



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

MIRELLA MONTEIRO SILVA

**BIOSENSOR PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA
FIBROSE CÍSTICA**

Recife
2018

MIRELLA MONTEIRO SILVA

BIOSSENSOR PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA FIBROSE CÍSTICA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
Co-orientadora: Dra. Natália Cybelle Lima Oliveira

**Recife
2018**

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Silva, Mirella Monteiro
Biossensor para diagnóstico molecular da fibrose cística / Mirella Monteiro Silva. –
2018.

52 f. : il.

Orientador: José Luiz de Lima Filho.

Coorientadora: Natália Cybelle Lima Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à
Saúde, Recife, 2018.

Inclui referências.

1. Fibrose cística – Diagnostico. 2. Doenças hereditárias. 3. Bioinformática. I. Lima Filho, José Luiz de (Orientador). II. Oliveira, Natália Cybelle Lima (Coorientadora). III. Título.

616.372

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 181

MIRELLA MONTEIRO SILVA

BIOSENSOR PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA FIBROSE CÍSTICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Área de concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Carlos Alves
Centro de pesquisas Aggeu Magalhães- CPqAM/FIOCRUZ/PE
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – UFPE

Prof. Dr. Gustavo Alves do Nascimento
Departamento de Bioquímica – UFPE *Campus* Caruaru

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
Departamento de Bioquímica - UFPE *Campus* Recife
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - UFPE

A meu avô, que apesar de nossa despedida na terra ter se dado a muito tempo, guardo todas as lembranças com muito carinho em meu coração.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pois a Ele devo tudo que tenho em minha vida.

A minha mãe Gracita e a meu esposo Filipe, por serem meu porto seguro e as únicas pessoas que conseguem me fazer manter a calma nos momentos de tempestade e me fazer acreditar que o amanhã será sempre um dia melhor. Graças a vocês, consigo ter forças para buscar alçar voos cada vez mais altos, pois sei que se eu cair vocês estarão lá para me motivar e me reerguer.

Ao meu filho, que apesar de ainda estar no meu ventre me fez conhecer o real sentido da palavra amor.

A minha irmã Vitória e meu irmão Cleydson, pelo incentivo que sempre me deram e que me faz ter forças para ir à busca dos meus objetivos.

A meus amigos Anderson, José Manoel e Carol por todos os ensinamentos, risadas e companheirismo. Tudo se torna mais fácil quando se tem vocês por perto.

Aos amigos do Grupo Biossensores, por todas as discussões, risadas entre um experimento e outro, por todos os conselhos e principalmente por todos os ensinamentos que a mim foi dado. Serei eternamente grata a cada um de vocês, cada um foi especial na minha construção acadêmica até aqui. Em especial a Natália, Carol, Marília, Giselda e Paulo vocês tornam os dias e as frustrações que acontecem nos experimentos ser muito mais leves.

Aos amigos do mestrado Aline, Anna, Geilza, Priscila, Luis, Toni e Wilson por todos os desesperos e risadas compartilhadas. Agradeço imensamente por ter entrado nesta turma, com certeza guardarei cada um de vocês no meu coração para sempre.

As minhas amigas da faculdade Ananda, Estéfani e Maria Clara vocês são muito importante para mim, obrigada pelo apoio e pelas palavras de conforto.

A Júlia e Castelletti, por toda a ajuda oferecida, principalmente na parte de bioinformática.

A todos os funcionários e pesquisadores que fazem parte do LIKA.

Ao meu orientador, professor José Luiz por ter aceitado me orientar em mais uma etapa da minha vida acadêmica. Sou extremamente grata pelas oportunidades que o senhor me deu.

A FACEPE, por ter fomentado a pesquisa realizada no meu mestrado.

Por fim, gostaria de agradecer a todas as pessoas que passaram durante esses dois anos em minha vida e que contribuíram para meu crescimento e meu amadurecimento.

“Pode se encontrar a felicidade mesmo nas horas mais
sombrias, se a pessoa se lembrar de acender a luz.”

J. K Rowling, 1999

RESUMO

A Fibrose Cística (FC) um distúrbio genético que afeta os sistemas respiratório, digestivo e reprodutivo, envolvendo a produção de muco, anormalmente espessos nos pulmões, que pode levar a infecções pulmonares fatais. A incidência da FC varia em todo o mundo. A causa fundamental da FC é a mutação em um único gene localizado no braço longo do cromossomo 7 (7q31.2), que codifica a proteína CFTR (regulador da condutância transmembranar). O subdiagnóstico continua a ser um desafio significativo. Como há uma falta de instalações de saúde e de especialistas multidisciplinares no tratamento da FC, tem se buscado dispositivos que promovam o diagnóstico precoce dessa doença. Sendo assim, os biossensores de DNA/RNA emergem como as tecnologias ideais para atender a esses propósitos. Apresenta-se, então, o desenvolvimento de um dispositivo eletroquímico para detectar microRNAs associados à FC. Primeiro, foi realizada uma busca por microRNAs na literatura e através de softwares de bioinformática, foi feita a correlação dos microRNAs 223 e 509 com a FC. A voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial foi utilizada para análise eletroquímica neste estudo. O microRNA 509 foi selecionado como o ideal para identificar especificamente a FC. Depois disso, a concentração ótima da sonda do microRNA foi determinada como sendo 15 μM . A detecção de limite do sistema foi estimada em 107.85 nM . O sistema também foi seletivo para detecção do microRNA 509. O uso de biossensores para diagnóstico a nível molecular pode contribuir para avanços futuros em uma detecção específica e efetiva da FC.

Palavras-chave: Fibrose Cística. Biossensores de DNA/RNA. MicroRNA. Bioinformática. Análises eletroquímicas.

ABSTRACT

Cystic Fibrosis (CF) is a genetic disorder that affects the respiratory, digestive and reproductive systems involving the production of abnormally thick mucus in the lungs and can lead to fatal lung infections. The incidence of CF varies throughout the world. The fundamental cause of CF is the mutation in a single gene located on the long arm of chromosome 7 (7q31.2), which encodes the CFTR (transmembrane CF conductance regulator) protein. Underdiagnosis remains as a significant challenge. As there is a lack of facilities and lack of multidisciplinary specialists in the treatment of CF, we have sought devices that promote the early diagnosis of this disease. Thus, DNA/RNA biosensors emerge as the ideal technologies to serve these purposes. Here, we report the development of an electrochemical device to detect microRNAs associated with CF. First, a search for microRNAs was carried out in the literature and through bioinformatics software, where it was possible to associate the relationship of microRNAs 223 and 509 with CF. Cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry were used for electrochemical analysis in this study. The 509 microRNA was selected as the ideal sequence to identify specifically CF. Thereafter, the optimum concentration of the probe was 15 μM . The limit of detection was about 107.85 nM . The system was also selective to detect only 509 microRNA. The use of diagnostic biosensors at the molecular level may contribute to future advances in specific and effective CF detection.

Keywords: Cystic Fibrosis. DNA/RNA biosensors. MicroRNA. Bioinformatics. Electrochemical analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Padrão da herança em pacientes com histórico familiar de FC	19
Figura 2 - Principais órgãos afetados em pacientes com FC	20
Figura 3 - Função dos canais CFTR e ENaC em células epiteliais normais e de pacientes com FC	21
Figura 4 - Classes dos defeitos no CFTR	21
Figura 5 - Distribuição dos pacientes em relação à idade ao diagnóstico	22
Figura 6 - Distribuição dos pacientes quanto ao Estado de nascimento	24
Figura 7 - Componentes dos biossensores	27
Figura 8 - I – Imobilização da sonda na superfície do eletrodo; II – Hibridização com sequência alvo	28
Figura 9 - Plataforma screen-printed desenvolvida pelo Grupo Biossensores-LIKA	30
Figura 10 - Diferentes estruturas do carbono	33
Figura 11 - Voltametria cíclica representando o comportamento do eletrodo modificado com L-Arginina (azul) e o eletrodo com L-arginina mais grafeno (vermelho)	41
Figura 12 - Histograma da variação das concentrações da sonda para imobilização. Leituras realizadas via DPV utilizando azul de metileno como indicador de redução em tampão TRIS-HCl pH 7,0	42
Figura 13 - Voltamograma mostrando o comportamento do eletrodo nu (a), eletrodo modificado com poli-L-arginina/grafeno (b), com poli-L-arginina/grafeno mais sonda (c), poli-L-arginina/grafeno mirando miNNA 509 (d) e poli-L-arginina/grafeno alvo não complementar (e).....	43
Figura 14 - Gráfico da inclinação da detecção limite obtida pelo biossensor. Condições voltamétricas: faixa de varredura potencial entre +0,5V e + 1,2V e taxa de varredura de 50mV/s. Todos os resultados aqui plotados foram a média de duplicados realizados de cada concentração	

alvo de miRNA 509	44
-------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - miRNA pré-selecionado e suas principais propriedades.	38 - 39
Tabela 2 - Propriedades estruturais dos miRNAs pré-selecionados obtidos pelo softwareCLC Main Workbench.	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CFTR	- Regulador da Condutância Transmembranar da Fibrose Cística
CFW	- Cystic Fibrosis Worldwide
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
DPN	- Diferença de Potencial Nasal
DPV	- Voltametria de Pulso Diferencial ENaC - Canal de Sódio Epitelial
ERB	- Elemento de Reconhecimento Biológico
FC	- Fibrose Cística
ITR	- Imunorreativo Tripsinogênio
miRNA	- microRNA
mRNA	- RNA mensageiro
NaCl	- Cloreto de Sódio
PNTN	- Programa Nacional de Avaliação Neonatal
REBRAFC	- Registro Brasileiro de Fibrose Cística
RNA	- Ácido Ribonucleico
TQIP	- Teste Quantitativo de Iontoforese por Pilocarpina
VC	- Voltametria Cíclica
WHO	- World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	16
1.2 OBJETIVOS	17
1.2.1 Objetivo Geral	17
1.2.1 Objetivos Específicos	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 FIBROSE CÍSTICA	18
2.1.1 Disfunção do CFTR	20
2.2 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA FC	22
2.3 BIOSSENSORES	26
2.3.1 Classificação dos Biossensores	27
2.3.2 Biossensores Eletroquímicos	29
2.3.3 Genossensores	30
2.3.4 Utilização de nanomateriais em biossensores eletroquímicos	31
2.4 BIOMARCADORES E miRNA	33
2.5 IMPORTÂNCIA DOS BIOSSENSORE NO DIAGNÓSTICO DA FC	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 MINERAÇÃO DE DADOS PARA OBTENÇÃO DE MIRNAS RELACIONADAS A FC	35
3.2 ANÁLISE E SELEÇÃO DOS BIOMARCADORES DE FC	35
3.3 REAGENTES	36
3.4 CONSTRUÇÃO DE ELETRODOS IMPRESSOS	36
3.5 MODIFICAÇÃO DOS ELETRODOS DE TRABALHO	36
3.6 IMOBILIZAÇÃO DA SONDA DE MIRNA	37
3.7 DETECÇÃO DO ALVO miRNA 509	37

3.8 ANÁLISES ELETROQUÍMICAS	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA E SELEÇÃO DE BIOMARCADORES	38
4.2 FORMATAÇÃO DA SELEÇÃO CONDUTORA	40
4.3 IMOBILIZAÇÃO E TESTE DE CONCENTRAÇÃO E SONDA DE miRNA	41
4.4 HIBRIDIZAÇÃO E DETECÇÃO DO RNA miRNA 509	42
5 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC) é uma doença autossômica recessiva rara. Estudos estimam entre 60.000 e 100.000 indivíduos acometidos pela FC, sendo a incidência variável entre etnias, tendo em torno de 1: 2.500 indivíduos nos descendentes de caucasianos. No Brasil, a incidência varia com a alta miscigenação tendo seus estudos concentrados a região Sul, sem evidenciar a realidade do país. Esta é uma desordem que compromete o sistema respiratório, digestivo e reprodutivo envolvendo a produção anormal de camadas espessas de muco. A causa fundamental da FC é a mutação em um único gene localizado no braço longo do cromossomo 7 (7q31.2), que codifica a proteína CFTR (regulador da condutância transmembranar da FC).

O genótipo deste gene não é determinante na modulação da gravidade, assim, indivíduos com mesmo genótipo apresentam manifestações clínicas distintas. O acometimento do trato respiratório associa-se com a maior morbidade e é causa de morte em mais de 90% dos pacientes. Desta forma, a ampla variabilidade na expressão clínica sugere que existam outros fatores, ambientais ou genéticos, modulando o fenótipo. Sendo assim, as tendências recentes na área de saúde e áreas afins consideram altamente importantes a detecção precisa e contínua de biomarcadores de doenças durante o tratamento médico.

Com este intuito, os miRNAs têm sido propostos como biomarcadores no prognóstico e risco de diversas doenças. Os miRNAs são um grupo de pequenos RNAs, não codificadores de proteínas, com aproximadamente 19-25 nucleotídeos de extensão. Diferindo da ampla gama de RNAs codificados pelo genoma humano, essa variedade de RNA tem se destacado por sua singular habilidade de modular uma enorme e complexa rede regulatória da expressão dos genes. Recentemente, tem sido observado o papel dos miRNAs associados a gravidade e aos sintomas da FC.

O sistema de escolha foi o genossensor eletroquímico, que tem as propriedades necessárias para produzir uma plataforma diagnóstica eficaz. O conceito da utilização de biomarcadores no desenvolvimento de sensores para diagnóstico fará com que esses dispositivos sejam altamente sensíveis e mais aplicáveis, promovendo a detecção específica e precoce de doenças, o que possibilita um tratamento mais eficaz para os pacientes acometidos.

1.1 JUSTIFICATIVA

A FC é uma doença que ainda apresenta grande dificuldade no seu diagnóstico, isso se dá devido às técnicas utilizadas e a falta de profissionais especializados. O diagnóstico precoce é

de suma importância para um tratamento eficaz. O uso de biossensores, sobretudo os genossensores, se constitui em uma das principais alternativas às técnicas de rotinas, pois se trata de um método rápido, de fácil manuseio, não necessita de mão de obra especializada, eficaz e de baixo custo, o que torna possível sua adoção pelo sistema de saúde. A construção de um biossensor para fins diagnósticos a nível molecular pode contribuir para os avanços futuros em um diagnóstico tipo-específico da FC.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

- Desenvolver um biossensor para diagnóstico molecular de microRNA associado à Fibrose Cística.

