The history of neuromyelitis optica. *J Neuroinflammation*.

2013b;10(1):797.

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;81(14):1197–204.

Kaida K, Kusunoki S. Ganglioside complexes as target antigens in Guillain-Barré syndrome and related disorders. Vol. 3, *Future Lipidology*. 2008. p. 425–34.

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;36(3–4):221–7.

Kawachi I, Lassmann H. Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017;88(2):137–45.

Kelly KL, Coronado E, Zhao LL, Schatz GC. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J Phys Chem B*. 2003;107(3):668–77.

Kessler RA, Mealy MA, Levy M. Treatment of Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder: Acute, Preventive, and Symptomatic. Vol. 18, *Current Treatment Options in Neurology*. 2016. p. 1–15.

Khlebtsov NG, Dykman LA. Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles. *J Quant Spectrosc Radiat Transf*. 2010;111(1):1–35.

Kim SH, Kim W, Huh SY, 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*. 2013;9(1):36–42.

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;71(3):276–83.

Kleiter I, Gahlen A, Borisow N, Fischer K, Wernecke KD, Wegner B, et al. Neuromyelitis optica: Evaluation of 871 attacks and 1,153 treatment courses. *Ann Neurol*. 2016;79(2):206–16.

- Krajczewski J, Kołataj K, Kudelski A. Plasmonic nanoparticles in chemical analysis. *RSC Adv.* 2017;7(28):17559–76.
- Kremer L, Mealy M, Jacob A, Nakashima I, Cabre P, Bigi S, et al. Brainstem manifestations in neuromyelitis optica: A multicenter study of 258 patients. *Mult Scler J.* 2014;20(7):843–7.
- Kvítek O, Siegel J, Hnatowicz V, Švorčík V. Noble metal nanostructures influence of structure and environment on their optical properties. *J Nanomater.* 2013;2013:1–15.
- Lawless D, Kapoor S, Meisel D. Bifunctional Capping of CdS Nanoparticles and Bridging to TiO<sub>2</sub>. *J Phys Chem.* 2002;99(25):10329–35.
- Lee DSW, Rojas OL, Gomerman JL. B cell depletion therapies in autoimmune disease: advances and mechanistic insights. *Nat Rev Drug Discov* 2020 203. 2020;20(3):179–99.
- Lee SH, Jun BH. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. *Int J Mol Sci.* 2019;20(865):1–24.
- Leite FL, Hausen M, Oliveira GS, Brum DG, Oliveira ON. Nanoneurobiophysics: new challenges for diagnosis and therapy of neurologic disorders. *Nanomedicine (Lond).* 2015;10(23):3417–9.
- Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman AS, Hinson SR. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med.* 2005;202(4):473–7.
- Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet.* 2004;364(9451):2106–12.
- Li S, Yin S, Jiang Y, Yin C, Deng Q, Du C. Specific protein detection in multiprotein coexisting environment by using LSPR biosensor. *IEEE Trans Nanotechnol.* 2010;9(5):554–7.
- Libbey JE, McCoy LL, Fujinami RS. Molecular mimicry in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol.* 2007;79:127–47.

