



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020023287-8 A2



(22) Data do Depósito: 13/11/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 24/05/2022

(54) **Título:** GENOSENSOR DE DNA PARA DETECÇÃO DO BIOMARCADOR MGMT E SEU USO PARA DIAGNÓSTICO DE CÂNCER ESPINOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO

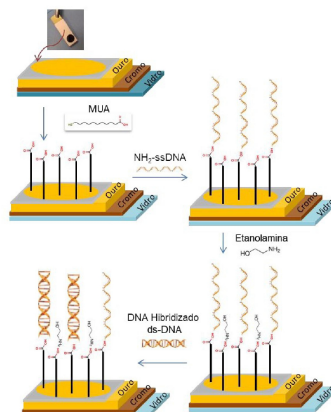
(51) **Int. Cl.:** G01N 27/26; G01N 27/327.

(52) **CPC:** G01N 27/26; G01N 27/327.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP; FUNDAÇÃO PIO XII - HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS.

(72) **Inventor(es):** OSVALDO NOVAIS DE OLIVEIRA JUNIOR; ANDRÉ LOPES CARVALHO; BRUNA PEREIRA SORROCHE; FLÁVIO MAKOTO SHIMIZU; LIDIA MARIA REBOLHO BATISTA ARANTES; MATIAS ELISEO MELENDEZ; OLIVIA CARR; PAULO AUGUSTO RAYMUNDO PEREIRA; PAULO BARBEITAS MIRANDA; RAFAEL DE OLIVEIRA PEDRO; RUI MANUEL VIEIRA REIS.

(57) **Resumo:** GENOSENSOR DE DNA PARA DETECÇÃO DO BIOMARCADOR MGMT E SEU USO PARA DIAGNÓSTICO DE CÂNCER ESPINOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO. A presente invenção se insere no campo da detecção de ácido nucleico envolvendo sensores, mais especificamente na detecção de MGMT por meio de um genossensor baseado em uma fita de ssDNA, utilizado para diagnóstico precoce de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. O referido genossensor é funcionalizado com ácido mercaptoundecanoico (AMU) e demonstrou sensibilidade e seletividade, inclusive na avaliação de diferentes graus de metilação dos biomarcadores. O referido genossensor compreende pelo menos um eletrodo (1) recoberto por um filme (2) monocamada automontado com alto grau de organização molecular, em que o filme monocamada é preferencialmente de ácido mercaptoundecanoico (AMU); e uma sonda (3) ssDNA de sequência [NH₂-C₆]-TCGCGGTGCGTATCGTTTGCC funcionalizada no referido filme.



**GENOSSENSOR DE DNA PARA DETECÇÃO DO BIOMARCADOR MGMT E SEU
USO PARA DIAGNÓSTICO DE CÂNCER ESPINOCELULAR DE CABEÇA E
PESCOÇO**

Campo da invenção:

[001] A presente invenção se insere no campo da detecção de ácido nucleico envolvendo sensores, especificamente na detecção de sequências de genes metilados por meio de biossensores, mais especificamente na detecção de MGMT (genes da metiltransferase de DNA da o6-metilguanina) por meio de um genossensor baseado em uma fita de ssDNA, utilizado para diagnóstico precoce de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço.

Fundamentos da invenção:

[002] É sabido que o câncer de cabeça e pescoço é o oitavo mais prevalente no mundo, com 830.000 novos casos e 430.000 mortes por ano^[1], sendo a terceira causa de morte por câncer em todo o mundo^[2]. Este cenário pode ser alterado com o diagnóstico precoce. Hoje, a detecção precoce do câncer pode, em princípio, ser realizada com ensaios envolvendo reações com antígenos e anticorpos^[3] em amostras de sangue, mas sua aplicabilidade requer a existência prévia da doença para que os biomarcadores adequados sejam expressos.

[003] Desse modo, métodos e dispositivos baseados no monitoramento de genes, em contrapartida, têm sido desenvolvidos com o intuito de fornecer uma detecção precisa ainda em estágios iniciais. Esses métodos e dispositivos exploram principalmente o fato de alguns tipos de câncer surgirem de alterações genéticas e epigenéticas, como a metilação do DNA (adição de grupos metil -CH₃)^[4].

[004] A metilação de genes é um marcador molecular em potencial para vários tumores^[4], sendo um evento precoce de carcinogênese em tumores de cabeça e pescoço, e que pode ser detectado em lesões precursoras. A gravidade e as metástases da doença estão correlacionadas com a hipermetilação dos promotores genéticos, como no caso do MGMT (genes da metiltransferase de DNA da o6-metilguanina).

[005] Os métodos convencionais de monitoramento de genes, incluindo análises quantitativas da reação em cadeia da polimerase (PCR) específica da metilação (Q-MSP), são caros e demorados. O tempo de análise de uma amostra utilizando PCR pode levar de 24 a 72 horas e ainda é necessário um especialista treinado para operar o equipamento e manipular as amostras. Além disso, um equipamento para PCR tem um custo entre R\$100.000,00 e R\$200.000,00 dependendo dos acessórios necessários.

[006] Como uma alternativa mais promissora, dispositivos eletroquímicos têm sido aplicados como genossensores para as referidas análises diagnósticas, sendo que estes são atraentes devido à facilidade e as diversas vantagens de genossensores seletivos e sensíveis em relação as técnicas de PCR, por exemplo.

[007] Utilizando-se um genossensor é possível reduzir o tempo de análise de PCR para 30 a 60 minutos, e um equipamento e insumos para serem utilizados de forma acoplada tem um custo máximo em torno de R\$600,00. Além disso, alguns genossensores podem ser operados por qualquer indivíduo e até mesmo pelo próprio indivíduo a ser examinado, dispensando-se a necessidade de um técnico especializado.

Estado da técnica:

[008] Alguns documentos do estado da técnica descrevem genossensores e/ou Kits e/ou métodos para diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço, baseados na detecção de genes hipermetilados, no entanto, ainda perduram algumas deficiências, principalmente associadas a distinção do estado de metilação dos genes.

[009] CN103743802 revela um biossensor de DNA com base em um eletrodo de dióxido de nano titânio dopado com ouro ordenado tridimensional utilizado para detectar genes de câncer de mama, sendo que este é funcionalizado com uma sonda de DNA (5'-Fc-GAA CAA AAG GAA GAA AATC-(SH)-3') marcada com ferroceno na extremidade 5' do referido eletrodo. O método de detecção compreende colocar o eletrodo modificado em uma solução de um segmento gênico de câncer de mama, hibridizar, detectar a variação de sinais de hibridização adotando um método volt-ampere de pulso diferencial e realizar a detecção eletroquímica no gene de câncer de mama.

[010] A doença a ser diagnosticada no documento CN103743802 é o câncer de mama, que obviamente possui uma sequência de DNA diferente do genossensor em questão, que visa à detecção do câncer de cabeça e pescoço. Por isso, modifica-se a quantidade e a ordenação de bases nitrogenadas no documento supracitado, em que a sequência da *probe* possui 19 pares de bases e a sequência complementar 13 pares de bases, enquanto que, o genossensor estudado, possui 24 pares de base na *probe* e 21 pares de bases na sequência complementar. Essa quantidade de bases interfere na temperatura de hibridização, que também é influenciada pela quantidade que citosinas e guaninas na sequência. Assim, as temperaturas de hibridização do documento chinês são de 35

°C a 60 °C, enquanto que, no genossensor da presente invenção a temperatura de hibridização é em torno de 86 °C. Além disso, o limite de detecção para o documento supracitado foi de $5,2 \cdot 10^{-7}$ mol /L e para o genossensor da presente invenção foi de $0,24 \cdot 10^{-12}$ mol/L, apresentando maior sensibilidade considerando significativamente algumas ordens de grandeza de diferença. Além disso, utilizou-se etanolamina para aumentar ainda mais a seletividade do sensor, e uma temperatura ambiente para imobilização da sonda de ssDNA.

[011] CN108489976 revela um kit de detecção no qual há uma etapa de funcionalização de nanobastões de ouro como ácido mercaptoundecanoico antes da aplicação de material biológico, sendo que a sonda de DNA utilizada é baseada em aptâmeros de DNA de câncer de próstata. No entanto, em contraposição à presente invenção, verifica-se que não há um método que permita a formação de uma camada automontada do referido ácido com alta organização, sendo que esta característica é essencial para o funcionamento do genossensor, pois uma camada com defeitos impede que o genossensor possua sensibilidade e a seletividade necessária, por exemplo, ao se avaliar uma sequência complementar ou uma sequência com uma única base trocada, tal como concretizado na presente invenção.

[012] Povedano et. al (2018) revelam duas abordagens diferentes de biossensor de afinidade eletroquímica para detecção rápida de metilação específica do gene de DNA, por meio de citosinas 5-metiladas (5-mC) no DNA utilizando o anticorpo anti-5-mC como elemento de biorreconhecimento. Uma das abordagens envolveu o uso de uma sonda de DNA específica e o anti-5-mC como bioreceptor detector do DNA metilado

capturado. O MGMT foi utilizado como um dos biomarcadores, e os autores relatam que a metilação da O6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) do promotor MGMT do glioma maligno parece ser um preditor útil da responsividade a agentes alquilantes que revertem alterações epigenéticas.

[013] Salienda-se que o biomarcador é diferente da presente invenção pois utiliza anticorpos para a detecção e não apenas a sequência de DNA metilado, e, além disso, há uma marcação com biotina na superfície, e ainda as sequências de DNA são completamente diferentes das utilizadas na presente invenção. Além disso, o genossensor da presente invenção consegue distinguir diferentes porcentagens de metilação em uma sequência, de acordo com o sinal de saída de impedância eletroquímica, culminando em um resultado de probabilidade de o indivíduo desenvolver a doença, o que não é concretizado no referido artigo.

[014] Soares et. al. (2018) revela um genossensor para detectar Papilomavírus humano (HPV16) associado ao câncer de cabeça e pescoço, sendo baseado em impedância eletroquímica, compreendendo um substrato de vidro, revestido com ouro, em que a sonda de DNA é a [NH₂-C₆]CAAGCAGAACCGGACAG, sendo esta ligada ao substrato por meio de um filme de quitosana (CHT) e sulfato de condroitina (CS).

[015] Apesar de o artigo acima relatar a detecção de um mesmo tipo de câncer e alguns componentes construtivos similares à presente invenção, verifica-se que o estudo foi feito com outro biomarcador, o que afeta significativamente a sequência de bases da sonda utilizada, e conseqüentemente, afeta a construção do sensor, visto que deve-se avaliar um agente de funcionalização adequado para que haja uma

hibridização adequada, tendo em conta que as condições de hibridização influenciam significativamente na organização do filme automontado e conseqüentemente na sensibilidade e seletividade do genossensor, visto que, somente como uma organização adequada do filme nanoestruturado da matriz seria possível imobilizar a sequência de maneira adequada.

[016] US20140323321 revela um método e um Kit para detecção de um distúrbio proliferativo celular, podendo ser o câncer de cabeça e pescoço, por meio da análise do estado de metilação de genes direcionados ou regiões reguladoras de genes em uma amostra de saliva ou soro. A presença de hipermetilação dos genes ou de suas regiões regulatória é indicativa da presença, ou maior possibilidade de recorrência e/ou pior prognóstico em indivíduos com câncer. Uma das possíveis regiões regulatórias de pelo menos um dos dois genes pode ser um MGMT.

[017] O referido documento cita 69 tipos de sequências que poderiam ser utilizados no referido tipo de detecção, sendo que a sequência utilizada na presente invenção não foi utilizada, pois somente a SEQ ID N° 52 citada possui compatibilidade nas duas primeiras trincas de base nitrogenada, em relação as outras sete trincas de base que compõem a *probe* utilizada na presente invenção.

[018] Ressalta-se que o princípio da técnica de PCR é baseado em reações ou interações de duas fitas simples de DNA em solução, enquanto a presente invenção se baseia na captura de uma sequência complementar por um suporte sólido funcionalizado.

[019] O PCR convencional utilizado em US20140323321 contém no mínimo duas longas etapas: a) Hibridização - os

iniciadores ou primers se ligam a fita de DNA que se pretende amplificar. Um deles é complementar à sequência em uma fita da dupla-hélice de DNA e o outro é complementar à sequência na outra fita. São estes que irão identificar/marcas qual trecho de interesse do DNA deverá ser copiado; b) Extensão ou polimerização - com o ponto de partida já identificado, a Taq polimerase liga-se à fita sinalizada pelo primer, complementando-a. Inicia-se então, a extensão do novo fragmento de DNA, formando novamente uma fita dupla de DNA. Na prática, a amplificação efetiva do DNA requer de 20 a 30 ciclos de reação, com os produtos de cada ciclo servindo como DNA-molde para o próximo - dando origem ao termo "reação em cadeia" da polimerase. Na PCR convencional, a detecção do produto de amplificação normalmente é feita em eletroforese em gel de agarose. Após a coloração, ocorre a visualização do DNA pesquisado.

[020] O referido pedido de patente americano ao utilizar a técnica de PCR na detecção de MGMT fica mais sujeito à presença de inibidores e contaminação que podem afetar a sua eficiência, com resultados errôneos, quando há baixa concentração, por exemplo, ou até mesmo inviabilizando o processo. Além disso, o limite de detecção da presente invenção de $0,24 \times 10^{-12}$ mol.L⁻¹ utilizando a presente amostra, é bem menor quando comparado ao PCR.

[021] Em suma, a presente invenção diferencia-se de maneira inventiva em relação as anterioridades pelo menos pelo fato de: i) utilizar uma sequência de ssDNA específica ainda não utilizada para tal detecção; ii) funcionalizar a superfície com ácido mercaptoundecanoico formando uma monocamada automontada altamente ordenada; iii) possibilitar

a diferenciação de diferentes graus de metilação por meio da diferenciação dos valores de impedância eletroquímica.

Breve descrição da invenção:

[022] A presente invenção se insere no campo da detecção de ácido nucleico envolvendo sensores, mais especificamente na detecção de MGMT por meio de um genossensor baseado em uma fita de ssDNA, utilizado para diagnóstico precoce de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. O referido genossensor é funcionalizado com ácido mercaptoundecanoico (AMU) e demonstrou sensibilidade e seletividade, inclusive na avaliação de diferentes graus de metilação dos biomarcadores.

Breve descrição das figuras:

[023] Para auxiliar na identificação das principais características deste genossensor e seu uso, são apresentadas as figuras às quais se faz referências, conforme se segue:

[024] Na Figura 1 apresenta-se um esquema preferencial de construção do referido genossensor.

[025] Na Figura 2 apresenta-se um espectro PM-IRRAS para monocamada automontada (SAM) de ácido mercaptoacético (MAA) imobilizada em diferentes tempos.

[026] Na Figura 3 apresenta-se o deslocamento da banda ν_{as} (CH₂) em função do tempo de imobilização no espectro PM-IRRAS da monocamada automontada (SAM) de ácido mercaptoacético (MAA).

[027] Na Figura 4 apresenta-se o espectro PM-IRRAS da monocamada automontada (SAM) de ácido mercaptoacético (MAA) e ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) imobilizada em 1 dia e 30 dias.

[028] Na Figura 5 apresentam-se o espectro de PM-IRRAS: (a) Sonda (NH₂-ssDNA) imobilizada sobre MUA em ouro; (b) sequência complementar (ds-DNA) hibridizada na sonda; (c) sequência não complementar (nc-DNA).

[029] Na Figura 6 apresentam-se os ângulos de contato do eletrodo de ouro, para monocamadas automontadas de ácido mercaptoundecanoico (MUA) preparadas em etanol, sonda (NH₂-ssDNA), etanolamina (Et-OH), sequência complementar (ds-DNA) e não complementar (nc-DNA), considerando-se ainda os solventes: água, formamida e diodometano.

[030] Na Figura 7 apresentam-se gráficos de energia de superfície do eletrodo de ouro, monocamadas automontadas (SAM) de MAA preparadas em água e etanol, sonda (NH₂-ssDNA), sequência complementar (ds-DNA) e não complementar (nc-DNA).

[031] Na Figura 8 apresentam-se gráficos de energia de superfície do eletrodo de ouro, monocamadas automontadas (SAM) de MUA preparadas em água e etanol, sonda (NH₂-ssDNA), sequência complementar (ds-DNA) e não complementar (nc-DNA).

[032] Na Figura 9 apresenta-se a diferença do sinal ($|Z| - |Z_0|$) (1 Hz) em função da temperatura de hibridização para a sequência complementar (ds-DNA) (10^{-8} M), do genossensor fabricado com a monocamada de MAA em etanol.

