



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Desenvolvimento de Genossensor para Diagnóstico de  
Neuroblastoma**

**Aluno:** Thalles Douglas Souza e Silva

**Orientador:** Ana Graci Brito Madurro

**Co-Orientador:** João Marcos Madurro

UBERLÂNDIA - MG  
2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Desenvolvimento de Genossensor para Diagnóstico de  
Neuroblastoma**

**Aluno:** Thalles Douglas Souza e Silva

**Orientador:** Ana Graci Brito Madurro

**Co-Orientador:** João Marcos Madurro

Disertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Uberlândia como parte dos  
requisitos para obtenção do  
Título de Mestre em Genética e  
Bioquímica (Área Bioquímica)

UBERLÂNDIA - MG  
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

S586d Silva, Thalles Douglas Souza e, 1987-  
2014 Desenvolvimento de genossensor para diagnóstico de  
neuroblastoma / Thalles Douglas Souza e Silva. - 2014.  
53 f. : il.

Orientadora: Ana Graci Brito-Madurro.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Inclui bibliografia.

1. Génetica - Teses. 2. Tumores - Teses. 3. Biossensores - Teses. I.  
Brito-Madurro, Ana Graci. II. Universidade Federal de Uberlândia.  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

---

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

## **Desenvolvimento de Genossensor para Diagnóstico de Neuroblastoma**

**ALUNO:** Thalles Douglas Souza e Silva

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Ana Graci Brito Madurro (Orientador)

**Examinadores:**

Sara Cuadros Orellana  
Rosana Maria Assunção  
Wallans Torres Pio dos Santos  
Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini

**Data da Defesa:** 29/07/2014

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

---

(Ana Graci Brito Madurro)

## **AGRADECIMENTOS**

- ❖ Primeiramente quero agradecer a força maior que acredito e confio (Jesus Cristo), sem a qual eu não teria os atributos necessários para cumprir com êxito as pesquisas desenvolvidas nesse estudo;
- ❖ Quero agradecer minha família, em especial minha mãe Regina Alves de Souza e Silva e meu pai Vicente Pereira da Silva, pelo apoio sempre incondicional em todos momentos que precisei;
- ❖ Agradeço a todo grupo constituinte do Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia (LAFIP), os quais além da amizade me ajudaram muito nos momentos que necessitei, em especial Ana Cristina Honorato de Castro e Vinícius Rezende Rodovalho que sempre me orientaram e não mediram esforços pra me ajudar em todos momentos;
- ❖ Agradeço a Profa. Dra. Ana Graci Brito-Madurro e ao Prof. Dr. João Marcos Madurro pela oportunidade que me concederam de desenvolver esses estudos no laboratório (LAFIP) e me proporcionar conhecimento inestimável na nessa área;
- ❖ Quero agradecer também todos os amigos, conhecidos e principalmente minha namorada Thamiris Fernandes de Oliveira, que muitas vezes mesmo estando longe, me ajudaram superar os contratempos que surgiram durante esses estudos.

“Não se deve desprezar o mais simples dos organismos vivos, pois algo tão pequeno como o voo de uma borboleta, pode causar um tufão do outro lado do mundo”

Teoria do Caos

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Radiografia da formação expansiva de um tumor localizado na adrenal esquerda decorrente de neuroblastoma. Deslocamento do tronco celíaco, da artéria esplênica, do pâncreas, da artéria renal e do rim esquerdo. (TORTURELLA et al., 2011).....	5
<b>Figura 2</b> – Imagem representativa das proteínas MYCN e MAX (A) e os fatores de transcrição que o heterodímero MYCN/MAX recrutam para exercer suas funções biológicas (B). Adaptado de WESTERMARK et al (2011).....	8
<b>Figura 3</b> - Detecção por fluorescência <i>in situ</i> da amplificação do oncogene MYCN nos corpos de cromatina em células com neuroblastoma (MOREAU et al, 2006).....	10
<b>Figura 4</b> – Reação de eletrooxidação do 4-aminofenol. Adapado de VIEIRA et al (2006).....	15
<b>Figura 5</b> – Imagem ilustrativa da constituição básica de um biossensor. Em (1) está representado as amostras possíveis de origem do analito específico a ser analisado, (2) representa o transdutor com seus constituintes ligado a um sistema de sinal elétrico (3). Adaptado de REIMHULT et al (2008).....	16
<b>Figura 6</b> - Esquema geral representativo do princípio de funcionamento de um biossenssor eletroquímico de DNA. Adaptado de LIU et al (2008).....	19
<b>Figura 7.</b> Rodamina B: em (A) está representado a estrutura molecular da Rodamina B, e em (B) está representado de forma ilustrativa, por modelagem molecular, a região de interação entre o composto e a molécula de DNA. Adaptado de (ISLAM et al., 2013).....	23

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Quadro sintomatológico de 32 pacientes diagnosticados com neuroblastoma e que apresentam amplificação do gene MYCN. Adaptado de (SCHNEIDERMAN et al., 2008).....	5
<b>Tabela 2.</b> Classificação dos neuroblastomas de acordo com o sistema internacional de estadiamento. Adaptado de (TORTURELLA et al., 2011).....	6
<b>Tabela 3.</b> Características de alguns mediadores de elétrons e intercalantes frequentemente utilizados para detecção indireta em biossensores eletroquímicos de DNA. Adaptado de (LIU et al., 2012).....	22

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

4-AF – 4-Aminofenol

DNA – Deoxyribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucleico)

EDC-NHS- (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida )-(N-hidroxisuccinimida)

EQM – Eletrodo Quimicamente Modificado

HVA – Ácido Homovanílico

INCA – Instituto Nacional do Câncer

INRG – International Neuroblastoma Risk Group (Internacional Grupo de Risco em Neuroblastoma)

LNA – Locked Nucleic Acid (Ácido Nucleico Bloqueado)

MYC – v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (homólogo ao oncogene viral v-myc da mielocitomatose aviária)

MYCB – v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene inespecific carcinoma derived homolog in *Rattus norvegicus* (homólogo ao oncogene viral v-myc da mielocitomatose aviária derivado de carcinoma não específico em *Rattus norvegicus*)

MYCC – v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene inespecific carcinoma derived homolog in humans (homólogo ao oncogene viral v-myc da mielocitomatose aviária derivado de carcinomas inespecíficos em humanos)

MYCL – v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene lung carcinoma derived homolog in humans (homólogo ao oncogene viral v-myc da mielocitomatose aviária derivado do carcinoma de pulmão em humanos)

MYCN – v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog in humans (homólogo ao oncogene viral v-myc da mielocitomatose aviária derivado do neuroblastoma em humanos)

MYCN1 – sonda (oligonucleotídeo complementar ao gene MYCN)

MYCN2 – alvo (oligonucleotídeo complementar à sonda MYCN1)

MYCS – v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene inespecífico carcinoma derived homolog in *Mus muscullus* (homólogo ao oncogene viral v-myc da mielocitomatose aviária derivado de carcinoma não específico em *Mus muscullus*)

PNA – Peptide Nucleic Acid (Ácido Nucleico Peptídeo)

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

RM – Ressonância Magnética

TA – Temperatura Ambiente

Ta – Temperatura de anelamento

Tm – Temperatura de *melting*

TC – Tumografia Computadorizada

VMA – Ácido Vanilmandélico

## SUMÁRIO

Apresentação .....	1
Capítulo I: Fundamentação teórica .....	2
1. Neuroblastoma .....	3
1.1. Definição, Epidemiologia e Sintomatologia .....	3
1.2. O Gene MYCN .....	7
1.3. O Diagnóstico .....	9
2. Eletrodos Quimicamente Modificados .....	11
2.1. Definição e Aplicações .....	11
2.2. Filmes Poliméricos como Agentes Modificadores .....	12
2.3. (Poli)4-aminofenol .....	14
3. Biossensores .....	16
3.1. Definição e Constituição básica de um Biossensor .....	16
3.2. Classificação dos Biossensores .....	17
3.3. Biossensores Eletroquímicos de DNA .....	18
3.4. Princípio de Funcionamento de um Biossensor Eletroquímico de DNA.....	19
3.5. Técnicas de Imobilização da Sonda .....	20
3.6. Detecção Eletroquímica da Hibridização .....	21
4. Controle de Qualidade de um Biossensor .....	24
4.1. Especificidade e Seletividade .....	24
4.2. Limite de Detecção (Sensibilidade) .....	24
4.3. Limite de Quantificação .....	25
4.4. Linearidade (Curva de Calibração) .....	25
5. Referências Bibliográficas .....	26
Capítulo II: Desenvolvimento de um Genossensor Eletroquímico para Detecção de MYCN Utilizando Rodamina B como Intercalante .....	34
Resumo .....	35
Abstract .....	36.
1. Introduction .....	37
2. Experimentals .....	38
2.1. Solutions and Reagents .....	38

2.2. Apparatus .....	38
2.3. Electrode surface modification .....	39
2.4. Probe Immobilization onto Modified Grafite Electrode.....	39
2.5. Hybridization Detection .....	40
2.6. Optimization of the temperature and hybridization time.....	40
2.7. Analysis of Interfering compounds.....	41
2.8. Calibration Curve .....	41
3. Results and Discussion .....	41
3.1. Direct Electrochemical Detection of Hybridization .....	41
3.2. Indirect Electrochemical Detection of Hybridization .....	43
3.3. Specificity Test .....	44
3.4. Selectivity Test .....	45
3.5. Calibration Curve .....	46
3.6. Analysis by Atomic Force Microscopy – AFM .....	47
4. Conclusions .....	49
Acknowledgments .....	49
References .....	49

## APRESENTAÇÃO

O neuroblastoma é uma neoplasia pediátrica que se desenvolve durante o crescimento fetal, ou nos primeiros anos de vida, com origem em células embrionárias precursoras do sistema nervoso simpático. Dentre as doenças malignas da infância, o neuroblastoma é considerado como a mais frequente, sendo responsável por aproximadamente 10% de todos os casos. Em termos citogenéticos, essa doença é caracterizada por apresentar algumas alterações, das quais a amplificação do oncogene MYCN é frequente. Sabendo que as principais técnicas de diagnóstico molecular para essas doenças possuem alto custo e demandam tempo considerável de espera, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um genossensor eletroquímico para detecção da amplificação do oncogene MYCN e consequentemente o diagnóstico do neuroblastoma. O sensor foi desenvolvido utilizando eletrodos de grafite, os quais favorecem a adsorção da biomolécula sonda, possuem rápido sinal de resposta e são de baixo custo. Uma sequência de nucleotídeos conservada do gene MYCN ( $MYCN1\ 0,063\times 10^{-3}\text{mol.L}^{-1}$ ) foi immobilizada na superfície do eletrodo de grafite, modificada com polímero 4-aminofenol, por eletropolimerização através de voltametria cíclica. Posteriormente, uma solução contendo a sequência complementar de  $MYCN1\ (MYCN2\ 0,189\times 10^{-3}\text{mol.L}^{-1})$ , foi aplicada na superfície do eletrodo com a sonda immobilizada. A detecção da hibridização das sequências complementares foi feita de forma direta e indireta, através de voltametria diferencial de pulso. Na detecção indireta, foi utilizado a Rodamina B como intercalante ( $5\times 10^{-5}\text{mol.L}^{-1}$ ), para aumentar o sinal de resposta. Testes de especificidade, interferentes, curva de calibração e de microscopia de força atômica (AFM) também foram feitos. Os resultados demonstraram que o genossensor em desenvolvimento possui a capacidade de discriminar e reconhecer de forma eficiente a sequencia de nucleotídeos alvo ( $MYCN2$ ).

## **Capítulo I: Fundamentação Teórica**

## **1.Neuroblastoma**

### **1.1.Definição, Epidemiologia e Sintomatologia**

O Neuroblastoma é um tumor maligno neuroepitelial com origem em células embrionárias precursoras do sistema nervoso simpático. Esse tipo de neoplasia se desenvolve durante o crescimento fetal ou nos primeiros anos de vida (SANTOS, 2010). Trata-se de um tumor sólido, extracraniano e seu desenvolvimento ocorre nas células nervosas indiferenciadas da crista neural (BOM et al., 2014; SANTOS, 2010; WESTERMARK et al., 2011).

Em alguns casos o neuroblastoma pode regredir espontaneamente, ou como na metade dos mesmos, pode metastizar. É possível também que ocorra a diferenciação do tumor, que pode se tornar um ganglioneuroma benigno (MOSSÉ et al., 2014; WARNAT et al., 2007). A idade da criança no momento do diagnóstico é um fator muito importante no desenvolvimento da doença, e consequentemente influencia nas probabilidades de cura. Os recém-nascidos com a doença localizada possuem elevada probabilidade de cura, mas as crianças mais velhas, normalmente com a doença avançada, têm chance reduzida de sobrevivência (SANTOS, 2010). Alguns estudos demonstraram que crianças diagnosticadas com idade acima de 18 meses possuem menores chances de cura do que as mais jovens (MOSSÉ et al., 2014; FISHER e TWEDDLE, 2012).

De modo geral, dentre as doenças malignas da infância, o neuroblastoma é uma das mais frequentes, ocorrendo em cerca de 8% a 10% dos casos. Em lactantes a incidência aumenta para 50% (CARTUM, 2010.; LU et al., 2003).

Estudos feitos a respeito da incidência dos tumores pediátricos pelo mundo estimaram que os mesmos representam cerca de 1% a 3% do total dos casos de câncer (COHN et al., 2009). Em alguns países em desenvolvimento, onde a população de crianças chega a 50%, a proporção do câncer infantil representa de 3 a 10% do total de neoplasias (COHN et al., 2009). Nos países desenvolvidos, a proporção diminui, chegando a cerca de 1%; porém, o óbito por neoplasia é considerado a segunda causa de morte na infância, correspondendo cerca de 4 a 5% (SANTOS, 2010).

Dados do *National Registry of Childhood Tumours*, da Grã-Bretanha, constataram que entre 1991 a 2000, 22,6% dos casos de câncer registrados foram neuroblastomas (FISHER e TWEDDLE, 2012).