- Lismont M, Dreesen L. Comparative study of Ag and Au nanoparticles biosensors based on surface plasmon resonance phenomenon. *Mater Sci Eng C*. 2012;32(6):1437–42.
- Liu H, Ge J, Ma E, Yang L. Advanced biomaterials for biosensor and theranostics. *Biomater Transl Med A Biomater Approach*. 1 de janeiro de 2019;213–55.
- Lizoń A, Wyrwal-Sarna M, Gajewska M, Drozd R. Silver nanoparticle-based assay for the detection of immunoglobulin free light chains. *Materials (Basel)*. 2019;12(18):1–14.
- Loiseau A, Asila V, Boitel-Aullen G, Lam M, Salmain M, Boujday S. Silver-Based Plasmonic Nanoparticles for and Their Use in Biosensing. *Biosensors*. 2019;9(78):1–39.
- 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*. 2002;125(Pt 7):1450–61.
- Mackay IR, Leskovsek N V., Rose NR. Cell damage and autoimmunity: a critical appraisal. *J Autoimmun*. 2008;30(1–2):5–11.
- Mansoori GA, Soelaiman TAF. Nanotechnology - An introduction for the standards community. *J ASTM Int*. 2005;2(6):17–38.
- Marco M Di, Shamsuddin S, Razak KA, Aziz AA, Devaux C, Borghi E, et al. Overview of the main methods used to combine proteins with nanosystems: Absorption, bioconjugation, and encapsulation. *Int J Nanomedicine*. 2010;5(1):37–49.
- Marnetto F, Hellias B, Granieri L, Frau J, Patanella AK, Nytrova P, et al. Western blot analysis for the detection of serum antibodies recognizing linear Aquaporin-4 epitopes in patients with Neuromyelitis Optica. *J Neuroimmunol*. 2009;217(1–2):74–9.
- Mathiisen TM, Lehre KP, Danbolt NC, Ottersen OP. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia*. 2010;58(9):1094–103.
- Matiello M, Kim HJ, Kim W, Brum DG, Barreira AA, Kingsbury DJ, et al. Familial neuromyelitis optica. *Neurology*. 2010;75(4):310–5.

- Matiello M, Schaefer-Klein J, Sun D, Weinshenker BG. Aquaporin 4 expression and tissue susceptibility to neuromyelitis optica. *JAMA Neurol.* 2013;70(9):1118–25.
- Matsuya N, Komori M, Nomura K, Nakane S, Fukudome T, Goto H, et al. Increased T-cell immunity against aquaporin-4 and proteolipid protein in neuromyelitis optica. *Int Immunol.* 2011;23(9):565–73.
- Misu T, Fujihara K, Kakita A, Konno H, Nakamura M, Watanabe S, et al. Loss of aquaporin 4 in lesions of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Brain a J Neurol.* 2007;130(Pt 5):1224–34.
- Molnarfi N, Schulze-Topphoff U, Weber MS, Patarroyo JC, Prod'homme T, Varrin-Doyer M, et al. MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *J Exp Med.* 2013;210(13):2921–37.
- Moraes AS, Brum DG, Ierich JCM, Higa AM, Assis ASJ, Miyazaki CM, et al. A highly specific and sensitive nanoimmunosensor for the diagnosis of neuromyelitis optica spectrum disorders. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–9.
- Mori M, Kuwabara S, Paul F. Worldwide prevalence of neuromyelitis optica spectrum disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2018;89(6):555–6.
- Mukherji S, Bharti S, Shukla G, Mukherji S. Synthesis and characterization of size and shape-controlled silver nanoparticles. *Phys Sci Rev.* 2019;4(1):1–73.
- Naresh V, Lee N. A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. *Sensors (Switzerland).* 2021;21(4):1–35.
- Del Negro MC, Marinho PBC, Papais-Alvarenga RM. Neuromyelitis optica: phenotypic characteristics in a Brazilian case series. *Arq Neuropsiquiatr.* 2017;75(2):81–6.
- Nesverova V, Törnroth-Horsefield S. Phosphorylation-Dependent Regulation of Mammalian Aquaporins. *Cells.* 2019;8(2):82.
- Olenin AY. Chemically Modified Silver and Gold Nanoparticles in Spectrometric Analysis. *J Anal Chem.* 2019;74(4):355–75.
- Oliveira E, Núñez C, Santos HM, Fernández-Lodeiro J, Fernández-Lodeiro A, Capelo JL,