[033] Na Figura 10 apresentam-se os espectros de impedância do genossensor construído com a monocamada automontada de MAA em etanol, sonda (NH₂-ssDNA) e sequência complementar (ds-DNA), para várias concentrações (10^{-9} a 10^{-6} M), em que a temperatura de hibridização foi fixada em 80 °C.

[034] Na Figura 11 apresentam-se os espectros de impedância do genossensor construído com a monocamada

automontada de MAA em etanol, sonda ($\text{NH}_2\text{-ssDNA}$) e sequência não complementar (nc-DNA), para várias concentrações (10^{-9} a 10^{-6} M), em que a temperatura de hibridização foi fixada em $80\text{ }^\circ\text{C}$.

[035] Na Figura 12 apresenta-se a diferença do sinal ($|Z| - |Z_0|$) (1 Hz) em função do logaritmo da concentração da sequência complementar (ds-DNA) e não complementar (nc-DNA), do genossensor fabricado com a monocamada de MAA em etanol.

[036] Na Figura 13 apresentam-se os espectros de impedância do genossensor construído a partir da monocamada automontada de MAA em etanol, sonda ($\text{NH}_2\text{-ssDNA}$) e etanolamina, com diferentes temperaturas de hibridização: 25 , 35 , 40 , $60\text{ }^\circ\text{C}$. Em (a) sequência complementar (ds-DNA) (10^{-8} M) e (b) sequência não complementar (nc-DNA) (10^{-8} M).

[037] Na Figura 14 apresentam-se a diferença do sinal ($|Z| - |Z_0|$) (1 Hz) em função da temperatura de hibridização, da sequência complementar (ds-DNA) e não complementar (nc-DNA), com concentração de 10^{-8} M, respectivamente.

[038] Na Figura 15 apresentam-se os espectros de impedância do genossensor com monocamada automontada de MAA em etanol, sonda ($\text{NH}_2\text{-ssDNA}$) e etanolamina: (a) sequência complementar (ds-DNA) e (b) não complementar (nc-DNA), em que a temperatura de hibridização fixa em $60\text{ }^\circ\text{C}$.

[039] Na Figura 16 apresenta-se a diferença do sinal ($|Z| - |Z_0|$) (1 Hz) em função do logaritmo da concentração da sequência complementar (ds-DNA) e não complementar (nc-DNA), do genossensor fabricado com a monocamada de MAA em etanol, utilizando etanolamina.

[040] Na Figura 17 apresenta-se a diferença do sinal ($|Z| - |Z_0|$) (1 Hz) em função do logaritmo da concentração da

sequência complementar (ds-DNA), do genossensor fabricado com a monocamada de MAA em etanol, utilizando etanolamina e com temperatura de hibridização menor em 5° C.

[041] Na Figura 18 apresenta-se a diferença do sinal ($|Z| - |Z_0|$) (1 Hz) em função do logaritmo da concentração da sequência complementar (ds-DNA) e não complementar (nc-DNA), do genossensor fabricado com a monocamada de MAA em etanol, utilizando etanolamina e com temperatura de hibridização maior em 5° C.

[042] Na Figura 19 apresenta-se a diferença do sinal ($|Z| - |Z_0|$) (1 Hz) em função do logaritmo da concentração da sequência complementar (ds-DNA) e não complementar (nc-DNA), do genossensor fabricado com a monocamada de MAA em etanol, utilizando etanolamina e com temperatura de hibridização maior em 10° C.

[043] Na Figura 20 apresenta-se a diferença do sinal ($|Z| - |Z_0|$) (1 Hz) em função do logaritmo do genossensor fabricado com a monocamada de MAA em etanol, utilizando etanolamina e com temperatura de hibridização igual a $T_m + 10$ ° C.

[044] Na Figura 21 revelam-se os espectros de SFG que foram obtidos da monocamada automontada de ácido mercaptoacético (MAA) imobilizada em diferentes tempos de 1 a 60 dias.

[045] Na Figura 22 revelam-se os espectros de impedância dos genossensores construídos a partir da monocamada automontada de ácido mercaptoundecanoico (AMU) sobre ouro funcionalizado com Probe de MGMT, exposto a diferentes concentrações da sequência complementar (ds-DNA) em (a) e da sequência não complementar (nc-DNA) em (b). Espectros

obtidos em solução contendo $K_3[Fe(CN)_6]$, $K_4[Fe(CN)_6]$ e PBS.

[046] Na Figura 23 representa-se a curva analítica obtida dos espectros de impedância eletroquímica na frequência de 1 Hz, com diferentes concentrações da sequência complementar (ds-DNA) e não complementar (nc-DNA), a partir dos genossensores construídos a partir da monocamada automontada de ácido mercaptoundecanoico (AMU).

[047] Na Figura 24 apresentam-se espectros de impedância dos biossensores construídos a partir da monocamada automontada de AMU em etanol, da sequência complementar (ds-DNA), sequência com 1 base trocada (1b-DNA) e da sequência não complementar (nc-DNA), com 1 μ M.

[048] Na Figura 25 apresenta-se um gráfico da diferença de sinal ($Z-Z_0$) correspondente à hibridização de 1,0 μ M das referidas diferentes sequências de DNA em AMU: complementar (ds-DNA), complementar com 1 base trocada na sequência (1b-DNA) e não-complementar (nc-DNA).

[049] Na Figura 26 apresenta-se o espectro de impedância correspondente à hibridização com 0,2 ng/ μ L de DNA das linhagens de células SCC25, FaDu, JHU28 e HN13 com diferentes percentuais de metilação.

[050] Na Figura 27 apresenta-se o gráfico da diferença de sinal ($Z-Z_0$) correspondente à hibridização com 0,2 ng/ μ L de DNA das linhagens de células SCC25, FaDu, JHU28 e HN13 com diferentes percentuais de metilação.

[051] Na Figura 28 apresenta-se o gráfico com o método de visualização denominado Interactive Document Mapping (IDMAP) obtidos das curvas de impedância versus frequência usando amostras comerciais contendo sequências complementares e não-complementares (controle negativo) com

diferentes concentrações do biomarcador MGMT em solução de PBS.

[052] Na Figura 29 apresenta-se o gráfico de IDMAP obtidos das curvas de impedância versus frequência para amostras de linhagens celulares com diferentes percentuais de metilação das linhagens de células SCC25, FaDu, JHU28 e HN13 em (b).

Descrição detalhada da invenção:

[053] A presente invenção se refere a um genossensor para detecção do biomarcador MGMT, que compreende:

peelo menos um eletrodo (1) recoberto por um filme (2) monocamada automontado com alto grau de organização molecular, em que o filme monocamada é preferencialmente de ácido mercaptoundecanoico (AMU);

uma sonda (3) ssDNA de sequência $[\text{NH}_2\text{-C}_6]\text{-TCGCGGTGCGTATCGTTTGCC}$ funcionalizada no referido filme.

[054] Os referidos filmes (2) são depositados no eletrodo preferencialmente por meio de uma técnica que permita a deposição de uma monocamada automontada, tais como automontagem por adsorção química (SAM), automontagem por adsorção física (LbL) ou técnica de Langmuir-Blodgett (LB), sendo preferencialmente por meio de adsorção química.

[055] A camada contendo moléculas de AMU é depositada na superfície externa do eletrodo, constituído externamente de ouro de maneira preferencial, sendo então posteriormente funcionalizada com uma camada da sonda ssDNA de MGMT, denominada *Probe*, que possui a seguinte sequência: (5'-TCGCGGTGCGTATCGTTTGCC-3') com um grupo amina e uma cadeia de seis carbonos, na extremidade 5' da cadeia. A referida sonda de DNA de fita simples contendo 24 bases foi utilizada

como modelo para a hibridização com uma outra simples fita de DNA sendo complementar à sonda.

[056] A sequência positiva de DNA usada como biomarcador para o gene MGMT chamada ssDNA-MGMT é a (5'-TCGCGGTGCGTATCGTTTGCC-3') e a negativa não complementar ssDNA-NC sem a presença de MGMT foi (5'-CGAGAACTTACGGTCCCCTTA-3'). Uma sequência complementar com 1 base nitrogenada trocada (5'-TCGCGGTGCGGATCGTTTGCG-3') foi usada para verificação do funcionamento e seletividade do genossensor.

[057] O ácido mercaptoundecanoico (AMU) contém 11 átomos de carbono, um grupo tiol e um carboxila, e foi selecionado devido à capacidade de promover ligação covalente com as biomoléculas. Outros produtos usados foram N-etil-N-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) e o ácido mercaptoacético (MAA). Ressalta-se que o MAA, apesar de ser amplamente utilizado para funcionalização, não apresentou condições favoráveis para a construção do referido genossensor, e, a partir destes testes, foi possível definir o ácido mercaptoundecanoico (AMU) como a monocamada preferencial.

[058] Em uma modalidade experimental, a monocamada automontada de AMU foi obtida através da imersão do eletrodo de ouro numa solução contendo cerca de 50×10^{-3} mol/L de AMU durante cerca de 24 h. Os grupos carboxílicos do AMU foram funcionalizados por imersão da monocamada em uma solução contendo cerca de 400×10^{-3} mol/L de EDC e cerca de 100×10^{-3} mol/L de NHS durante cerca de 30 min, a fim de ativar a superfície para a ligação com a *Probe*, descrita previamente.

[059] O referido eletrodo é constituído

preferencialmente de uma camada base de vidro, uma camada intermediária de cromo e uma camada externa de ouro. Essa configuração é importante para facilitar as medidas de impedância eletroquímica, que é o princípio utilizado na presente invenção. A referida camada ultrafina de ouro tem cerca de 20 nm de cromo e 150 nm de ouro.

[060] Uma camada de uma sonda ssDNA (*MGMT Probe*) foi imobilizada em uma monocamada automontada de AMU, que mostrou ser sensível e seletiva para detectar MGMT em solução tampão fosfato salino (controles positivos e negativos de MGMT). Em comparação, por exemplo, com o mesmo tipo de sonda funcionalizado com ácido mercaptoacético, que não apresentou a seletividade adequadas e, além disso, a monocamada automontada de MAA só se organiza adequadamente em um tempo de imobilização de 30 dias ou mais, o que não é viável para a construção de genossensores.

[061] Desse modo, é significativo que o uso de uma sonda ssDNA torne a fabricação do biossensor mais simples do que se uma sequência de RNA fosse empregada, por exemplo, devido à maior estabilidade do ssDNA em comparação às moléculas de RNA. Além disso, ressalta-se que a detecção foi possível com espectroscopia de impedância eletroquímica com limite de detecção de $0,24 \times 10^{-12}$ mol/L.

[062] A referida invenção apresenta vantagens que podem levar à produção em larga escala de biossensores, úteis a públicos variados, e que ainda podem ser utilizados também para prever prognóstico e como biomarcador de monitoramento para os pacientes diagnosticados com câncer de cabeça e pescoço.

[063] A presente invenção prevê ainda que os dados das

medidas eletroquímicas sejam analisados com técnicas de visualização de informação, ou abordagens estatísticas ou computacionais, ou com aprendizado de máquina e inteligência artificial. Esse uso permite distinguir amostras contendo o gene MGMT de outras amostras contendo a sequência negativa e/ou com apenas uma base trocada, como demonstrado pelos testes de concretização.

[064] A técnica de fabricação do referido dispositivo é iniciada pela limpeza do substrato de vidro-cromo recoberto com ouro. Em seguida, o substrato é funcionalizado com uma camada automontada de ácido mercaptoundecanoico (AMU) seguido da funcionalização com o material biológico (ss-DNA).

[065] A adsorção química é o método preferencial utilizado para produção do referido genossensor, e consiste de uma técnica em que as moléculas orgânicas de AMU são imobilizadas ordenadamente sobre a superfície de ouro através ligações covalentes^[8].

[066] A camada automontada é ultrafina, com nanômetros (nm) de espessura, cujas moléculas são imobilizadas devido à ligação química entre o átomo de enxofre contido no AMU e a superfície contendo ouro. Entre os processos sucessivos de imobilização dos materiais, é feita uma lavagem utilizando o solvente de cada etapa, por exemplo, o AMU é preparado em etanol e então, sua etapa de lavagem deve ser realizada preferencialmente com etanol. Os filmes automontados (SAM) são obtidos através da simples imersão da superfície contendo ouro em uma solução contendo o AMU.

[067] O dispositivo contendo a camada de AMU é preferencialmente ativado em uma solução com N-

Hidroxisuccinimida e 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (NHS/EDC). A referida etapa de ativação possibilita a ligação covalente entre o grupo NH_2 da *probe* do DNA do MGMT e a monocamada automontada de AMU. O dispositivo com a monocamada automontada de AMU ativada é imerso em uma solução com moléculas de DNAs em uma solução tampão fosfato.

[068] No que tange à configuração do eletrodo, o material transparente é preferencialmente vidro e o material condutor externo depositado sobre é preferencialmente de ouro, mas pode ser outro tal como platina e prata, ou também de materiais de carbono condutores como nanotubos de carbono de paredes simples ou multiparedes, grafeno, negro de fumo e esferas ocas de carbono.

[069] O genossensor da presente invenção deve ser conectado a um equipamento que faz a medida de impedância eletroquímica monitorando a interação entre as moléculas de DNA na sua superfície, podendo ser um Potenciostato/galvanostato. As medidas mostrarão variação na capacitância ou impedância ou resistência de transferência de carga, ocorridas devido à hibridização das cadeias de DNAs e RNAs na superfície dos biossensores.

[070] A detecção pode ser feita por técnicas eletroquímicas, como espectroscopia de impedância eletroquímica (preferencial) e voltametria cíclica. A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é uma técnica de caracterização eletroquímica e permite estudar o comportamento geral de um sistema quando um número grande de processos intercorrelacionados ocorre em diferentes velocidades.

[071] A EIE é utilizada em ampla gama de estudos, abrangendo desde o transporte eletrônico em dispositivos semicondutores até o estudo de processos cinéticos eletroquímicos das mais diferentes naturezas. Em particular, a EIE serve para caracterização de sistemas eletroquímicos que não se alteram no tempo; em outras palavras, é uma técnica de estado estacionário.

[072] A resposta da aplicação de um pequeno sinal alternado (de corrente alternada, ac), feita em uma ampla faixa de frequências e em vários potenciais, possibilita diferenciar processos com tempos característicos distintos, que na maioria das técnicas tradicionais eletroquímicas seriam vistos como contribuições simultâneas à resposta total.

[073] As técnicas baseadas em medidas eletroquímicas por voltametria cíclica se caracterizam por processos que resultam de reações redox, que possam ocorrer num eletrodo de trabalho nanoestruturado, por efeito da polarização eletroquímica, entre dois valores de potenciais, E_i e E_f . A varredura do potencial é realizada a uma velocidade constante (v). Como resposta da análise, obtém-se uma curva de intensidade de corrente (I) versus potencial aplicado (E). Há uma varredura do potencial a partir de um potencial inicial (E_i) até um potencial final (E_f), regressando ao potencial inicial, obtendo-se assim uma curva I vs. E designada de voltamograma cíclico (VC).

[074] As medidas eletroquímicas da presente invenção foram realizadas em uma célula de vidro termostaticada de 25 mL a 25°C, com configuração para entrada de três eletrodos: a monocamada imobilizada no eletrodo de ouro como eletrodo

de trabalho (área geométrica de $0,9 \text{ cm}^2$), eletrodo de Ag/AgCl (contendo KCl saturado) como eletrodo de referência e um fio de platina ($1,0 \text{ cm}^2$) como contra-eletrodo. Os dados de EIS foram obtidos na faixa de frequência entre $0,1 \text{ Hz}$ e 100 kHz com amplitude de 10 mV e sob condições de circuito aberto em uma solução contendo $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

[075] O referido genossensor foi caracterizado e a adsorção de cada camada na arquitetura do mesmo foi monitorada com espectroscopia de absorção de reflexão infravermelha modulada por polarização (PM-IRRAS) e espectroscopia vibracional por geração de soma de frequência (SFG). Os espectros PM-IRRAS são obtidos em um espectrofotômetro KSV, modelo PMI 550 (KSV Instruments, Finlândia), com resolução espectral de 8 cm^{-1} e com ângulo de incidência de 81° . Os espectros SFG são realizados usando um espectrômetro SFG comercial (Ekspla, Lituânia) com base em um laser $\text{Nd}^{3+}:\text{YAG}$ pulsado (pulso de 25 ps de duração com uma taxa de repetição de 20 Hz).