1.2.2 Objetivos Específicos

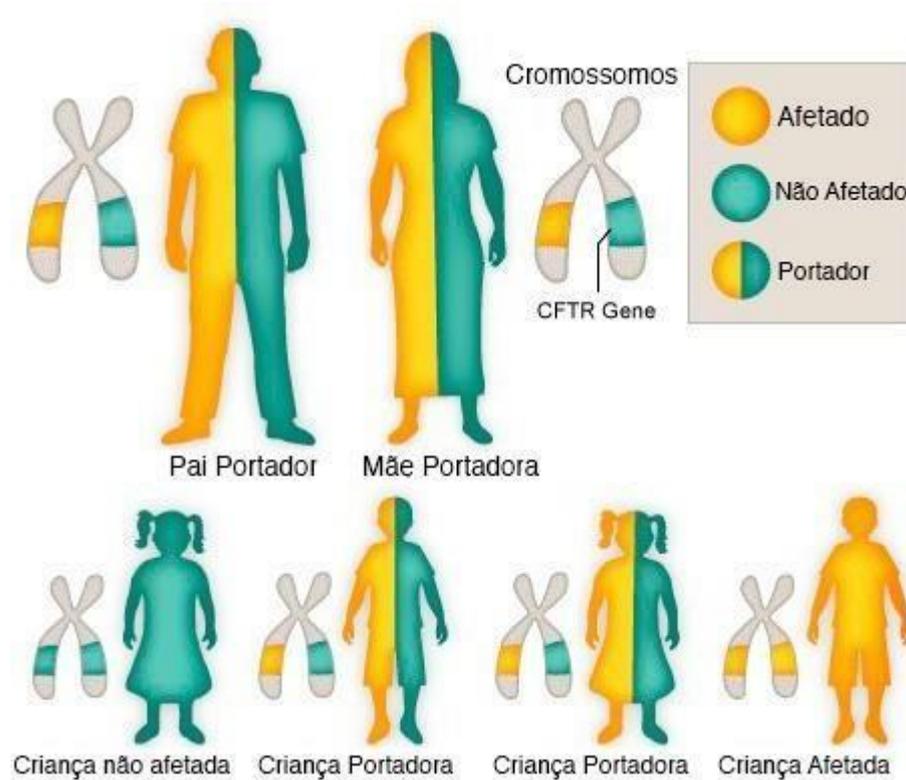
- Selecionar, por análises *in silico*, microRNAs específicos para diagnóstico da Fibrose Cística;
- Construir eletrodos impressos de carbono e prata;
- Construir um sistema eletroquímico modificado por compósitos condutores;
- Desenvolver método otimizado de imobilização de microRNAs sobre o compósito condutor utilizado;
- Realizar testes de interação com o alvo selecionado e otimizar este processo;
- Avaliar a estabilidade do biossensor frente aos principais
- parâmetros físico-químicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FIBROSE CÍSTICA

Os achados clínicos, bioquímicos e fisiológicos em mucoviscidosis (fibrose cística) foram obtidos muito antes da descoberta da doença que o gene Regulador da Condutância Transmembranar da Fibrose Cística (CFTR) causava em 1989. Em 1936, os pediatras suíços Fanconi e seus colegas descreveram a "síndrome celíaca", com fibrose congênita do pâncreas e bronquiectasias pulmonares. Isto foi seguido por uma descrição mais precisa da doença, gerando o termo fibrose cística (KUNZELMANN, 2017). Estima-se que haja entre 70.000 e 100.000 pessoas com FC em todo o mundo, mas é difícil indicar um valor preciso (CFW, 2018). O tratamento ideal envolve uma equipe multidisciplinar, no entanto, embora tenham sido realizados progressos, muitas vezes, falta o fornecimento de instalações e faltam especialistas de representação multidisciplinar no tratamento da FC. Como tal, existe uma necessidade urgente de maior conscientização e treinamento especializado para profissionais de saúde em disciplinas pediátricas e adultas (SILVA-FILHO et al. 2016). Logo após a FC ser reconhecida e caracterizada, os clínicos que cuidam de pacientes com FC observaram que a doença ocorreu em famílias com um padrão de herança recessiva autossômica (SOSNAY et al. 2016). Um indivíduo para ser acometido pela Fibrose Cística deve herdar dois genes defeituosos, um do pai e outro da mãe. Cada vez que duas pessoas portadoras da FC concebem um filho, há uma chance de 25 por cento deste filho apresentar a Fibrose Cística; uma chance de 50% de que a criança seja portadora do gene da fibrose cística sem apresentar manifestações da doença; e uma chance de 25% de que a criança não seja portadora, como pode ser observado na Figura 1 (WHO, 2018). O estudo da FC foi um teste importante para as ferramentas moleculares usadas entender como DNA e genes são responsáveis por traços hereditários (SOSNAY et al. 2016).

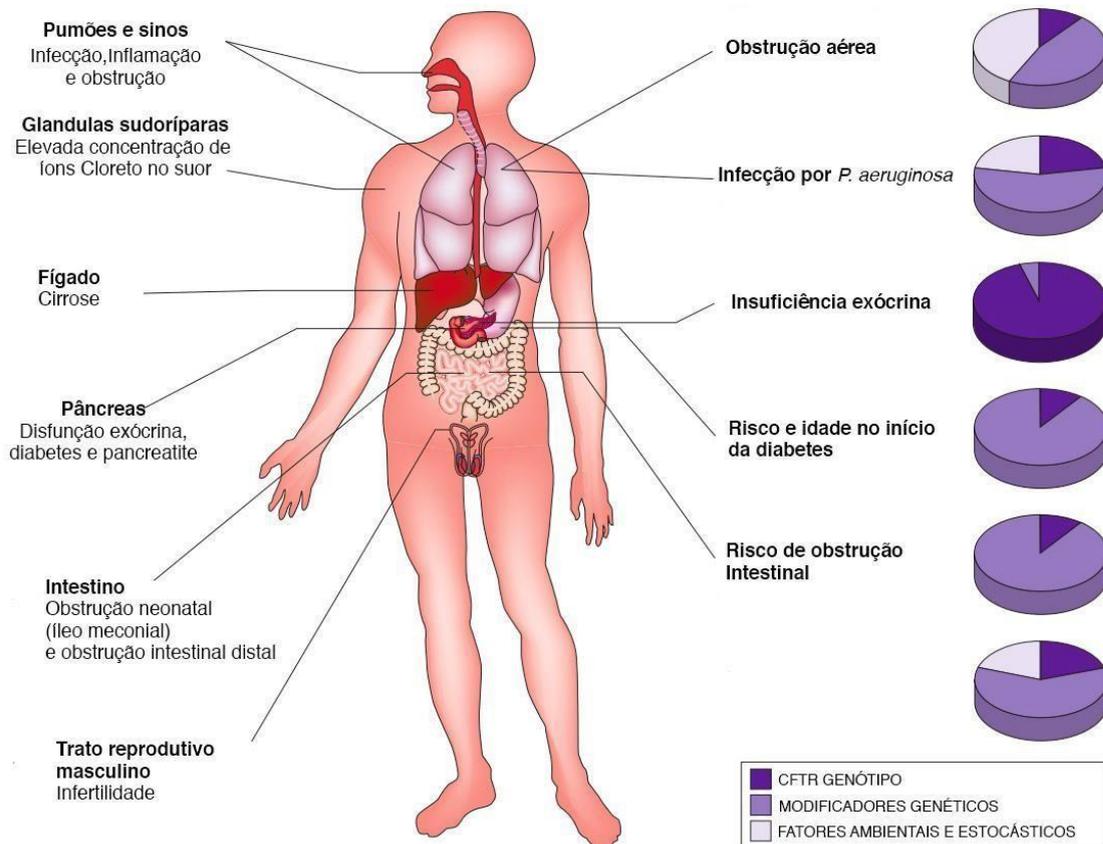
Figura 1. Padrão da herança em pacientes com histórico familiar de FC.



Fonte: CFTR.INFO (2018).

A FC é uma doença complexa caracterizada por doenças pancreática, gastrointestinal, envolvimento hepatobiliar e pulmonar crônica (Figura 2). Trata-se de uma doença de característica progressiva e potencialmente letal, ainda pouco conhecida em nosso país, apesar da existência de alguns centros e profissionais dedicados a estudá-la e cuidar dos pacientes há muitos anos (REBRAFC, 2016). A fibrose cística resulta de mutações localizadas no gene CFTR que contém 27 éxons, com um tamanho aproximado de 250 kb e localização 7q31.2, que codifica uma proteína conhecida como CFTR (Regulador da Condutância Transmembranar da Fibrose Cística) (PARANJAPE et al. 2017; CANT et al. 2014).

Figura 2. Principais órgãos afetados em pacientes com FC.



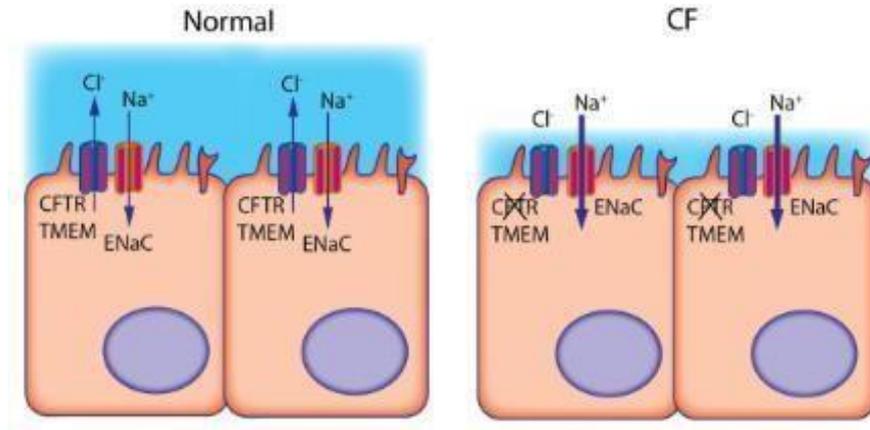
Fonte: Adaptado de Cutting (2014).

2.1.1 Disfunção no CFTR

A proteína CFTR é uma glicoproteína que atua como regulador de cAMP do canal de cloreto (Cl^-). Vários estudos relataram um relacionamento entre CFTR e ENaC (Canal de Sódio Epitelial) ambos localizados na membrana apical das células epiteliais em diferentes órgãos. A alteração nesta proteína provoca uma diminuição na função do canal de cloreto CFTR e uma consequente falta de homeostasia iônica e de água nas superfícies epiteliais (MATTEIS et al. 2015; MARSON, 2011; CONESE et al. 2011). A mutação do CFTR restringe a absorção de sal através da ENaC na glândula sudorípara, enquanto que nas condições fisiológicas, Na^+ e Cl^- são absorvidas pelo epitélio do ducto. A falta de CFTR bloqueia a absorção transcelular de Cl^- e, portanto, a absorção de Na^+ , que também é inibida devido à necessidade de eletroneutralidade dentro da célula (Figura 3). Como resultado, uma concentração elevada de NaCl no suor é uma evidência diagnóstica efetiva da doença (MATTEIS et al. 2015). Embora o CFTR seja amplamente expresso em dutos e tubos de revestimento epitelial em todo o corpo, a disfunção CFTR nos pulmões é a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com FC

(CONESI et al. 2011).

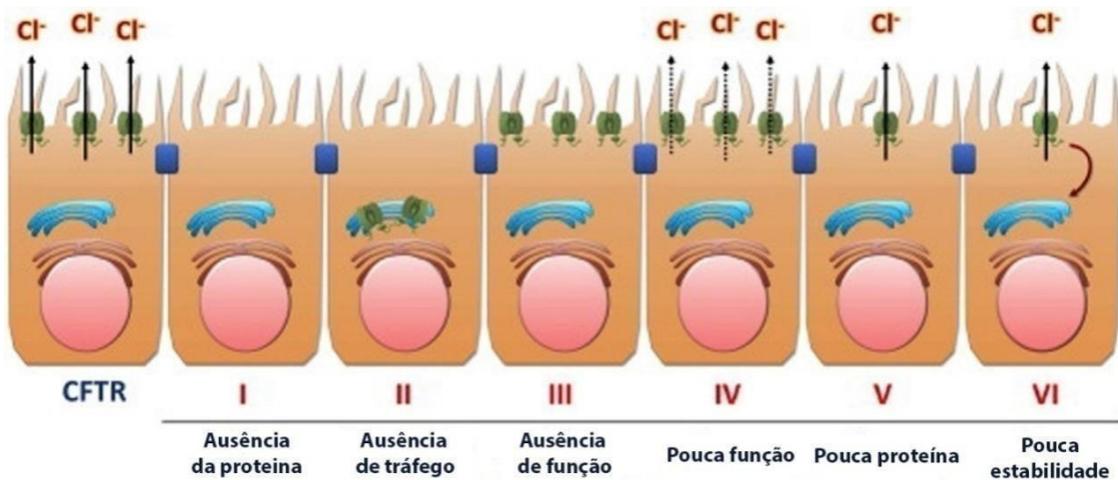
Figura 3. Função dos canais CFTR e ENaC em células epiteliais normais e de pacientes com FC.



Fonte: Adaptado de cfrstructure.org (2018).

Até a data, mais de 2000 mutações CFTR foram identificadas e a maioria é extremamente rara; a maior mutação F508del representa aproximadamente 70% de todos os alelos CF. São categorizadas em seis classes distintas que reportam anormalidades de síntese, estrutura e função de proteínas (Figura 4) (PARANJAPÉ et al. 2017; NAGY-JR et al. 2016; FURGERI et al. 2018; SHEN et al. 2016). Portanto, a identificação precisa das mutações do CFTR contribui grandemente para a prevenção, o diagnóstico e até mesmo o tratamento (terapia ou terapia genética específica da mutação) da doença (SHEN et al. 2016).

Figura 4. Classes dos defeitos no CFTR.