- et al. Revisiting the use of gold and silver functionalised nanoparticles as colorimetric and fluorometric chemosensors for metal ions. *Sensors Actuators, B Chem.* 2015;212:297–328.
- Owens GP, Ritchie A, Rossi A, Schaller K, Wemlinger S, Schumann H, et al. Mutagenesis of the aquaporin 4 extracellular domains defines restricted binding patterns of pathogenic neuromyelitis optica IgG. *J Biol Chem.* 2015;290(19):12123–34.
- 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;67(8):1016–7.
- Pandit L, Cox LM, Malli C, D’Cunha A, Rooney T, Lokhande H, et al. *Clostridium bolteae* is elevated in neuromyelitis optica spectrum disorder in India and shares sequence similarity with AQP4. *Neurol Neuroimmunol neuroinflammation.* 2021;8(1):1–11.
- Pang D, Thierry AR, Dritschilo A. DNA studies using atomic force microscopy: Capabilities for measurement of short DNA fragments. *Front Mol Biosci.* 2015;2(1):1–7.
- Papadopoulos MC. Treatment of NMO: state of the art and emerging therapies. *Nat Rev Neurol.* 2014;10(9):493–506.
- Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin 4 and neuromyelitis optica. *Lancet Neurol.* 2012;11(6):535–44.
- Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin water channels in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2013 144. 2013;14(4):265–77.
- Patterson SL, Goglin SE. Neuromyelitis Optica. *Rheum Dis Clin North Am.* 2017;43(4):579–91.
- Paul F, Jarius S, Aktas O, Bluthner M, Bauer O, Appelhans H, et al. Antibody to aquaporin 4 in the diagnosis of neuromyelitis optica. *PLoS Med.* 2007;4(4):669–74.
- Peiris S, McMurtrie J, Zhu HY. Metal nanoparticle photocatalysts: Emerging processes for green organic synthesis. *Catal Sci Technol.* 2016;6(2):320–38.

- Pesavento, Profumo, Merli, Cucca, Zeni, Cennamo. An Optical Fiber Chemical Sensor for the Detection of Copper(II) in Drinking Water. *Sensors*. 2019;19(5246):1–13.
- Petryayeva E, Krull UJ. Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing—A review. *Anal Chim Acta*. 7 de novembro de 2011;706(1):8–24.
- Phuan PW, Ratelade J, Rossi A, Tradtrantip L, Verkman AS. Complement-dependent cytotoxicity in neuromyelitis optica requires aquaporin-4 protein assembly in orthogonal arrays. *J Biol Chem*. 2012;287(17):13829–39.
- Pillai ZS, Kamat P V. What factors control the size and shape of silver nanoparticles in the citrate ion reduction method? *J Phys Chem B*. 2004;108:945–51.
- 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;286(11):9216–24.
- Pisani F, Mola MG, Simone L, Rosito S, Alberga D, Mangiatordi GF, et al. Identification of a point mutation impairing the binding between aquaporin-4 and neuromyelitis optica Autoantibodies. *J Biol Chem*. 2014;289(44):30578–89.
- Pittock SJ, Berthele A, Fujihara K, Kim HJ, Levy M, Palace J, et al. Eculizumab in Aquaporin-4–Positive Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *N Engl J Med*. 2019;381(7):614–25.
- Pittock SJ, Lennon VA, Bakshi N, Shen L, McKeon A, Quach H, et al. Seroprevalence of Aquaporin-4–IgG in a Northern California Population Representative Cohort of Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol*. 2014;71(11):1433–6.
- Pittock SJ, Lennon VA, Krecke K, Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Brain abnormalities in neuromyelitis optica. *Arch Neurol*. 2006;63(3):390–6.
- Pittock SJ, Zekeridou A, Weinshenker BG. Hope for patients with neuromyelitis optica spectrum disorders — from mechanisms to trials. *Nat Rev Neurol* 2021 1712. 2021;17(12):759–73.
- 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;69(2):292–302.