[076] A presente invenção pleiteia ainda o uso do referido genossensor para a detecção e diagnóstico de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço.

Exemplo de preparação e coleta de dados

[077] Uma monocamada de AMU foi obtida por imersão da superfície de ouro em uma solução contendo 50 mmol/L de AMU por 20 h . Os grupos carboxílicos da monocamada contendo AMU são ativados por imersão da superfície com o filme em uma solução constituída de $0,4 \text{ mol/L}$ de EDC e $0,1 \text{ mol/L}$ de NHS, que prepara a superfície para a ligação com a sonda de DNA de MGMT. Por fim, o biossensor Au/AMU/Probe-MGMT é imerso em

solução contendo 1,0 mmol/L de etanolamina bloqueando possíveis sítios ativos inibindo interações não específicas na superfície do dispositivo.

[078] A detecção do biomarcador MGMT é realizada a partir de soluções de MGMT preparadas com diferentes concentrações, por exemplo entre $1,0 \times 10^{-11}$ e 10^{-6} mol/L, em solução contendo tampão fosfato salino e 1,0 mmol/L de $MgCl_2$. O biossensor foi imerso nas soluções contendo concentrações entre $1,0 \times 10^{-11}$ e $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L de DNA por uma hora a $86^\circ C$ na etapa de hibridização. Após a adsorção do biomarcador sobre a Probe-DNA do biossensor, este foi lavado para remover ou minimizar a adsorção não específica de reagentes. O mesmo protocolo foi usado para as amostras contendo as sequências não-complementares e com uma base trocada.

[079] A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foi a técnica utilizada com o potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 204 equipado com módulo FRA, gerenciado pelo software NOVA. As medidas foram feitas em uma faixa de frequência entre 0,1 Hz e 100 kHz com amplitude de potencial de 10 mV e sob condições de circuito aberto em solução contendo 5,0 mmol/L de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ e tampão fosfato (PBS).

[080] As medidas foram realizadas em um compartimento do tipo cela de vidro termostatizada de 25 mL a $25^\circ C$ configurada para três eletrodos: o biossensor contendo a monocamada automontada de AMU e Probe-DNA formada sobre a superfície de ouro serviu como eletrodo de trabalho (área geométrica de $9,0 \text{ mm}^2$), o eletrodo de referência foi de Ag/AgCl (3 mol/L KCl) e uma folha de platina ($1,0 \text{ cm}^2$) era usada como eletrodo auxiliar. A solução na cela foi mantida sem agitação e sem

borbulhamento de gases antes ou durante a realização das medidas.

Testes de concretização

[081] Os testes de concretização tiveram o intuito de demonstrar a seletividade e sensibilidade do genossensor produzido utilizando o ácido mercaptoundecanoico (AMU) em relação a um genossensor produzido utilizando o ácido mercaptoacético (MAA), de modo a evidenciar a não obviedade da escolha do material para formação da monocamada automontada:

[082] Inicialmente, a partir do espectro de PM-IRRAS para diferentes tempos de imobilização da monocamada automontada (SAM) de ácido mercaptoacético (MAA) (50 mM) em etanol. As amostras foram preparadas em substratos de ouro diferentes para os diversos tempos de imobilização, para que as medidas fossem realizadas no mesmo dia e sob as mesmas condições. Como o MAA é uma molécula pequena, pois possui 2 carbonos e terminação com ácido carboxílico, faz-se necessário observar sua organização molecular para construção de um genossensor, visto que esta é uma característica fundamental para posterior imobilização da sonda de DNA.

[083] Na Figura 2 é possível identificar três bandas características do estiramento dos grupos C-C: estiramento simétrico $\nu_s(\text{CH}_2)$ em 2843 cm^{-1} , estiramento assimétrico $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ em 2912 cm^{-1} e estiramento assimétrico $\nu_{as}(\text{CH}_3)$ em 2954 cm^{-1} . Há uma mudança na banda em 2912 cm^{-1} para menores números de onda na Figura 3, em função do aumento do tempo de imobilização, o que indica aumento da organização do MAA a partir de 30 dias de imobilização. Entre as moléculas

adsorvidas no substrato, há interações de van der Waals nas cadeias de hidrocarboneto, que induzem organização das moléculas fazendo com que a monocamada se torne mais compacta.

[084] Pela figura 4 é possível avaliar os espectros PM-IRRAS da monocamada automontada (SAM) de ácido mercaptoacético (MAA) e ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) ambos (50 mM) em etanol. Para o ácido mercaptoundecanoico (MUA) o tempo de imobilização e organização da molécula é superior a 20 h, sendo que se utilizou o tempo de 24h. A banda referente ao estiramento assimétrico $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ em 2912 cm^{-1} , relacionada à organização da monocamada, coincide para MAA em 30 dias e MUA em 1 dia. Ou seja, 1 dia de imobilização do MUA é suficiente para obter uma monocamada aderida e organizada sobre o substrato de ouro, ao contrário de pelo menos 30 dias para o MAA.

[085] A partir da figura 5 verificam-se os espectros de PM-IRRAS dos DNAs imobilizados sobre o MUA na região de 1600 a 1800 cm^{-1} . O espectro da sonda (NH_2 -ssDNA) é mostrado no gráfico (a), enquanto no gráfico (b) traz-se o espectro da sequência complementar (ds-DNA) hibridizada na sonda, e no gráfico (c) está o espectro para a sequência não complementar (nc-DNA). Os três espectros apresentaram as mesmas 4 bandas, em 1622 , 1646 , 1694 e 1745 cm^{-1} . A banda em 1622 cm^{-1} é atribuída à flexão do NH_2 da guanina, a de 1646 cm^{-1} é atribuída à deformação do anel (estiramento $\text{C}=\text{N}$) da citosina e as bandas em 1694 e 1745 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento de carbonila da timina (BREWER et al., 2002).

[086] Uma forma de diferenciar esses espectros é verificar a área das bandas. Para isso fez-se a deconvolução

das bandas, a partir da qual se obteve a largura de banda, área e posição, conforme a **Tabela 1**. A área das 4 bandas para a sequência complementar (ds-DNA) é menor que a obtida para a sonda e sequência não complementar. Isso ocorre devido à formação dos pares de bases (A-T, C-G) com ligações de hidrogênio. O movimento de flexão de NH₂ da adenina torna-se mais restrito no par de bases e, portanto, a energia do movimento de NH₂ aumenta. A frequência de estiramento da carbonila da timina na ligação de hidrogênio no par de bases A-T diminuiu após a formação do par de bases, devido à diminuição da constante da força de C-O com a ligação de hidrogênio. As áreas sob os espectros para a sonda e sequência não complementar são próximas, o que significa não ter ocorrido hibridização da sequência não complementar.

Tabela 1: Parâmetros de área e largura de banda das bandas com deconvolução dos espectros de PM-IRRAS da Figura 5

Banda	Sonda	W (largura da banda)	A (área)	Posição (cm ⁻¹)
1	NH ₂ -ssDNA	18,23 ± 3,84	0,25 ± 0,09	1621
	ds-DNA	14,10 ± 4,01	0,09 ± 0,04	1622
	nc-DNA	14,40 ± 4,20	0,16 ± 0,08	1622
2	NH ₂ -ssDNA	29,52 ± 3,82	0,95 ± 0,12	1646
	ds-DNA	24,23 ± 3,32	0,48 ± 0,06	1647
	nc-DNA	24,57 ± 3,94	0,75 ± 0,12	1646
3	NH ₂ -ssDNA	37,38 ± 3,88	0,93 ± 0,08	1694
	ds-DNA	35,21 ± 4,66	0,49 ± 0,05	1694
	nc-DNA	35,40 ± 4,34	1,00 ± 0,10	1694
4	NH ₂ -ssDNA	33,71 ± 1,68	1,27 ± 0,07	1745
	ds-DNA	26,67 ± 1,52	0,61 ± 0,04	1745
	nc-DNA	28,81 ± 1,88	1,06 ± 0,07	1745

[087] Foi medido ainda o ângulo de contato em todas as etapas de construção do genossensor, de modo que na construção com o ácido mercaptoundecanoico foi utilizado o solvente etanol, estando os referidos valores representados na Figura 6. O MUA possui uma parte polar (grupo carboxila) e outra parte apolar (cadeia carbônica). Quanto maior a parte apolar da cadeia, mais insolúvel em água será a substância, e, por isso, ácidos carboxílicos com mais de 10 carbonos não são solúveis em água, que é o caso do MUA, que possui 11 carbonos. Nos filmes produzidos o MUA apresentou característica de superfície com menor hidrofiliçidade, com valores elevados de ângulo de contato. A sonda (NH_2 -ssDNA) é apolar devido às bases nitrogenadas estarem expostas, apresentando característica hidrofóbica e o ângulo de contato menor que para o MUA.

[088] A estrutura do DNA é formada por um grupo fosfato e açúcar, sendo polar, enquanto sua parte interior (bases nitrogenadas A, T, C, G) é apolar. Assim, o ângulo de contato para sonda (NH_2 -ssDNA) e para a sequência não complementar (nc-DNA) foi característico de superfícies com menor hidrofiliçidade, pois as bases nitrogenadas estavam expostas na superfície (ZHANG et al., 2008). Ao contrário, para a sequência complementar (ds-DNA) apenas os grupos fosfatos estavam expostos, gerando comportamento mais hidrofílico (JAISWAL et al., 2018).

[089] A energia de superfície é definida como aumento da energia livre do sistema por unidade de área superficial criada, ou seja, é o trabalho reversível requerido para aumentar a superfície por unidade de área. Esse é o trabalho de adesão, relacionado com a interação entre as superfícies

em contato. Quanto maior a energia de superfície maior será a adesão.

[090] Na Figura 7 e 8 é mostrada a energia de superfície, calculada segundo o modelo de Owens-Wendt-Rabel-Kaelble (OWENS; WENDT, 1969), para diferentes modificações no eletrodo de ouro. Foram preparados eletrodos com monocamada automontada com ácido mercaptoacético em água e etanol, e com ácido mercaptoundecanoico somente em etanol. Os eletrodos continham NH₂-ssDNA, NH₂-ssDNA/ds-DNA (sequência complementar) e NH₂-ssDNA/nc-DNA (sequência não complementar). A energia de superfície da monocamada automontada para o ácido mercaptoacético (MAA) preparada em etanol foi maior que MAA preparada em água. Isso significa que a MAA em etanol melhora a adesão superficial e a imobilização da sonda (NH₂-DNA).

[091] Considerando a imobilização com AMU, verifica-se pela figura 8 que a energia de superfície para a sonda e sequência complementar foi maior que para outras moléculas, o que significa que as moléculas tiveram maior adesão, conseqüentemente, melhor imobilização em comparação com a monocamada automontada de MAA em etanol.

[092] Na tentativa de obter seletividade dos genossensores foram estudadas otimizações dos parâmetros de fabricação dos mesmos, tomando como meta obter a máxima variação da impedância eletroquímica quando é alterada a concentração da sequência complementar.

[093] Foram considerados os parâmetros temperatura e tempo de hibridização das sequências complementar (ds-DNA) e não complementar (nc-DNA), usando como método de detecção a impedância eletroquímica. Essas medidas foram realizadas

em 5 mM de ferrocianeto e ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$) em PBS/MgCl₂ (1 mM). Os eletrodos foram preparados com MAA em etanol (50 mM).

[094] Foram utilizadas diferentes temperaturas (25 °C a 80 °C) de hibridização para a sequência complementar (ds-DNA) em concentração de 10⁻⁸ M. O tempo de exposição para cada temperatura foi de 30 min, sendo que eram deixados mais 30 min para esfriar depois.

[095] A partir da figura 9 nota-se que o espectro da impedância da sequência ds-DNA começou a se distinguir do espectro da sonda a partir de 45 °C, com a impedância aumentando com a temperatura até 80 °C. A diferença do sinal da sequência complementar (ds-DNA), em diferentes temperaturas de hibridização, menos o sinal da sonda (NH₂-ssDNA) em 1 Hz mostra que a variação na impedância aumenta com a temperatura, indicando que, das temperaturas testadas, a de 80 °C leva a resultados com melhor distinção entre a sonda (fita simples) e a sequência complementar (ds-DNA) hibridizada (dupla hélice). No entanto, não foram usadas temperaturas maiores do que 80 °C, pois o grande tempo de exposição em altas temperaturas poderia degradar a sequência de DNA.

[096] A partir destes resultados anteriores foram determinados possíveis parâmetros para obter um desempenho otimizado para os genossensores baseados em ácido mercaptoacético (MAA), desse modo, os seguintes parâmetros foram utilizados:

i) matriz com monocamada SAM de MAA obtida com 50 mM em etanol com tempo de adsorção de 1 dia.

ii) tempo de deposição da sonda (NH₂-ssDNA) de 2h em 1 µM em PBS/MgCl₂ (1 mM).

iii) temperatura de 80°C para os experimentos de detecção, com tempo de exposição para hibridização de 30 min.

[097] Os espectros de impedância para diferentes concentrações da sequência complementar (ds-DNA) são mostrados na Figura 10, em que se observa claro deslocamento do espectro para maiores impedâncias com o aumento da concentração de ds-DNA. Isso significa que o genossensor está diferenciando a sequência hibridizada (dupla fita) da sonda (fita simples).

[098] Com o mesmo procedimento foram obtidos espectros para genossensores expostos a diferentes concentrações da sequência não complementar (nc-DNA). Como mostra a Figura 11, o resultado não foi o esperado, pois os espectros também dependeram da concentração. Ou seja, houve diferenciação da sequência não complementar, assim como havia sido observado com a sequência complementar.

[099] O insucesso nas medidas de sensoriamento pode ser visto numa comparação dos dados de impedância na frequência de 1 Hz, de modo que, a Figura 20 ressalta a diferença de impedância entre a sequência complementar (ds-DNA) e a sonda (NH₂-ssDNA) em 1 Hz, que aumenta com a concentração praticamente da mesma forma do que se observa para a sequência não complementar (nc-DNA). Em suma, não houve seletividade nesse genossensor funcionalizado com ácido mercaptoacético, pois a sequência não complementar apresentou aumento na impedância, o que não era esperado.

[100] Com intuito de melhorar a seletividade do referido genossensor, foi usada a etanolamina como bloqueador de

possíveis sítios ativos e como espaçador para a sonda (NH_2 -ssDNA). O genossensor foi preparado com os mesmos parâmetros dos experimentos anteriores, MAA (50 mM em etanol), sonda (NH_2 -ssDNA) e 1 μM em PBS/ MgCl_2 (1 mM). A etanolamina foi preparada em água ultrapura com 1 mM por 1 hora de imobilização. Neste experimento variou-se a temperatura de hibridização de 25 °C a 60 °C, para a sequências complementar (ds-DNA) e não complementar (nc-DNA) ambos com 10^{-8} M.

[101] Na Figura 13 (a) verifica-se um aumento de sinal com o aumento da temperatura de hibridização, indicando melhor distinção das sequências (NH_2 -ssDNA e ds-DNA). Na Figura 13(b) estão os espectros da sequência não complementar (nc-DNA) para diferentes temperaturas, onde se pode notar que a distinção das sequências não é tão clara como na Figura 13(a). Ainda assim, mesmo sem ligações específicas da sonda, a impedância variou com relação à referência, que é o espectro para o genossensor com etanolamina e concentração nula da sequência.

[102] Na Figura 14 mostra-se a alteração na impedância das sequências analisadas ($|Z|$) e da sonda/Etanolamina ($|Z_0|$), com diferentes temperaturas de hibridização. Observa-se que para temperaturas menores (25, 35 e 40 °C) não houve seletividade do genossensor, ou seja, não distinguiu o que é a sequência complementar da sequência não complementar. No entanto, para 60 °C houve uma variação maior entre as sequências, indicando que possivelmente a seletividade do genossensor com MAA seria melhor para temperaturas mais altas.

[103] A partir desse último experimento, havia a expectativa de que a seletividade pudesse ser melhorada com

a deposição de etanolamina para diminuir a adsorção não específica, se for usada uma alta temperatura. Empregando, assim, 60 °C nos experimentos de hibridização, foram obtidos os espectros para concentrações da sequência complementar e não complementar, variando de 10^{-9} a 10^{-6} M.

[104] Os resultados da figura 15 mostram que a dependência com a concentração é até maior para a sequência não complementar. Isso quer dizer que o genossensor não foi seletivo, a despeito de a variação na impedância ter sido maior para a sequência complementar.