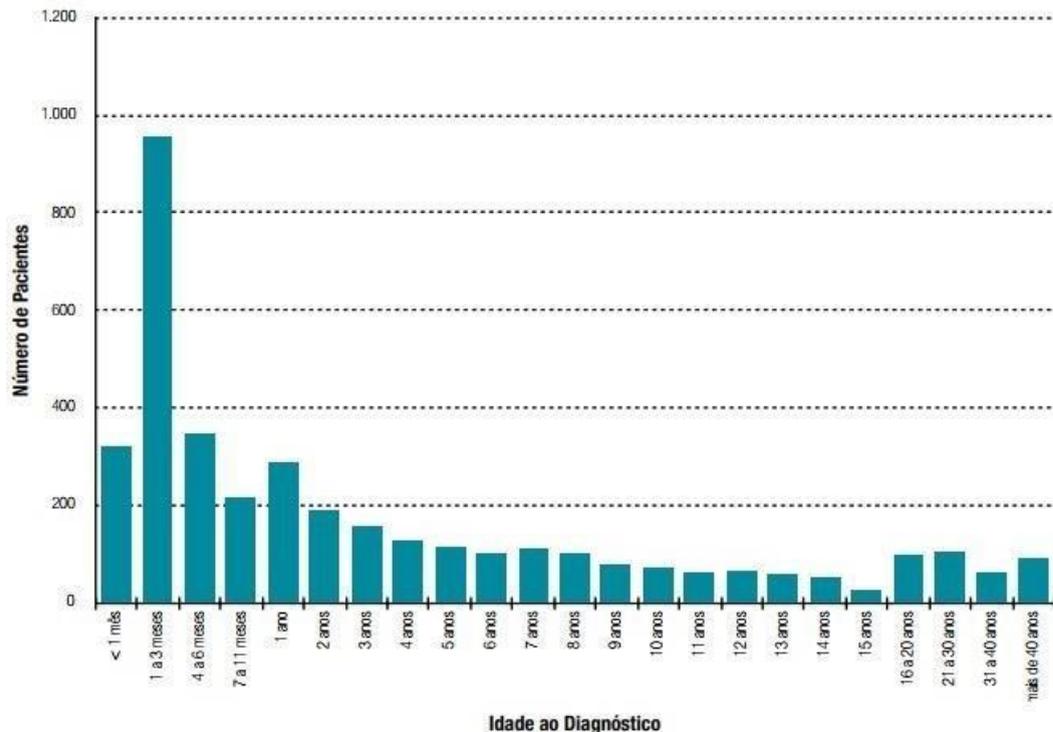
Fonte: Adaptado de Sosnay (2016).

2.2 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA FC

A incidência da FC varia em todo o mundo e evidências indicam que a prevalência da FC é rara. O subdiagnóstico continua a ser um desafio significativo, apesar das melhorias nos últimos anos, destacando a necessidade de uma compreensão mais ampla e maior consciência da doença (HUPES, 2015; SILVA-FILHO et al. 2016).

A maioria dos países com pacientes com FC não tem registros ou dados de instalações de saúde e milhares de pacientes com FC são tratados por sintomas sem nunca terem sido diagnosticados. Nos EUA e no Reino Unido, a expectativa de vida média é de 35 a 40 anos. Em países como El Salvador, Índia e Bulgária, a expectativa de vida cai para abaixo de 15 anos (CFW, 2018). A sobrevivência dos pacientes depende da confirmação e do diagnóstico precoce e iniciação do tratamento nos estágios iniciais da doença. Na Figura 5, temos a distribuição do número de pacientes em relação à idade do diagnóstico no último relatório do Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC) em 2015.

Figura 5. Distribuição dos pacientes em relação à idade ao diagnóstico.



Fonte: REBRAFC (2015).

A identificação é obtida pela presença de sinais ou sintomas, histórico familiar, imunorreativo tripsinogênio alterada (ITR) na triagem neonatal e confirmada por teste de suor positivo em

duas medições separadas, presença de duas mutações de FC ou teste de diferença de potencial nasal (DPN) alterado. O último teste requer habilidades consideráveis e raramente é usado no Brasil (MUNCK et al, 2015; DOMINGOS et al. 2015).

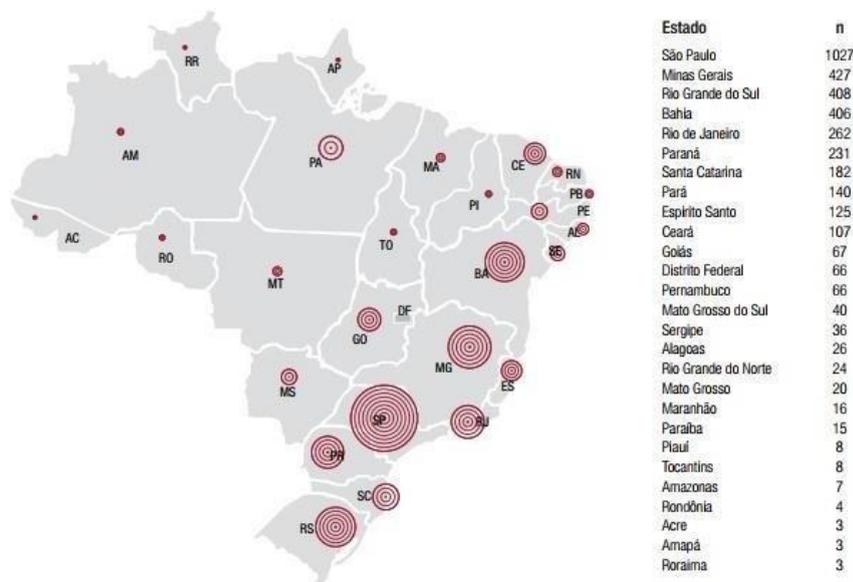
No Brasil, o exame de detecção da FC foi introduzido no Programa Nacional de Avaliação Neonatal (PNTN) em 2001 com o teste de ITR realizado em sangue coletado de recém-nascidos e teste de suor (MUNCK et al, 2015; DOMINGOS et al. 2015). O teste do pezinho na rede pública de saúde foi incluído nas ações do PNTN, sendo gratuito e obrigatório para bebês entre o terceiro e sétimo dia de vida. O teste é baseado na dosagem da tripsina imunorreativa percussor de enzimas pancreáticas, onde sua concentração costuma estar persistentemente elevada no sangue de recém-nascidos com FC graças à fibrose do pâncreas apresentada já no período uterino, acarretando refluxo das enzimas para a circulação (PIZZIGNACCO et al. 2011). Apesar de ter melhorado o diagnóstico este teste do ITR possui falhas, apresentando uma taxa de 20% de falsos negativos. Além desta problemática o ITR só pode ser feito em crianças nas primeiras semanas de vida, após isso seus níveis declinam (MUNCK et al, 2015). O teste do suor é utilizado como segundo teste, para confirmação, porém devido a falhas na coleta e na quantidade da amostra, o teste do suor também apresenta elevado número de falsos negativos (DOMINGOS et al, 2015). Em 1959, Gibson e Cooke desenvolveram a medida da concentração de cloreto do suor pelo teste quantitativo de iontoforese por pilocarpina (TQIP). Desde então, a medida do cloreto de suor pelo TQIP tem sido considerada o método padrão-ouro para diagnosticar a FC. Apesar disto, a implementação do teste do suor apresenta muitas dificuldades (MATTAR et al. 2014). É dividido em três estágios: estimulação, coleta e medição de eletrólitos. Durante a fase de estimulação pode ocorrer: baixa quantidade de produção de suor, dificuldades para imobilizar crianças, estresse, queimaduras, dor, urticária, vermelhidão e irritação da pele, quando a densidade de corrente é aplicada acima de 0,5 mA / cm. Choque elétrico e lesões na pele podem ocorrer quando o eletrodo metálico está em contato direto com a pele, em caso de uso indevido. Na fase de coleta pode ocorrer: contaminação, evaporação da amostra e tempo inadequado na produção de suor (GOMEZ et al. 2014). Durante a dosagem o procedimento é vulnerável a erros se não for realizado por profissionais experientes que são especificamente treinados em coleta e análise de suor. A FC é frequentemente subdiagnosticada e/ou diagnosticada tardiamente no Brasil, em parte devido à complexidade do teste do suor e a escassez de profissionais treinados para conduzir adequadamente o TQIP (MATTAR et al. 2014; GOMEZ et al. 2014).

O teste DPN envolve medir a diferença de potencial bioelétrico transepitelial em várias

regiões do epitélio nasal, o valor de referência para DPN é baseado nos valores obtidos entre pacientes com e sem fibrose cística (OOI et al., 2014). Os testes genéticos são importantes ferramentas para o diagnóstico preciso de doenças, além de auxiliarem na tomada de decisão quanto a terapia que será abordada em cada paciente e diminuir a quantidade de casos inconclusivos (DIANA et al. 2016; LIM et al. 2015).

A população com FC mundial tem crescido significativamente. O diagnóstico tem aumentado tanto por reconhecimento de manifestações clínicas compatíveis ou por história familiar positiva, como pelo rastreamento neonatal, já disponível no Brasil (Figura 6). Porém, esta doença ainda precisa ser mais bem divulgada e diagnosticada em alguns locais onde tem sido subdiagnosticada, principalmente nos países em desenvolvimento. Quanto mais cedo o paciente tem acesso ao tratamento e acompanhamento em centros especializados, tende a ter uma sobrevida melhor e maior é a chance de se promover qualidade de vida. Com a proporção de adultos portadores de FC crescendo progressivamente, novas demandas vêm surgindo para os serviços de saúde. Nessa faixa etária, complicações são mais comuns e outras questões precisam ser abordadas, como saúde reprodutiva, planejamento familiar e transplante de órgãos. Diferentes estudos buscam a definição de indicadores prognósticos que ajudem no manejo destes pacientes, mas isto é um grande desafio dado a grande possibilidade de viés metodológico por se tratar de doença sistêmica, com ampla gama de manifestações e influenciada por diferentes fatores ambientais (FIRMIDA et al. 2011).

Figura 6. Distribuição dos pacientes quanto ao Estado de nascimento.



Fonte: REBRAFC (2015).

Atualmente, com o entendimento da fisiopatologia da doença e o advento de modalidades

terapêuticas novas (como reposição de enzimas digestivas, fisioterapia respiratória, antibioticoterapia e a possibilidade de transplante pulmonar) têm possibilitado a redução da morbidade e aumento da sobrevida dos pacientes com FC. Planos de tratamento ajudam os pacientes com FC a manter sua saúde, apesar de todo plano ser único normalmente incluem visitas trimestrais ao seu centro especializado, além de técnicas de limpeza aérea, medicações orais, nebulização e inalação; terapias nutricionais e exercícios regulares (MACKENZIE et al. 2014). Pessoas com FC normalmente começam a terapia de limpeza aérea logo depois de serem diagnosticados e continuam praticando por toda sua vida. Enquanto essas técnicas de limpeza aérea podem diferir na necessidade de assistência ou equipamento, mas todos têm a mesma função de remover as secreções dos pulmões. A decisão de qual técnica usar é influenciada pela idade, preferência do paciente e custo (WILSON et al. 2014).

A má absorção é predominantemente ocasionada pela disfunção pré-epitelial e decorre da rejeição de nutrientes não hidrolisados no lúmen pela insuficiente secreção pancreática. Frequentemente nos fibrocísticos, o pâncreas não produz enzimas suficientes para a completa digestão dos alimentos ingeridos, e uma das primeiras manifestações é a má-absorção de nutrientes. As proteínas requeridas para o crescimento e reparo de tecidos do corpo não são totalmente utilizadas. A gordura, o nutriente mais energético não é absorvido; assim, o crescimento é atrasado e as deficiências de vitaminas lipossolúveis podem ocorrer. A educação alimentar destinada a pacientes com fibrose cística e familiares, envolvendo informação nutricional, uso correto de enzimas, recomendações reforçadas de uma alimentação adequada e uso de suplementos hiperenergéticos, quando indicado, pode assegurar que os pacientes recebam um ótimo tratamento nutricional e uma melhora na qualidade de vida (ROSA et al., 2008). Estudos documentam a melhora do condicionamento físico, aumento da força muscular ventilatória e a melhora da resposta ao tratamento do fibrocístico com o exercício físico, além da qualidade de vida, no entanto, os dados a respeito do aumento da sobrevida permanecem sem maiores esclarecimentos (HAACK e NOVAES, 2013). No tratamento da fibrose cística, vários medicamentos (antibióticos, anti-inflamatórios, broncodilatadores, mucolíticos) ou procedimentos (fisioterapia respiratória, oxigenioterapia, transplante de pulmão, reposição de enzimas digestórias, suporte nutricional, suporte psicológico e social, terapia gênica) podem ser necessários, incluindo uma equipe multidisciplinar de profissionais. Além do tratamento medicamentoso e de outros procedimentos clínicos, o cuidado da família é essencial, e já mostrou trazer benefícios para os pacientes, também é importante que estejam sempre bem informados sobre a doença (BRENNAN e SCHRIJVER, 2016; ROSA et al. 2008).

2.3 BIOSSENSORES

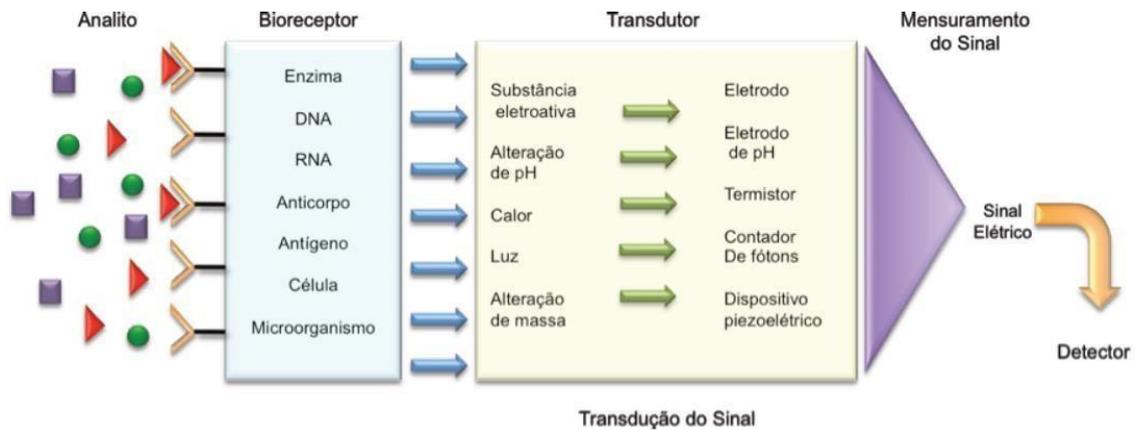
A medicina personalizada requer o desenvolvimento de novos e mais rápidos, detectores para o reconhecimento de biomarcadores, cumprindo a necessidade de ferramentas de “point-of-care” do diagnóstico médico, eliminando a demanda de tempo entre visita médica, requisição e realização dos exames, retorno ao médico e só então início do tratamento (IANESELLI, 2013; MOREIRA et al., 2013). Com este intuito, os biossensores têm sido desenvolvidos e a pesquisa neste campo vem tornando-se cada vez mais popular, ocupando um papel importante na área das ciências analíticas (KISSINGER, 2005). Um biossensor é um dispositivo analítico capaz de realizar análises químicas ou biológicas, sem pré-processamento de amostra (SILVA et al. 2018).