- Popescu BFG, Lucchinetti CF. Pathology of Demyelinating Diseases. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2012;7:185–217.
- Popescu BFG, Pirko I, Lucchinetti CF. Pathology of multiple sclerosis: where do we stand? *Continuum (Minneap Minn)*. 2013;19(4):901–21.
- Prasad S, Chen J. What you need to know about AQP4, MOG, and NMOSD. *Semin Neurol*. 2019;39(6):718–31.
- Qin Y, Ji X, Jing J, Liu H, Wu H, Yang W. Size control over spherical silver nanoparticles by ascorbic acid reduction. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2010;372(1–3):172–6.
- Quan C, Yu H, Qiao J, Xiao B, Zhao G, Wu Z, et al. Impaired regulatory function and enhanced intrathecal activation of B cells in neuromyelitis optica: distinct from multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2013;19(3):289–98.
- Rai M, Ingle AP, Trzcińska-Wencel J, Wypij M, Bonde S, Yadav A, et al. Biogenic silver nanoparticles: What we know and what do we need to know? *Nanomaterials*. 2021;11(11):1–34.
- Ratelade J, Zhang H, Saadoun S, Bennett JL, Papadopoulos MC, Verkman AS. Neuromyelitis optica IgG and natural killer cells produce NMO lesions in mice without myelin loss. *Acta Neuropathol*. 2012;123(6):861–72.
- Ravindran A, Chandran P, Khan SS. Biofunctionalized silver nanoparticles: Advances and prospects. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2013;105:342–52.
- Reibold M, Paufler P, Levin AA, Kochmann W, Pätzke N, Meyer DC. Carbon nanotubes in an ancient Damascus sabre. *Nat* 2006 4447117. 2006;444(7117):286–286.
- Rivas L, Garcı J V. Growth of Silver Colloidal Particles Obtained by Citrate Reduction To Increase the Raman Enhancement Factor. *Langmuir*. 2001;(11):574–7.
- Rousseuw PJ. Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *J Comput Appl Math*. 1987;20(C):53–65.
- Ruiz-Gaviria R, Baracaldo I, Castañeda C, Ruiz-Patiño A, Acosta-Hernandez A, Rosselli D. Specificity and sensitivity of aquaporin 4 antibody detection tests in patients with

- neuromyelitis optica: A meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord*. 2015;4(4):345–9.
- Saadoun S, Papadopoulos MC. Role of membrane complement regulators in neuromyelitis optica. *Mult Scler*. 2015;21(13):1644–54.
- Saallah S, Lenggoro IW. Nanoparticles carrying biological molecules: Recent advances and applications. *KONA Powder Part J*. 2018;2018(35):89–111.
- Sabela M, Balme S, Bechelany M, Janot JM, Bisetty K. A Review of Gold and Silver Nanoparticle-Based Colorimetric Sensing Assays. *Adv Eng Mater*. 2017;19(12):1–24.
- Sagan SA, Cruz-Herranz A, Spencer CM, Ho PP, Steinman L, Green AJ, et al. Induction of paralysis and visual system injury in mice by T cells specific for neuromyelitis optica autoantigen aquaporin-4. *J Vis Exp*. 2017;2017(126):1–10.
- 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;82(6):474–81.
- Scheuer C, Boot E, Carse N, Clardy A, Gallagher J, Heck S, et al. Directed self-assembly of nanoparticles into macroscopic materials using antibody-antigen recognition. *Adv Mater*. 1999;11:449–52.
- Sellner J, Hemmer B, Mühlau M. The clinical spectrum and immunobiology of parainfectious neuromyelitis optica (Devic) syndromes. *J Autoimmun*. 2010;34(4):371–9.
- Sepúlveda B, Angelomé PC, Lechuga LM, Liz-Marzán LM. LSPR-based nanobiosensors. *Nano Today*. 1 de junho de 2009;4(3):244–51.
- De Seze J, Stojkovic T, Ferriby D, Gauvrit JY, Montagne C, Mounier-Vehier F, et al. Devic's neuromyelitis optica: clinical, laboratory, MRI and outcome profile. *J Neurol Sci*. 2002;197(1–2):57–61.
- Shankaran DR, Gobi KV, Miura N. Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. *Sensors Actuators B Chem*. 2007;121(1):158–77.