[105] A falta de seletividade é melhor ilustrada nos gráficos de alteração na impedância da sequência ($|Z|$) com relação à referência da sonda/etanolamina ($|Z_0|$) em 1 Hz da Figura 16. A diferença de $|Z| - |Z_0|$ na impedância foi maior para a sequência complementar, porém a variação com a concentração foi menor, o que é visto como uma inclinação menor na dependência com a concentração.

[106] Algumas outras tentativas foram feitas para obter genossensores seletivos, alterando-se parâmetros de manuseio das sequências de DNA. Segundo as informações (DataSheet) da Sigma-Aldrich sobre a sequência complementar, a temperatura de fusão (T_m) dessa sequência é 76,8 °C. Utilizando-se como referência PCR Cycling Parameters-Six Key Considerations for Success (Parâmetros de Ciclo de PCR -Seis Principais Considerações para o Sucesso) no site da ThermoFisher (THERMOFISHER, 2019) verifica-se que a temperatura de hibridização deve ser preferencialmente igual a T_m menos 5 °C. Foram, então, realizados experimentos nessas condições, com temperatura de hibridização de 71,8 °C ($T_m - 5$ °C).

[107] Os dados da figura 17 indicam que não houve

adsorção da sonda na SAM, e para a sequência complementar não houve distinção com o aumento da concentração, de modo a indicar uma dependência não monotônica, ou seja, não foi possível obter detecção utilizando-se a temperatura de hibridização acima mencionada.

[108] Por conseguinte, em outro experimento, utilizou-se uma temperatura de hibridização 5 °C a mais do que a T_m (ou seja, utilizou-se 81,8 °C). A princípio não houve uma mudança significativa dos espectros considerando as etapas de construção do genossensor, e os resultados da figura 18 corroboram que, nessas condições o genossensor não distinguiu a concentração, e nem as sequências como esperado, visto que se observa uma alteração na impedância maior para a sequência não complementar.

[109] Mantendo-se as condições do experimento anterior, a temperatura de hibridização foi alterada para $T_m + 10$ °C, ou seja 86,8 °C, e um indicio de seletividade foi indicado pela alteração do espectro de ds-DNA para cada concentração, ao contrário do que ocorreu com nc-DNA. No entanto, a partir da figura 19, apesar de se notar maior diferença para a sequência complementar, a sensibilidade parece ser extremamente baixa, com alteração de impedância de aproximadamente 1k Ω .

[110] Desse modo, para confirmar se esse genossensor estava realmente funcionando, repetiu-se o experimento anterior com $T_m + 10$ °C (86,8 °C) e todas as outras condições e comprovou-se que os espectros não são distintos para as diferentes concentrações da sequência complementar, de modo que os resultados não são reprodutíveis. Na Figura 20, evidencia-se a falta de reprodutibilidade visto que, a

variação na impedância não aumenta com a concentração da sequência complementar.

[111] A partir da análise de todos estes experimentos e resultados, identificou-se que os genossensores não são eficazes com a metodologia e arquitetura molecular utilizadas (MAA). Como várias condições de hibridização foram tentadas sem sucesso, restou verificar se o problema não estaria no filme automontado, pois sabe-se que a organização das biomoléculas (neste caso a sequência de DNA) deve ser adequada para que a hibridização seja eficiente.

[112] Com isso, duas iniciativas foram tomadas: realizar experimentos de SFG para verificar a organização da sequência de prova, e proceder com uma alteração do material do filme automontado. Os resultados de SFG da Figura 21 confirmaram que a organização da monocamada SAM de MAA não era adequada. Por isso, passou-se a empregar um ácido correspondente com cadeia maior, o ácido mercaptoundecanoico (MUA), levando a resultados promissores para a fabricação do genossensor da presente invenção.

[113] Na Figura 21 revelam-se espectros de SFG para as amostras de MAA com diferentes tempos de imobilização (1 a 60 dias) em etanol. As amostras foram preparadas em substratos de ouro diferentes, para que as medidas fossem realizadas no mesmo dia. Nas amostras com 30 e 60 dias observou-se uma banda em 1250 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação C-O do grupo (SONG; LIU; HE, 2008).

[114] Para que apareça um sinal no SFG é necessário que haja orientação média resultante das moléculas, o que pode ser observado apenas nas amostras com mais de 30 dias de imobilização. Nas amostras com menos tempo de imobilização

(1, 7, e 14 dias) não se observou sinal no SFG, devido à orientação aleatória do MAA.

[115] Os resultados de SFG para os filmes de MAA foram cruciais para explicar as falhas nas tentativas de obter genossensores eficazes com MAA, de modo que um técnico no assunto não saberia da ineficiência do MAA sem os experimentos tais como PM-IRRAS e SFG, que podem ser excepcionais para triagem de materiais e condições de fabricação de genossensores.

[116] A caracterização eletroquímica foi usada para investigar a imobilização da sonda (NH_2 -ssDNA) e a hibridização das sequências complementar (ds-DNA) e não complementar (nc-DNA). Essas medidas foram realizadas em 5 mM de ferrocianeto e ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) em PBS/ MgCl_2 (1 mM). Os eletrodos foram preparados com diferentes plataformas (SAM), usando MUA (50 mM) em etanol, ambos imobilizados por 1 dia. Ressalta-se que, quando esses experimentos foram executados, ainda não se sabia que para o MAA um dia não era suficiente para ter uma organização da monocamada e que 30 dias seriam inviáveis considerando-se uma aplicação industrial do mesmo.

[117] Os espectros de impedância eletroquímica da Figura 22 se referem aos sensores construídos com a monocamada automontada de ácido mercaptoundecanoico (MUA), com diferentes concentrações de sequência complementar (ds-DNA) e não complementar (nc-DNA) (10^{-11} a 10^{-6} M): a) mostra o espectro de impedância para a sequência complementar, em que a impedância aumenta com a concentração devido à hibridização da sequência complementar com a sonda; b) mostra espectros da sequência não complementar para diferentes concentrações,

em que a impedância variou pouco, com valor próximo da impedância para etanolamina (6,97 k Ω em 1 Hz). Ou seja, há apenas um pouco de adsorção.

[118] Foi estudado ainda o comportamento da hibridização da sequência complementar (ds-DNA) e não complementar (nc-DNA) com diferentes concentrações, entre 10^{-11} a 10^{-6} M. Esse teste foi realizado por impedância eletroquímica em 5 mM de ferrocianeto e ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$) em PBS/MgCl₂ (1 mM). Os espectros foram analisados na frequência de 1 Hz, obtendo a diferença do sinal da sequência-controle menos o sinal NH₂-ssDNA/Etanolamina ($|Z| - |Z_0|$).

[119] Na Figura 23 apresenta-se a diferença de sinal em função do log da concentração para o genossensor construído com MUA, pois foi a plataforma que obteve melhor distinção das sequências de DNA. Após a hibridização, as medidas de impedância eletroquímica mostraram aumento do sinal em função do aumento da concentração da sequência complementar (ds-DNA). Quando a sonda (NH₂-ssDNA) hibridiza com a sequência complementar, forma-se uma estrutura de dupla hélice deixando expostos os grupos fosfato eletronegativos na superfície. Isso dificulta a espécie $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ atingir o eletrodo devido à repulsão eletrostática, aumentando a impedância.

[120] Em outro eletrodo foi analisada a sequência não complementar (nc-DNA), que apresentou um sinal independente (não variável) da concentração. A curva analítica é linear com o logaritmo da concentração de ssDNA, enquanto alterações insignificantes foram observadas para o nc-DNA. Para NH₂-ssDNA, a faixa de concentração linear entre $1,0 \times 10^{-11}$ e $5,0$

$\times 10^{-8}$ M e entre $1,0 \times 10^{-8}$ e $1,0 \times 10^{-6}$ M pode ser ajustada com a equação de regressão $(|Z|-|Z_0|) = 199.150,21 + 15.772,64 \log C$ e $(|Z|-|Z_0|) = 517.319,07 + 54.125,61 \log C$, em que C é a concentração de ssDNA. O limite de detecção é de 0,24 e 277×10^{-12} M, correspondente a cada faixa linear, estimada usando $LOD = 3SD / \theta$, sendo θ a inclinação e SD o desvio padrão da regressão linear. Foram realizadas três medidas para cada concentração de DNA e calculado o desvio padrão.

[121] O teste de seletividade para o genossensor foi feito com a plataforma contendo a monocamada automontada de MUA, para diferentes sequências de DNA, sequência complementar (ds-DNA), 1 base trocada (1b-DNA) e a sequência não complementar (nc-DNA), com parâmetros de impedância iguais aos do teste de hibridização.

[122] Foram analisados os espectros de impedância de cada sequência com concentração de 1 μ M (Figura 24), comparando a diferença do sinal das sequências controle e o sinal da última etapa de preparação do sensor (NH_2 -ssDNA / Etanolamina) ($|Z|-|Z_0|$).

[123] A partir da figura 25 verifica-se a diferença do sinal de impedância das diferentes sequências em 1 Hz. A sequência complementar (ds-DNA) gerou maior sinal do que as outras sequências, mostrando que houve hibridização das duas fitas. A sequência 1b-DNA tem a mesma sequência de bases da ds-DNA, porém uma base central é diferente. Isso significa que uma base não é complementar à sonda NH_2 -ssDNA, havendo assim uma hibridização parcial, e o sinal é então menor que aquele do ds-DNA.

[124] Nos experimentos anteriores relativos ao

genssensor da presente invenção, fabricado com ácido mercaptoundecanoico (AMU), foi analisada a detecção com amostras sintéticas a partir da plataforma com AMU, imobilizando a sonda e etanolamina como espaçador e bloqueador de sítios ativos. Como os resultados foram positivos, com distinção entre diferentes concentrações da sequência específica, pode-se agora verificar a possibilidade de detecção em amostras de células.

[125] Foram usadas as linhagens celulares HN13 (97%), JHU28 (93%), Fadu (3%), SCC25 (2%) com diferentes graus de metilação, em que o valor entre parênteses denota a porcentagem de metilação. Foi utilizada apenas uma concentração de 0,2 ng/ μ L de DNA, pois existe uma limitação do volume das amostras fornecidas e a quantidade suficiente para cobrir a área ativa dos eletrodos.

[126] Na Figura 26 é possível verificar os espectros de impedância dos DNAs metilados hibridizados na sonda. A impedância aumentou com o grau de metilação, pois quanto maior a quantidade de citosina metilada a sequência se aproxima da sequência complementar (ds-DNA) discutida até agora. Isso acontece porque os DNAs metilados passam por um tratamento com bissulfito de sódio que converte as citosinas não metiladas em uracilas, mantendo as citosinas metiladas em citosina.

[127] Na Figura 27 apresenta-se a diferença do sinal de impedância dos DNAs metilados e a sonda (NH₂-ssDNA/Etanolamina) ($|Z| - |Z_0|$) em 1 Hz. A amostra com maior porcentagem de metilação (HN13) com 97% gerou o maior sinal, pois é a sequência complementar à sonda, ocorrendo hibridização. A amostra com menor porcentagem de metilação

(SCC25), com 2%, proporcionou o menor sinal, o que era esperado pois é a sequência não complementar à sonda. As medidas foram feitas em triplicata para cada concentração de DNA e calculado o desvio padrão.

[128] O desempenho ótimo dos genossensores de AMU é comprovado pelos dados da Figura 28, através da projeção das curvas de módulo da impedância versus frequência por IDMAP. Observa-se clara distinção entre as amostras com diferentes concentrações de DNA com a sequência complementar (ds-DNA) e não complementar (nc-DNA).

[129] O coeficiente de silhueta para o mapa da Figura 28 é 0,359, um valor relativamente baixo, pois a distinção completa levaria a um coeficiente igual a 1. Isso ocorre porque amostras com respostas eletroquímicas muito diferentes entre si foram colocadas no mapa, de maneira que as amostras da mesma classe (por exemplo, as amostras sintéticas com tampão PBS) ficaram próximas.

[130] As amostras de linhagens celulares com diferentes porcentagens de metilação da Figura 29 tiveram seus símbolos representativos separados, com amostras com alto grau de metilação (JHU28 e HN13) distantes das do sinal PBS. Pode-se inferir, portanto, que a distinção deve ser mais eficiente se forem visualizados dados de amostras da mesma classe. De fato, para os dados das células apenas, o mapa da Figura 29 tem coeficiente de silhueta de 0,783, confirmando a capacidade de distinção das amostras de diferentes graus de metilação com o referido genossensor.

[131] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas

no escopo das reivindicações anexas.

[132] Referências:

1. F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *Ca-Cancer J Clin*, 68 (2018) 394-424;
2. A.L.S. Galbiatti, J.A. Padovani, J.V. Maniglia, C.D.S. Rodrigues, E.C. Pavarino, E.M. Goloni-Bertollo, Head and neck cancer: causes, prevention and treatment, *Braz J Otorrinolar*, 79 (2013) 239-247;
3. J.C. Soares, A.C. Soares, P.A.R. Pereira, V.D. Rodrigues, F.M. Shimizu, M.E. Melendez, C.S. Neto, A.L. Carvalho, F.L. Leite, S.A.S. Machado, O.N. Oliveira, Adsorption according to the Langmuir-Freundlich model is the detection mechanism of the antigen p53 for early diagnosis of cancer, *Phys Chem Chem Phys*, 18 (2016) 8412-8418;
4. H. Fayazfar, A. Afshar, M. Dolati, A. Dolati, DNA impedance biosensor for detection of cancer, TP53 gene mutation, based on gold nanoparticles/aligned carbon nanotubes modified electrode, *Anal Chim Acta*, 836 (2014) 34-44;
5. T. Wink, S.J. vanZuilen, A. Bult, W.P. vanBennekom, Self-assembled monolayers for biosensors, *Analyst*, 122 (1997) R43-R50;
6. G. Decher, J.D. Hong, Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process .1. Consecutive Adsorption of Anionic and Cationic Bipolar Amphiphiles on Charged Surfaces, *Makromol Chem-M Symp*, 46 (1991) 321-327;

7. O.N.d.O. Junior, Langmuir-Blodgett Films - Properties and Possible Applications, Brazilian Journal of Physics, 22 (1992) 10;
8. M.C. Canbaz, C.S. Simsek, M.K. Sezginurk, Electrochemical biosensor based on self-assembled monolayers modified with gold nanoparticles for detection of HER-3, Anal Chim Acta, 814 (2014) 31-38;
9. L.E. Johannessen, P. Brandal, T.A. Myklebust, S. Heim, F. Micci, I. Panagopoulos, MGMT Gene Promoter Methylation Status - Assessment of Two Pyrosequencing Kits and Three Methylation-specific PCR Methods for their Predictive Capacity in Glioblastomas, Cancer Genom Proteom, 15 (2018) 437-446;
10. A.K. Braczynski, D. Capper, D.T.W. Jones, J. Schittenhelm, D. Stichel, A. von Deimling, P.N. Harter, M. Mittelbronn, High density DNA methylation array is a reliable alternative for PCR-based analysis of the MGMT promoter methylation status in glioblastoma, Pathology - Research and Practice, 216 (2020) 152728;
11. E. Povedano, E. Vargas, V.RV Montiel et al. Electrochemical affinity biosensors for fast detection of gene-specific methylations with no need for bisulfite and amplification treatments. Sci Rep 8, 6418 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24902-1>;
12. A. C. Soares, J. C. Soares, V. C. Rodrigues et. al. Microfluidic-Based Genossensor To Detect Human Papillomavirus (HPV16) for Head and Neck Cancer. ACS Applied Materials & Interfaces 2018 10 (43), 36757-36763. DOI: 10.1021/acsami.8b14632;

13. BREWER, S. H. et al. Detection of DNA Hybridization on Gold Surfaces by Polarization Modulation Infrared Reflection Absorption Spectroscopy. *Langmuir*, v. 18, n. 11, p. 4460 4464, maio 2002;
14. JAISWAL, N. et al. Electrochemical genossensor based on carboxylated graphene for detection of water borne pathogen. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 275, p. 312 321, dez. 2018;
15. ZHANG, J. et al. DNA Sensing by Silicon Nanowire: Charge Layer Distance Dependence. *Nano Letters*, v. 8, n. 4, p. 1066 1070, abr. 2008;
16. OWENS, D. K.; WENDT, R. C. Estimation of the surface free energy of polymers. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 13, n. 8, p. 1741 1747, ago. 1969;
17. THERMOFISHER. PCR Cycling Parameters Six Key Considerations for Success. Disponível em: https://www.thermofisher.com/br/en/home/lifescience/cloning/cloning_learning_center/invitrogen_school_of_molecular_biology/pcrreducation/pcr_reagents_enzymes/pcr_cycling_considerations.html;
18. SONG, R.; LIU, Y.; HE, L. Synthesis and characterization of mercaptoacetic acid modified ZnO nanoparticles. *Solid State Sciences*, v. 10, n. 11, p. 1563 1567, nov. 2008.