O termo biossensor possui diferentes definições, dependendo do campo ao qual ele é aplicado. Por exemplo, para um biólogo, um biossensor é “um dispositivo que traduz uma variável biológica, como potenciais elétricos, movimentos ou concentrações químicas em sinais elétricos”. Para um químico, uma definição mais adequada seria “um dispositivo que se utiliza de reações biológicas mediadas por enzimas isoladas, imunossistemas, tecidos, organelas ou células para detectar componentes químicos, geralmente por sinais elétricos, térmicos ou óticos”. Um físico ainda poderia definir um biossensor como “um dispositivo que detecta, registra e transmite uma informação, por meio de uma considerada mudança fisiológica ou ocorrência de um processo” (IUPAC, 1992; MARKS et al., 2008). Entretanto, de uma maneira geral, os biossensores são definidos como ferramentas analíticas que combinam biomoléculas imobilizadas (ácidos nucleicos, anticorpos, células, entre outros) a um transdutor para criar uma superfície que permita a medição qualitativa e/ou quantitativa de um analito específico (GARAY et al., 2015; FENG, DAI e WANG, 2014; BELLUZO et al., 2008).

A tecnologia dos biossensores oferece a possibilidade de uma avaliação rápida, sensível e seletiva de diversos analitos, geralmente podem ser distribuídas em uma ampla variedade tanto clínica, como ambiental e de alimentos (GARAY et al., 2015; YANG et al., 2015). Estes dispositivos bioanalíticos possibilitam a detecção quantitativa e/ou qualitativa do analito e é composto por: (I) um bioreceptor, ou seja, uma molécula biológica com função de reconhecimento, podendo ser DNA, RNA, aptâmeros, enzimas, anticorpos, entre outros; (II) um transdutor, onde serão imobilizados os bioreceptores, tendo função de converter o sinal proveniente do evento de reconhecimento biológico em um sinal mensurável; e a última parte (III) constitui-se de um detector, microprocessador onde os sinais oriundos do transdutor serão

amplificados e analisados através de softwares especializados (Figura 7) (FENG et al. 2014; CAYGILL, BLAIR e MILLNER, 2010).

Figura 7: Componentes dos biossensores.



Fonte: Adaptado de Yokoyama (2011).

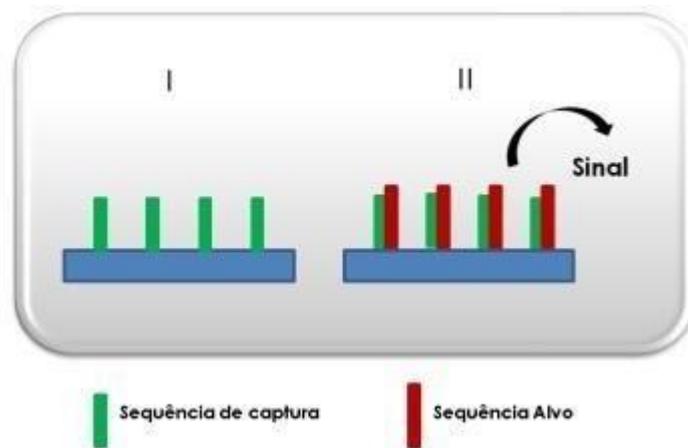
2.3.1 Classificação dos Biossensores

Os biossensores podem, então, ser classificados de acordo com o bioreceptor imobilizado e com o tipo de transdutor utilizado. De acordo com o tipo de elemento de reconhecimento biológico imobilizado podem ser classificados em: enzimáticos, microbiológicos, imunossensores, genossensores, entre outros. A classificação baseada no transdutor utilizado diz respeito ao tipo de sinal gerado após o evento de reconhecimento biológico (SILVA et al. 2018).

Com relação ao bioreceptor os biossensores podem ser de diversos tipos. O biossensor enzimático é um dispositivo que combina a sensibilidade e a seletividade de uma enzima com um transdutor. O princípio deste biossensor está baseado na catálise do substrato. Já o imunossensor é um tipo de biossensor baseado numa reação imunológica específica, onde o antígeno ou anticorpo é imobilizado na superfície do transdutor. Com relação ao microbiológico é um dispositivo que combina uma célula microbiológica imobilizada. A vantagem do uso de células microbiológicas como biocatalisadores reside, principalmente, no fato de que as mesmas têm a capacidade de se adaptarem a condições adversas sem perderem a sensibilidade ao contrário do que ocorre com as enzimas (LABUDA et al. 2010; ROLIM, 2013). O genossensor é um dispositivo que utiliza uma sonda de ácido nucléico (DNA ou RNA) imobilizada como elemento de reconhecimento. Os genossensores são dispositivos analíticos avançados que

exibem a promessa de diagnóstico com elevada especificidade e sensibilidade, são de baixo custo e podem ser utilizados para detecção precoce de diversas patologias (CAMPOS-FERREIRA et al. 2013; ROLIM, 2013; NASCIMENTO et al. 2012). O conceito de genossensores pode revolucionar os estudos genéticos e os diagnósticos biomoleculares, tornando-os mais acessíveis, mais específicos e com detecção quase instantânea. Biossensores de ácidos nucleicos foram desenvolvidos para detectar um alvo específico de DNA ou RNA, por hibridização com sondas complementares (Figura 8) (HUANG et al. 2015; ROLIM, 2013).

Figura 8: I – Imobilização da sonda na superfície do eletrodo; II – Hibridização com sequência alvo.



Fonte: Adaptado de Rollim (2013).

De acordo com o tipo de transdutor utilizado, os biossensores podem ser classificados em ópticos, térmicos, piezoelétricos, eletroquímicos, entre outros (ROLIM, 2013; CAYGILL, BLAIR e MILLNER, 2010). Uma parte essencial de um biossensor é o transdutor, cuja função é o de transformar a velocidade da reação bioquímica que ocorre durante o reconhecimento biológico para uma resposta mensurável (ROLIM, 2013; ARCOS- MARTÍNEZ et al. 2010; LABUDA et al. 2010).

Os biossensores ópticos avaliam absorção de luz, fluorescência, luminescência, refletância, índice de refração, e permitem análises em tempo real com alta sensibilidade (LONG, ZHU e SHI, 2013). Os biossensores térmicos, por sua vez, têm um transdutor que, uma vez que o analito interage com seu bioreceptor, ocorre um aquecimento ou variação da temperatura que é proporcional à quantidade de analito na amostra. Este tipo de transdutor não requer recalibração constante e tem aplicação em análise de alimentos, cosméticos e na indústria farmacêutica. Existem outros biossensores que detectam a massa sobre seu transdutor,

constituído de cristais piezoelétricos, como os de quartzo. Estes transdutores piezoelétricos se baseiam na propriedade dos materiais de vibrarem em frequências específicas quando estimulados por determinado sinal elétrico. A partir do evento de reconhecimento biológico ocorre aumento de massa sobre a superfície do transdutor, modificando a frequência de oscilação e viabilizando a detecção do analito (MONOSIK, STREDANSKY e STURDIK, 2012). Por fim, os biossensores eletroquímicos, utilizam eletrodos como transdutores. O princípio básico desta classe de biossensores é que a interação entre a biomolécula imobilizada e seu alvo (analito) produz ou consome íons ou elétrons, afetando as propriedades elétricas da solução, como a corrente ou potencial elétrico (CAYGILL, BLAIR e MILLNER, 2010; MONOSIK, STREDANSKY e STURDIK, 2012).

2.3.2 Biossensores Eletroquímicos

Os transdutores eletroquímicos são baseados no movimento de íons e na difusão de espécies eletroativas. Os biossensores que utilizam esses transdutores são mais utilizados quando comparado com outros transdutores, pois são estáveis, apresentam “screening” rápido, alta sensibilidade, possuem a grande vantagem de serem econômicos e a possibilidade de automação, permitindo sua aplicação em um grande número de amostras. São utilizados também em análises clínicas e testes de monitoramento (HUANG et al. 2015; ROLIM, 2013; ARCOS-MARTÍNEZ et al. 2010). Estas vantagens têm aumentado com o advento dos eletrodos impressos. Os eletrodos impressos evitam alguns dos problemas comuns de eletrodos sólidos clássicos, como efeitos de memória e processos de limpeza bastante dispendiosos. Além disso, a extensa gama de formas de modificação dos impressos abre um grande campo de aplicações para estes eletrodos. Essas modificações incluem, por exemplo, a imobilização de um componente biológico para o desenvolvimento seletivo, sensível e descartável de biossensores (APETREI e APETREI, 2015). Os componentes biológicos podem ser imobilizados sobre a superfície do eletrodo de trabalho através de adsorção, aprisionamento, microencapsulação, reticulação ou ligação covalente. A tecnologia impressosconsiste em deposições “layer-by-layer” (camada-a-camada) de tinta sobre um substrato sólido, através da utilização de uma tela ou de malha, que define a geometria do sensor (Figura 9) (APETREI e APETREI, 2015; ARCOS-MARTÍNEZ et al. 2010).

Figura 9: Plataforma *screen-printed* desenvolvida pelo grupo Biossensores-LIKA



Fonte: A autora

Procedimentos baseados nos biossensores impressos são mostrados como dispositivos práticos para a determinação rápida, de baixo custo e fácil de usar para muitas substâncias de interesse analítico (APETREI e APETREI, 2014; ARCOS-MARTÍNEZ et al. 2010). Este sistema é composto por eletrodos de trabalho, referência e auxiliar que permitem a imobilização do analito em estudo e a geração de sinais elétricos a partir de uma energia gerada por técnicas amperométricas, potenciométricas, voltamétricas, entre outras (PRIVETT et al. 2010).

2.3.3 Genossensores

O desenvolvimento de genossensores (também conhecidos como biossensores de DNA) tem aumentado consideravelmente ao longo dos últimos anos (SADIK et al. 2009). O interesse em adotar o DNA como bioreceptor vem do fato de que esta molécula é capaz de identificar e especificar sequências de ácidos nucleicos dos diferentes organismos vivos, o que eleva a eficiência dos diagnósticos a níveis moleculares (MANZANARES-PALENZUELA et al. 2015; LIU et al. 2012).

Os princípios dos genossensores baseiam-se na formação da dupla hélice do DNA. O DNA é composto por quatro unidades de nucleotídeos (adenina, guanina, citosina e timina) que se repetem ao longo da cadeia do DNA. Este, por sua vez, adquire a configuração de dupla hélice ao ligar-se à sua cadeia complementar, que são ligadas por meio de pontes de hidrogênio, evento conhecido como hibridização (MANZANARES-PALENZUELA et al. 2015; IUNI-IUI et al. 1997; KÖSER et al. 2012). A formação da cadeia dupla de DNA (dsDNA) ocorre porque as bases dos nucleotídeos irão refazer as pontes de hidrogênio existentes somente com suas bases

complementares específicas: adenina (A) pareia-se com timina (T) e citosina (C) pareia-se com a guanina (G), sendo que no caso do RNA, a uracila (U) substitui a timina e pareia-se com a adenina. A estabilidade dessa ligação depende da sequência de nucleotídeos em ambas as cadeias: uma combinação perfeita na sequência de nucleotídeos produz uma dsDNA altamente estável, enquanto que um mau-pareamento aumenta a instabilidade entre as cadeias, enfraquecendo a formação da dsDNA. Estes mesmos princípios são aplicáveis ao RNA, em que podem ocorrer hibridizações do tipo RNA-RNA e RNA-DNA (GUO et al. 2012; SANTIAGO-SIM et al. 2012; SCHNEIDER, 2012).