No Brasil, a incidência anual varia entre 7 e 12 casos por milhão de crianças até 15 anos, alcançando estimadamente 7,3 casos/milhão (CARTUM, 2010.; BOM et al., 2014). Pesquisas feitas pelo INCA (Instituto Nacional do Câncer), a respeito da incidência de tumor do sistema nervoso simpático periférico, no período de 1997 a 2004, registraram para o sexo masculino a maior taxa média em Porto Alegre (1998-2002), com 36,8 casos por milhão e a menor em Belém (1997-2001), com 7,9 casos por milhão. Para o sexo feminino, a maior taxa foi registrada em Goiânia (1999-2003), com 35,3 casos por milhão e a menor foi em Vitória (1997), com 5,5 casos por milhão.

No ano de 2009, as últimas informações a respeito da taxa de mortalidade referente a neoplasias no Brasil, mostraram que os tumores pediátricos (faixa etária de 1 a 19 anos) se encontram entre as dez primeiras causas de morte no país (DATASUS, 2009). Pesquisas realizadas em 2011, estimaram que para o ano de 2014, ocorrerão aproximadamente cerca de 384.340 casos novos de câncer em geral no país, sendo que destes, 11.530 acometerão crianças e adolescentes até os 19 anos (INCA, 2013).

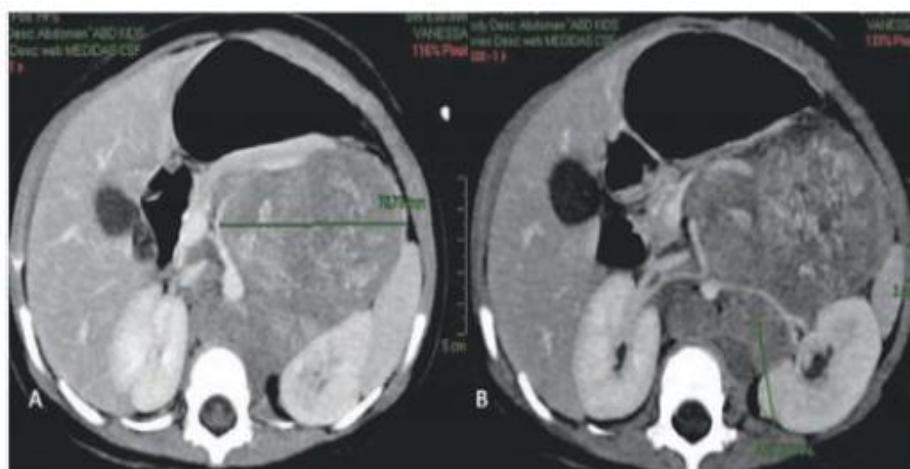
Devido ao fato de que o neuroblastoma é um tumor embrionário, e que se desenvolve a partir das células da crista neural, podendo migrar pelas glândulas da adrenal e gânglios para-espinhal simpáticos, sua manifestação clínica é bastante variável e heterogênea (SCALFI-HAPP et al., 2007).

Apesar do complexo quadro sintomatológico, algumas manifestações clínicas são frequentes em neuroblastomas (tabela 1). Dentre elas foram evidenciadas a formação de tumores primários na adrenal (figura 1), retroperitônio paravertebral, mediastino posterior, pélvis e pescoço (FISHER e TWEDDLE, 2012; SANTOS, 2010).

**Tabela 1.** Quadro sintomatológico de 32 pacientes diagnosticados com neuroblastoma e que apresentam amplificação do gene MYCN. Adaptado de (SCHNEIDERMAN et al., 2008)

Características	Número de pacientes (%)
<b>Tumor Primário</b>	
Adrenal	25
Tórax	9
Cervical	2
Abdominal	31
Sistema Digestivo	25
Outros	6
<b>Ploidia</b>	
Diploidia + Hipodiploidia	52
Hiperdiploidia	48
<b>Histologia</b>	
Favorável	57
Desfavorável	43

Os tumores pélvicos podem afetar o intestino e a bexiga. Pode ocorrer também a formação de tumores paravertebrais, o que causa uma compressão na medula espinhal. A síndrome de Horner também ocorre com frequência. Nesse caso, há um crescimento rápido de uma massa cervical na região da cabeça e do pescoço (FISHER e TWEDDLE, 2012; SANTOS, 2010).



**Figura1** – Radiografia da formação expansiva de um tumor localizado na adrenal esquerda decorrente de neuroblastoma. Deslocamento do tronco celíaco, da artéria esplênica, do pâncreas, da artéria renal e do rim esquerdo. (TORTURELLA et al., 2011).

O estágio 4s (“s” de especial, do inglês “*special*” e “4” de metástase) do neuroblastoma é considerado como o mais crítico da doença (tabela 2). Nesse caso, é frequente a existência de um tumor primário localizado na glândula adrenal com metástases limitadas à pele, fígado e/ou medula óssea (FISHER e TWEDDLE, 2012).

**Tabela 2.** Classificação dos neuroblastomas de acordo com o sistema internacional de estadiamento. Adaptado de (TORTURELLA et al., 2011).

Sistema Internacional de Estadiamento	
<b>1</b>	Tumor localizado, confinado à sua área de origem; excisão cirúrgica macroscópica completa; com ou sem doença microscópica residual; linfonodos ipso e contralaterais microscopicamente não acometidos.
<b>2A</b>	Tumor unilateral, com excisão macroscópica incompleta; linfonodos ipso e contralaterais microscopicamente não acometidos
<b>2B</b>	Tumor unilateral com excisão macroscópica completa ou incompleta; linfonodos ipsilaterais regionais acometidos; linfonodos contralaterais microscopicamente não acometidos
<b>3</b>	Tumor cruzando a linha média, com ou sem envolvimento de linfonodos regionais ou tumor unilateral, com envolvimento de linfonodos contralaterais; ou tumor de linha média com envolvimento bilateral de linfonodos regionais
<b>4</b>	Tumor disseminado, acometendo linfonodos distantes, tecido ósseo, medula óssea, fígado e/ou outros órgãos (exceto os definidos pelo estádio 4S)
<b>4S</b>	Tumor primário localizado como definido pelos estádios 1 ou 2, com disseminação limitada ao fígado, pele e/ou medula óssea

A ocorrência de síndromes paraneoplásicas, apesar de serem raras, também fazem parte do quadro sintomatológico (FISHER e TWEDDLE, 2012). A síndrome de opsomioclonus-ataxia, por exemplo, é caracterizada por movimentos involuntários dos membros, do tronco, e dos olhos (SANTOS, 2010).

## 1.2.O Gene MYCN

A neoplasia, apesar de ser multicausal, é caracterizada principalmente pela perda dos controles de reconhecimento de interação entre as células e da proliferação celular (FARIA e ROBENHORST, 2006). A ativação descontrolada dos proto-oncogenes, juntamente com a inibição dos supressores tumorais, são fundamentais para a gênese do processo neoplásico (DANG, 2012). Estudos de expressão gênica em pacientes com neuroblastoma têm demonstrado a amplificação do gene MYCN (WARNAT et al., 2007). A amplificação do DNA é um mecanismo pelo qual uma célula cancerígena adquire várias cópias de parte do seu genoma, o que possibilita sua expressão aumentada e lhe confere uma vantagem de crescimento seletivo ou para adquirir resistência aos agentes quimioterapêuticos (MOREAU et al., 2006).

Denomina-se como MYC a família de proto-oncogenes que inclui atualmente cinco representantes principais: MYCC, MYCN, MYCL, MYCB e MYCS (FARIA e ROBENHORST, 2006). O primeiro oncogênio dessa família foi descoberto através de pesquisas feitas a respeito de mielocitomatose manifestada em aves. Esses estudos demonstraram que a causa dos tumores é proveniente de um retrovírus oncogênico identificado como v-MYC (SHEINER; BISHOP, 1979; ROUS, 1983).

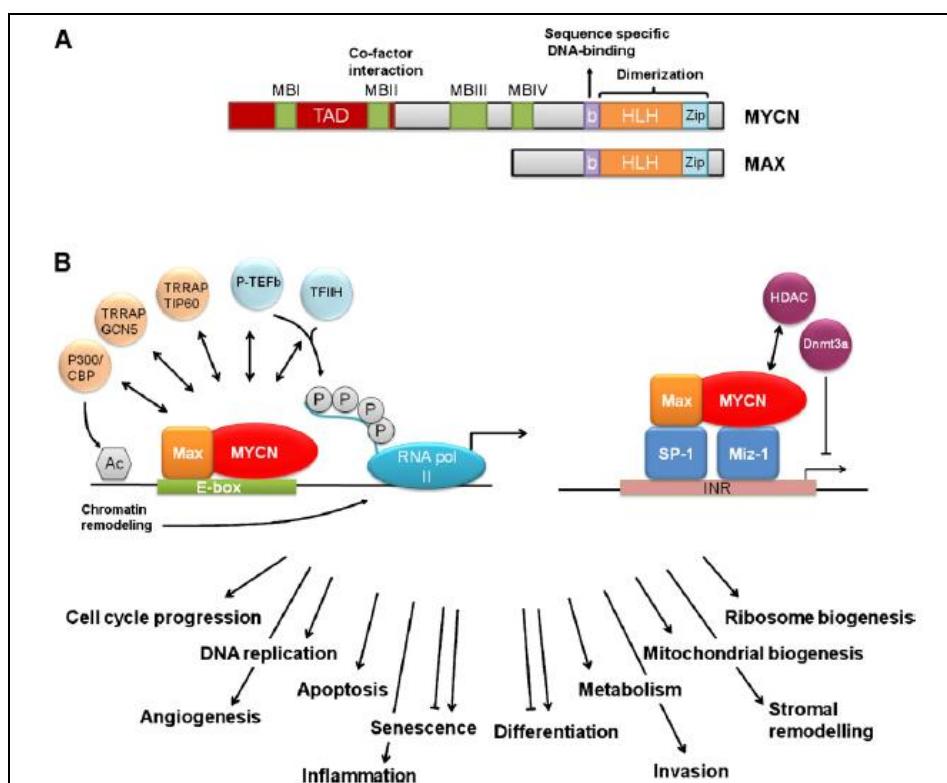
Subsequentemente, o gene MYCC foi identificado como homólogo desse oncogene viral, com sua superexpressão demonstrada em vários tumores humanos e animais (DANG, 2012). Posteriormente, outros dois genes foram descobertos e sua expressão aumentada também foi relacionada com câncer em humanos: o MYCN (neuroblastomas) e o MYCL (carcinomas de pulmão). Estudos recentes identificaram a expressão desregulada dos genes MYCB e MYCS como causadores de tumores em roedores, mas pesquisas mais específicas ainda devem ser feitas (FARIA e ROBENHORST, 2006; MOREAU et al., 2006).

Os genes MYCN e MYCC são homólogos, mas enquanto a superexpressão de MYCC é demonstrada em diversos tipos de neoplasias (GIR et al., 2006), a amplificação do MYCN é verificada em neoplasias associadas com origem embrionária e/ou neuroendócrina, assim como Retinoblastoma, Tumor de

Wilm, Rabdomiosarcoma, Meduloblastoma, Glioblastoma, e Câncer de pequenas células pulmonares (WESTERMARK et al., 2011).

O MYCN, expressa uma proteína que é responsável pela regulação de mecanismos vitais a célula, como proliferação, crescimento celular, síntese proteica, metabolismo, apoptose e diferenciação (DANG, 2012).

A proteína codificada pelo proto-oncogene MYCN é composta por 464 resíduos de aminoácidos e contém um domínio de ativação transcrecional na região amino-terminal e domínios carboxi-terminais de interação proteica e de ligação a DNA (WESTERMARK et al., 2011). Para exercer sua função de fator de transcrição, a proteína Myc deve formar um complexo heterodimérico com a proteína Max, o qual se ligara a motivos E-box de DNA (5'-CANNTG-3'). O dímero Myc-Max recruta co-fatores transcrecionais para a ativação gênica (figura 2), e também podem se ligar a outros fatores para promover a repressão gênica. (WESTERMARK et al., 2011).



**Figura 2** – Imagem representativa das proteínas MYCN e MAX (A) e os fatores de transcrição que o heterodímero MYCN/MAX recrutam para exercer suas funções biológicas (B). Adaptado de WESTERMARK et al (2011).

Apesar de também estar associada a outros tipos de neoplasias do gênero, a amplificação do gene MYCN na região 2p24 do cromossomo, é um forte indicativo de neuroblastoma, ocorrendo em cerca de 20% dos mesmos (FISHER e TWEDDLE, 2012). Estudos clínicos têm demonstrado claramente que a expressão aumentada de MYCN contribui para o fenótipo maligno do neuroblastoma, o que inclui aumento do potencial de crescimento celular e tumorigenicidade (BORDOW et al., 1998). Mesmo em pacientes com outros indicadores favoráveis, a taxa de sobrevivência varia de 15 a 35% (WESTERMARK et al., 2011)

### **1.3.O Diagnóstico**

Devido à complexidade da manifestação clínica da doença, vários exames devem ser feitos para diagnosticar o neuroblastoma.

Em relação aos tumores primários, é necessário fazer a caracterização histopatológica dos mesmos, para comprovar evidência histológica da natureza neural do tumor. Além das biopsias, técnicas radiológicas como a TC (Tomografia Computadorizada) e/ou RM (Ressonância Magnética) são muito utilizadas para avaliação de tumores primários abdominais, pélvicos, cervicais e mediastínico (SANTOS, 2010). A RM é superior nos tumores paravertebrais. A cintilografia de corpo inteiro, com metaiodobenzilguanidina com iodo 123, permite avaliar a distribuição da neoplasia (SANTOS, 2010).