REIVINDICAÇÕES

1) GENOSSENSOR DE DNA PARA DETECÇÃO DO BIOMARCADOR MGMT, **caracterizado por** compreender:

pelo menos um eletrodo (1) recoberto por um filme (2) monocamada automontado, em que o filme monocamada é preferencialmente de ácido mercaptoundecanoico (AMU); e

uma sonda (3) ssDNA de sequência [NH₂-C6]-TCGCGGTGCGTATCGTTTGCC funcionalizada no referido filme.

2) GENOSSENSOR, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o eletrodo é preferencialmente constituído de uma camada base de vidro, uma camada intermediária de cromo e uma camada externa de ouro.

3) GENOSSENSOR, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que a camada externa também pode ser de prata ou platina.

4) GENOSSENSOR, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de os sítios ativos da sonda (3) serem opcionalmente bloqueados pela adição de etanolamina.

5) GENOSSENSOR, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de ter limite de detecção de $0,24 \times 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$.

6) GENOSSENSOR, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de os filmes (2) serem depositados preferencialmente por automontagem por adsorção química (SAM).

7) GENOSSENSOR, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de compreender ainda um elemento transdutor (4).

8) GENOSSENSOR, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de o elemento transdutor (4) ser

baseado preferencialmente em medidas de impedância eletroquímica.

9) GENOSENSOR, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de as medidas de impedância eletroquímica variarem de acordo com o grau de metilação do biomarcador.

10) USO do genossensor, conforme definido nas reivindicações de 1 a 9, **caracterizado** por ser para detecção precoce de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço.