2.3.4 Utilização de nanomateriais em biossensores eletroquímicos

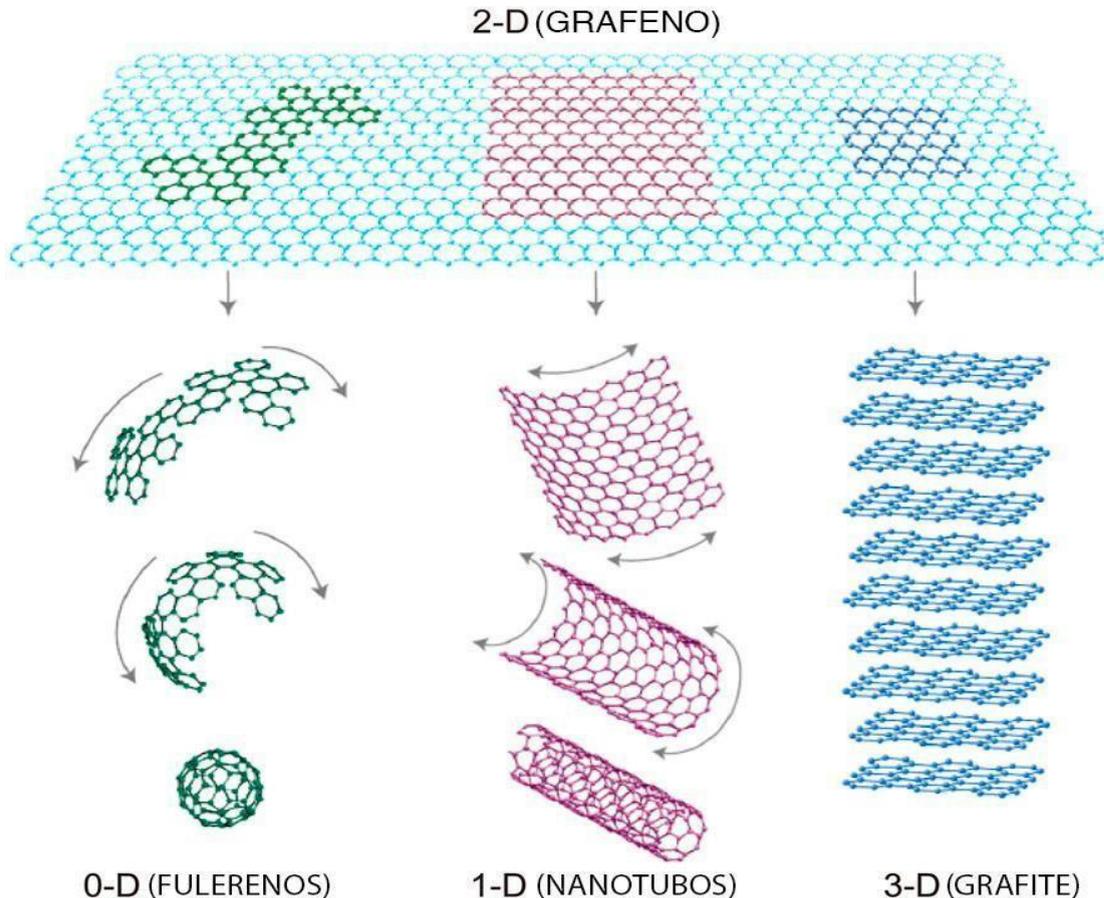
A utilização de nanomateriais em biossensores eletroquímicos recebeu considerável atenção pelos grupos de investigação nas últimas décadas. A possibilidade de analisar seletivamente amostras biológicas diretamente sem pré-tratamento fracionado, equipamento barato, simples manipulação e sistema de modelagem simples para calibração são as vantagens dos métodos eletroquímicos (SOLEYMANI et al, 2017; QURESHI, GURBUZ e NIAZI, 2012).

Os polímeros condutores são geralmente chamados de “metais sintéticos” por possuírem propriedades elétricas, magnéticas ou ópticas de metais e semicondutores. Estes possuem uma estrutura eletrônica única, que é responsável pela alta condutividade elétrica, baixo potencial de ionização e alta afinidade eletrônica (LI et al. 2012; FAEZ et al. 2000). A síntese destes polímeros condutores pode ser realizada tanto quimicamente quanto eletroquimicamente. De modo geral, a eletropolimerização é uma técnica mais versátil e aplicável a diversas situações devido às suas vantagens em termos de forte aderência à superfície do eletrodo, à estabilidade química da análise do filme, alta sensibilidade, seletividade e homogeneidade na deposição eletroquímica, custos reduzidos, realização a temperatura ambiente, é eficiente para eletrodos de áreas maiores, resulta no confinamento do polímero ao eletrodo e sua forma e propriedades podem ser controladas (SOLEYMANI et al, 2017; PENG et al., 2009).

Os polímeros condutores têm sido amplamente utilizados em sensores eletroquímicos e ensaios porque eles têm vários grupos funcionais que oferecem seletividade em relação ao analito alvo. Devido às excelentes propriedades eletrocatalíticas, a eletropolimerização de aminoácidos ganhou grande atenção no campo dos sensores / biossensores (HASANZADEH et al, 2017; TIG, 2017). Entre os diferentes monômeros, descobriram que a arginina pode sofrer uma reação de polimerização oxidativa em diversas condições e formar uma forte adesão ao

substrato em que é cultivada. O revestimento Poli-Arginina sobre a superfície de substratos é geralmente fino e oferece estrutura altamente robusta em uma ampla gama de pH. O potencial latente da Poli-Arginina, até agora foi implementado como uma plataforma de detecção eletroquímica para uma miríade de substâncias (SOLEYMANI et al, 2017). A poli-arginina foi utilizada para a modificação do eletrodo e aplicada para a determinação eletroquímica, devido à sua versatilidade e facilidade de preparação (ZHANG et al., 2012). Por outro lado, materiais compósitos que combinam grafeno e polímero (como poli-arginina) têm maior atenção devido à melhora no desempenho eletrocatalítico dos eletrodos (TIG, 2017; LI et al., 2012).

O carbono é um dos elementos mais abundantes da natureza; os átomos de carbono podem formar redes complicadas que são fundamentais para a química orgânica e a existência da vida. O carbono é um material único que pode existir em formas que variam de zero dimensional (0-D) a tridimensional (3-D) (Figura 10). O grafite e seus alótropos, como o grafeno, o óxido de grafeno (GO), os nanotubos de carbono (CNTs) e o óxido de grafeno reduzido (RGO), atraíram um grande interesse para uso em física quântica, nanoeletrônica, catálise, nanocompósitos e tecnologia de sensores por causa de sua estrutura e geometria únicas. Em comparação com outros alótropos de carbono, como os CNTs, o grafeno possui várias vantagens em várias aplicações, incluindo biossensores (incluindo DNA, anticorpos, sacarídeos, componentes inorgânicos, moléculas de fármacos e determinação de múltiplos componentes) e entrega de fármacos, devido à sua menor toxicidade e biocompatibilidade superior (ZHANG et al., 2017). Os materiais de grafeno têm sido extensivamente estudados na modificação de eletrodos devido às suas propriedades únicas, como grande área superficial, super condutividade, boa resistência mecânica, forte capacidade de adsorção e grande estabilidade química. Além disso, materiais à base de grafeno podem ser facilmente obtidos através de transformação química simples de grafite (YANG et al. 2015; LI et al. 2012; MA et al. 2012).

Figura 10. Diferentes estruturas do carbono.

Fonte: Adaptado de ZHANG et al. (2017).

2.4 BIOMARCADORES E miRNA

Muitos estudos buscam novos biomarcadores e estes possuem diversas aplicações, dentre estas associações estão os biossensores (TOTHILL, 2009). Visando a seleção de um biomarcador em potencial para a CF, elementos genéticos, como os microRNA (miRNA), que têm sido propostos como biomarcadores no prognóstico e risco de diversas doenças, podem apresentar uma boa opção (FARUQ e VECCHIONE, 2015).

Estudos revelam que pequenas moléculas de RNA, os microRNA (miRNA), são responsáveis por fazer o controle gênico de diversas funções celulares, e que uma perturbação na expressão de determinados miRNAs está intimamente ligado a doenças cardiovasculares, cânceres, diabetes, doenças neurodegenerativas, entre outras. Os miRNAs constituem uma classe recentemente descoberta de RNAs não-codificantes que desempenham um papel chave na regulação da expressão gênica. Atuando ao nível pós-transcricional, estas moléculas fascinantes podem aperfeiçoar a expressão de 30% de todos os genes codificantes de proteínas

de mamíferos. Estes miRNAs, são moléculas de RNA de cadeia simples, curtas de aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento (DELAY et al. 2013).

A regulação positiva (superexpressão) de miRNAs específicos poderiam levar à repressão da expressão do gene supressor de tumor, e por outro lado a regulação negativa da miRNAs específicos pode resultar num aumento da expressão do oncogene; ambas estas situações malignas induzir efeitos subsequentes sobre a proliferação celular, diferenciação e apoptose que levam a crescimento do tumor e progresso. A regulação gênica ocorre através da ligação específica do miRNA com a região 3' não traduzida (3' UTR) do RNA mensageiro (mRNA) de determinado gene, resultando em uma alteração na expressão gênica ou na degradação da proteína transcrita. Apenas um tipo de miRNA é capaz de se ligar e regular centenas de mRNA diferentes, portanto a expressão de um miRNA defeituoso pode estar envolvido no início de diversas doenças metabólicas. Os miRNAs recentemente têm sido propostos como biomarcadores no prognóstico e risco de doenças (LABIB e BEREZOVSKI, 2015; TOTHILL, 2009; DELAY, 2013). Nos últimos anos, o papel dos miRNA em associação à gravidade e aos sintomas da CF tem sido intensamente estudado (LABIB e BEREZOVSKI 2015; AHANDA, et al, 2015) e já existem tabelas de miRNA com sequências de moléculas que estão em desregulação quando há a doença ou quando há a mutação DeltaF508. Essa informação dá a base para a análise desses miRNA e seleção do melhor biomarcador para a CF.

2.5 IMPORTÂNCIA DOS BIOSSENSORES NO DIAGNÓSTICO DA FC

O diagnóstico precoce da FC previne a desnutrição grave e promove o crescimento em longo prazo de crianças afetadas. Sendo assim, o diagnóstico fornecido por dispositivos “point-of-care” irão facilitar a detecção precoce de doenças e possibilitará tratamentos mais efetivos (ZHANG et al. 2017).

De acordo com a *Cystic Fibrosis Foundation*, cerca de 70 mil pessoas no mundo vivem com Fibrose Cística. No Brasil, no Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC), contabiliza-se cerca de 3.000 pessoas com a doença, mas é possível que existam muito mais pacientes sem diagnóstico e tratamento adequados. Ainda não existe uma cura para a Fibrose Cística, mas os recentes avanços já permitem que os pacientes vivam por mais tempo e com muito mais qualidade. Para isso, o diagnóstico precoce e a adesão ao tratamento são fundamentais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MINERAÇÃO DE DADOS PARA OBTENÇÃO MIRNAS RELACIONADAS

A FC Para a execução desta etapa, foi realizada uma vasta revisão bibliográfica sobre miRNA relacionados à CF e miRNA desregulado durante a FC Utilizaram-se ferramentas de pesquisa em literatura e bibliotecas tradicionais, como GoogleScholar, ScienceDirect e PubMed. Para isso, foram utilizados termos como "miRNA", "Fibrose Cística",

"Desregulação" e "Biomarcadores".

Além disso, uma pesquisa de elementos genéticos relacionados à FC e miRNAs foi realizada através do banco de dados Thomson Reuters MetaCore (portal.genego.com), que tem pesquisas para biomoléculas, funções, vias metabólicas e interações já descritas, e suas informações são baseadas em artigos científicos. A busca por miRNA foi feita para a presença de fibrose cística e termos como "Network elements", "miRNA" e "Fibrose Cística" foram utilizados. Também realizamos uma pesquisa através de alvos de miRNA validados e previstos, como miRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>) e miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>).

3.2 ANÁLISE E SELEÇÃO DE BIOMARCADORES DE FC

Usando miRBase (<http://www.mirbase.org/>), um banco de dados específico de miRNA, analisamos as características do miRNA já encontradas como localização cromossômica e sequência de nucleotídeos. Outras propriedades como estrutura secundária, temperatura de anelamento, autoanelamento e conteúdo GC foram observadas através do software CLC Main Workbench 6.9.2. Também com o uso das ferramentas "Annealing" e "BLAST NCBI", foi realizado um estudo de complementaridade e hibridação do miRNA com o genoma humano e sequências de várias outras espécies de nucleotídeos, no NCBI (Centro Nacional de Informações em Biotecnologia). banco de dados, para a avaliação de sua especificidade e conservação.

A seleção de dois miRNAs como melhores biomarcadores de aplicabilidade baseou-se nesses dados e em outros critérios, como ter o gene CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) como alvo validado, sendo superexpressado na FC, que teve mais relatos na literatura e especificidade relacionados à FC.

3.3 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram de alta pureza. As sondas miRNA 509 foram adquiridas como um pó liofilizado da IDT Technologies, EUA. As soluções armazenadas e diluídas (25 nMole) foram preparadas com tampão fosfato 0,05 M (pH 7,4) e mantidas congeladas. Para as demais análises utilizou-se L-Arginina (SIGMA), Grafeno, Ferrocianeto Tri-hidratado de Potássio (SIGMA), Ferricianeto de Potássio (SIGMA), tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,0 e Azul de Metileno 500 μ M.

3.4 CONSTRUÇÃO DE ELETRODOS IMPRESSOS

Os eletrodos impressos em tela foram construídos em suporte polimérico sólido e resistente, sendo constituídos por três linhas condutoras. O tamanho dos biossensores foi calculado de acordo com os estudos de condutividade e interferência dos sinais elétricos, que foram monitorados no software NOVA, versão 2.0. As linhas condutoras foram impressas na superfície de poliestireno (PS). O eléctrodo de referência foi impresso com tinta Ag / AgCl (ACHENSON), sobreposto a uma linha condutora e seco em estufa a 60 ° C durante 4 horas. A tinta prata / cloreto de prata apresenta potencial conhecido, constante e completamente insensível à composição da amostra do estudo. O eletrodo de trabalho (área superficial de aproximadamente 7 mm²) e o auxiliar constituído de pasta de carbono foram impressos sobrepostos na segunda e terceira linha condutora. Subsequentemente, os biossensores foram novamente secos em estufa a 60 ° C durante 6 horas. Eletrodos baseados em pasta de carbono têm algumas vantagens sobre outros eletrodos, como versatilidade, baixa corrente de fundo, baixo ruído, baixo custo, bem como uma variedade de modificações de superfície, bem como facilidade de renovação da superfície (SILVA et al, 2011; VIEIRA, 2007). Após a definição da plataforma, os eletrodos secos foram lavados intensivamente com 0,1% de solução de ácido sulfúrico e, em seguida, com água ultrapura e foram secos em estufa por 60 min a 60 ° C.

3.5 MODIFICAÇÃO DOS ELETRODOS DE TRABALHO

Para a síntese do grafeno, foi utilizado o método de Hummer modificado (ARCOS-MARTÍNEZ, 2010; APETREI e APETREI, 2015). Consiste na adição de 3 g de KMnO₄, 50 mL de H₂SO₄ e 25 mL de HNO₃ em um recipiente para promover a separação e oxidação das folhas de grafeno do grafite. Depois de oxidado, o grafeno foi levado a um forno para redução

a alta temperatura (500 ° C por 15 minutos). Subsequentemente, pesou-se 3,5 mg de arginina (10 mM) e diluiu-se em 2 mL de tampão acetato (pH 5,0; 0,5 M). Em seguida, 2 mg de grafeno reduzido foram adicionados à solução e levados ao banho de sonicador durante 30 minutos. As comparações de condutividade de arginina e arginina mais grafeno foram feitas em CV usando Ferri / Ferro Cianeto 5 mM. As leituras de DPV foram realizadas usando tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,0 e Azul de Metileno 500µM. Para formar a camada de poli-L-arginina, juntamente com o grafeno, 50µL da solução foram colocados na superfície do eletrodo de trabalho e eletropolimerizados por voltametria cíclica aplicando um potencial de varredura de -1,5 V a 2,0 V por 10 ciclos a uma velocidade de varredura. de 100 mVs⁻¹.