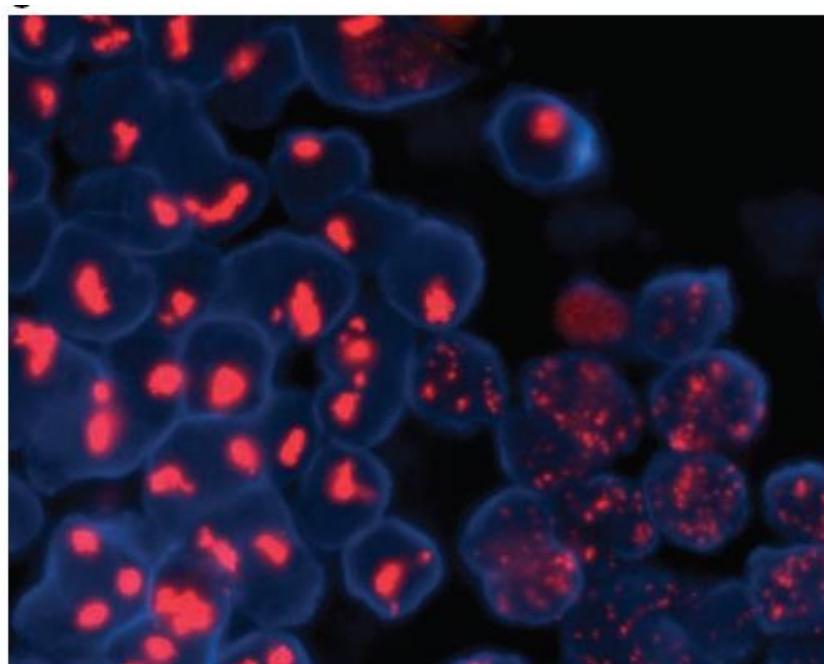
A classificação de Shimada, adaptada e renomeada pela *International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Pathology Classification*, enfatiza a importância das características histopatológicas do tumor no prognóstico. De acordo com tal classificação, um elevado grau de diferenciação dos neuroblastos, presença de estroma desenvolvido com células de Schwann, baixo índice de mitoses e cariorrexis (baixo turn-over) são considerados fatores de bom prognóstico. O oposto relaciona-se com mau prognóstico (MOSSÉ et al., 2014).

O monitoramento de alguns biomarcadores é um parâmetro utilizado para o diagnóstico do neuroblastoma. A elevação da dopamina sérica e dos metabólitos HVA (ácido homovanílico) e VMA (ácido vanililmandelico) na urina são os

marcadores mais específicos para o diagnóstico (BARCO et al., 2014). Outros, assim como, desidrogénase láctica, ferritina, cromogranina e enolase neuro-específica também são utilizadas, porém são muito inespecíficos (FISHER e TWEDDLE, 2012; SANTOS, 2010).

Em termos genéticos, o neuroblastoma é caracterizado por apresentar algumas alterações e anormalidades. A amplificação do proto-oncogene MYCN, perdas alélicas no braço curto do cromossomo 1, no braço longo do cromossomo 11, no braço curto do cromossomo 3 e ganho de material genético do cromossomo 17 são exemplos dessas alterações (BRODEUR, 2003; FISHER e TWEDDLE, 2012; SANTOS, 2010). Mutações nos genes ALK e PHOX2B são indicativos de predisposição ao neuroblastoma (FISHER e TWEDDLE, 2012)

Estudos têm evidenciado que a amplificação do gene MYCN, que ocorre em cerca de 20% a 25% dos neuroblastomas primários (figura 3), sugestivamente é considerado como fator diagnóstico para a doença (BORDOW et al., 1998; SANTOS, 2010; SCHINEIDERMAN et al., 2008).



**Figura 3** - Detecção por fluorescência *in situ* da amplificação do oncogene MYCN nos corpos de cromatina em células com neuroblastoma (MOREAU et al, 2006).

## **2.Eletrodos Quimicamente Modificados (EQMs)**

### **2.1. Definição e Aplicações**

Eletrodo quimicamente modificado (EQM) é um termo utilizado para designar eletrodos que possuem espécies quimicamente ativas, convenientemente immobilizadas em suas superfícies com a finalidade de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo solução. Esse conceito, em termos eletroquímicos, foi utilizado primeiramente por MURRAY e colaboradores (1975), os quais publicaram um trabalho clássico descrevendo a modificação química da superfície de eletrodos de SnO<sub>2</sub> via organosilanos (SOUZA, 1997).

Essa modificação que ocorre na superfície do eletrodo confere ao mesmo características físico-químicas do agente modificador. Dessa maneira, é necessário analisar o composto químico a ser utilizado, para que o mesmo possa se adequar ao propósito de funcionamento do eletrodo (CARVALHO, 2011). A utilização de nanomateriais (nanopartículas de ouro, nanotubos de carbono), compostos orgânicos (anilina, aminofenol, EDC-NHS) e inorgânicos (Fitalocianinas, Porfirinas) tem grande aplicabilidade como agentes modificadores (GHAEDI et al., 2013; JANEGITZ et al., 2011; VIEIRA et al., 2006).

A escolha do material que constitui o eletrodo de trabalho também é um aspecto muito importante, pois o mesmo deve apresentar características eletroquímicas apropriadas para o método de modificação escolhido. Dentre os substratos mais utilizados destacam-se o ouro, a platina, carbono vítreo, mercúrio na forma de filme, fibras de carbono e pasta de carbono (CARVALHO, 2011).

Nos últimos anos, os eletrodos quimicamente modificados tem gerado grande interesse, principalmente nas áreas de eletroquímica e eletroanalítica. Devido a grande versatilidade de modificações e de agentes modificadores eletroquímicos, esses materiais podem ser aplicados em amostras ambientais, clínicas e industriais. Vários estudos têm demonstrado que a utilização dos EQMs em sensores, melhora de maneira significativa a sensibilidade, a seletividade e a estabilidade dos mesmos (GHAEDI et al, 2013) . Esse fato ocorre devido a

existência dos fenômenos de pré-concentração, eletrocatalise e exclusão de interferentes (SOUZA, 1997).

A maioria das aplicações analíticas de EQMs envolvem técnicas voltamétricas ou amperométricas, e a sensibilidade das mesmas é diretamente relacionada à razão corrente faradaica (if)/corrente capacitiva (ic). A inclusão da etapa inicial de pré-concentração do analito, possibilita um aumento na componente faradaica da corrente e elevam a sensibilidade da técnica voltamétrica utilizada (SOUZA, 1997). A forma convencional de pré-concentração, principalmente para íons metálicos, é a eletrodeposição, mas devido a presença de interferentes esse método se torna limitado em amostras reais.

Na eletrocatalise, o principal objetivo é aumentar a cinética da transferência de elétrons do composto redox que está presente na superfície do eletrodo. Dessa maneira, ocorre a redução do sobrepotencial de ativação, o qual é o potencial adicional necessário para vencer a barreira da energia de ativação de uma eletrólise em um eletrodo (SOUZA, 1997). Consequentemente, ocorre o aumento da sensibilidade e da especificidade das determinações do sistema.

A adsorção ou eletrólise de algum interferente na superfície do eletrodo e a competição do mesmo com a espécie de interesse, são fatores que podem mascarar a resposta eletroquímica do composto utilizado. A utilização de uma membrana polimérica na superfície do eletrodo, a qual seja compatível com a espécie de interesse, é um dos artifícios para inibir por meios físicos a ação dos interferentes (CARVALHO et al., 2011).

## **2.2.Filmes Poliméricos como Agentes Modificadores**

Polímero é qualquer material orgânico ou inorgânico, sintético ou natural, que possua um alto peso molecular e variedades estruturais repetitivas normalmente de baixa massa molecular (KAHOVEC et al., 2002). Os polímeros são classificados principalmente como: Polímeros redox, polímeros condutores eletronicamente e polímeros de troca iônica.

No inicio dos anos 70, SHIRAKAWA e IKEDA demonstraram a possibilidade de preparar filmes auto-suportados de poliacetileno pela

polimerização direta do acetileno. O polímero produzido apresentou propriedades semicondutoras que atraíram pouco interesse. Em 1977, quando MacDIARMID e colaboradores trataram o poliacetileno com ácido ou base de Lewis, pôde-se perceber que a condutividade do polímero aumentou até 13 ordens de grandeza. Este método envolve a remoção ou adição de elétrons da cadeia polimérica, sendo denominado “dopagem” (De PAOLI e GAZOTTI, 2002).

Em épocas passadas, os polímeros sintetizados sempre se comportaram como excelentes isolantes elétricos, mas nos últimos anos uma nova classe de polímeros orgânicos tem sido desenvolvida, cuja importância está relacionada à possibilidade de conduzir eletricidade (MAIA et al., 2000). Depois do trabalho de MacDIARMID e colaboradores, houve um crescimento significativo da pesquisa sobre estruturas poliméricas conjugadas, levando ao desenvolvimento de novas famílias de polímeros condutores (BAGHERI et al., 2013). Com modificações químicas apropriadas, eles podem exibir um intervalo de condutividades desde semicondutor até condutor, chegando a condutividades comparáveis à do cobre ( $10^6$  S.cm<sup>-1</sup>). Também chamados de “metais sintéticos”, os polímeros condutores se caracterizam por apresentar longos sistemas π conjugados, ou seja, uma alternância de ligações simples e duplas ao longo da cadeia (De PAOLI e GAZOTTI, 2002).

A polimerização eletroquímica, ou eletropolimerização, é uma técnica muito utilizada para a funcionalização da superfície do eletrodo. Esse método consiste na aplicação de um potencial, ou corrente adequada, para o transdutor embebido numa solução aquosa contendo moléculas de monômeros. A oxidação do monômero dá origem a um cátion radical, que pode reagir com um segundo cátion radical ou com um monômero neutro. Nesse processo um dímero é formado, o qual também pode sofrer oxidação, dando origem a um polímero na superfície do eletrodo (SASSOLAS et al., 2012). Para os heterocíclicos, ocorre a formação de um cátion-radical do monômero, seguido do acoplamento de dois cátions radicais, com saída de dois prótons e reconstituição do sistema aromático (MAIA et al., 2000).

No caso de síntese química, um agente oxidante é introduzido no meio reacional provocando a formação do cátion radical. O requisito básico para a

espécie ser utilizada como oxidante é possuir um potencial de redução suficiente para a oxidação do monômero (MAIA et al., 2000).

Nos biossensores, a imobilização da biomolécula na matriz polimérica pode ocorrer por adsorção, “*entrapment (aprisionamento)*” ou ligação covalente com algum grupo funcional do polímero (SASSOLAS et al., 2012). A utilização de polímeros condutores na construção de sensores é muito frequente, sendo que os de maior aplicabilidade são a Polianilina, Polipirrol, Politiofenol e polifenol (De PAOLI e GAZOTTI, 2002).

Em relação aos biossensores eletroquímicos de DNA, algumas pesquisas têm demonstrado a utilização da eletropolimerização na superfície dos eletrodos como alternativa para melhorar a imobilização das sondas de oligonucleotídeos (BALVEDI et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014).

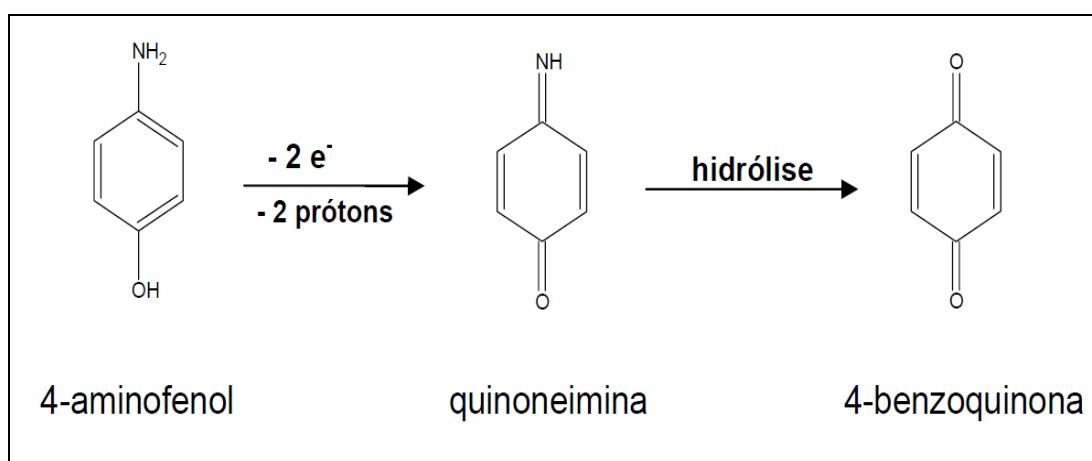
### **2.3.Poli(4-aminofenol)**

Os polímeros não condutores apresentam alta resistividade, crescimento auto-limitado, película polimérica muito mais fina do que os filmes típicos de polímeros condutores, permeabilidade seletiva e propriedades anti-incrustantes (FRANCO et al., 2008). Todas essas características, associadas com o seu rápido tempo de resposta, fazem desses polímeros uma ótima alternativa para melhorar a seletividade dos biossensores.

O 4-aminofenol pertence a uma classe de compostos não condutores que apresentam interessante propriedade eletroquímica, pois possuem dois grupos que podem ser oxidados, NH<sub>2</sub> e OH (FRANCO et al., 2008). A eletropolimerização dos fenóis ocorre pelo acoplamento orto ou para dos radicais de fenolato gerados pela oxidação de seu ânion. Subsequentemente, reações produzem oligômeros e poli (óxidos de feníleno), os polímeros então se depositam na superfície do eletrodo (VIEIRA et al., 2006).

Estudos recentes sugerem que a eletro-oxidação do 4-aminofenol envolve a absorção de dois elétrons e dois prótons, produzindo um quinoneimina (figura 4). No passo seguinte, quinoneimina sofreria hidrólise, produzindo p-benzoquinona. Sugere-se também que as reações químicas secundárias entre p-

benzoquinona e 4-aminofenol tornam-se cada vez mais importante medida que o valor do pH é aumentado, possibilitando a ocorrência de reações de acoplamento 1,4 e geração de filme na superfície do eletrodo sobre a eletrooxidação de 4-aminofenol (VIEIRA et al., 2006).