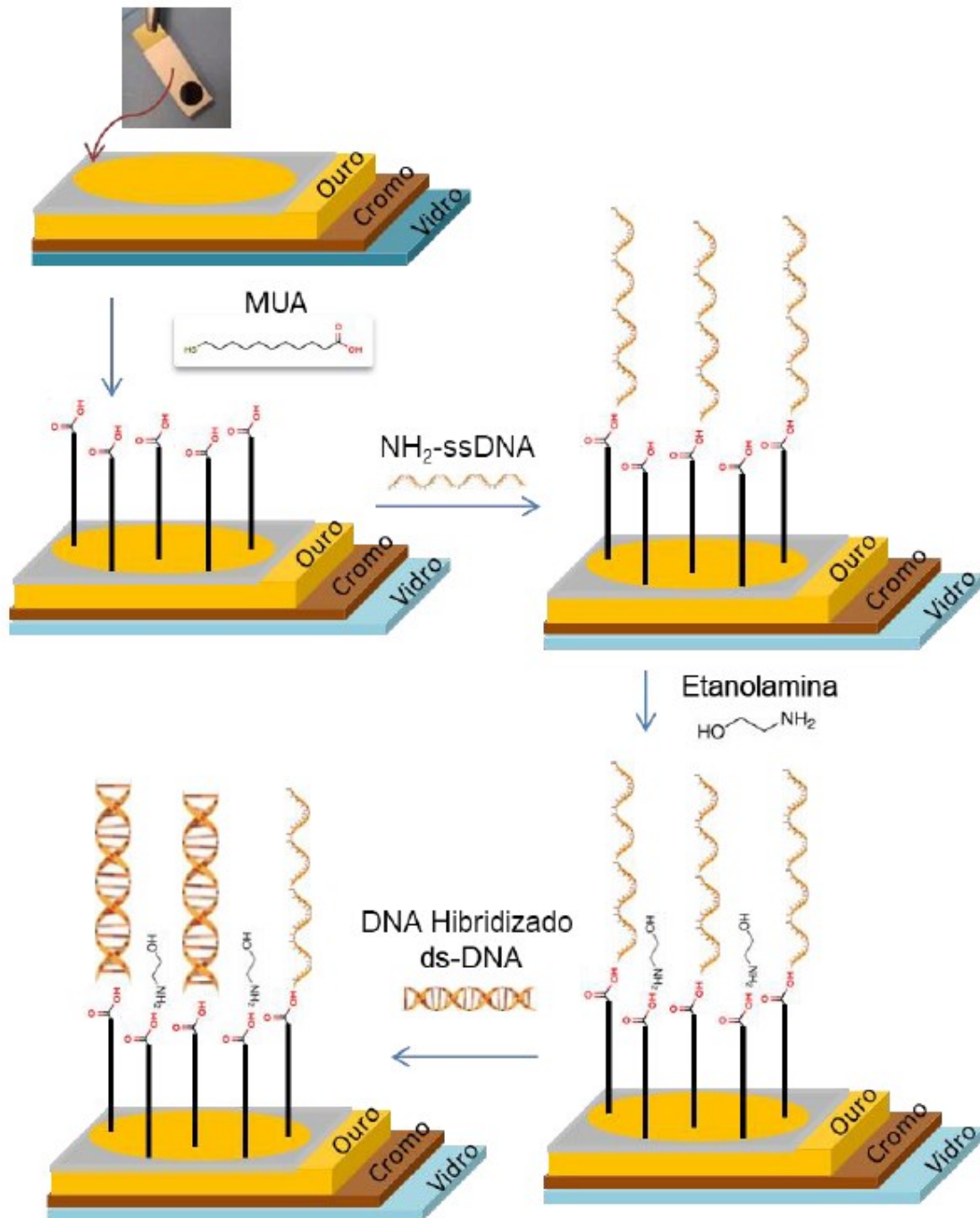


Figura 1

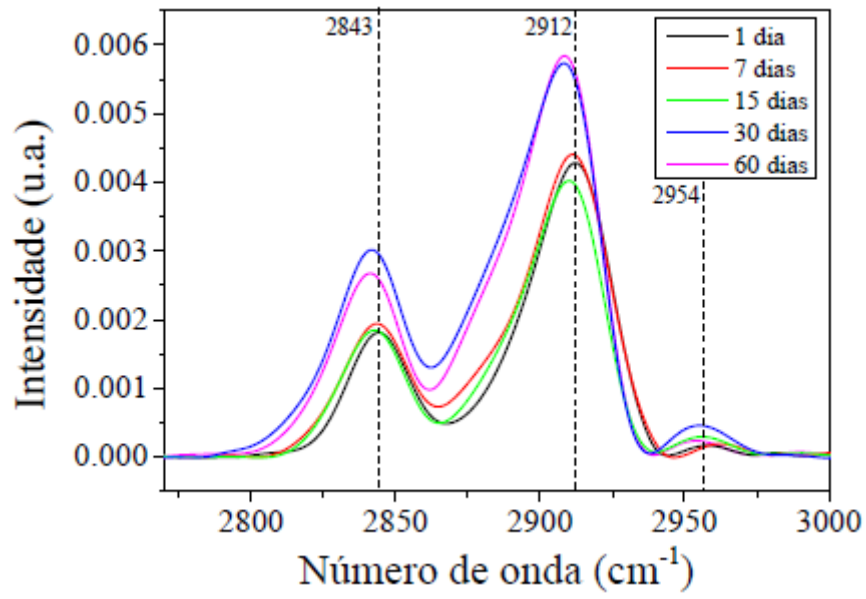


Figura 2

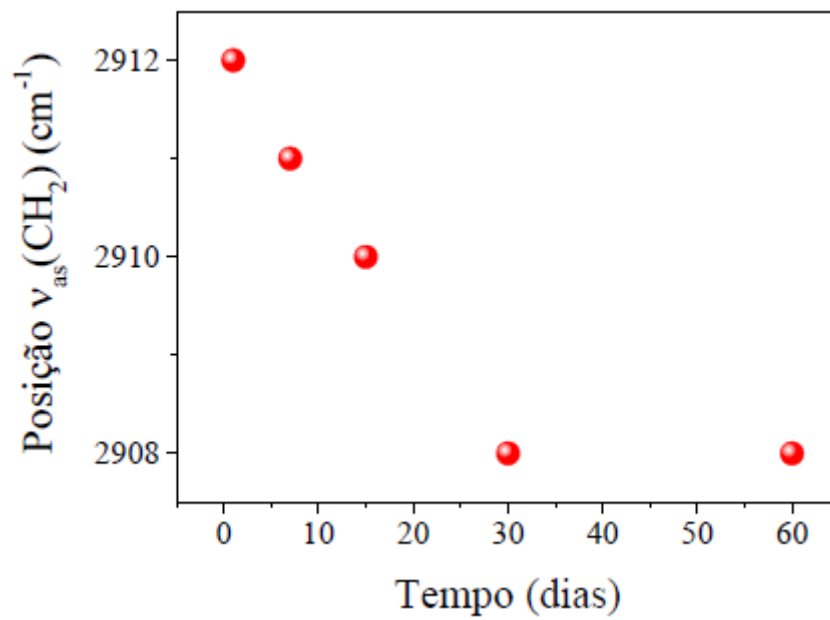


Figura 3

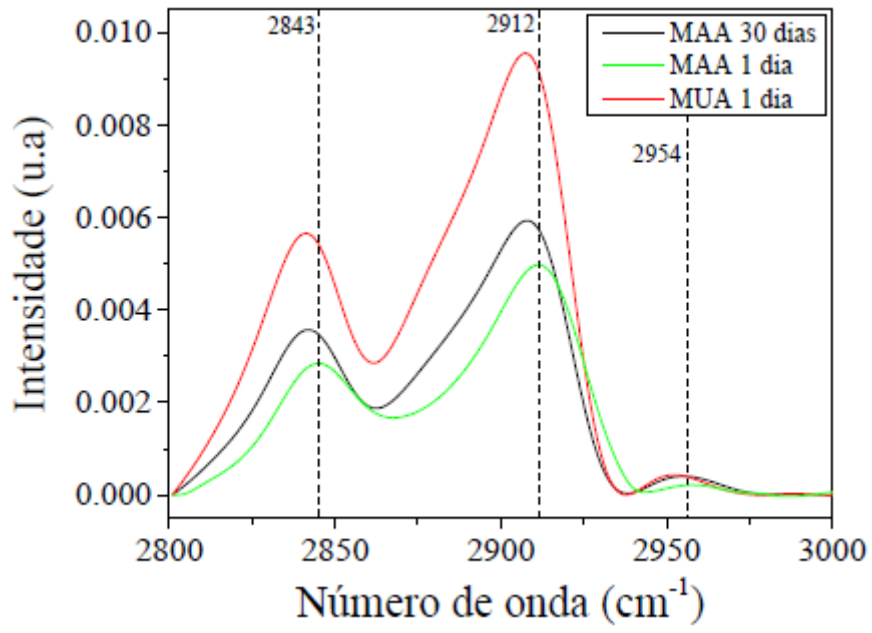


Figura 4

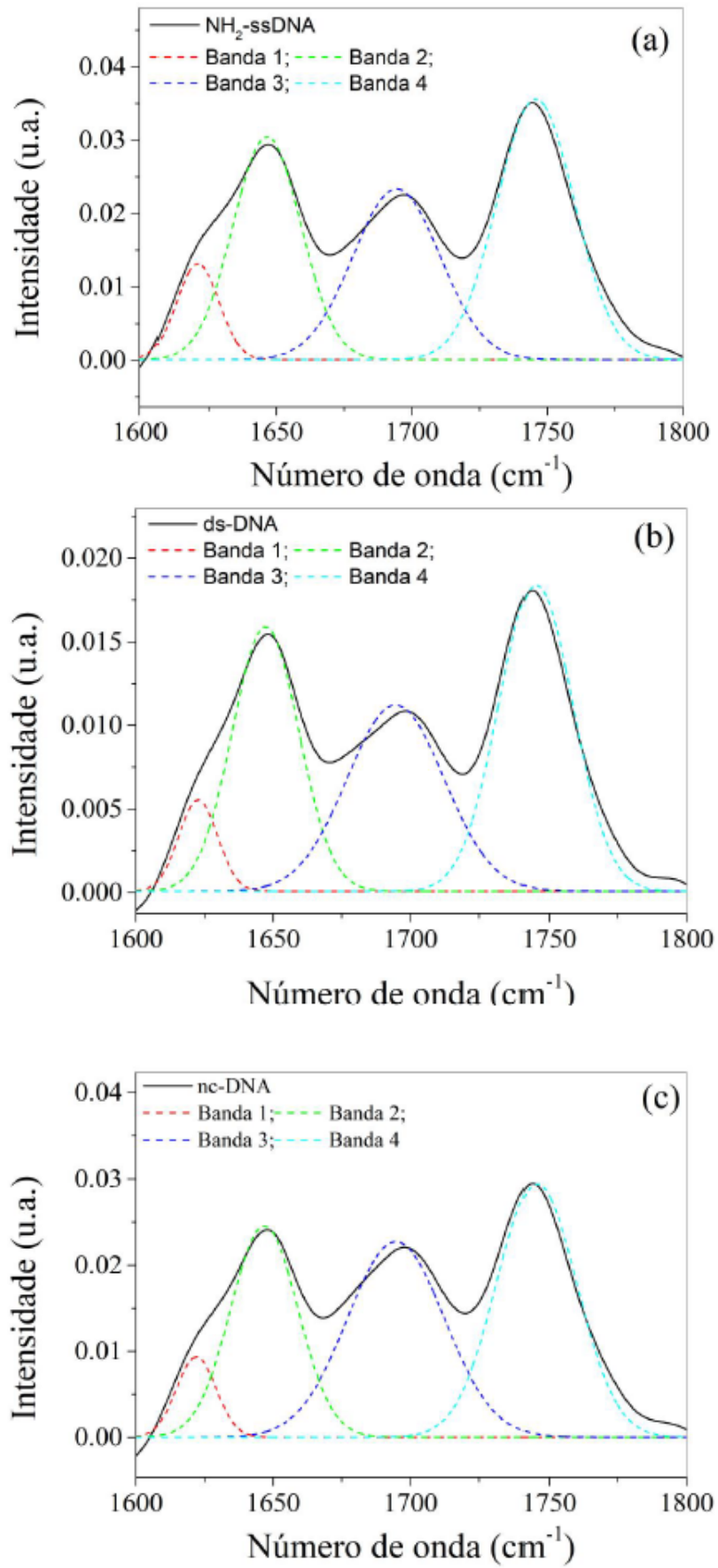


Figura 5

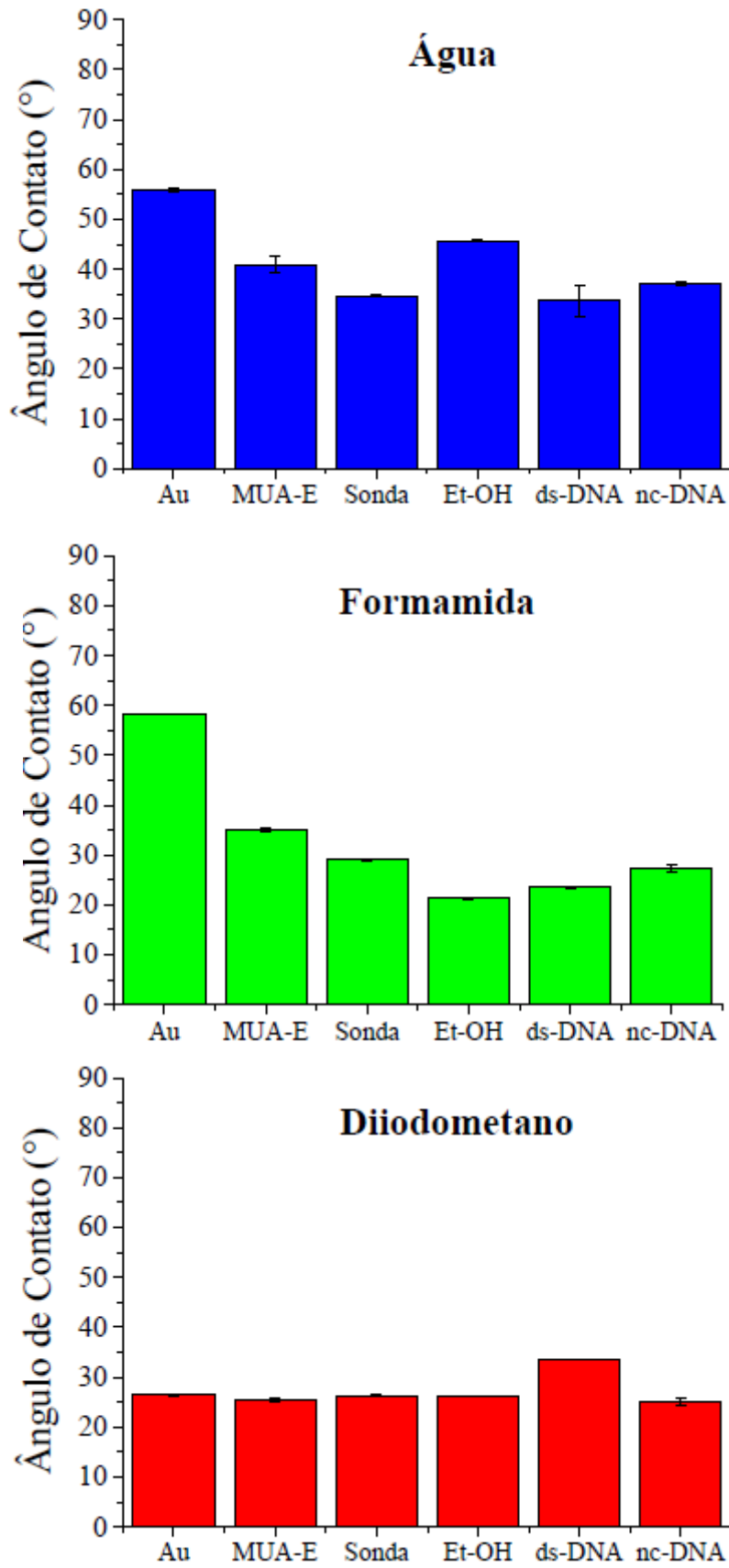


Figura 6

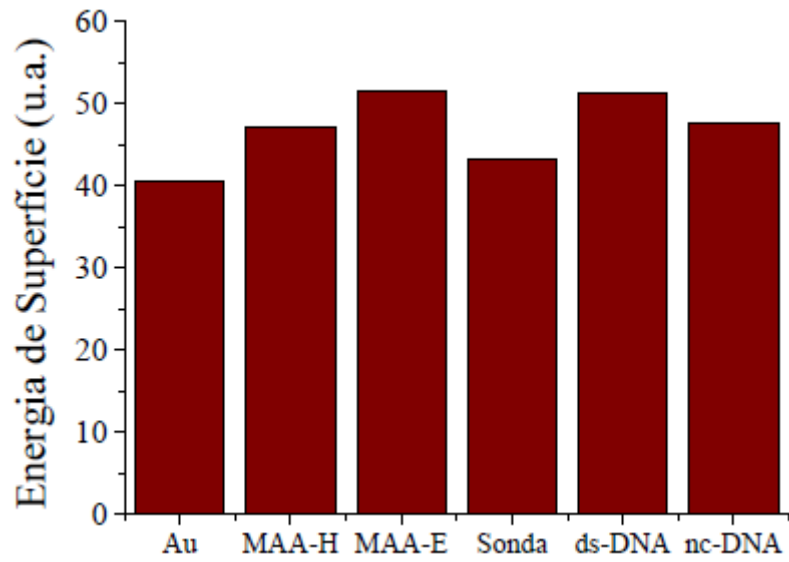


Figura 7

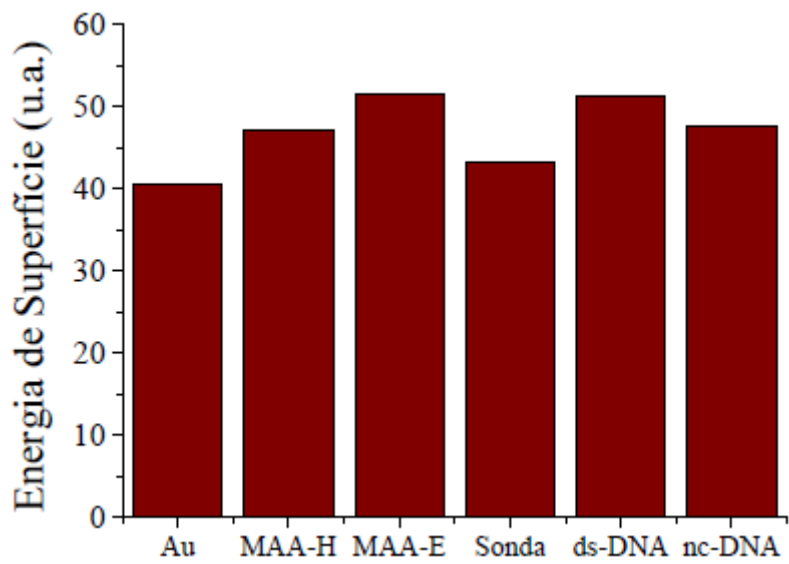