3.6 IMOBILIZAÇÃO DA SONDA DE MIRNA

A sonda foi imobilizada no transdutor por adsorção. Nesta etapa, a melhor condição de imobilização da sonda foi avaliada utilizando diferentes concentrações (1 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM e 25 µM). No eletrodo eletropolimerizado com solução de arginina e grafeno, 5 µL de sonda de DNA complementar ao miRNA 509 foram colocados na superfície do eletrodo de trabalho, à temperatura ambiente (23 ° C).

3.7 DETECÇÃO DO ALVO miRNA509

Para a detecção de FC, a molécula alvo (miRNA 509) foi adicionada ao transdutor imobilizado com a sonda e incubada durante 10 minutos a uma temperatura de anelamento específica (47 ° C). Depois disso, uma solução de azul de metileno 500 mM foi adicionada ao eletrodo de trabalho modificado por 5 min.

3.8 ANÁLISES ELETROQUÍMICAS

Para análise dos sinais eletroquímicos, os biossensores hibridizados com a sonda e o DNA alvo foram lidos com tampão Tris-HCl e azul de metileno 500 mM como indicador de redução e acoplados ao potenciostato AUTOLAB PGSTAT utilizando o NOVA 2.0 como interface de software. A técnica de Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) foi utilizada para detectar os sinais eletroquímicos em cada etapa dos experimentos, nos quais foi aplicado um escaneamento de potenciais entre -4,0 e 0,0, com amplitude de 10 mV e velocidade de varredura de 20 mV / s.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA E SELEÇÃO DE BIOMARCADORES

No processo de mineração de dados, foram encontrados 21 trabalhos científicos, incluindo artigos de revisão, que investigaram possíveis funções do miRNA na regulação do gene CFTR.

Destes artigos, observamos 120 miRNAs que estão em desregulação em indivíduos com FC. O miRNA pode ser desregulado como consequência da falta de proteína funcional (devido à mutação DeltaF508 CFTR) ou pode, quando em concentrações alteradas, ser a causa da falta desta proteína, uma vez que desempenha funções de regulação pós-transcricional de genes. No entanto, a maioria dos artigos estudados não elucidou todas as vias metabólicas nas quais cada miRNA participa; analisando apenas a expressão desses miRNAs em pacientes e culturas de células ou usando sistemas de previsão para listar miRNAs que possuem o gene CFTR como alvo.

A busca no MetaCore obteve 107 miRNA que também foram descritos nos artigos estudados. Já na análise do miRTarBase e do miRDB, foram encontrados 9 e 52 miRNA que possuem o gene CFTR como alvo validado por esses bancos de dados, no entanto, neste caso, foram encontrados miRNAs que não foram listados nos artigos ou no MetaCore, possivelmente porque tinha sido validado nestes bancos recentemente. A partir dos miRNAs encontrados nas diversas fontes e suas propriedades estudadas no miRBase (<http://www.mirbase.org/>), foram escolhidos cinco miRNAs que estavam seguindo os seguintes critérios: foram melhor descritos na literatura, foram superexpressos na FC ou quando havia a mutação DeltaF508, a CFTR era um alvo validado e tinha especificidade para a FC, e não desempenhou um papel importante na patogênese de outras doenças. Esses miRNAs são: miR-101, miR-145, miR-223, miR-494 e miR-509, apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. miRNA pré-selecionado e suas principais propriedades.

MiRNA	Sequência	Localização cromossômica	ID (miRBase)	CFTR (alvo)
hsa- miR-101-3p	UACAGUACUGUGAUAACUGAA	1p31.3	miRBase:MI0000103	Validado
hsa- miR-145-5p	GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU	5q32	miRBase:MI0000461	Validado

hsa- miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	Xq12	miRBase:MI0000300	Validado
hsa- miR-494-3p	UGAAACAUAACACGGGAAACCUC	14q32.31	miRBase:MI0003134	Validado
hsa-miR-509-3p	UGAUUGGUACGUCUGUGGGUAG	Xq27.3	miRBase:MI0003196	Validado

Estes critérios foram escolhidos porque, para uso em biossensor, o alvo deve ter a maior especificidade possível, ou o diagnóstico pode resultar em falsos positivos, sendo dada preferência ao superexpressado em condições patológicas, facilitando a análise eletroquímica e diferenciação entre o perfil de o estado patológico e o estado normal.

A partir desta tabela, análises adicionais foram realizadas para selecionar apenas um miRNA. Análises estruturais revelaram as estruturas secundárias do miRNA e seus ssDNAs complementares, bem como sua porcentagem de nucleotídeos GC, o que pode interferir na leitura eletroquímica, no seu nível de autoanelamento e na sua temperatura ideal de anelamento. Os resultados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Propriedades estruturais dos miRNAs pré-selecionados obtidos pelo software CLC Main Workbench.

MicroRNA	Temperatura de anelamento (°C)	Autoanelamento (n° nt)	Conteúdo GC (%)
miR-101	52,59	28,00	33,33
miR-145	63,14	26,00	52,17
miR-223	58,95	24,00	40,91
miR-494	59,70	20,00	45,45
miR-509	60,61	14,00	50,00

Nesta análise, considerou-se o autoanelamento, que deve ser baixo para maximizar a capacidade de hibridação com as fitas complementares. Outra análise realizada foi o anelamento com todo o genoma humano. Houve apenas perfeita correspondência entre a sequência de miRNA e seus próprios genes, o que indica que não há outra sequência igualmente gerada pelo genoma humano, promovendo maior especificidade.

A última análise foi a BLAST NCBI, que realiza o pareamento de sequências de miRNAs em genomas de bancos NCBI. Nesta fase, miR-494 e miR-145 foram completamente complementares às sequências em bactérias, respectivamente *Tannerella forsythia*, encontrada em doenças periodontais, e *Persicobacter* sp. JZB09, que é mais comumente encontrado no

solo. Ficou definido que os miRNAs compatíveis com estas bactérias não poderiam ser candidatos, para evitar a ocorrência de falsos positivos.

Assim, o miRNA selecionado como o melhor biomarcador para a fibrose cística foi hsa-miR-509-3p. Porque o miR-509 tem o menor grau de autoanelamento, além de ter alto conteúdo de GC, o que o torna uma boa escolha como biomarcador. O miRNA selecionado foi solicitado pela empresa IDT - Integrated DNA Technologies para ser utilizado nos testes biossensores. As sequências utilizadas neste trabalho foram:

miR-509 sonda 5' - CTA CCC ACA GAC GTA CCA

ATC A - 3'; miR-509 alvo 5' -

UGAUUGGUACGUCUGUGGGUAG - 3'

miR-509 alvo não complementar 5' - UGA UUG GUA AUG UGG GUA G - 3'

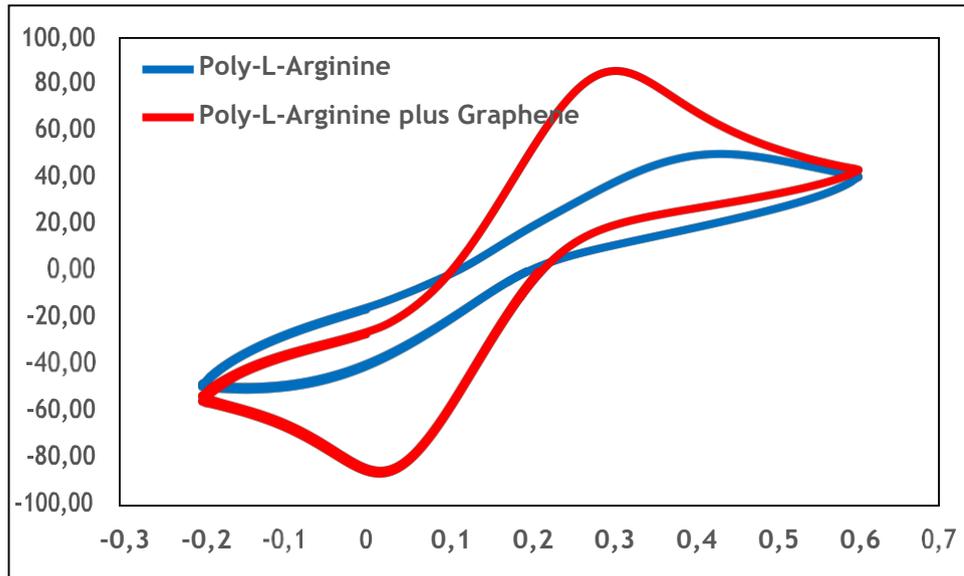
4.2 FORMAÇÃO DA SOLUÇÃO CONDUTORA

L-arginina e grafeno foram usados para formar uma solução condutora. O grafeno consiste de uma folha com uma estrutura bidimensional que possui propriedades elétricas, mecânicas, ópticas e térmicas excepcionais, o que o torna um candidato promissor para melhorar as propriedades físicas e químicas de compósitos devido à sua alta condutividade, grande área superficial, eletrônica transferência de heterogeneidade e grande estabilidade química (ZHANG et al, 2017; MA et al, 2013; SUN et al, 2013). Para a produção do nanocompósito, a produção de grafeno foi inicialmente realizada. Para isso, utilizou-se o método modificado da Hummer, que consiste na oxidação de folhas de grafite e posteriormente sua redução química foi feita através de altas temperaturas.

O Poly-L-Arg tem sido amplamente divulgado sobre seu uso para modificação de eletrodos. A L-arginina pode sofrer reação de polimerização oxidativa sob várias condições e formar uma forte adesão ao substrato no qual ela é imobilizada. O revestimento de poliarginina na superfície dos substratos é geralmente fino e oferece uma estrutura altamente robusta em uma ampla faixa de pH (SOLEYMANI et AL, 2017). L-Arg não só pode fazer o grafeno funcionalizado, mas também exibe excelente atividade eletrocatalítica. O Poly-L-Arg / Graphene exibe capacidade de enriquecimento, propriedades eletroquímicas proeminentes, grande área de superfície e determinações eletroquímicas altamente sensíveis e simultâneas (YI et AL, 2016). Essa melhoria pode ser comprovada por algumas técnicas, como a análise de voltametria (Figura 11). Pode-se observar que mesmo a L-Arginina sendo um material

condutor, a solução deste aminoácido junto com o grafeno promove uma melhora significativa no sistema eletroquímico, onde o aumento na área do gráfico corresponde ao aumento da condutividade no sistema.

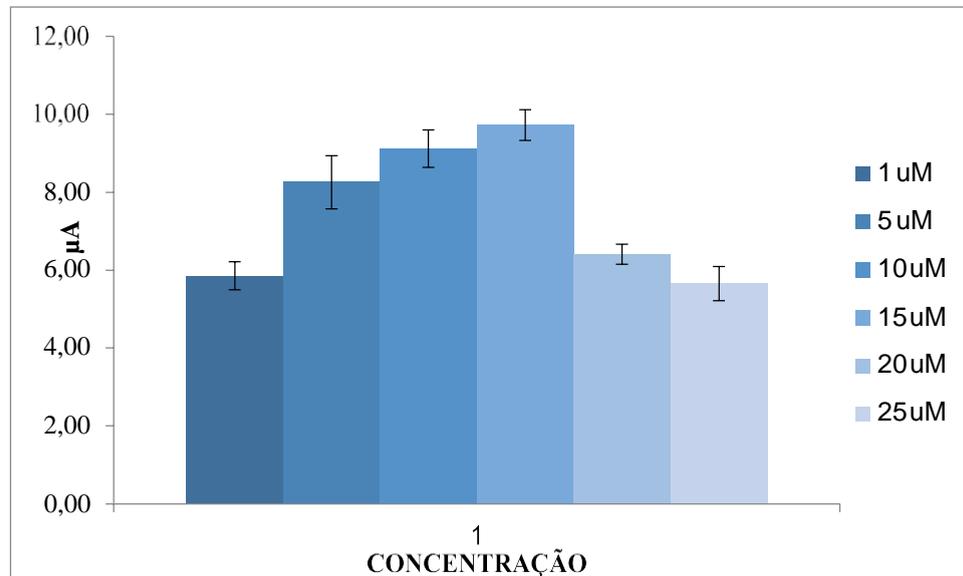
Figura 11. Voltametria cíclica representando o comportamento do eletrodo modificado com L-Arginina (azul) e o eletrodo com L-arginina mais grafeno (vermelho).



4.3 IMOBILIZAÇÃO E TESTE DE CONCENTRAÇÃO DE Sonda DE miRNA

A imobilização de um elemento biológico no eletrodo é o primeiro ponto a ser considerado na construção de um biossensor. Determinar a concentração ótima da sonda é vital para melhorar o desempenho dos genossensores, além de minimizar desperdícios e interferências na resposta eletroquímica do sistema. Em seguida, diversas concentrações foram avaliadas para o processo de imobilização dos oligonucleotídeos na matriz polimérica (Figura 12). O objetivo deste teste foi observar o comportamento da concentração da sonda no eletrodo através da redução eletroquímica do azul de metileno. O gráfico abaixo exibe um histograma em que o pico atual varia em função da concentração de oligonucleotídeos imobilizados na matriz polimérica. Das concentrações de sonda testadas (1,0 μM a 25 μM), a melhor resposta obtida foi em 15 μM . Como mostrado no gráfico, há um aumento na corrente de pico à medida que a concentração é aumentada até a concentração de 15 μM (5,85 μA a 9,73 μA). Depois disso, com um aumento da concentração da sonda, percebe-se uma saturação do sistema, que pode ser vista por uma queda nos picos de corrente (6,40 μA).

Figura 12. Histograma da variação das concentrações da sonda para imobilização. Leituras realizadas via DPV utilizando azul de metileno como indicador de redução em tampão TRIS-HCl pH 7,0.