**Figura 4** – Reação de eletrooxidação do 4-aminofenol. Adapado de VIEIRA et al (2006).

Devido à presença de dois agrupamentos eletroativos, NH<sub>2</sub> e OH, os aminofenóis podem formar polímeros com locais reativos para incorporação de metais ou biomoléculas, com aplicações em eletrocatalise e biossensores eletroquímicos (FRANCO et al., 2008). Estudos recentes têm demonstrado que em meio ácido os polímeros de aminofenóis apresentaram boa atividade eletroquímica (KONG et al., 2011; VIEIRA et al., 2006).

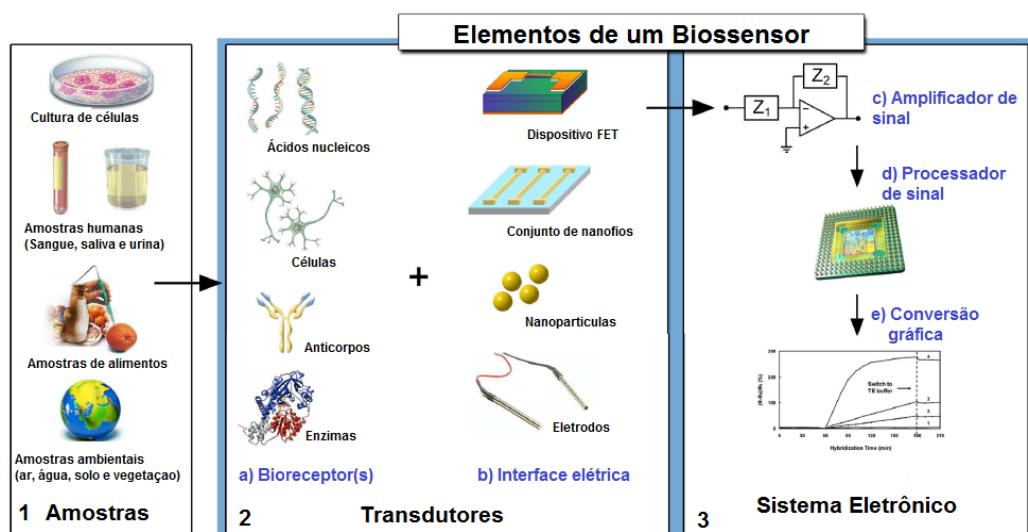
No desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, a utilização de polímeros não condutores têm se tornado frequente, conforme alguns trabalhos encontrados na literatura (BALVEDI et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014). Em relação ao polímero de 4-aminofenol, PARAÍSO e colaboradores (2014), demonstraram a utilização do mesmo na imobilização da enzima piruvato oxidase para reconhecimento da alanina aminotransferase (ALT), no desenvolvimento de um bioeletrodo para diagnóstico de doenças no fígado.

### 3.Biossensores

#### 3.1.Definição e Constituição básica de um Biossensor

Biossensores são pequenos dispositivos, capazes de proporcionar informação quantitativa, seletiva, analítica ou semi-quantitativa que utilizam um elemento de reconhecimento biológico (THEVENOT et al., 2001; ZHANG et al., 2000). Esses dispositivos são ligados a um sistema de detecção, transdução e amplificação do sinal gerado pelas interações biológicas existentes (figura 5). São constituídos basicamente por dois componentes principais: o biorreceptor e o transdutor de sinal (REIMHULT, et al., 2008; THEVENOT et al., 2001). O biorreceptor compreende a plataforma na qual irá ocorrer a reação biológica. Normalmente essas reações ocorrem entre duas biomoléculas principais, das quais uma é imobilizada e utilizada como sonda para reconhecer a molécula alvo. O transdutor é responsável por converter os processos de biorreconhecimento em sinais mensuráveis (massa, carga, calor ou luz) e está associado a uma unidade processadora de sinal que é muito importante na análise do mesmo (REIMHULT et al., 2008; ZHANG et al., 2000).

Em relação à constituição dos biorreceptores, vários componentes biológicos têm elevado potencial para serem utilizados, como enzimas, anticorpos, receptores, ácidos nucleicos e aptâmeros (REIMHULT, et al., 2008; PERUMAL e HASHIM, 2013).



**Figura 5** – Imagem ilustrativa da constituição básica de um biosensor. Em (1) estão representadas algumas das possíveis amostras de origem do analito específico a ser analisado, (2) representa o transdutor com seus constituintes ligado a um sistema de sinal elétrico (3). Adaptado de REIMHULT et al (2008).

### 3.2. Classificação dos Biosensores

As mudanças físico-químicas geradas pelo biorreceptor podem ser mensuradas de diversas formas, e dessa maneira, vários tipos de transdutores de sinal podem ser acoplados no mesmo. Dentre os principais tipos de transdutores utilizados pode-se citar os ópticos, piezoelétricos, calorimétricos, e eletroquímicos (PERUMAL e HASHIM, 2013).

Os transdutores ópticos baseiam-se na medição da luz observada ou emitida como um resultado de uma reação química ou biológica. Nesse caso, fibras ópticas são usadas para guiar as ondas de luz a detectores adequados, como um eletrodo ou semicondutor (TELES e FONSECA, 2008). A Surface Plasmon Resonance (SPR) é uma técnica óptica muito utilizada no desenvolvimento de biosensores (CARVALHO e RATH, 2003).

Os transdutores piezoelétricos conseguem medir alteração de massa ou microviscosidade, onda de cisalhamento e superfície acústica (THÉVENOT et al, 2001). O princípio dessa técnica é a variação de massa que existe depois que uma substância biologicamente ativa se liga com seu analito-alvo. Os cristais de quartzo têm sido muito utilizados em sistemas piezoelétricos, pois sua frequência pode oscilar na faixa de megahertz ( $10^6$  ciclos/segundo) de maneira proporcional à massa do cristal, além de serem muito sensíveis às variações de massa. A massa do cristal aumenta enquanto a frequência de ressonância das oscilações diminui proporcionalmente (TELES e FONSECA, 2008).

Os transdutores calorimétricos detectam substratos baseados no calor envolvido nas reações bioquímicas do analito com uma substância biológica ativa adequada, como uma enzima. A forma mais utilizada acopla as substâncias diretamente ao termíster, que detecta o calor envolvido na reação bioquímica (THÉVENOT, 2001).

Os transdutores eletroquímicos medem o movimento de íons e difusão de espécies eletroativas. Devido a sua alta sensibilidade, compatibilidade com tecnologias de microfabricação, portabilidade, requisitos de energia mínima, triagem rápida, estabilidade e baixo custo (WANG, 2002) são os dispositivos mais utilizados em biossensores para testes de monitoramento e diagnóstico em análises clínicas.

Classificam-se em: amperométricos, os quais medem a corrente resultante da oxidação ou redução eletroquímica de uma espécie eletroativa, ocorrendo a transferência de elétrons do analito para o eletrodo ou vice-versa (THÉVENOT et al., 2001); potenciométricos, que determinam a diferença de potencial entre o eletrodo indicador e o de referência ou dois eletrodos de referência separados por uma membrana seletiva permeável, em que não há fluxo de corrente significativa entre eles (THÉVENOT et al, 2001); condutimétricos, que medem as alterações na condutância. As reações catalisadas pelas enzimas, por exemplo, produzem ou consomem espécies iônicas, mudando a quantidade de portadores de carga móvel no eletrólito (SASSOLAS et al., 2012).

### **3.3.Biossensores Eletroquímicos de DNA**

As sequências de ácidos nucleicos são distintas para qualquer organismo vivo, e devido a esse fato, podem fornecer meios práticos para identificar e diagnosticar várias doenças causadas por patógenos (LIU et al., 2012). Nos últimos anos, novas tecnologias que envolvem o DNA têm surgido, e dentre elas a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) tem sido muito utilizada devido a sua alta sensibilidade (GUIDUCCI et al., 2004; LIU et al., 2012). Apesar das diversas inovações no que se refere as técnicas que utilizam o material genético como amostra, ainda existe uma necessidade de métodos de diagnóstico mais rápidos.

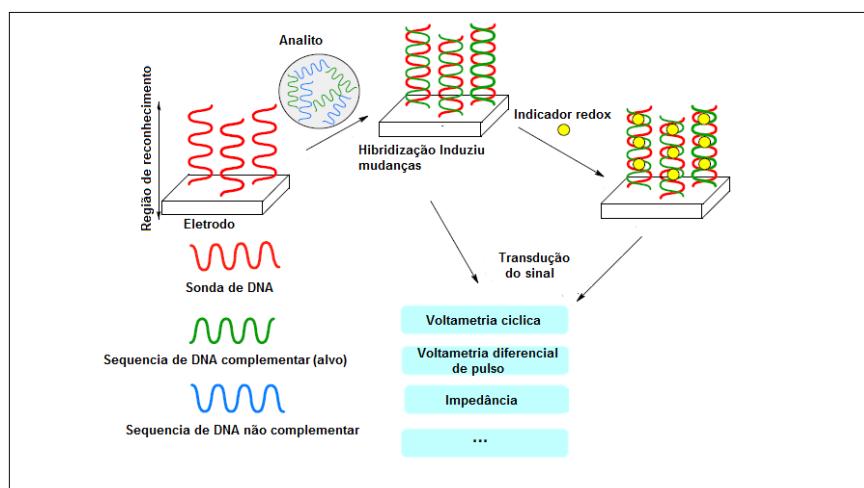
O biossensor eletroquímico de DNA é um dispositivo que integra um ácido nucleico (formas naturais e biomiméticas de oligo/polinucleótidos) como o elemento de reconhecimento biológico e um eletrodo como o transdutor físico (LABUDA et al., 2010; THEVENOT et al., 2001). Esse tipo de sensor tem aplicação em estudos de expressão genética, genotipagem, farmacogenômica,

classificação de patógeno, descoberta de drogas, sequenciamento e diagnóstico molecular (LIU et al., 2012). Em comparação com os testes tradicionais que envolvem ácidos nucleicos, o biossensor eletroquímico de DNA possui vantagens como a detecção rápida, simplicidade, alta sensibilidade, seletividade, conveniência experimental e baixo custo (LIU et al., 2012; TELES e FONSECA, 2008).

### 3.4.Princípio de Funcionamento de um Biosensor Eletroquímico de DNA

O biossensor eletroquímico de DNA baseia-se na detecção eletroquímica da hibridização das cadeias de DNA complementares que ocorre na superfície do eletrodo (figura 6). Desse modo, geralmente é feito o monitoramento da variação do sinal de corrente, antes e depois da ligação das fitas complementares, sob condições de potenciais controlados (LIU et al., 2012).

O eletrodo modificado contendo a sonda immobilizada, que é um oligonucleotídeo, geralmente é imerso numa solução contendo a sequência complementar do mesmo. A ligação das duas cadeias de oligonucleotideos complementares irá resultar na formação de um híbrido, o qual irá induzir mudanças eletroquímicas na superfície do eletrodo que podem ser mensuradas pelo transdutor de sinal, como capacidade e condutância por exemplo (LIU et al., 2012; PERUMAL & HASHIM, 2013).



**Figura 6-** Esquema geral representativo do princípio de funcionamento de um biossenssor eletroquímico de DNA. Adaptado de LIU et al (2008).

### 3.5.Técnicas de Imobilização da Sonda

Para garantir uma boa sensibilidade e seletividade do biossensor eletroquímico de DNA, é necessário estabilidade da sonda imobilizada e que o processo de hibridização seja otimizado. Existem vários tipos de eletrodos de trabalho, e dessa forma, as técnicas de imobilização da sonda nos mesmos também são variadas (LIU et al., 2012). Dentre as principais técnicas utilizadas em biossensores podem-se incluir: auto-montagem de monocamadas ou multicamadas organizadas na superfície do eletrodo (ZHANG et al., 2000); fixação de sondas biotiniladas em eletrodos funcionalizados com avidina, promovendo a interação biotina-avidina na superfície do eletrodo (LIU et al., 2012); funcionalização da superfície do eletrodo com compostos orgânicos e utilização do complexo EDC-NSH (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida )-(N-hidroxisuccinimida) (JANEGITZ et al., 2011).

Nos ultimos anos, diversos tipos de sondas foram desenvolvidas, no intuito de melhorar a especificidade da interação entre as fitas de DNA complementares. Dentre elas destacam-se o ácido nucleico peptídeo (PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA) e Harpir DNA (LABUDA et al., 2010; G. LIU et al., 2008).

A sonda do tipo Hairpin-DNA (DNA em forma de “gancho”) é utilizada especialmente para reconhecimento de genes alvo específicos. A habilidade de detectar a hibridização do alvo sem a separação do híbrido e das sondas não hibridizadas, a capacidade de distinguir uma única base incompatível e possuir um sinal de transdução inerente a mecanismo de alta sensibilidade são algumas vantagens da utilização desse tipo de sonda (LIU et al., 2012). Alguns estudos já demonstraram a utilização da sonda Hairpin-DNA para detectar alterações genéticas, como a detecção da fusão dos genes BCR/ABL em leucemia mielóide crônica (CHEN et al., 2008).

O PNA é um tipo de DNA sintético, no qual ocorre a substituição do agrupamento fosfodiéster pelo 2-aminoetilglicina (LABUDA et al., 2010). Esse tipo de sonda é conveniente para detecção de incompatibilidade de base única, em

mutações pontuais, pois a estabilidade da ligação DNA-PNA é fortemente influenciada por incompatibilidade de bases simples (LABUDA et al., 2010; LIU et al., 2008). Alguns estudos já têm demonstrado a eficiência desse tipo de sonda em detecções de incompatibilidade de base única (FANG et al., 2008).

O LNA, do inglês “Locked Nucleic Acid”, é um nucleotídeo de RNA modificado com uma ponte de ligação extra que conecta o oxigênio-2' com o carbono-4', deixando a ribose na conformação 3'-endo (KAUPPINEM et al., 2006). As bases que constituem o LNA podem aumentar significativamente a afinidade de hibridização com o alvo e também pode-se perceber que esse tipo de sonda consegue distinguir incompatibilidade de base única (KAUPPINEM et al., 2006). A redução da flexibilidade conformacional da ribose, resistência a nuclease aumentada e baixa toxicidade são algumas vantagens de utilização do LNA (LIU et al., 2008). CHEN e colaboradores (2008), demonstraram a eficiência desse tipo de sonda no reconhecimento da fusão dos genes CML e APL.