Figura 8

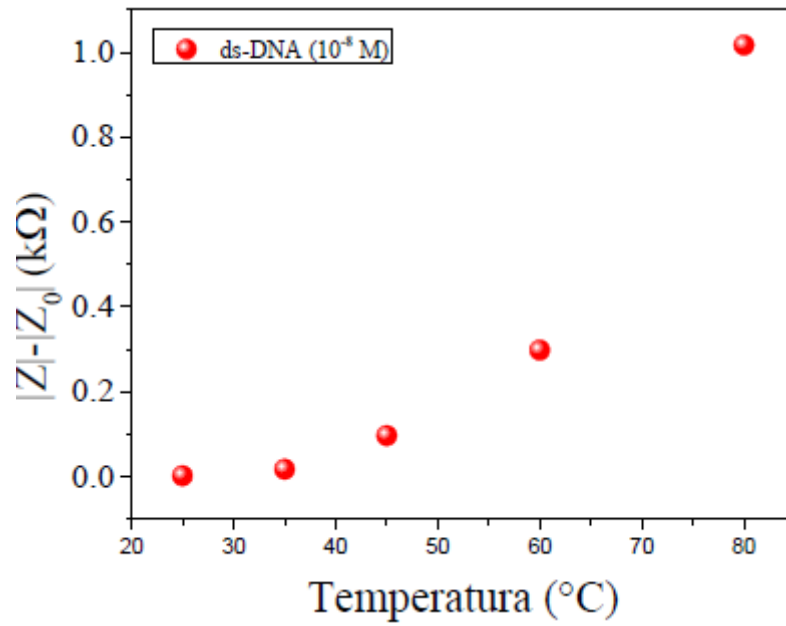


Figura 9

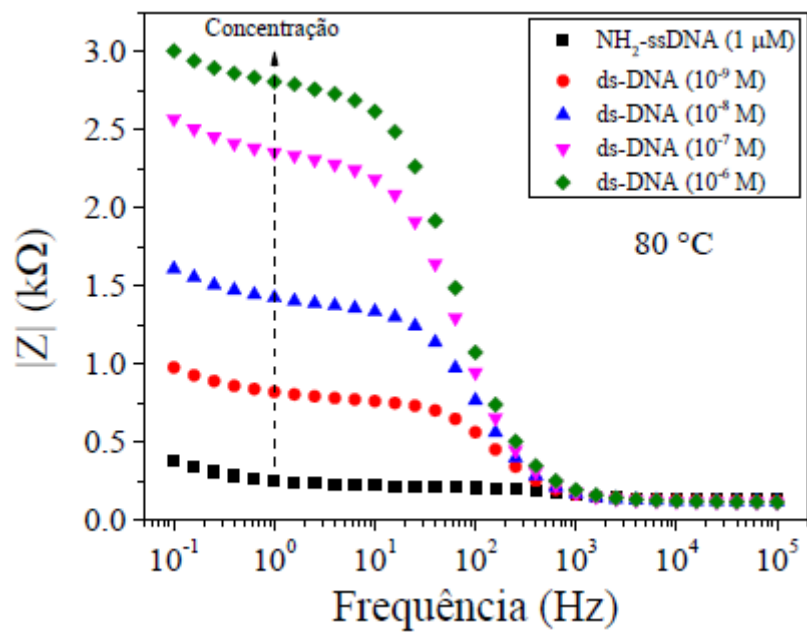


Figura 10

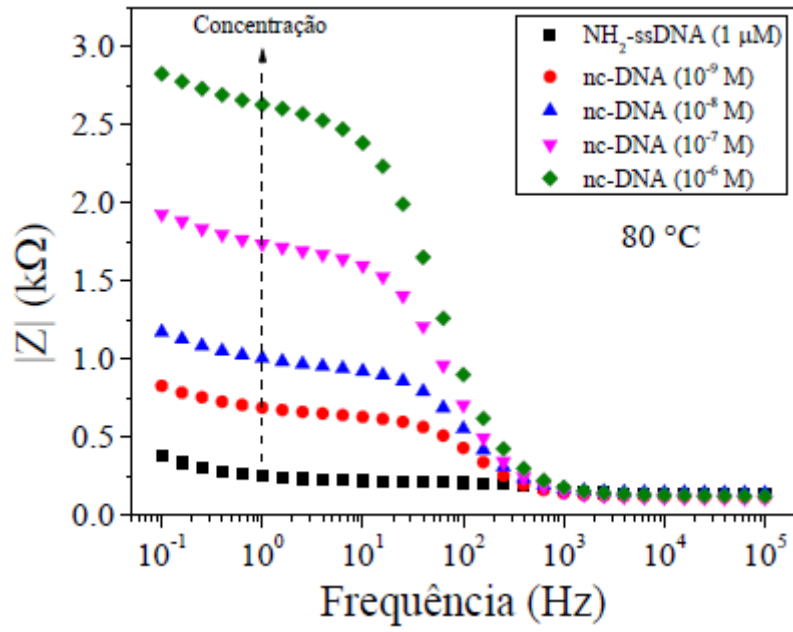


Figura 11

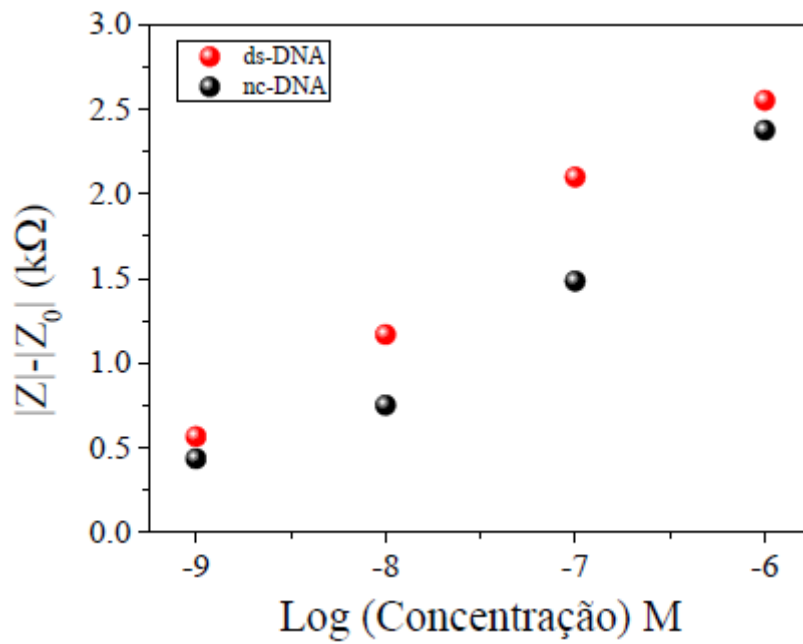


Figura 12

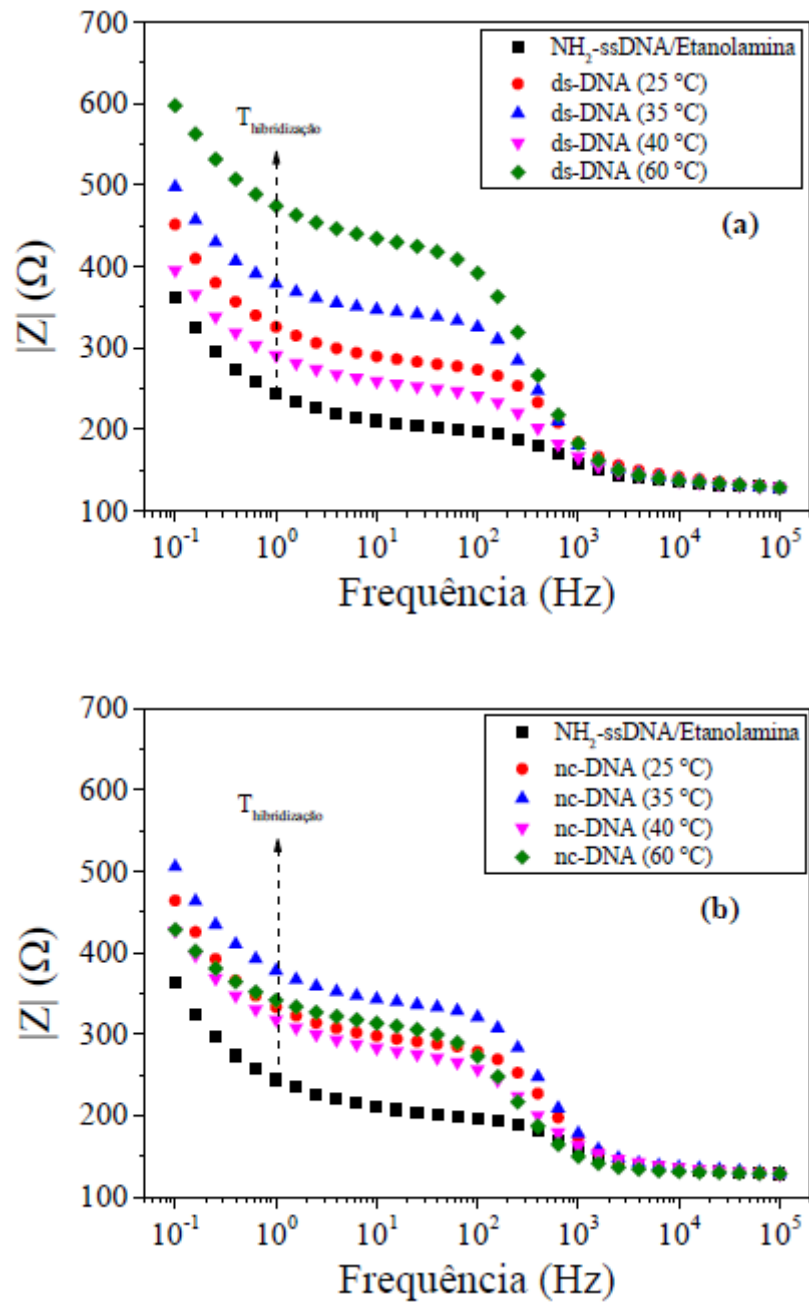


Figura 13

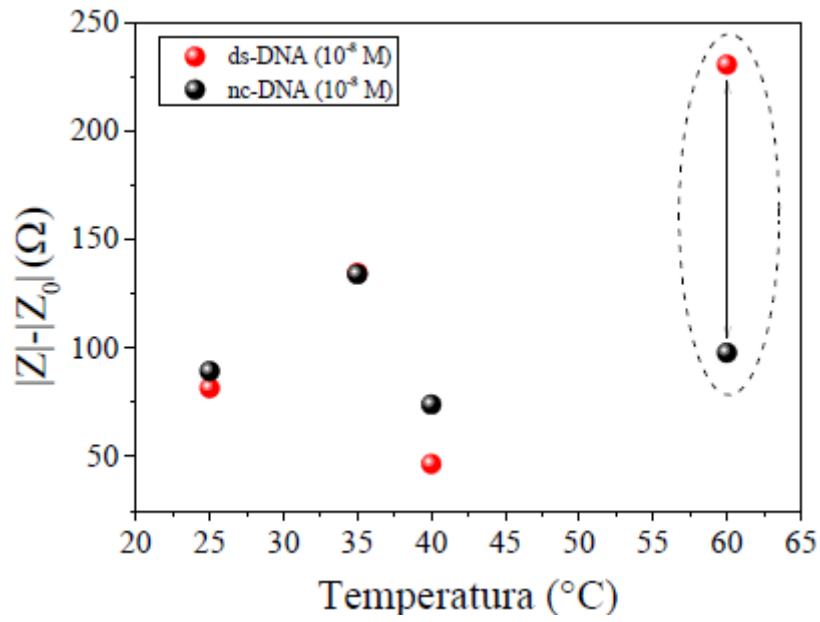


Figura 14

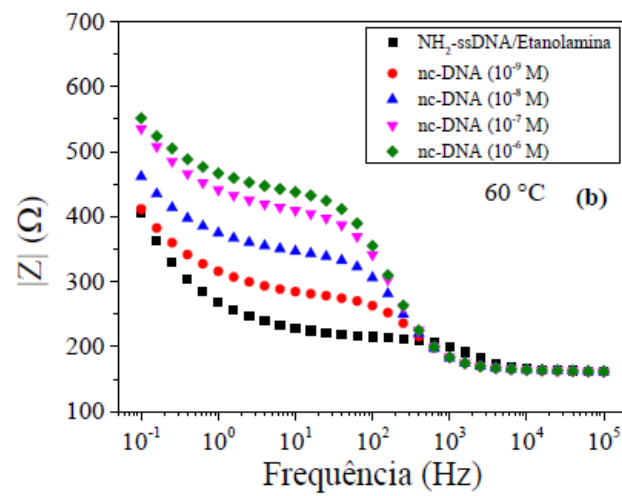
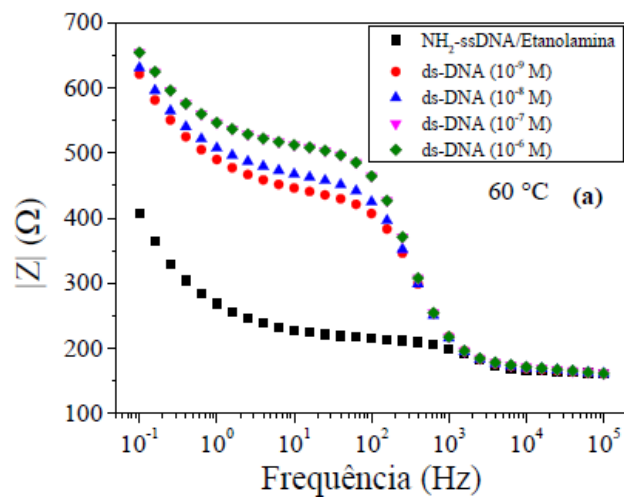