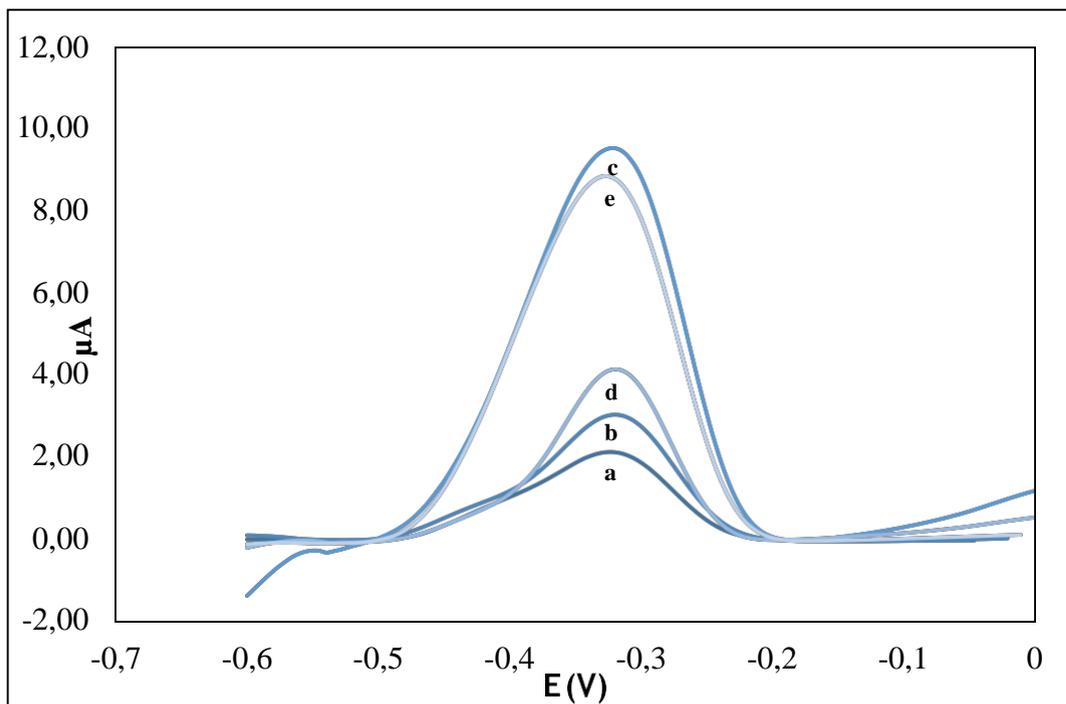
A redução dos picos de corrente após a concentração de 15 μM , uma vez que as maiores concentrações de sondas de DNA na superfície do eletrodo aumentam o impedimento estérico entre as bases nitrogenadas e o transdutor, o que impede que os elétrons produzidos no processo de oxidação acessem a superfície do eletrodo (CAMPOS-FERREIRA et al, 2013; NASCIMENTO et al, 2012).

4.4 HIBRIDIZAÇÃO E DETECÇÃO DO miRNA 509

Após a modificação do eletrodo, foram realizados testes para analisar a capacidade do nanocompósito de promover a imobilização da sonda. A imobilização, neste caso, ocorre por adsorção eletrostática do oligonucleotídeo carregado negativamente na matriz polimérica de carga positiva (NORTON et al, 2015). O pico atual no VPD representa o sinal de redução do azul de metileno, usado como indicador de oxirredução, sendo capaz de diferenciar os oligonucleotídeos simples e bicatenários pela disponibilidade de guaninas para interação (NASCIMENTO et al, 2012). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e através do VPD podemos observar que o eletrodo branco apresenta pico de oxidação de 2,10 μA (Figura 13a). O eletrodo modificado com poli-L-arginina / grafeno mostrou um pico de redução de 3,04 μA (Figura 13b), o aumento, que ocorre quando comparado ao eletrodo branco, é devido às propriedades condutivas da solução do polímero juntamente com a redução de o azul de metileno. O eletrodo com nanocompósito após a imobilização da sonda promoveu um aumento

de pico ainda maior, apresentando 9,47 μA (Figura 13c). Este aumento é justificado devido à eletroatividade das guaninas presentes na sonda, quando a fita simples é immobilizada, as guaninas da sonda ficam livres para oxidar, aumentando assim o pico de corrente. Isso prova que a sonda foi immobilizada com sucesso no eletrodo (CAMPOS-FERREIRA et al, 2013). Por outro lado, quando ocorre a hibridização com o alvo miRNA 509, as guaninas não são mais livres, causando a diminuição do pico de corrente, apresentando 4,15 μA (Figura 13d).

Figura 13. Voltamograma mostrando o comportamento do eletrodo nu (a), eletrodo modificado com poli- L-arginina / grafeno (b), com poli-L-arginina / grafeno mais sonda (c), poli-L-arginina / grafeno mirando miRNA 509 (d) e poli-L-arginina / grafeno alvo não complementar (e).

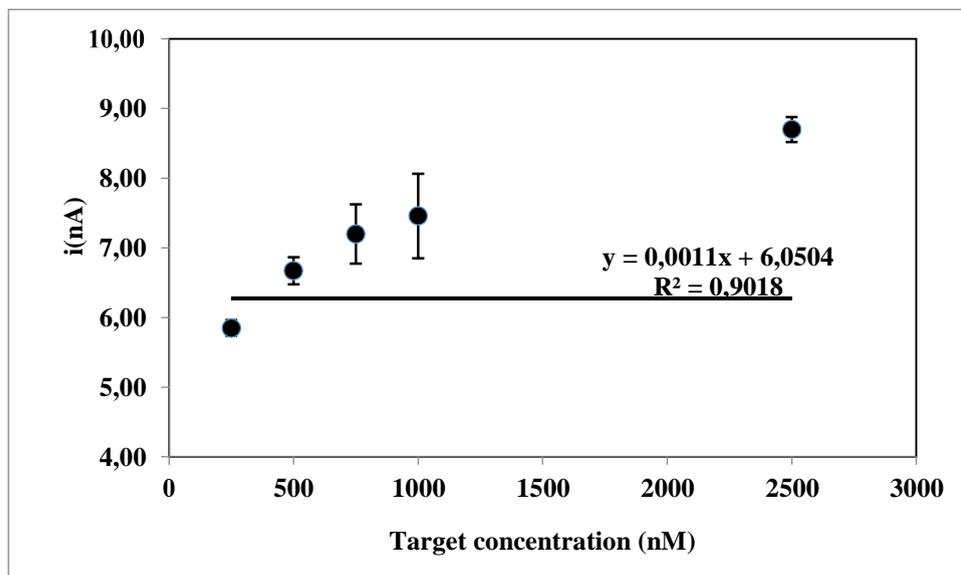


Um aumento significativo dos sinais voltamétricos foi observado após a hibridação do miRNA 509 com sequência não complementar quando comparado ao DNA complementar, mas ligeiramente inferior ao eletrodo modificado pela sonda, obtendo-se um pico de 8,69 μA (Figura 13e). Isso pode ser atribuído à pequena e irregular hibridização de sequências não complementares com a sonda (POURNAGHI-AZAR et al, 2008), que indica que somente a sequência-alvo é capaz de formar um DNA de fita dupla estável sobre a superfície do eletrodo, endossando a seletividade do DNA.

A fim de verificar o desempenho do eletrodo modificado por poli-L-arginina e grafeno e immobilizado por sonda de DNA, ele foi testado com quantidades variáveis da sequência alvo

complementar (509 miRNA). Os sinais eletroquímicos baseados na oxidação da guanina na superfície do eletrodo modificado são mostrados abaixo (Figura 14). Primeiro, foi mostrado que os picos de corrente aumentaram com o aumento da sequência alvo de 250nM para 2500nM. Essa diferença aconteceu porque as regiões oxidável das bases de guanina no ssDNA estão agora ligadas com ligações de hidrogênio que mantêm a dupla cadeia unida, diminuindo os sinais eletroquímicos do dsDNA na superfície do eletrodo (NASCIMENTO et al, 2012; LUCARELLI et al, 2008; WANG et al, 2001).

Figura 14. Gráfico da inclinação da detecção limite obtida pelo biossensor. Condições voltamétricas: faixa de varredura potencial entre +0,5 V e + 1,2V e taxa de varredura de 50mV / s. Todos os resultados aqui plotados foram a média de duplicados realizados de cada concentração alvo de miRNA 509.



A partir dos dados obtidos na curva de concentração-alvo foi possível obter a equação de regressão do sistema dada por $y = 0,0011x + 6,0504$ é linear entre 250 nM e 2500 nM, com um coeficiente de correlação de 0,9018. Um limite de detecção de 107,85 nM pode ser estimado pela equação $3s / m$, onde s é o desvio padrão da solução em branco (picos de corrente do eletrodo modificado com sonda) e m é a inclinação da regressão linear (SEHATNIA et al, 2011).

5 CONCLUSÕES

Depois de uma vasta procura por elementos genéticos (miRNA's), o presente trabalho mostrou através de técnicas de bioinformática e análises em bancos de dados, a seleção de um biomarcador potencial para a Fibrose Cística, sendo selecionado o miR-509. O microRNA 509 foi escolhido por apresentar ótimas características frente aos principais parâmetros físico-químicos requeridos para um biossensor.

Além disso, foi construída uma plataforma de análise eletroquímica com eletrodos impressos de carbono e prata, modificados com a eletropolimerização de um copolímero de poli-L-arginina e grafeno. Também foi avaliada a estabilidade do biossensor frente aos principais parâmetros físico-químicos, estabelecendo o melhor tempo e melhor concentração de imobilização. O biossensor proposto para realizar este diagnóstico foi desenvolvido utilizando um nanocompósito de grafeno e poli-L-arginina, obtendo resposta satisfatória. Foi demonstrado ainda que o composto produzido não só obtém melhor performance eletroquímica, mas também acarreta em melhor imobilização no processo de adsorção do oligonucleotídeo. Sendo assim o trabalho desenvolveu um biossensor que demonstrou ser sensível e específico para detecção precoce do miRNA 509. Onde, no futuro este poderá auxiliar no diagnóstico precoce, podendo assim aumentar o tempo de sobrevivência de pacientes acometidos pela Fibrose Cística.

Definem-se como perspectivas do trabalho a validação do genossensor através de testes de detecção do microRNA 509 em amostras biológicas.

REFERÊNCIAS

- AHANDA, M. L. E. et al. The hsa-miR-125a/hsa-let-7e/hsa-miR-99b cluster is potentially implicated in Cystic Fibrosis pathogenesis. **Journal of Cystic Fibrosis**, 2015.
- APETREI, I. M. e APETREI, C. The biocomposite screen-printed biosensor based on immobilization of tyrosinase onto the carboxyl functionalised carbon nanotube for assaying tyramine in fish products. **Journal of Food Engineering**, v. 149, p. 1–8, 2015.
- ARCOS-MARTÍNEZ, M. J. Screen-printed biosensors in microbiology; a review. **Talanta**, v. 82, p. 1629–1636, 2010.
- BELLUZO, M.S. et al. Assembling amperometric biosensors for clinical diagnostics. **Sensors**, v. 8, p. 1366-1399, 2008.
- BRENNAN, M. L.; SCHRIJVER, I. Cystic Fibrosis: A Review of Associated Phenotypes, Use of Molecular Diagnostic Approaches, Genetic Characteristics, Progress, and Dilemmas. **The Journal of molecular diagnostics : JMD**, v. 18, n. 1, p. 3–14, jan. 2016.
- BUDNIKOV, H. C.; EVTUGYN, G. a e PORFIREVA, A. V. Electrochemical DNA sensors based on electropolymerized materials. **Talanta**, v. 102, p. 137–55, 2012.
- CAMPOS-FERREIRA, D. S. et al. Electrochemical DNA biosensor for human papillomavirus 16detection in real samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 804, p. 258– 263, 2013.
- CANT, N.; POLLOCK, N.; FORD, R. C. CFTR structure and cystic fibrosis. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 52, p. 15–25, 2014.
- CAYGILL, R. L.; BLAIR, G. E. e MILLNER, P. a. A review on viral biosensors to detect human pathogens. **Analytica Chimica Acta**, v. 681, n. 1-2, p. 8–15, 2010.
- CFTR. Info Genetics and cell biology of **CFTR**. Disponível em: <<http://www.cftr.info/about-cf/genetics-and-cell-biology-of-cftr/>>. Acessado em: 09 janeiro de 2018.
- CFW – Cystic Fibrosis Worldwide. **What is cystic Fibrosis?** Disponível em: <<https://www.cff.org/What-is-CF/About-Cystic-Fibrosis/>>. Acessado em: 09 janeiro de 2018.
- CONESE, M. et al. Gene and cell therapy for cystic fibrosis: From bench to bedside. **Journal of Cystic Fibrosis**. v.10 Suppl 2, p.114–S128, 2011.
- CUTTING, G. R. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 1, p. 45–56, 2014.
- DELAY, C.; MANDEMAKERS, W. e HÉBERT, SS. MicroRNAs in Alzheimer’s disease. **Neurobiology of disease**, v. 46(2), p. 285–90, 2013.
- DIANA, A. et al. The novel complex allele [A238V;F508del] of the CFTR gene: clinical phenotype and possible implications for cystic fibrosis etiological therapies. **Journal of**

Human Genetics, v. 61, n. January, p. 1–9, 2016.

DOMINGOS, M. T. et al. Sweat conductivity and coulometric quantitative test in neonatal cystic fibrosis screening. **Jornal de Pediatria**, 2015.

FAEZ, R. et al. Polímeros Condutores. **Atualidades em Química**, v. 11 maio 2000.

FARUQ, O., Vecchione A. microRNA: diagnostic perspective. **Frontiers in Medicine** v.2, p. 1-10, 2015.

FENG, C. et al. Optical aptasensors for quantitative detection of small biomolecules: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v 59, p. 64-74, 2014.

FIRMIDA, M. C, LOPES, A. J. Aspectos Epidemiológicos da Fibrose Cística. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, UERJ, v. 10, n. 4, p. 12–22, 2011.

FURGERI, D. T. et al. Cystic fibrosis transmembrane regulator haplotypes in households of patients with cystic fibrosis. **Gene** v. 641, p. 137–143, 2018.

GARAY, et al. Analysis and optimization of a hydrogel matrix for the development of a sandwich-type glucose biosensor. **Sensors and Actuators B**, v. 211, p. 125–130, 2015.