### **3.6.Detecção Eletroquímica da Hibridização**

No eletrodo com a sonda imobilizada é aplicada uma solução contendo seu analito alvo, que no caso é uma sequência complementar de oligonucleotídeos. A partir desse momento, existe uma tendência de ocorrência de hibridização das fitas simples de DNA complementares. A confirmação desse evento pode ser realizada por dois métodos: pela detecção direta, ou pela detecção indireta (TELES e FONSECA, 2008).

Os ácidos nucleicos possuem algumas propriedades eletroquímicas, as quais lhe são conferidas pelas eletroatividade dos seus constituintes, como as nucleobases e os resíduos de açúcar (LABUDA et al., 2010). PALACEK e colaboradores (2000), desenvolveram métodos para discriminar eletroquimicamente a fita simples da cadeia dupla de DNA. Estudos posteriores demonstraram que as nucleobases podem ser oxidadas ou reduzidas, a partir de uma determinada janela de potencial aplicada (LABUDA et al., 2010). Esses potenciais de oxidação e/ou redução das bases nitrogenadas variam de acordo com o tipo de eletrodo de trabalho utilizado.

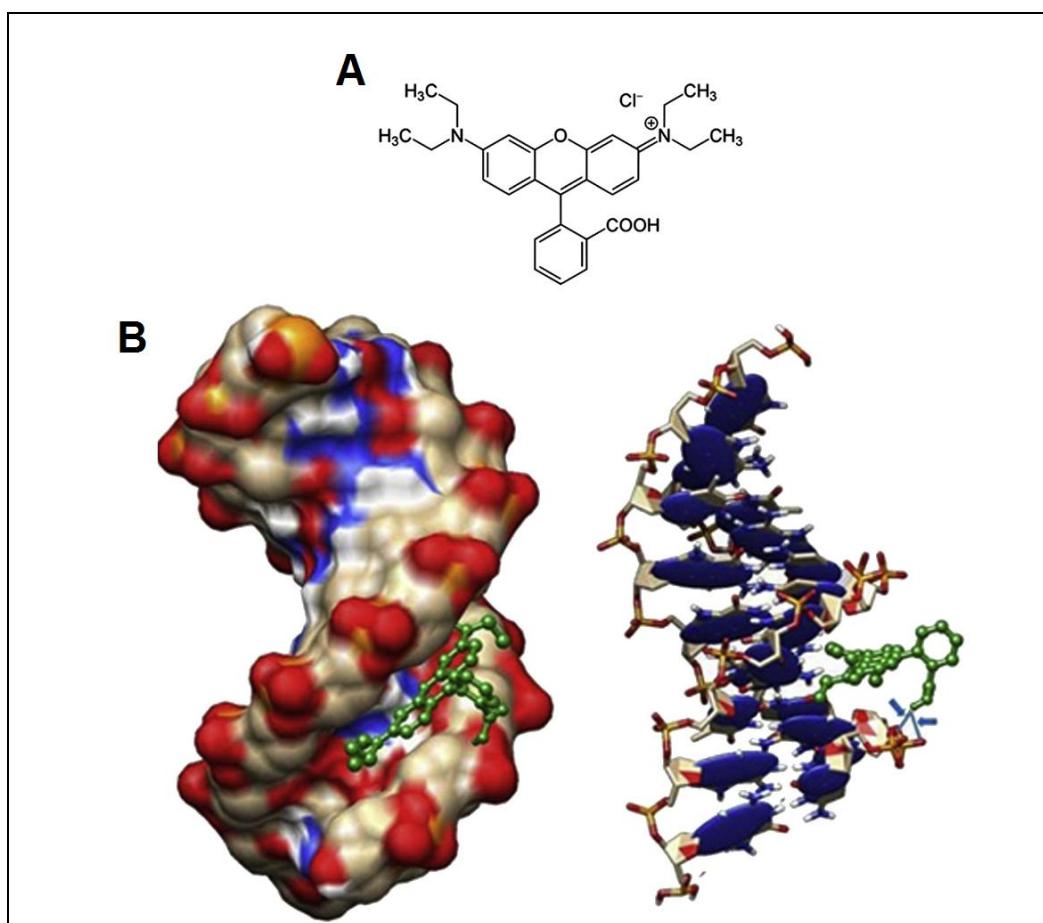
Na detecção eletroquímica direta, é monitorado o sinal de corrente proveniente da oxidação e/ou redução das nucleobases que constituem as cadeias de DNA (LIU et al., 2012). A reação de hibridização, geralmente provoca uma diminuição da corrente de pico redox, porque os pontos redox da dupla fita de DNA estão comprometidos com as pontes que mantêm as cadeias juntas (TELES e FONSECA, 2008). Além disso, a maior rigidez da cadeia dupla em comparação com a cadeia simples dificulta o seu acomodamento espacial na superfície microscópica do eletrodo, diminuindo a transferência de elétrons (TELES e FONSECA, 2008).

A detecção eletroquímica indireta é caracterizada pela utilização de mediadores de elétrons ou intercalantes que se ligam às cadeias de DNA (WANG, 2002). Nesse caso, é feito o monitoramento do sinal de corrente proveniente da oxidação ou redução do intercalante ou do mediador de elétron utilizado (tabela 3). Os pares redox  $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ ,  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  e  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  são frequentemente utilizados como mediadores de elétrons em biossensores (Liu LIU et al., 2012; WANG, 2002). Dentre os intercalantes com grande aplicabilidade em biossensores, podem-se citar o Azul de Metileno, Brometo de Etídio, Hoechst 33258 e Hematoxilina (LIU et al., 2012; WANG, 2002). Na maioria dos casos, os intercalantes possuem alta afinidade com a cadeia dupla de DNA, ligando-se ao sulco menor da mesma.

**Tabela 3.** Características de alguns mediadores de elétrons e intercalantes frequentemente utilizados para detecção indireta em biossensores eletroquímicos de DNA. Adaptado de (LIU et al., 2012).

Mediador ou Intercalante	Técnica de detecção	Faixa de linearidade	Limite de detecção
$\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$	Voltametria Diferencial de Pulso	$1 \times 10^{-12} - 1 \times 10^{-8}$ M	$1 \times 10^{-12}$ M
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$	Medida Microgravimétrica	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-8}$ M	$1 \times 10^{-13}$ M
$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$	Cronocoulometria	$8.7 \times 10^{-17} - 1.6 \times 10^{-12}$ M	$2.8 \times 10^{-17}$ M
Azul de Metileno	Voltametria Diferencial de Pulso	$6 \times 10^{-11}$ M – $2.2 \times 10^{-10}$ M	$6.7 \times 10^{-12}$ M
2-Nitroacridona	Voltametria Diferencial de Pulso	$1.8 \times 10^{-8}$ M – $9.1 \times 10^{-8}$ M	$6.7 \times 10^{-9}$ M
Hoescht 33258	Voltametria de Varredura linear	1.5 – 25 mg/L	1.5 mg/L

A Rodamina B é um corante de xanteno muito utilizado na detecção de íons metálicos por fluorescência, e na biotecnologia, possui grande aplicabilidade em estudos de microscopia de fluorescência, citometria de fluxo e ELISA (ISLAM et al., 2013). Esse corante possui propriedades farmacológicas e apresenta atividade antibacteriana quando conjugado com outros pepetídeos (BUCKI et al., 2004). Pesquisas já demonstraram que a Rodamina B possui efeitos mutagênicos. Em culturas de células *in vitro*, a exposição das mesmas a esse composto acarretou o surgimento de aberrações cromossômicas (ELLIOT et al., 1990). De acordo com ISLAM e colaboradores (2013), a Rodamina B possui alta afinidade com a fita dupla de DNA, ligando-se na região do sulco menor da mesma, conforme a figura 7. Essa propriedade permite que esse corante possa ser utilizado como um potencial intercalante de DNA.



**Figura 7.** Rodamina B: em (A) está representada a estrutura molecular da Rodamina B, e em (B) está representada de forma ilustrativa, por modelagem

molecular, a região de interação entre o composto e a molécula de DNA. Adaptado de (ISLAM et al., 2013).

## **4. Controle de Qualidade de um Biosensor**

Alguns aspectos são fundamentais para que o biosensor em construção possa ser considerado como capaz de detectar de forma eficaz a biomolécula desejada. Parâmetros analíticos como sensibilidade, seletividade, especificidade, linearidade, e limite de quantificação são rigorosamente utilizados para garantir a credibilidade de um biosensor.

### **4.1. Especificidade e Seletividade**

Especificidade e seletividade são parâmetros que indicam a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (THOMPSON et al., 2002). Para análise qualitativa (teste de identificação) é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos (preferivelmente em relação ao material de referência conhecido) em amostras contendo o analito, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contenham o analito, mas compostos estruturalmente semelhantes. Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais (ANVISA, 2003).

### **4.2. Limite de Detecção**

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado (sensibilidade), porém não necessariamente

quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (THOMPSON et al., 2002). O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável. No caso de métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base (ANVISA, 2003).

#### **4.3. Limite de Quantificação**

Limite de Quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (THOMPSON et al., 2002). É um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em analitos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito (por exemplo, porcentagem p/p ou p/V, partes por milhão) na amostra. O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis (ANVISA, 2003).

#### **4.4. Linearidade**

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (THOMPSON et al., 2002). Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. Os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r$ ) deve ser = 0,99 (ANVISA, 2003).

Atualmente, vários biossensores, inclusive de DNA, têm se destacado por apresentar alta sensibilidade, especificidade e seletividade com limite de detecção na ordem de picomolar (LIU et al, 2008).

## 5.Referências Bibliográficas

- BAGHERI, H.; AYAZI, Z.; NADERI, M. Conductive polymer-based microextraction methods : A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 767, p. 1–13, 2013.
- BALVEDI, R. P. A.; CASTRO, A. C. H; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. Detection of a Specific Biomarker for Epstein-Barr Virus Using a Polymer-Based Genosensor. **International Journal of Molecular Science**, p. 9051–9066, 2014.
- BARCO, S.; GENNAI, I.; REGGIARDO, G.; GALLENI, B.; BARBAGALLO, L.; MAFFIA, A.; VISCARDI, E.; LEONARDIS, F.; CECINATI, V.; SORRENTINO, S.; GARAVENTA, A.; CONTE, M.; CANGEMI, G. Urinary homovanillic and vanillylmandelic acid in the diagnosis of neuroblastoma: Report from the Italian Cooperative Group for Neuroblastom. **Clinical Biochemistry**, 2014.
- BOM, A. P. K. P.; DEPONTE, C. S.; LIMA, I. C.; PIASECKI, I.; PIERIN, A. J.; BONATTO, J. V. Neuroblastoma cervical - Um relato de caso. **Residencia Pediátrica**, v. 4, n. 1, p. 17–21, 2014.
- BORDOW, S. B.; NORRIS, M. D.; HABER, P. S.; MARSHALL, G. M.; HABER, M. Prognostic significance of MYCN oncogene expression in childhood neuroblastoma. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 16, n. 10, p. 3286–94, 1998.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de informações sobre mortalidade :SIM.** Brasília: Ministério da Saúde, 2008. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sim/cnv/obtuf.def>>. Acesso em: 22 Maio. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **INCA e Ministério da Saúde apresentam estimativas de câncer para 2014.** Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca\\_ministerio\\_saude\\_apresentam\\_estimativas\\_cancer\\_2014](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014)>. Acesso em: 22 Maio. 2014.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos - Resolução nº 899, 29 de maio de 2003.** Disponível em [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm). Acesso em: 17 Abril. 2014.

BRODEUR, G. M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. **Nature**, v. 3, 2003.

BUCKI, R.; PASTORE, J.J.; RANDHAWA, P.; VEGNERS, R.; WEINER, D.J.; JANMEY, P.A. Antibacterial activities of Rhodamine B-conjugated gelsolin-derived peptides compared to those of the antimicrobial peptides cathelicidin LL37, magainin II, and melittin. **Antimicrobial Agents Chemother**. v.48, p.1526-33, 2004.

CARVALHO, R. M.; RATH, S. SPR - Uma Nova Ferramenta Para Biossesores. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 97–104, 2003.

CARVALHO, S. E. Q. Desenvolvimento e aplicação de eletrodos quimicamente modificados com Hexacianoferratos dos metais Fe, Ni e Co . **Dissertação de Mestrado do Instituto de Química de São Carlos**, 2011.

CARTUM, J. Variáveis de prognóstico em crianças maiores de um ano portadoras de neuroblastoma disseminado. **Tese - Faculdade de Medicina, Universidade de São paulo**, São Paulo, 2010.

CHEN, J.; ZHANG, J.; HUANG, L.; LIN, X.; CHEN, G. Biosensors and Bioelectronics Hybridization biosensor using 2-nitroacridone as electrochemical indicator for detection of short DNA species of Chronic Myelogenous Leukemia. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 349–355, 2008.

COHN, S.L. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. **Journal Clinical Oncology**, V.27. n. 2. p. 289-97, 2009

DANG, C. V. Review MYC on the Path to Cancer. **Cell**, v. 149, n. 1, p. 22–35, 2012.

DE PAOLI, W. A.; GAZOTTI, M.-A. Electrochemistry, Polymers and Opto-Electronic Devices: A Combination with a Future. **Jornal da Sociedade Brasileira de Química**, v. 13, n. 4, p. 410–424, 2002.

ELLIOT, G.S.; MASON, R.W.; EDWARDS, I.R. Studies on the pharmacokinetics and mutagenic potential of Rhodamine B. **Journal Clinical Toxicology**. V.28, p.45-59, 1990.

FANG, B.; JIAO, S.; LI, M.; QU, Y.; JIANG, X. Label-free electrochemical detection of DNA using ferrocene-containing cationic polythiophene and PNA probes on nanogold modified electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, p. 1175–1179, 2008.

FARIA, M. H.; ROBENHORST, S. H. B. Impacto do oncogene C-MYC no câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 2, p. 165–171, 2006.