- Shanmuganathan R, Karuppusamy I, Saravanan M, Muthukumar H, Ponnuchamy K, Ramkumar VS, et al. Synthesis of Silver Nanoparticles and their Biomedical Applications - A Comprehensive Review. *Curr Pharm Des.* 2019;25(24):2650–60.
- Sherly Arputha Kiruba V, Dakshinamurthy A, Subramanian PS, Mosae Selvakumar P. Green synthesis of biocidal silver-activated charcoal nanocomposite for disinfecting water. *J Exp Nanosci.* 2015;10(7):532–44.
- Singh R, Mehra R, Walia A, Gupta S, Chawla P, Kumar H, et al. Colorimetric sensing approaches based on silver nanoparticles aggregation for determination of toxic metal ions in water sample: a review. *Int J Environ Anal Chem.* 2021;
- Sinmaz N, Nguyen T, Tea F, Dale RC, Brilot F. Mapping autoantigen epitopes: Molecular insights into autoantibody-associated disorders of the nervous system. *J Neuroinflammation.* 2016;13(219):1–23.
- Smith CH, Waubant E, Langer-Gould A. Absence of neuromyelitis optica IgG antibody in an active relapsing-remitting multiple sclerosis population. *J Neuroophthalmol.* 2009;29(2):104–6.
- Solenov E, Watanabe H, Manley GT, Verkman AS. Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;286(2):426–32.
- Sousa CRS, Holanda AL de, Nunes ABA, Alves GSA, Sampaio MC. Nanotecnologia e nanociência: considerações históricas e interdisciplinar. *Hegemonia.* 2018;(25):150–8.
- Sperling RA, Parak WJ. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philos Trans R Soc London A Math Phys Eng Sci.* 2010;368(1915):1333–83.
- Sun Y, Xia Y. Gold and silver nanoparticles: A class of chromophores with colors tunable in the range from 400 to 750 nm. *Analyst.* 2003;128(6):686–91.
- Tahara M, Oeda T, Okada K, Kiriyama T, Ochi K, Maruyama H, et al. Safety and efficacy of rituximab in neuromyelitis optica spectrum disorders (RIN-1 study): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.*

2020;19(4):298–306.

Takahashi T, Fujihara K, Nakashima I, Misu T, Miyazawa I, Nakamura M, et al. Establishment of a new sensitive assay for anti-human aquaporin-4 antibody in neuromyelitis optica. *Tohoku J Exp Med.* 2006;210(4):307–13.

Tang L, Dong C, Ren J. Highly sensitive homogenous immunoassay of cancer biomarker using silver nanoparticles enhanced fluorescence correlation spectroscopy. *Talanta.* 2010;81(2010):1560–7.

Tedder TF. CD19: a promising B cell target for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2009;5(10):572–7.

Thanh NTK, Green LAW. Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. *Nano Today.* 2010;5(3):213–30.

Thiruppathi R, Mishra S, Ganapathy M, Padmanabhan P, Gulyás B, Thiruppathi R, et al. Nanoparticle Functionalization and Its Potentials for Molecular Imaging. *Adv Sci.* 2017;4(3):1600279.

Tian F, Clift MJD, Casey A, Del Pino P, Pelaz B, Conde J, et al. Investigating the role of shape on the biological impact of gold nanoparticles in vitro. *Nanomedicine (Lond).* 2015;10(17):2643–57.

Tice C, McDevitt J, Langford D. Astrocytes, HIV and the Glymphatic System: A Disease of Disrupted Waste Management? *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:521.

Traboulsee A, Greenberg BM, Bennett JL, Szczechowski L, Fox E, Shkrobot S, et al. Safety and efficacy of satralizumab monotherapy in neuromyelitis optica spectrum disorder: a randomised, double-blind, multicentre, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Neurol.* 2020;19(5):402–12.

Tradtrantip L, Asavapanumas N, Verkman AS. Emerging therapeutic targets for neuromyelitis optica spectrum disorder. *Expert Opin Ther Targets.* 2020;24(3):219–29.

Tradtrantip L, Duan T, Yeaman MR, Verkman AS. CD55 upregulation in astrocytes by statins as potential therapy for AQP4-IgG seropositive neuromyelitis optica. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1):1–13.