GOMEZ, C. C. S. et al. Pulsed direct and constant direct currents in the pilocarpine iontophoresis sweat chloride test. **BMC Pulmonary Medicine** v. 14, p. 198, 2014.

GUO, P. et al. Uniqueness, advantages, challenges, solutions, and perspectives in therapeutics applying RNA nanotechnology. **Nucleic acid therapeutics**, v. 22, n. 4, p. 226-45, 2012.

HAACK, A.; NOVAES, M. R. G. Exercício físico e fibrose cística: uma revisão bibliográfica. **Com. Ciências da Saúde**, v. 24, n. 2, p. 145–154, 2013.

HASANZADEH, M. et al. Poly arginine-graphene quantum dots as a biocompatible and non-toxic nanocomposite: Layer-by-layer electrochemical preparation, characterization and non-invasive malondialdehyde sensory application in exhaled breath condensate. **Materials Science and Engineering C**, v. 75, p. 247–258, 2017.

HASANZADEH, M. et al. Poly arginine-graphene quantum dots as a biocompatible and non-toxic nanocomposite: Layer-by-layer electrochemical preparation, characterization and non-invasive malondialdehyde sensory application in exhaled breath condensate. **Materials Science and Engineering C**, v. 75, p. 247–258, 2017.

HUANG, H. et al. An ultrasensitive electrochemical DNA biosensor based on graphene/ Au nanorod/polythionine for human papillomavirus DNA detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, p. 442–446, 2015.

HUPES. **Complexo HUPES alerta para a necessidade de diagnóstico e tratamento da Fibrose Cística**, 2015. Disponível em: <<http://www.complexohupes.ufba.br/noticias/complexo-hupes-alerta-para-a-necessidade-de-diagnostico-e-tratamento-da-fibrose-cistica/>>. Acessado em: 23 de dezembro de 2017.
IANESELLI, L.; GRENCI, G.; CALLEGARI, C.; TORMEN, M. e CASALIS, L.

Development of stable and reproducible biosensors based on electrochemical impedance spectroscopy: Three-electrode versus two-electrode setup. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 55, p. 1–6, 2014.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). Glossary for chemists of terms used. **Pure and Applied Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 143-168, 1992.
IUNI-IUI, Z.; HONG, C. U. I.; RUIFU, Y. DNA based biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 15, n. 1, p. 43-58, 1997.

KISSINGER, P. T. Biosensors-a perspective. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 12, p. 2512-6, 15 jun. 2005.

KÖSER, C. U. et al. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 8, p. e1002824, 2012.

KUNZELMANN, K. et al. Bicarbonate in cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis** xx (jun. 2017) xxx–xxx.

LABIB, M. e BEREZOVSKI, M. V. Electrochemical sensing of microRNAs: Avenues and paradigms. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, p. 83–94, 2015.

LABUDA, J. et al. Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report)*. **Pure Appl. Chem.**, vol. 82, n. 5, p. 1161–1187, 2012.

LI, X. et al. Conducting polymers in environmental analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 39, p. 163–179, 2012.

LI, X. et al. Conducting polymers in environmental analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 39, p. 163–179, 2012.

LIM, R. M. et al. Targeted mutation screening panels expose systematic population bias in detection of cystic fibrosis risk. **Genetics in Medicine**, n. April, p. 1–6, 2015.

LIU A, WANG K, WENG S, LEI Y, LIN L, CHEN W, et al. Development of electrochemical DNA biosensors. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 101–11, 2012.

LONG, F; ZHU, A. e SHI, H. Recent advances in optical biosensors for environmental monitoring and early warning. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 10, p. 13928–48, 2013.
LUCARELLI, F., TOMBELLI, S., MINUNNI, M., MARRAZZA, G., MASCINI, M. Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridisation detection, **Biosensor and Bioelectronics**, v. 9, p.139–59, 2008.

MA, et al. In situ intercalative polymerization of pyrrole in graphene analogue of MoS₂ as advanced electrode material in supercapacitor. **Journal of Power Sources**, v. 229, p.72-78, 2013.

MA, et al. In situ intercalative polymerization of pyrrole in graphene analogue of MoS₂ as advanced electrode material in supercapacitor. **Journal of Power Sources**, v. 229, p.72-78, 2013.

MACKENZIE, T. et al. Longevity of patients with cystic fibrosis in 2000 to 2010 and beyond: Survival analysis of the Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. **Annals of Internal Medicine**, v. 161, n. 4, p. 233–241, 2014.

MANZANARES-PALENZUELA, C. L. et al. Electrochemical genosensors as innovative tools for detection of genetically modified organisms. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 66, p. 19-31, 2015.

MARKS, R. S. et al. **Handbook of Biosensors and Biochips**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2008.

MARSON, F. A. L. **Análises de genes modificadores relacionados a gravidade clínica da fibrose cística**. CAMPINAS-SP, 2011.

MATTAR, A. C. V. et al. Sweat conductivity: An accurate diagnostic test for cystic fibrosis? **Journal of Cystic Fibrosis** xx (2014) xxx–xxx.

MATTEIS, V. et al. Chromogenic device for cystic fibrosis precocious diagnosis: A “point of care” tool for sweat test. **Sensors and Actuators B** v.225, p. 474–480, 2015.

MONOŠÍK, R.; STREĎANSKÝ, M. e ŠTURDÍK, E. Biosensors - classification, characterization and new trends. **Acta Chimica Slovaca**, v. 5, n. 1, p. 109–120, 2012.

MOREIRA, F. T. C. et al. Novel biosensing device for point-of-care applications with plastic antibodies grown on Au-screen printed electrodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 182, p. 733–740, 2013.

MUNCK, A. et al. Cystic Fibrosis Screen Positive, Inconclusive Diagnosis (CFSPID): A new designation and management recommendations for infants with an inconclusive diagnosis following newborn screening. **Journal of Cystic Fibrosis**, 2015.

NAGY-JR, B. et al. Human Epididymis Protein 4: A Novel Serum Inflammatory Biomarker in Cystic Fibrosis. **CHEST** v. 150(3), p. 661-672, 2016.

NASCIMENTO, G. A. et al. Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymeric film on screen-printed electrode. **Biosensors and Bioelectronics** v.38, p. 61–66, 2012.

NASCIMENTO, G. A. et al. Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymeric film on screen-printed electrode. **Biosensors and Bioelectronics** v.38, p. 61–66, 2012.

NORTON, M. L. e GREEN, N. S. Interactions of DNA with graphene and sensing applications of graphene field-effect transistor devices: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 853, p. 127–142, 2015.

OOI, C. Y. et al. Does extensive genotyping and nasal potential difference testing clarify the diagnosis of cystic fibrosis among patients with single-organ manifestations of cystic fibrosis? **Thorax**, v. 69, n. 3, p. 254–60, 2014.

PARANJAPE, S. M. et al. Cystic fibrosis in the era of precision medicine. **Pediatric Respiratory Reviews** xxx (2017) xxx–xxx.

PENG, H. et al. Conducting polymers for electrochemical DNA sensing. **Biomaterials**, v. 30, n. 11, p. 2132–48, 2009.

PIZZIGNACCO, T. P.; MELLO, D. F.; LIMA, R. G. [The experience of disease in cystic fibrosis: the paths to comprehensive care]. **Revista da Escola de Enfermagem da U S P**, v. 45, n. 3, p. 638–644, 2011.

POURNAGHI-AZAR M. H., ALIPOUR, E., ZUNUNI, S. Direct and rapid electrochemical biosensing of the human interleukin-2 DNA in unpurified polymerase chain reaction (PCR) -amplified real samples. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 524–30, 2008.

PRIVETT, B. J. SHIN, J. H.; SCHOENFISCH, M. H. Electrochemical sensors. **Analytical chemistry**, v. 82, n. 12, p. 4723-41, 15 jul 2010.

QURESHI, A. et al. Biosensors for cardiac biomarkers detection: A review. **Sensors and Actuators B**, v. 171– 172, p. 62– 76, 2012.

REBRAFC - Registro Brasileiro de Fibrose Cística, 2016. **Relatórios anuais (REBRAFC)**. Disponível em:<http://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/index2.html>. Acessado em 10 de janeiro de 2018.

ROLIM, T. V. C. Síntese e Funcionalização de Nanopartículas com Oligonucleotídeo para Aplicação em Genossensores no Diagnóstico Avançado de Predisposição à Hipertensão Arterial. **São Paulo, 2013.**

ROSA, F. R. et al. Fibrose cística: Uma abordagem clínica e nutricional. **Revista de Nutricao**, v. 21, n. 6, p. 725–737, 2008.

SADIK O a, Aluoch AO, Zhou A. Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques. **Biosensors & bioelectronics**, v24, p. 2749-65, 2009.

SANTIAGO-SIM, T.; COLOSIMO, S.; POWNER, D. J. Introduction to genetic processes in transplantation. **Progress in Transplantation** , v. 22, n. 2, p. 192-8, 2012.

SCHNEIDER, U. V. Improved DNA hybridization parameters by Twisted Intercalating Nucleic Acid (TINA) duplex helix formations. **Danish Medical Journal**, v. 59, n. 1, p. 1-35, 2012.

SEHATNIA, B., GOLABI, F., SABZI, R. E., HEJAZI, M. S. Modeling of DNA Hybridization Detection Using Methylene Blue as an Electroactive Label. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 8, p.115–22, 2011.

SHEN, Y. et al. Clinical Phenotypes and Genotypic Spectrum of Cystic Fibrosis in Chinese Children. **The Journal of Pediatrics**. v. 171, 2016.

SILVA, N. F. D. et al. Electrochemical biosensors for Salmonella: State of the art and challenges in food safety assessment. **Biosensors and Bioelectronics** v. 99, p. 667–682, 2018.

SILVA, V. P. A. et al. Biossensor Amperométrico para Determinação de Peróxido de Hidrogênio em Leite. **Eclética Química**, v.36, n. 2, p. 143-157, 2011.

SILVA-FILHO, L.V.R.F. et al. Cystic fibrosis in Latin America—Improving the awareness. **Journal of Cystic Fibrosis** v.15, p. 791–793, 2016.

SOLEYMANI, J. et al. Electrochemical sensing of doxorubicin in unprocessed whole blood, cell lysate, and human plasma samples using thin film of poly-arginine modified glassy carbon electrode. **Materials Science and Engineering C** v. 77, p. 790–802, 2017.

SOLEYMANI, J. et al. Electrochemical sensing of doxorubicin in unprocessed whole blood, cell lysate, and human plasma samples using thin film of poly-arginine modified glassy carbon electrode. **Materials Science and Engineering C** v. 77, p. 790–802, 2017.

SOSNAY, P. R. et al. Molecular Genetics of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator: Genotype and Phenotype. **Pediatr Clin N Am** v. 63, p.585–598, 2016.

SUN, L.Z. et al. Surface work function of chemically derived graphene: A first- principles study. **Physics Letters A**, v. 377, p. 1760–1765, 2013.

TANG, W. et al. Graphene/polypyrrole intercalating nanocomposites assupercapacitors electrode. **Electrochimica Acta**, v. 112, p. 44– 52, 2013.

TIG, Gözde Aydoğdu. Development of electrochemical sensor for detection of ascorbic acid, dopamine, uric acid and L-tryptophan based on Ag nanoparticles and poly(L-arginine)-graphene oxide composite. **Journal of Electroanalytical Chemistry** v. 807, p. 19–28, 2017.

TIG, Gözde Aydoğdu. Development of electrochemical sensor for detection of ascorbic acid, dopamine, uric acid and L-tryptophan based on Ag nanoparticles and poly(L-arginine)-graphene oxide composite. **Journal of Electroanalytical Chemistry** v. 807, p. 19–28, 2017.

TOTHILL, IBTISAM E. Biosensors for cancer markers diagnosis. **Seminars in Cell & Developmental Biology** v. 20, p. 55–62, 2009.

VIEIRA, S. N. Contribuição para o Desenvolvimento de Biossensores Eletroquímicos para Detecção de Hepatopatias, **2007**.

WANG, J., KAWDE, A. Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization. **Analytica Chimica Acta**,v. 431, p. 219–24 2001.

WHO, World Health Organization. **Genes and human disease**. Disponível em: <<http://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/index2.html>>. Acessado em 09 de janeiro de 2018.

WILSON, L. M. et al. Airway clearance techniques for cystic fibrosis: an overview of Cochrane systematic reviews. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 8, 2014.

YANG, Y. et al. Electrochemical biosensor based on three-dimensional reduced graphene oxide and polyaniline nanocomposite for selectivedetection of mercury ions. **Sensors and**

Actuators B, v. 214, p. 63–69, 2015.

YI, Y. et al. Highly sensitive and simultaneous electrochemical determination of 2-aminophenol and 4-aminophenol based on poly (L-arginine)- β -cyclodextrin/carbon nanotubes@graphene nanoribbons modified electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 353–358, 2016.

YI, Y. et al. Highly sensitive and simultaneous electrochemical determination of 2-aminophenol and 4-aminophenol based on poly (L-arginine)- β -cyclodextrin/carbon nanotubes@graphene nanoribbons modified electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 353–358, 2016.

YOKOYAMA, **What are biosensors?** Disponível em: <<http://www.jaist.ac.jp/~yokoyama/biosensor.html>>. Acessado em 11 de janeiro de 2018.

ZHANG, C. et al. A smartphone-based chloridometer for point-of-care diagnostics of cystic fibrosis. **Biosensors and Bioelectronics** v.97, p. 164–168, 2017.

ZHANG, F. et al. Simultaneous electrochemical determination of uric acid, xanthine and hypoxanthine based on poly(l-arginine)/graphene composite film modified electrode. **Talanta** v. 93, p. 320– 325, 2012.

ZHANG, F. et al. Simultaneous electrochemical determination of uric acid, xanthine and hypoxanthine based on poly(l-arginine)/graphene composite film modified electrode. **Talanta** v. 93, p. 320– 325, 2012.

ZHANG, Q. et al. Advanced review of graphene-based nanomaterials in drug delivery systems: Synthesis, modification, toxicity and application. **Materials Science and Engineering C** v. 77, p. 1363–1375, 2017.

ZHANG, Q. et al. Advanced review of graphene-based nanomaterials in drug delivery systems: Synthesis, modification, toxicity and application. **Materials Science and Engineering C** v. 77, p. 1363–1375, 2017.