FISHER, J. P. H.; TWEDDLE, D. A. Seminars in Fetal & Neonatal Medicine Neonatal neuroblastoma. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 17, n. 4, p. 207–215, 2012.

FRANCO, D. L.; AFONSO, A. S.; VIEIRA, S. N.; FERREIRA, L. F.; GONÇALVES, R. A.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Electropolymerization of 3-aminophenol on carbon graphite surface: Electric and morphologic properties. **Materials Chemistry and Physics**, v. 107, p. 404–409, 2008.

GHAEDI, M.; NADERI, S.; MONTAZEROZOHORI, M. Chemically modified multiwalled carbon nanotube carbon paste electrode for copper determination. **Arabian Journal of Chemistry**, 2013.

GUIDUCCI, C.; STAGNI, C.; ZUCCHERI, G.; BOGLIOLO, A.; BENINI, L.; SAMORI, B.; RICCO, B. DNA detection by integrable electronics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, p. 781–787, 2004.

ISLAM, Md. M.; CHAKRABORTY, M.; PANDYA, P.; MASUM, A. A.; GUPTA, N.; MUKHOPADHYAY. Binding of DNA with Rhodamine B: Spectroscopic and molecular modeling studies. **Dyes and pigments**. V. 99, p.412-422, 2013.

JANEGITZ, B. C.; PAULIUKAITA, R.; GHICA, M. E.; BRETT, C. M. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Direct electron transfer of glucose oxidase at glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a dihexadecylphosphate film. **Sensors & Actuators B: Chemical**, v. 158, n. 1, p. 411–417, 2011.

KAHOVEC, J.; FOX, R. B.; HATADA, K. Nomenclature of Regular Single-Strand Organic Polymers. **International Union of Pure and Applied Chemistry** . v.74, p.1921-1956, 2002.

KONG, Y.; ZHOU, Y.; SHAN, X.; JIANG, Y.; YAO, C. Electropolymerization of m - aminophenol on expanded graphite and its electrochemical properties. **Synthetic Metals**, v. 161, n. 21-22, p. 2301–2305, 2011.

LABUDA, J.; BRETT, A. M. O.; EVTUGYN, G.; FOJTA, M.; MASCINI, M.; OZSOZ, M.; PALCHETTI, I.; PALECEK, E.; WANG, J. Electrochemical nucleic acid-based biosensors : Concepts , terms , and methodology ( IUPAC Technical Report )\*. **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, n. 5, p. 1161–1187, 2010.

LIU, A.; WANG, K.; WENG, S.; LEI, Y.; LIN, L.; CHEN, W.; LIN, X.; CHEN, Y. Development of electrochemical DNA biosensors. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 101–111, 2012.

LIU, G.; WAN, Y.; GAU, V.; ZHANG, J.; WANG, L.; SONG, S.; FAN, C. An Enzyme-Based E-DNA Sensor for Sequence-Specific Detection of Femtomolar DNA Targets. *n.* 18, p. 8575–8580, 2008.

LU, X.; PEARSON, A. e LUNEC, J. The MYCN oncoprotein as a drug development target. **Cancer Letters**, v. 197, p. 125–130, 2003.

MAIA, D. J.; DE PAOLI, M. A.; ALVES, O. L.; ZARBIN, A. J. G.; NEVES, S. SÍNTSESE DE POLÍMEROS CONDUTORES EM MATRIZES SÓLIDAS HOSPEDEIRAS. **Química Nova**, v. 23, n. 2, 2000.

MOREAU, L. A.; McGRADY, P.; LONDON, W. B. Does MYCN Amplification Manifested as Homogeneously Staining Regions at Diagnosis Predict a Worse Outcome in Children with Neuroblastoma ? A Children ' s Oncology Group Study Does MYCN Amplification Manifested as Homogeneously Staining Regions at Diagnosi. **Clinical Cancer Research**, 2006.

MOSSÉ, P. Y.; DEYELL, R. J.; BERTHOLD, F.; NAGAKAWARA, A.; AMBROS, P. F.; MONCLAIR, T.; COHN, S. L.; PEARSON, A.D.; LONDON, W.B.; MATTHAY, K. K. Neuroblastoma in Older Children, Adolescents and Young Adults: A Report From the International Neuroblastoma Risk Group Project. **Pediatric Blood Cancer**. V.61, p.627–635, 2014.

MOSES, P. R.; WIER, P; MURRAY, R. W. Chemically Modified Tin Oxide Electrode. **Analytical Chemistry**,v.47, p.1882-1886, 1975.

PALACEK, H.; JELEN, F. In **Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins.Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics**, PALACEK, E; SCHELLER. F; WANG, J. **Elsevier, Amsterdam**, p. 74–174, 2005.

PARAÍSO, L. F.; PAULA, L. F.; FRANCO, D. L.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. Bioelectrochemical Detection of Alanine Aminotransferase for Molecular Diagnostic of the Liver Disease. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 9, p. 1286–1297, 2014.

PERUMAL, V.; HASHIM, U. ScienceDirect Advances in biosensors : Principle , architecture and. **Journal of Economics, Finance and Administrative Science**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2013.

REIMHULT, E; GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VOROS, J. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, p. 1400–1458, 2008.

RODRIGUES, L. P.; FERREIRA, L. F.; MONTE, A. F. G.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Bioelectrode Applied to Diagnosis of Cardiac Disease. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, p. 1–11, 2014.

SANTOS, T. A. P. Neuroblastoma: anjo e demónio da Oncologia Pediátrica Neuroblastoma : anjo e demónio da Oncologia Pediátrica. **Arquivos de Medicina**, 2010.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J. e LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 489–511, 2012.

SCALFI-HAPP, C.; JAUSS, A.; IBACH, W.; HOLLRICKER, O.; FULDA, S.; HAUSER, C.; STEINER, R.; RUCK, A. Confocal Raman microscopy as a diagnostic tool for investigation of living neuroblastoma tumour cells. **Medical Laser Application**, v. 22, n. 3, p. 157–164, 2007.

SHIRAKAWA, H.; IKEDA, S. Cyclotrimerization of Acetylene by the tris (acetylacetonato) Titanium (III) Diethylaluminum Chloride System. **Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry**, v.12, p.929-937, 1974.

SHIRAKAWA, H.; LOUIS, E. J.; MacDIARMID, A. G.; CHINAG, C. K.; HEEGER, A. J.; J. Synthesis of Electrically Conducting Organic Polymer: Halogen Derivatives of Polyacetylene. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p. 578-580, 1977.

SCHNEIDERMAN, J.; LONDON, W. B.; BRODEUR, G. M.; CASTLEBARRY, R. P.; LOOK, A. T.; COHN, S. L. Clinical significance of MYCN amplification and

ploidy in favorable-stage neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 26, n. 6, p. 913–8, 2008.

SOUZA, M. F. B. Eletrodos Quimicamente Modificados Aplicados À Eletroanálise: Uma Breve Abordagem. **Química Nova**, v. 20, n. 2, p. 191–195, 1997.

TELES, F. R. R.; FONSECA, L. P. Trends in DNA biosensors. **Talanta**, v. 77, p. 606–623, 2008.

THEVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Technical report Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, p. 121–131, 2001.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**. V. 74, p.835-855, 2002.

TORTURELLA, M. R.; FIGUEIREDO, M. N. F. C.; JÚNIOR, P. J. O.; MEIRELES, S. H. S.; YAMANE, Y. Neuroblastoma com metástase orbitária. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 70, n. 2, p. 109–113, 2011.

VIEIRA, S. N.; FERREIRA, L. F.; FRANCO, D. L.; AFONSO, A. S.; GONÇALVES, R. A.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Electrochemical Modification of Graphite Electrodes with Poly ( 4-aminophenol ). **Macromolecular Symposia**, p. 236–242, 2006.

WANG, J. Electrochemical nucleic acid biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 469, p. 63–71, 2002.

WARNAT, P.; OBERTHUER, A.; FISCHER, M.; WESTERMANN, F.; EILS, R.; BRORS, B. Cross-study analysis of gene expression data for intermediate neuroblastoma identifies two biological subtypes. **Biomed Central Cancer**, v. 7, p. 89, 2007.

WESTERMARK, U. K.; WILHELM, M.; FRENZEL, A.; HENRIKSSON, M. A. Seminars in Cancer Biology The MYCN oncogene and differentiation in neuroblastoma. **Seminars in Cancer Biology**, v. 21, n. 4, p. 256–266, 2011.

ZHANG, S.; WRIGHT, G. e YANG, Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 15, p. 273–282, 2000.

**Capítulo II: Desenvolvimento de um Genossensor  
Eletroquímico para Detecção de MYCN Utilizando  
Rodamina B como Intercalante**

## **RESUMO**

Um novo genossensor eletroquímico de grafite modificado com poli (4-aminofenol) foi construído para a detecção de neuroblastoma, um tumor maligno originário a partir de células precursoras embrionárias do sistema nervoso simpático, e associado com a amplificação do oncogene MYCN. O genossensor produzido exibiu propriedades elétricas e morfológicas distintas, utilizando rodamina B, espécie capaz de se ligar com a fita dupla de DNA, como indicador do processo de hibridação. O limite de detecção obtido foi de 0,47 µmol.L<sup>-1</sup> (N = 3) e mostrou maior seletividade para o DNA complementar, utilizando amostras de soro. Esta plataforma de detecção de DNA foi aplicada com sucesso para detectar a MYCN, um biomarcador importante para o neuroblastoma.

**Palavras-Chave:** MYCN, neuroblastoma, rodamina b, genossensor, poli(4-aminofenol)

## **Development of an electrochemical genosensor for MYCN detection using rhodamine B as electroactive label**

Thalles Douglas Souza e Silva<sup>1</sup>, Ana Cristina Honorato de Castro<sup>1</sup>, Vinícius Rezende Rodovalho<sup>1</sup>, João Marcos Madurro<sup>2</sup>, Ana Graci Brito Madurro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Brazil

<sup>2</sup>Institute of Chemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Brazil.

\*Author to whom correspondence should be addressed. Tel. +55 34 32182203; Fax: +55 3432182203; E-mail: agbrito@iqufu.ufu.br

### **Abstract**

A novel electrochemical genosensor with modified graphite with poly(4-aminophenol) has been constructed for detection of neuroblastoma, a malignant tumor originating from embryonic precursor cells of the sympathetic nervous system and associated with the amplification MYCN oncogene. The produced genosensor exhibited distinct electric and morphological properties using rhodamine b, specie able to bind with DNA duplex, as indicator of the hybridization process. The detection limit was evaluated to be 0.47 umol.L<sup>-1</sup> (N=3) and showed very high selectivity for the complementary DNA using serum sample. This DNA sensing platform was successfully applied to detect the MYCN, an important biomarker for neuroblastoma.

**Keywords:** MYCN, neuroblastoma, rhodamine b, genosensor, poly(4-aminophenol)

## **1- Introduction**

Neuroblastoma is a neuroepithelial malignant tumor originating from embryonic precursor cells of the sympathetic nervous system. This type of cancer develops during fetal growth or the first years of life (SANTOS, 2010). It is a solid tumor, extracranial and its development occurs in undifferentiated nerve cells of the neural crest (BOM et al., 2014; WESTERMARK et al., 2011; BORDOW et al., 1998). Studies regarding the incidence of childhood cancer around the world estimate that neuroblastoma represents about 1% to 3% of all cancer cases (COHN et al., 2009).

Recent studies have demonstrated that gene amplification of MYCN can be used as diagnosis of neuroblastoma (MOSSÉ et al., 2014; SCHNEIDERMAN et al., 2008). The MYCN belongs to a family of human proto-oncogenes that includes: MYCL associated with lung carcinomas and MYCC related to others kinds of cancers (FARIA e ROBENHORST, 2006). The protein encoded by the proto-oncogene MYCN is composed of 464 amino acid residues and contains a transcriptional activation domain at the N-terminal region and domains of protein interaction and DNA binding at the C-terminal end (WESTERMARK et al., 2011; LU, et al., 2003) being responsible for the regulation of vital cell mechanisms such as proliferation, cell growth, protein synthesis, metabolism, differentiation and apoptosis (DANG, 2012).

The traditional diagnostic methods for neuroblastoma are invasive and/or require much time for the analysis (FISHER e TWEDDLE, 2012; BOM et al., 2014; BARCO et al., 2014, SANTOS, 2010). Therefore, the need for more practical methods and rapid diagnosis is evident.

Biosensors are elements capable of recognizing a biomarker and can be applied for the molecular diagnosis of diseases (LABUDA et al., 2010, TELES e FONSECA, 2008, THEVENOT et al. 2001). Such devices are important analytical tools and used for clinical diagnosis (BALVEDI et al., 2014, PARAISO et al., 2014, RODRIGUES et al., 2014), drugs detection (REIMHULT et al., 2008), environmental impact (SANVICENS et al., 2011) among others (RUSHWARTH, et al. 2014).

Both conducting or non-conducting polymers for the biosensors is widely used since these materials to presents self-limited growth, fast response time, selective permeability and anti-fouling properties and other advantages that justify their use in biosensor applications (COSNIER, 2003; SASSOLAS, et al., 2012, FRANCO et al., 2008, VIEIRA et al., 2006).

Polymers derived from aminophenols are interesting materials since after electropolymerization produced reactive sites for incorporation of metals or biomolecules such as DNA molecules (FRANCO et al., 2008; VIEIRA et al., 2006).

In this work, a specific probe (MYCN1) targeting the proto-oncogene MYCN2 was used for the development of a genosensor based on a poly(4-aminophenol)-modified electrode. This work is the first example of the use of MYCC probes for the recognition of this particular gene using rhodamine b as indicator for molecular diagnosis of human diseases.

## 2. Experimentals

### 2.1. *Solutions and reagents*

All reagents used were of analytical grade. The solutions were prepared using deionized water ( $18.2\text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$ , Milli-Q plus system).

The 4-aminophenol monomer was purchased from Acros Organics, perchloric acid ( $\text{HClO}_4$ , 70%). Before the electrodeposition procedures, all solutions were maintained under bubbling with  $\text{N}_2$ . Rhodamine B was purchased from Sigma-Aldrich.