Figura 15

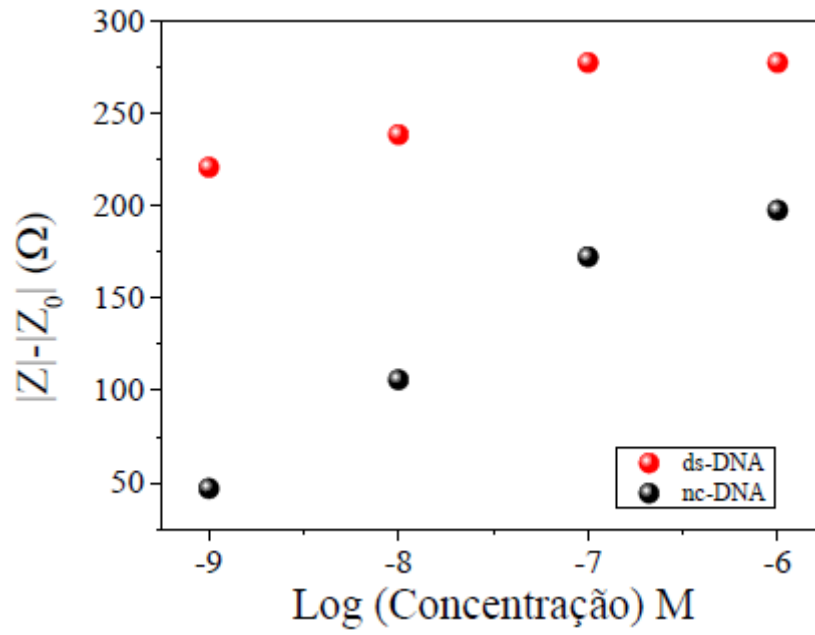


Figura 16

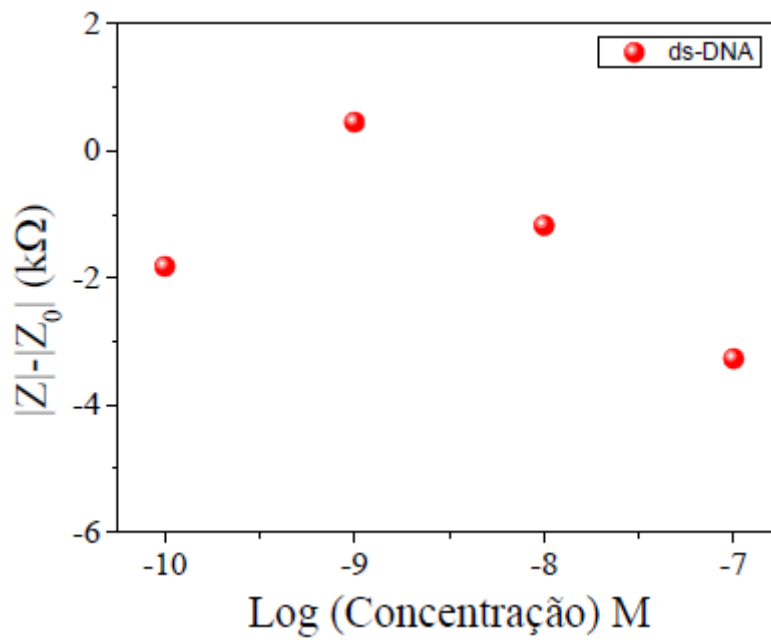


Figura 17

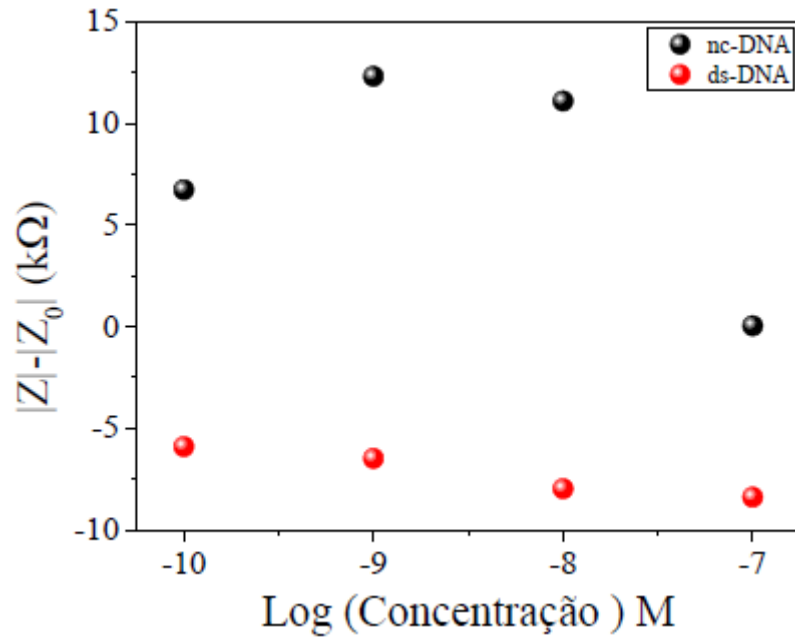


Figura 18

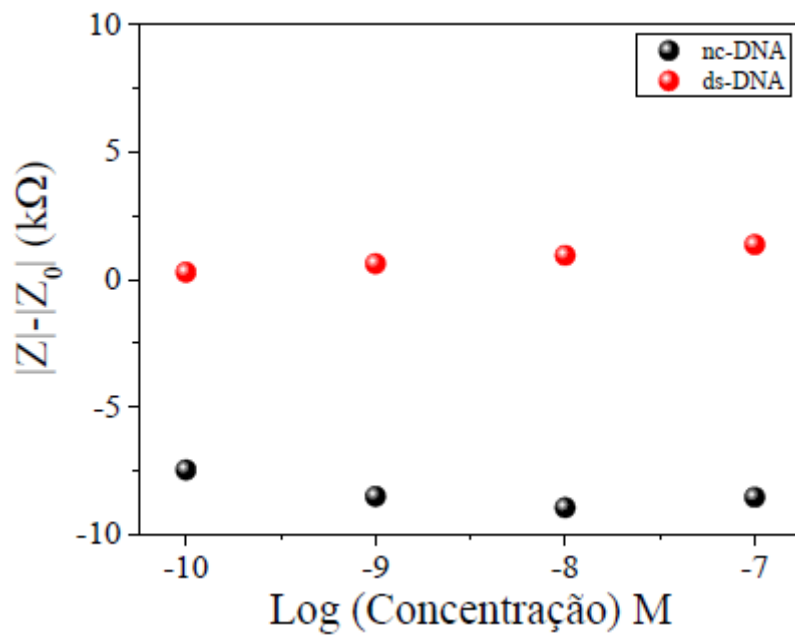


Figura 19

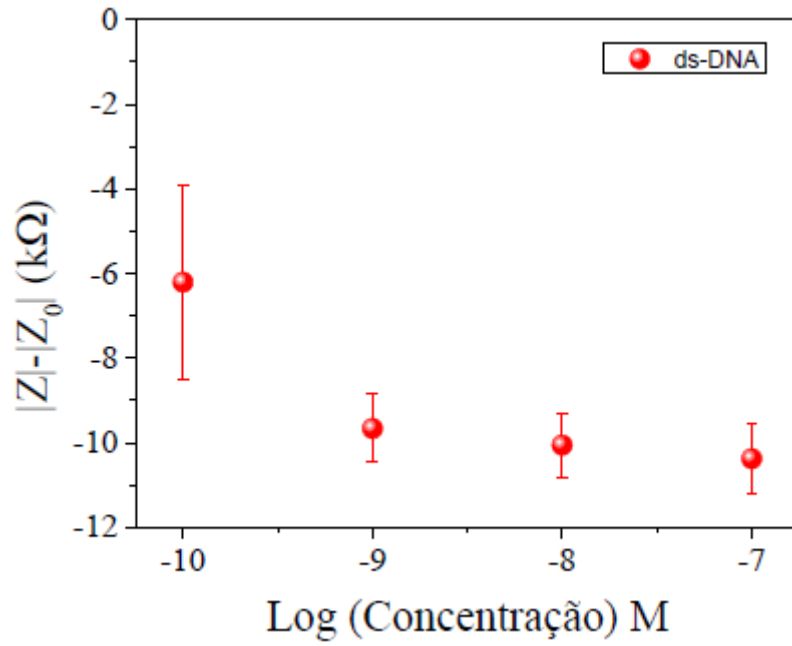


Figura 20

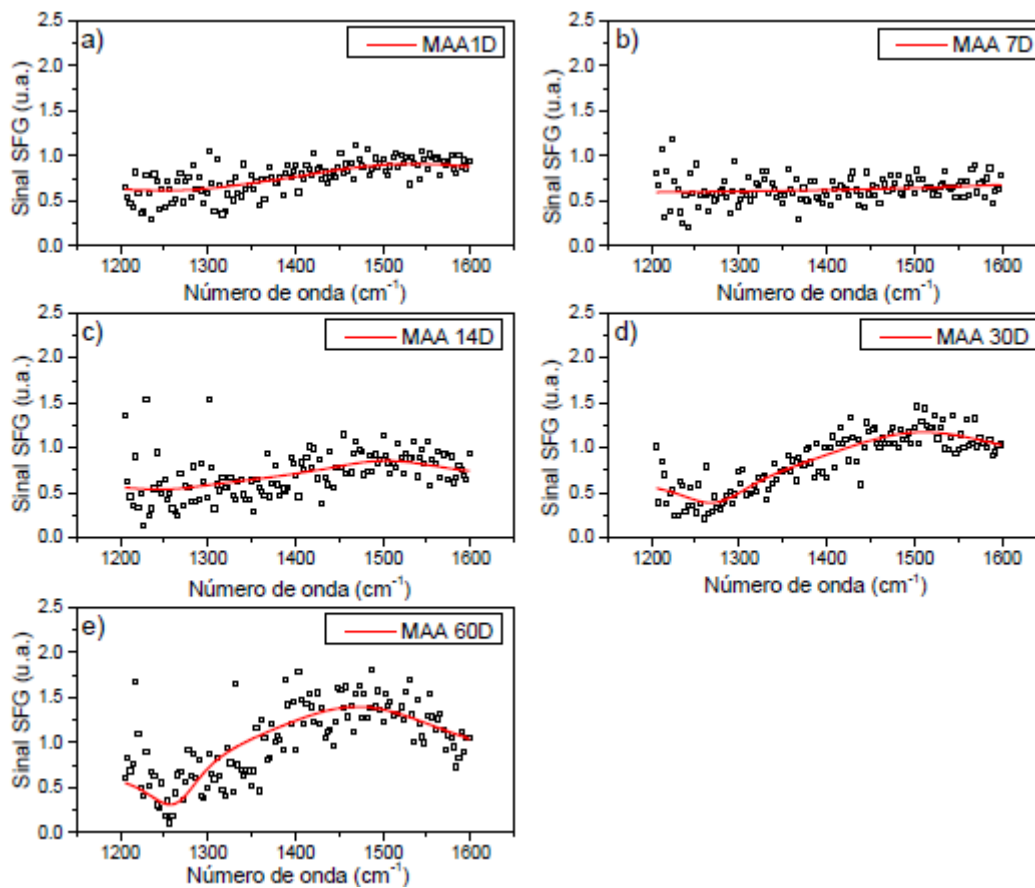


Figura 21

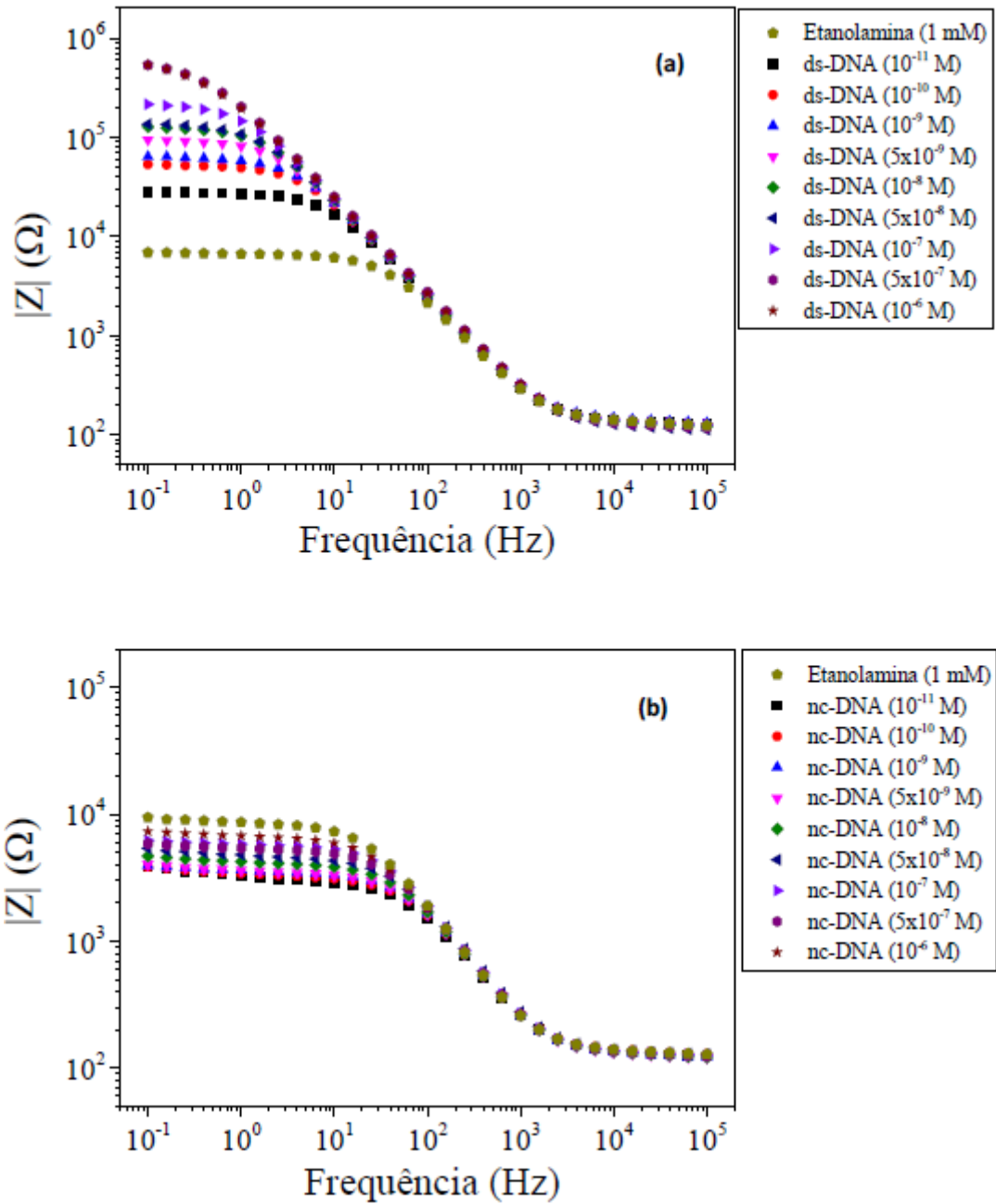


Figura 22

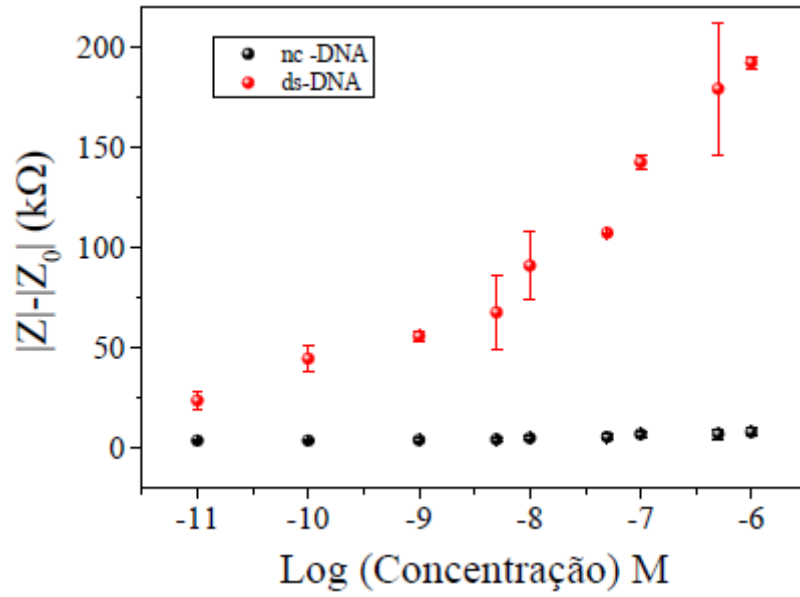


Figura 23

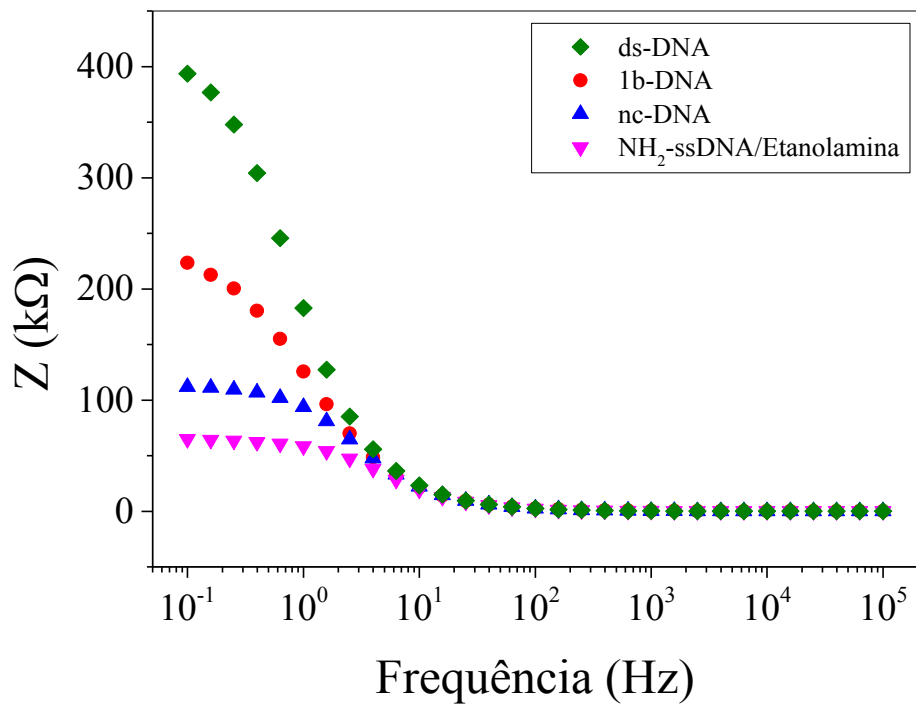


Figura 24

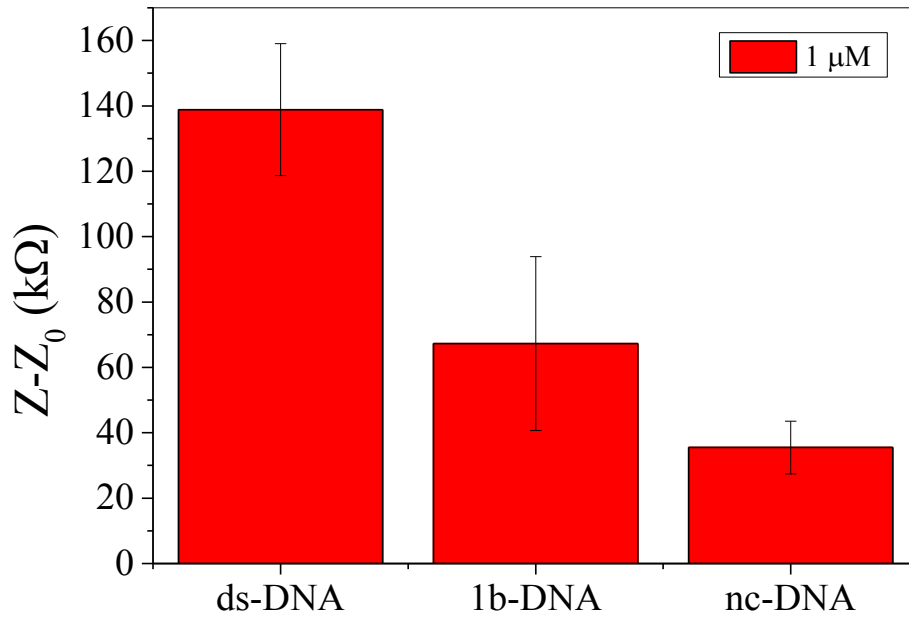


Figura 25

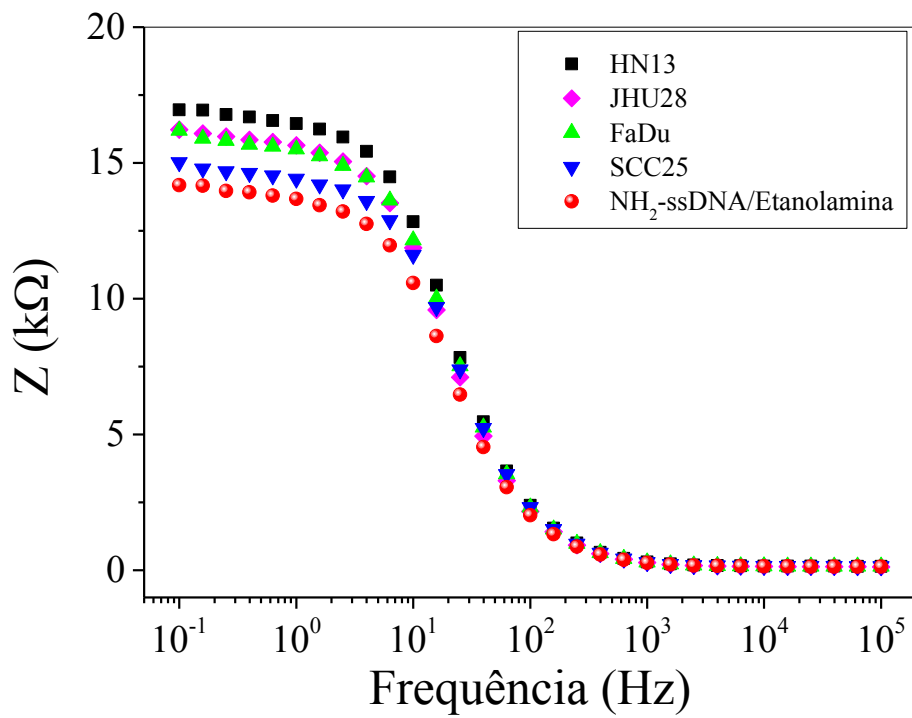


Figura 26

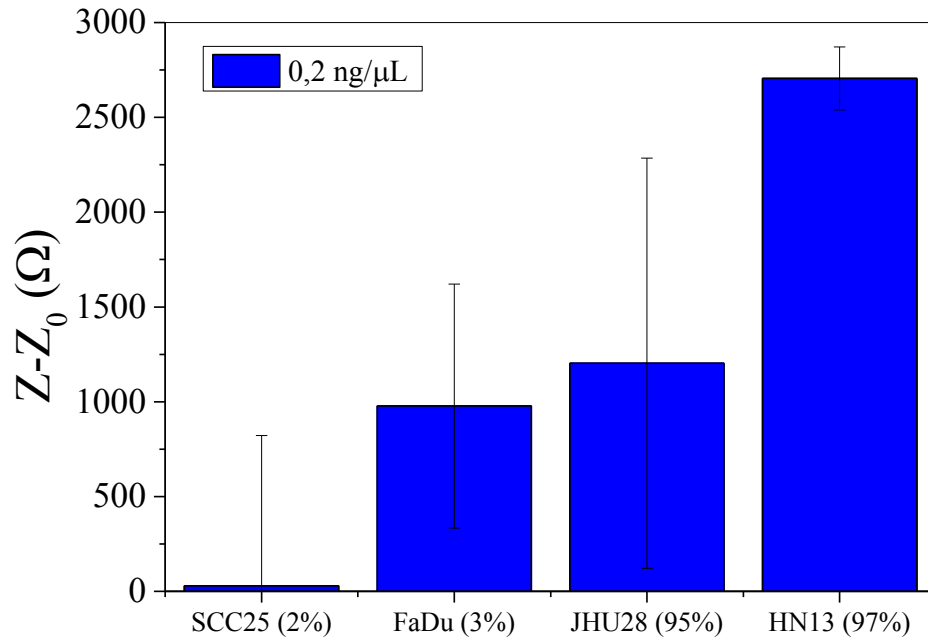


Figura 27

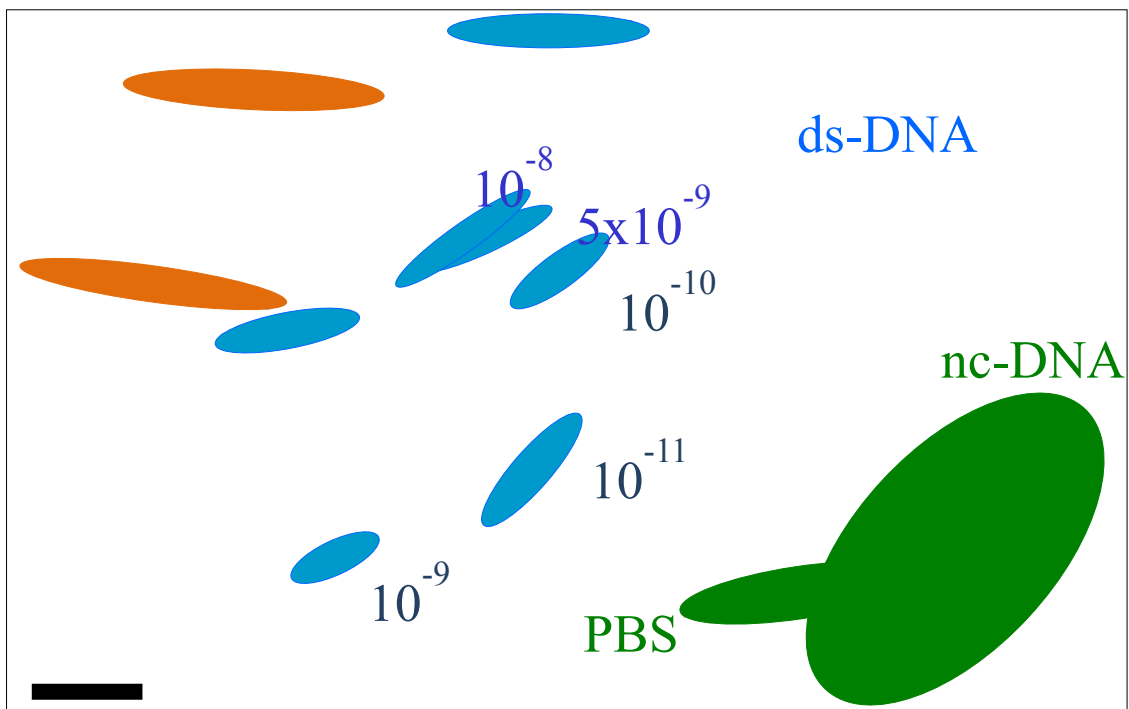


Figura 28

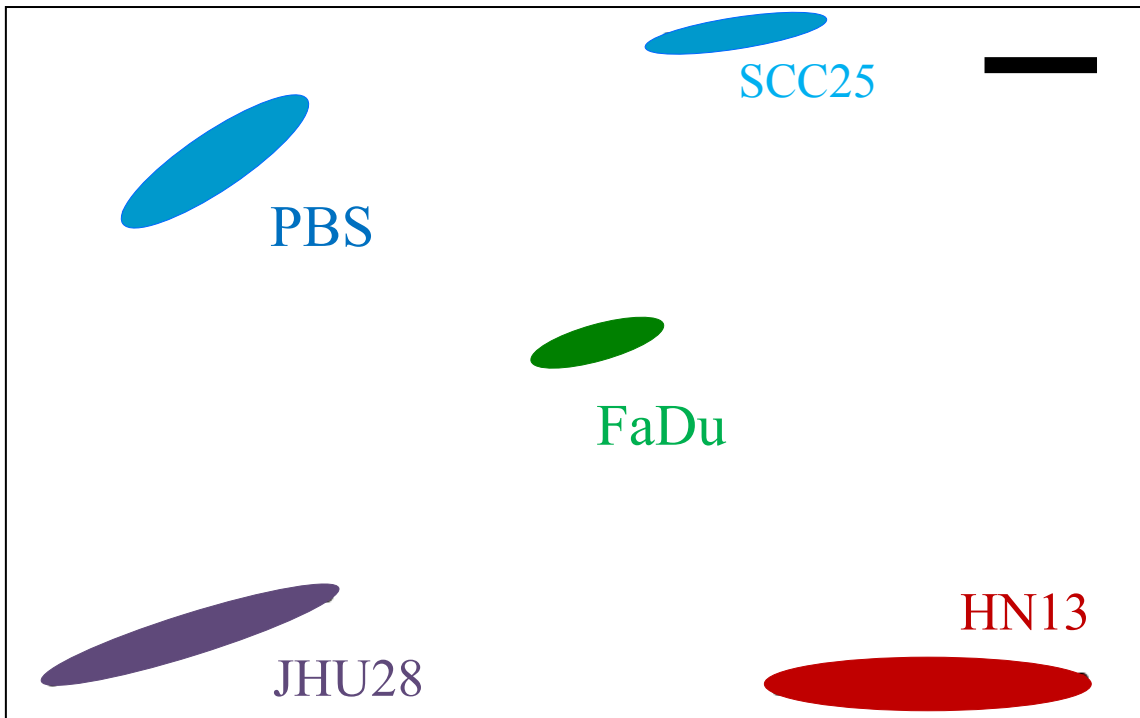


Figura 29

RESUMO

GENOSSENSOR DE DNA PARA DETECÇÃO DO BIOMARCADOR MGMT E SEU USO PARA DIAGNÓSTICO DE CÂNCER ESPINOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO

A presente invenção se insere no campo da detecção de ácido nucleico envolvendo sensores, mais especificamente na detecção de MGMT por meio de um genossensor baseado em uma fita de ssDNA, utilizado para diagnóstico precoce de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. O referido genossensor é funcionalizado com ácido mercaptoundecanoico (AMU) e demonstrou sensibilidade e seletividade, inclusive na avaliação de diferentes graus de metilação dos biomarcadores. O referido genossensor compreende pelo menos um eletrodo (1) recoberto por um filme (2) monocamada automontado com alto grau de organização molecular, em que o filme monocamada é preferencialmente de ácido mercaptoundecanoico (AMU); e uma sonda (3) ssDNA de sequência [NH₂-C6]-TCGCGGTGCGTATCGTTTGCC funcionalizada no referido filme.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de Sequência - Espinocelular-20.txt
- Data de Geração do Código: 13/11/2020
- Hora de Geração do Código: 19:15:24
- Código de Controle:
 - Campo 1: B1A9BA3E71B03E41
 - Campo 2: 0D0B266C8CD8BEE6