- Tripathy SK, Yu Y-T. Spectroscopic investigation of S-Ag interaction in omega-mercaptopundecanoic acid capped silver nanoparticles. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2009;72(4):841–4.
- Turkevich J. Colloidal gold. Part I. *Gold Bull* 1985 183. 1985;18(3):86–91.
- Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc.* 1951;11:55–75.
- Tzartos SJ, Kokla A, Walgrave SL, Conti-Tronconi BM. Localization of the main immunogenic region of human muscle acetylcholine receptor to residues 67-76 of the  $\alpha$  subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(9):2899–908.
- Vaknin-Dembinsky A, Brill L, Kassis I, Petrou P, Ovadia H, Ben-Hur T, et al. T-cell responses to distinct AQP4 peptides in patients with neuromyelitis optica (NMO). *Mult Scler Relat Disord.* 2016;6:28–36.
- Verheggen ICM, de Jong JJA, van Boxtel MPJ, Postma AA, Verhey FRJ, Jansen JFA, et al. Permeability of the windows of the brain: feasibility of dynamic contrast-enhanced MRI of the circumventricular organs. *Fluids Barriers CNS.* 2020;17(66):1–13.
- Verkman AS, Ratelade J, Rossi A, Zhang H, Tradtrantip L. Aquaporin-4: orthogonal array assembly, CNS functions, and role in neuromyelitis optica. *Acta Pharmacol Sin* 2011 326. 2011;32(6):702–10.
- Vilela D, González MC, Escarpa A. Sensing colorimetric approaches based on gold and silver nanoparticles aggregation: Chemical creativity behind the assay. A review. *Anal Chim Acta.* 2012;751:24–43.
- Vogel AL, Knier B, Lammens K, Kalluri SR, Kuhlmann T, Bennett JL, et al. Deletional tolerance prevents AQP4-directed autoimmunity in mice. *Eur J Immunol.* 2017;47(3):458–69.
- Wang H, Dai Y, Qiu W, Zhong X, Wu A, Wang Y, et al. HLA-DPB1 0501 is associated with susceptibility to anti-aquaporin-4 antibodies positive neuromyelitis optica in southern Han Chinese. *J Neuroimmunol.* 2011;233(1–2):181–4.
- Wasseff SK, Scherer SS. Cx32 and Cx47 mediate oligodendrocyte:astrocyte and

- oligodendrocyte:oligodendrocyte gap junction coupling. *Neurobiol Dis.* 2011;42(3):506–13.
- Waters P, Vincent A. Detection of anti-aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica: current status of the assays. *Int MS J.* 2008;15(3):99–106.
- Waters PJ, McKeon A, Leite MI, Rajasekharan S, Lennon VA, Villalobos A, et al. Serologic diagnosis of NMO: A multicenter comparison of aquaporin-4-IgG assays. *Neurology.* 2012;78(9):665–71.
- Waters PJ, Pittock SJ, Bennett JL, Jarius S, Weinshenker BG, Wingerchuk DM. Evaluation of aquaporin-4 antibody assays. Vol. 5, *Clinical and Experimental Neuroimmunology.* 2014. p. 290–303.
- Weinshenker BG, Wingerchuk DM, Vukusic S, Linbo L, Pittock SJ, Lucchinetti CF, et al. Neuromyelitis optica IgG predicts relapse after longitudinally extensive transverse myelitis. *Ann Neurol.* 2006;59(3):566–9.
- 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;85(2):177–89.
- Wingerchuk DM, Hogancamp WF, O'Brien PC, Weinshenker BG. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology.* 1999;53(5):1107–14.
- Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, Pittock SJ, Weinshenker BG. The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol.* 2007;6(9):805–15.
- Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology.* 2006;66(10):1485–9.
- Wingerchuk DM, Weinshenker BG. Neuromyelitis optica: clinical predictors of a relapsing course and survival. *Neurology.* 2003;60(5):848–53.
- Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P, Noell S, Mack AF. Structure and functions of aquaporin-4-based orthogonal arrays of particles. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2011;287:1–41.
- Yeo ELL, Chua AJS, Parthasarathy K, Yeo HY, Ng ML, Kah JCY. Understanding

aggregation-based assays: Nature of protein corona and number of epitopes on antigen matters. *RSC Adv.* 2015;5(20):14982–93.