The MYCN oligonucleotides were synthesized by Alpha DNA: 5'-TGCAGTTCCGGTGGCTGATC-3' (MYCN1probe), 3' ACGTCAAGGCCACCGACT AG-5' (MYCN2 target) and 3'-AATGTGCTCCCCAACTCCTC-3' (non-MYCN) for the DNA non-complementary sequence.

Stock solutions of the  $0.063\text{ mmol L}^{-1}$  probe and  $0.189\text{ mmol L}^{-1}$  target oligonucleotides were prepared in SSC 6X buffer ( $0.9\text{ mol L}^{-1}$  NaCl,  $90\text{ mmol L}^{-1}$  sodium citrate, pH 7.0) and stored in a freezer until use. Phosphate buffer components ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) were purchased from Sigma-Aldrich

Chemical, USA (ACS purity). All reagents were used as received. The hybridization experiments were conducted at 55 °C.

## 2.2. Apparatus

All electrochemical experiments were performed using a CH Instruments potentiostat, model 420A. Cells of three compartments and one compartment, were used for electropolymerization and detection of biomolecules, respectively. A graphite disk (6 mm diameter) cut from a graphite rod (99.9995%, Alfa Aesar) was used as working electrode. Platinum was used as the auxiliary electrode and silver-silver chloride (Ag/AgCl, KCl 3.0 mol.L<sup>-1</sup>) as reference electrode. All solutions were degassed by nitrogen bubbling. Surface morphology was carried out using atomic force microscopy (AFM) (*Shimadzu SPM 9600*). All experiments were conducted at room temperature.

## 2.3. Electrode surface modification

Before electropolymerization, graphite electrodes were mechanically polished with alumina (3µm diameter) slurry, ultra sonicated, washed with deionized water and dried in nitrogen.  $2.5 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> 4-aminophenol in 0.5 mol.L<sup>-1</sup> perchloric acid was deoxygenated at N<sub>2</sub> for 60 minutes. The electrodeposition with poly(4-aminophenol) onto graphite electrode was performed through continuous potential scans by cyclic voltammetry, 100 scans, 50mV.s<sup>-1</sup> of according with VIEIRA et al (2006) in three-compartment cell.

## 2.4. Probe Immobilization onto modified graphite electrode

The immobilization of oligonucleotide was carried out by applying MYCN1 ( $0.063 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>, 18µL) onto modified electrode at 37°C. Then the electrode was immersed in 10mL phosphate buffer (0.1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7.4) with agitation and dried in N<sub>2</sub>. The blocking of the binding of non-specific biomolecules on electrode

surface was done with BSA 0.5% (w/v) for 1 hour, then the electrode was immersed in 10mL phosphate buffer ( $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7.4) and dried in  $\text{N}_2$ . After that, differential pulse voltammetry (DPV) measurements in one-compartment electrochemical cell connected to a potentiostat were obtained by using 1ml phosphate ( $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7.4) as electrolyte to evaluate the electrochemical sign of modified electrode with the probe.

## 2.5. Hybridization Detection

Detection of complementary target was carried out in two ways: Directly by monitoring the oxidation peaks of the bases of nitrogen, and indirectly through the use of a mediator, which amplifies the response signal.

For direct detection, MYCN2 target ( $0.189 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $20\mu\text{L}$ ) was applied onto the poly(4-AP)/MYCN1(probe) surface and maintained at  $55^\circ\text{C}$  for different times for the hybridization, according to next item on the methodology of this work (2.6). Then the electrode was immersed in phosphate buffer ( $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7.4) and dried in  $\text{N}_2$ . The annealing temperature of the oligonucleotide (MYCN1) was obtained by Gene Runner software (version 3.01).

For the indirect detection, MYCN2 target ( $0.189 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $20\mu\text{L}$ ) was applied onto the poly(4-AP)/MYCN1(probe). Hybridization was carried out at  $55^\circ\text{C}$  for 10 minutes. Then the electrode was immersed in phosphate buffer ( $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7.4) and dried in  $\text{N}_2$ . Following that, Rhodamine B solution ( $5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $20\mu\text{L}$ ) was applied onto poly(4-AP)/MYCN1(probe):MYCCN2(target) and maintained at room temperature for 5 minutes. To evaluate the electrochemical signal of rodhamine b, differential pulse voltammetry measurements were conducted using phosphate buffer ( $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7.4) as electrolyte.

## 2.6. Optimization of the temperature and hybridization time

Experiments were performed to optimize the temperature and the hybridization time. The optimum temperature was calculated by the equation  $T_a =$

$T_m - 5^\circ\text{C}$ , where:  $T_m$  is the melting temperature and  $T_a = \text{annealing temperature}$ , calculated as SANTALUCIA et al (1998).

The test of optimum time of the hybridization was carried out in the presence of the complementary target (MYCN2  $0.189 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) incubated for 5, 10, 15, 20 and 30 minutes at  $55^\circ\text{C}$ .

## 2.7. Analysis of interfering compounds

For this study, we added to the solution of the interfering compounds in the concentration normally found in the blood ( $3.6 \text{ mg. dL}^{-1}$  ascorbic acid,  $1 \text{ mg. dL}^{-1}$  uric acid,  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  alanine,  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  glutamate,  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  glucose,  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  glycine,  $5.0 \text{ g. dL}^{-1}$  albumine and serum enriched with MYCN2. The experiments were carried out at  $55^\circ\text{C}$ , 10 minutes.

## 2.8. Calibration Curve

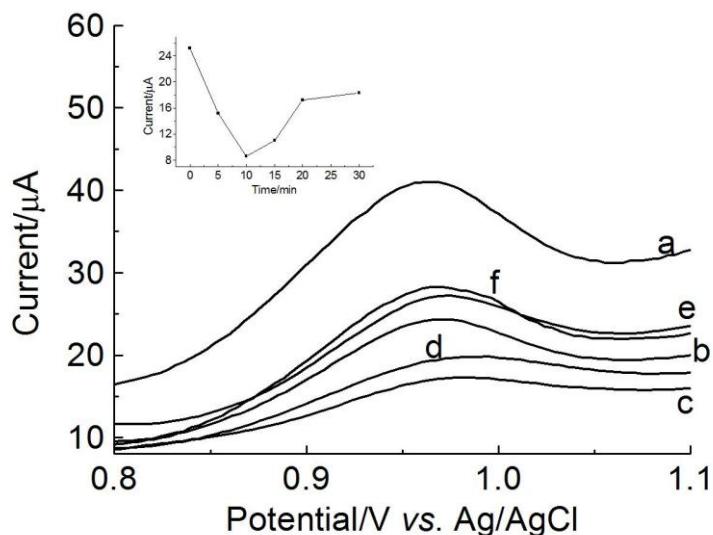
To evaluate the sensitivity and the detection limit of the genosensor,  $20 \mu\text{L}$  of different concentrations of MYCN2 solution ( $2.52 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $3.78 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $7.56 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $3.78 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  e  $1.89 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ) were applied onto the genosensor surface. Hybridization was performed at  $55^\circ\text{C}$  for 10 minutes. The electrodes were then rinsed by immersion in phosphate buffer ( $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7.4) and dried in  $\text{N}_2$ . The detection was performed by monitoring the oxidation peak of the Rhodamine B ( $5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ) by differential pulse voltammetry.

# 3- Results and Discussion

## 3.1- Direct electrochemical detection of Hybridization

The direct electrochemical detection is based on the measurement of physicochemical changes that occur on the electrode surface after hybridization. In electrochemical DNA biosensors, the most common method is to monitor the current signal of oxidation or reduction of the nitrogenous bases (LIU et al., 2012).

The effect of the hybridization for the MYCN1(probe): MYCN2(target) interaction at different times is shown in Fig. 1.



**Figure 1.** Differential pulse voltammograms of graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) prepared in pH 0.5 (baseline-corrected), 100 scans, containing (MYCN1,  $63\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) before hybridization (a) and after hybridization at different times of incubation with complementary target (MYCN2,  $189\mu\text{mol.L}^{-1}$ ): 5 min. (b), 10 min. (c), 15 min. (d), 20 min. (e) and 30 min. (f). Electrolyte: phosphate buffer ( $0.10 \text{ mol L}^{-1}$ ), pH 7.4. Modulation amplitude: 25mV. Pulse interval: 0.2s;  $20\text{mVs}^{-1}$ . Inset: Effect of the hybridization time on the genosensor response.

In the time of 10 minutes, the current intensity concerning oxidation of guanosine after target recognition was lower compared to other times, which becomes more evident the phenomenon of hybridization. At this time, at the temperature of  $55^\circ\text{C}$ , proved to be sufficient for binding of the complementary sequences. Times larger under the same conditions can interfere in the hydrogen bonds that connect the complementary sequences of nucleobases, generating higher current signal.

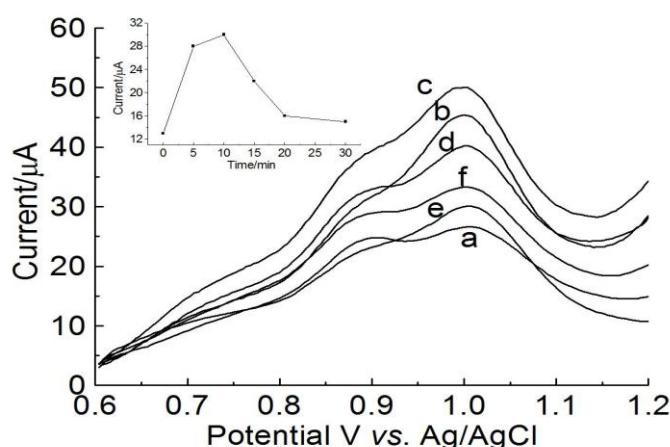
Decrease in current intensities at  $+0.95\text{V}$  is explained by formation of hydrogen bonds between complementary sequences during the hybridization of oligonucleotides, leading to a duplex, inside of which it is more difficult to oxidize the bases, decreasing the peak current of the guanosine, a usual biomarker for

biosensor, after the hybridization (Oliveira-Brett et al., 2004; Oliveira-Brett et al.; 2000) and the double-stranded DNA on the electrode surface is less flexible than the single-stranded DNA and the oxidation of the nucleobases inside the double helix is more difficult, due to the presence of hydrogen bonds (TELLES e FONSECA, 2008).

### 3.2. Indirect electrochemical detection of hybridization

Rhodamine-like fluorophores are extensively used in biotechnological applications such as fluorescence microscopy, flow cytometry and ELISA type tests and more recently in electrochemical biosensors (SUN et al., 2014).

The indirect electrochemical detection is characterized by the use of intercalating agents or mediators that will affect the electrical response generated by hybridization on the electrode surface (WANG, 2002). In this work, rhodamine B was used as indicator of the hybridization (Fig. 2).



**Figure 2.** Differential pulse voltammograms of rhodamine b onto graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) prepared in pH 0.5 (baseline-corrected), 100 scans, containing (MYCN1,  $63\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) before hybridization (a) and after hybridization at different times of incubation with complementary target (MYCN2,  $189\mu\text{mol.L}^{-1}$ ): 5 min. (b), 10 min. (c), 15 min. (d), 20 min. (e) and 30 min. (f). Electrolyte: phosphate buffer ( $0.10 \text{ mol L}^{-1}$ ), pH 7.4. Modulation amplitude:

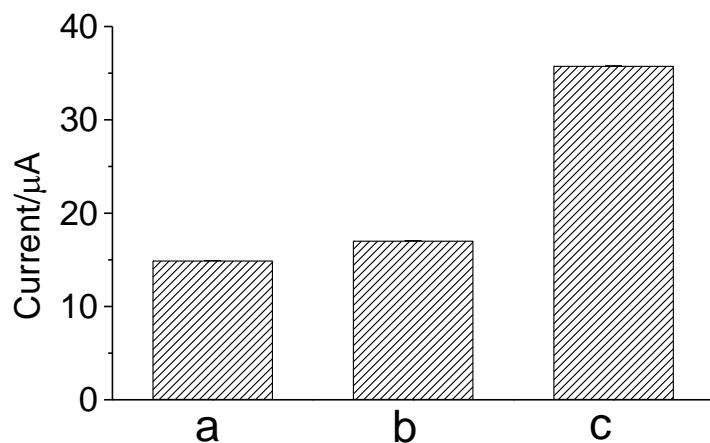
25mV. Pulse interval: 0.2s; 20mVs<sup>-1</sup>. Inset: Effect of the hybridization time on the genosensor response.

The results show an increase in current amplitude in the presence of complementary target, indicating the accumulation of rhodamine B in the DNA duplex (LIU et al., 2012). Rhodamine B has a high affinity for DNA and intercalates via minor groove of the double helix (ISLAM et al. 2013).

Ten minutes was the length of time chosen for the duplex formation using rhodamine b as an indicator, since under these conditions the measured current amplitude was maximal(Fig 2, inset).

### 3.3. Specificity test

Specificity was tested using the specific oligonucleotide MYCN2, which was suitable for the capture of target sequences and a non-specific sequence oligonucleotide (Fig 3).



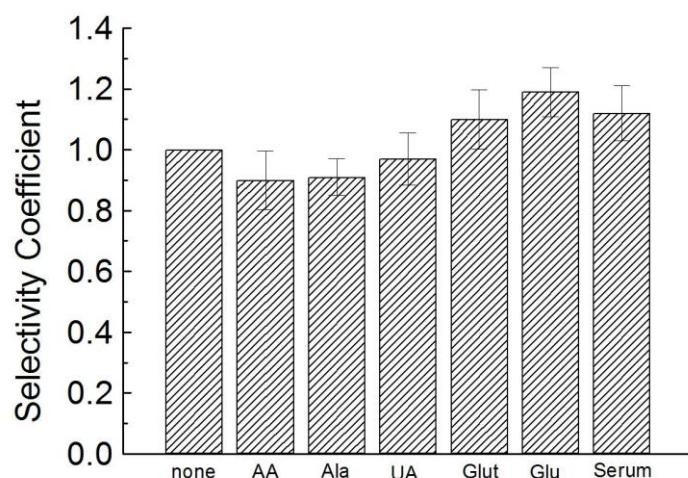
**Figure 3.** Bar chart obtained by means of the differential pulse voltammograms of rhodamine b onto graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) prepared in pH 0.5 (baseline-corrected), 100 scans, containing (MYCN1, 63 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) before hybridization (a) and after hybridization with non-complementary target (b) or complementary target (c). Electrolyte: phosphate buffer (0.10 mol L<sup>-1</sup>), pH 7.4.

Modulation amplitude: 25mV. Pulse interval: 0.2s;  $20\text{mVs}^{-1}$ . Experiments were performed in triplicate.

The results showed that the immobilized probe is effective in the recognition of a complementary target. The electrochemical detection presents a ratio of 2.4 between the signal of the specific probe and the signal of the immunosensor and 1.1 for the non specific target, indicating that the system discriminates with efficiency the MYCN2 target.

### 3.4. Selectivity test

The presence of interference in the blood can change the electrochemical signal and compromise the sensitivity and selectivity of the biosensor. Effect of some common interfering substances in MYCN2 detection, such as ascorbic acid, alanine, uric acid, glutamate, glucose and serum in the response of the biosensor was evaluated (Fig. 4). The experiment was conducted in triplicate.



**Figure 4.** Bar chart of the selectivity coefficient for graphite electrode/poly(4-aminophenol)/MYCN1/ MYCN1 in absence (none) or presence of the interfering compounds: ascorbic acid (AA)  $3.6 \text{ mg.dL}^{-1}$ ; alanine (ala)  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ; uric acid (UA)  $1 \text{ mg.dL}^{-1}$ ; glutamate (glut)  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ; glucose (glu)  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  and undiluted serum. Electrolyte: phosphate buffer ( $0.10 \text{ mol.L}^{-1}$ ), pH 7.4. Modulation amplitude:

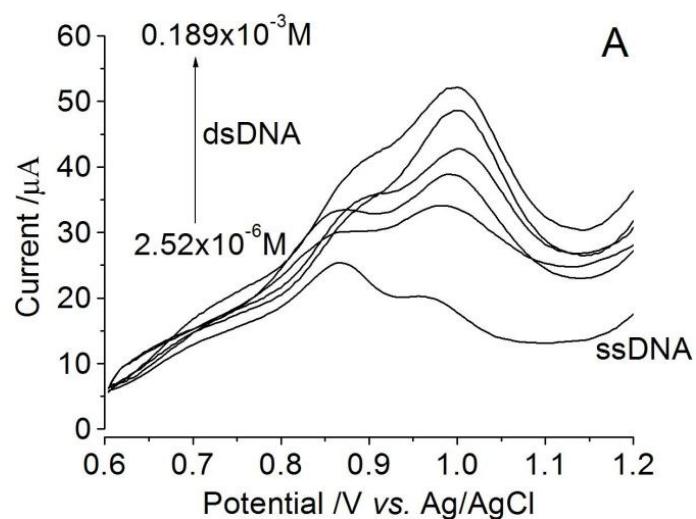
25 mV. Pulse interval: 0.2s; 20mVs<sup>-1</sup>. Rhodamine b ( $5 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>) was used as indicator of the hybridization.

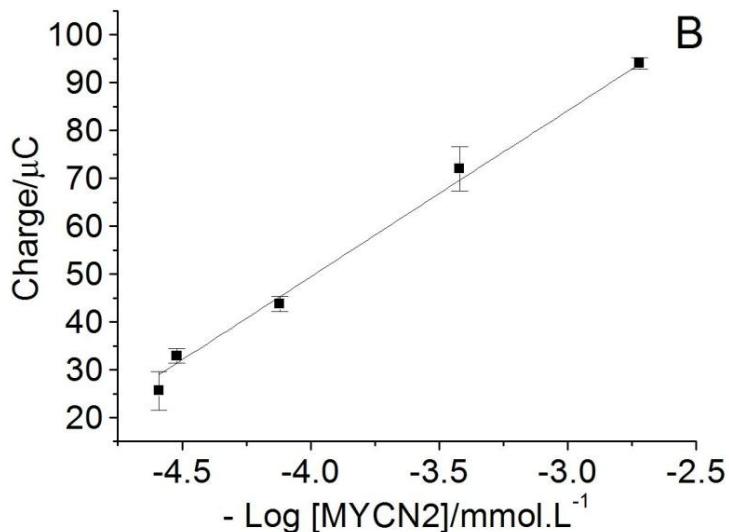
The selectivity coefficient,  $SC = I_c + i / I_c$  was used to estimate the level of interference of each biomolecule in the genosensor response.  $I_c$  and  $I_c + i$  are the response of the current signal in the presence and the absence of interferent, respectively (SAXENA et al., 2011). Our results indicate that the response of the genosensor is not significantly affected in the presence of interfering substances usually found in biological fluids, such as ascorbic acid, alanine, uric acid, glutamate, glucose and serum.

Serum is composed of a complex mixture and albumin (PACZESNY, 2013, GHUMAN et al., 2005). The compatibility of the genosensor with serum indicates its suitability for use with real samples.

### 3.5. Calibration Curve

After the optimization of experimental conditions, the detection limit was determined using rhodamine B as indicator (Fig. 5).





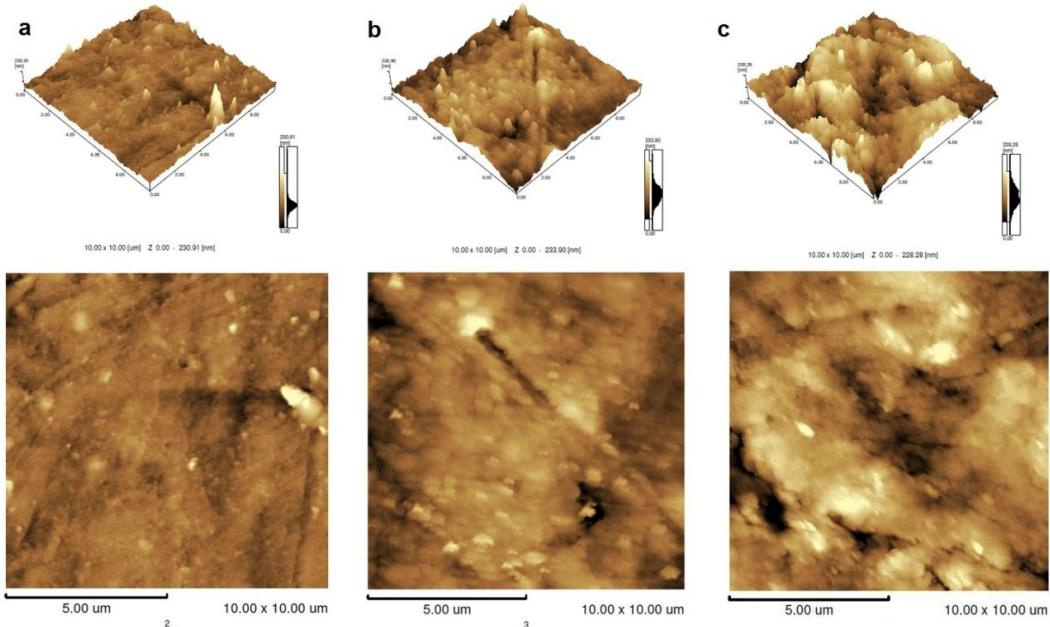
**Figure 5.** (A) Electrochemical response for the oxidation signal of rhodamine b ( $5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ) obtained after the hybridization of modified electrode containing the probe MYCN1 ( $63 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) with different concentrations of MYCN2 ( $2.52 \times 10^{-3} \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $3.78 \times 10^{-3} \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $7.56 \times 10^{-3} \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $3.78 \times 10^{-2} \text{ mmol.L}^{-1}$  and  $1.89 \times 10^{-1} \text{ mmol.L}^{-1}$ ). (B) Linear range of charge versus concentration of MYCN2.

The sensitivity of the MYCN genosensor was evaluated indirectly using different concentrations of complementary target (MYCN2) by differential pulse voltammetry. The experiment was performed in triplicate.

As shown in the figure 5A, the increase of MYCN2 target cause increase in the current signal of oxidation of rhodamine B, indicating accumulation of the indicator onto surface and duplex formation. The genosensor presents detection limit from  $0.45 \mu\text{mol.L}^{-1}$  and correlation coefficient of 0.996 ( $N=3$ ). The obtained standard deviation values (see Fig 5B) indicating that the biosensor has excellent reproducibility.

### 3.6. Analysis by atomic force microscopy

Atomic force microscopy was used to analyze the changes that occurred onto the surface of genosensor before and after duplex formation (Fig. 5).



**Figure 6.** AFM images of (a) graphite/poly(4-aminophenol), (b) graphite/poly(4aminophenol)/MYCN1, (c) graphite/poly(4-aminophenol)/MYCN1:MYCN2.

AFM images were used to study the surface of the poly(4-aminophenol)-modified electrode without biomolecules, after immobilization of the oligonucleotide probe (MYCN1) and after incubation with the complementary target (MYCN2) (Fig. 6). Roughness values obtained by AFM were: 22.27 nm [modified electrode with poly(4-aminophenol)], 32.29 nm [modified electrode with poly(4-aminophenol)/MYCN1], 44.42 nm [modified electrode with poly(4-aminophenol)/MYCN1:MYCN2]. Alterations of the surface were observed after incubation with the complementary target (MYCN2). Modified electrodes containing poly(4-aminophenol)/MYCN1 (Fig. 6B) showed globular topographies with larger clusters when compared with poly(4-aminophenol)/MYCN1:MYCN2 (Fig 6C). The hybridized DNA is less flexible, difficulting its accommodates more tightly on the electrode surface (TELLES e FONSECA, 2008), and presents increase in the roughness values. These alterations between the surfaces suggest the occurrence of a hybridization event, in agreement with the results of electrochemical studies.

#### **4. Conclusions**

We report a sensitive electrochemical genosensor for the detection of DNA specific sequences for the diagnostic of neuroblastoma. This genosensor shows important features for practical use, such as simplicity, specificity and excellent selectivity in serum sample. We show that the time for the duplex formation, by direct or indirect detection, is 10 min. The genosensor response is not significantly affected by substances found in biological fluids or serum sample and the detection limit is  $0.47 \text{ umol.L}^{-1}$ . This platform is promising for diagnosis as well as life sciences research.

#### **Acknowledgments**

The authors are grateful for financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

#### **References**

- BALVEDI, R. P. A.; CASTRO, A. C. H; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. Detection of a Specific Biomarker for Epstein-Barr Virus Using a Polymer-Based Genosensor. **International Journal of Molecular Science**, p. 9051–9066, 2014.
- BARCO, S.; GENNAI, I.; REGGIARDO, G.; GALLENI, B.; BARBAGALLO, L.; MAFFIA, A.; VISCARDI, E.; LEONARDIS, F.; CECINATI, V.; SORRENTINO, S.; GARAVENTA, A.; CONTE, M.; CANGEMI, G. Urinary homovanillic and

vanillylmandelic acid in the diagnosis of neuroblastoma: Report from the Italian Cooperative Group for Neuroblastom. **Clinical Biochemistry**, 2014.

BOM, A. P. K. P.; DEPONTE, C. S.; LIMA, I. C.; PIASECKI, I.; PIERIN, A. J.; BONATTO, J. V. Neuroblastoma cervical - Um relato de caso. **Residencia Pediátrica**, v. 4, n. 1, p. 17–21, 2014.

BORDOW, S. B.; NORRIS, M. D.; HABER, P. S.; MARSHALL, G. M.; HABER, M. Prognostic significance of MYCN oncogene expression in childhood neuroblastoma. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 16, n. 10, p. 3286–94, 1998.

COHN, S.L. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. **Journal Clinical Oncology**, v.27, n. 2, p. 289-97, 2009

COSNIER, S. Biosensors based on electropolymerized films: new trends. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.377, n.3, p.507-520, 2003.

DANG, C. V. Review MYC on the Path to Cancer. **Cell**, v. 149, n. 1, p. 22–35, 2012.

GHUMAN, J.; ZUNZAIN, P. A.; PETITPAS, I.; BHATTACHARYA, A. A.; OTAGIRI, M.; CURRY, S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. **Journal of Molecular Biology**.v.353, p. 38–52, 2005.

FARIA, M. H. . e ROBENHORST, S. H. B. Impacto do oncogene C-MYC no câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 2, p. 165–171, 2006.

FISHER, J. P. H. e TWEDDLE, D. A. Seminars in Fetal & Neonatal Medicine Neonatal neuroblastoma. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 17, n. 4, p. 207–215, 2012.

FRANCO, D. L; AFONSO, A. S.; VIEIRA, S. N.; FERREIRA, L. F.; GONÇALVES, R. A.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Electropolymerization of 3-

aminophenol on carbon graphite surface : Electric and morphologic properties. **Materials Chemistry and Physics**, v. 107, p. 404–409, 2008.

ISLAM, M.; CHAKRABORTY, M.; PANDYA, P.; MASUM, A. A.; GUPTA, N.; MUKHOPADHYAY. Binding of DNA with Rhodamine B : Spectroscopic and molecular modeling studies. **Dyes and Pigments**, v. 99, n. 2, p. 412–422, 2013.

LABUDA, J.; BRETT, A. M. O.; EVTUGYN, G.; FOJTA, M.; MASCINI, M.; OZSOZ, M.; PALCHETTI, I.; PALECEK, E.; WANG, J. Electrochemical nucleic acid-based biosensors : Concepts , terms , and methodology ( IUPAC Technical Report )\*. **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, n. 5, p. 1161–1187, 2010.

LIU, A.; WANG, K.; WENG, S.; LEI, Y.; LIN, L.; CHEN, W.; LIN, X.; CHEN, Y. Development of electrochemical DNA biosensors. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 101–111, 2012.

LU, X.; PEARSON, A. e LUNEC, J. The MYCN oncoprotein as a drug development target. **Cancer Letters**, v. 197, p. 125–130, 2003.

MOSSÉ, P. Y.; DEYELL, R. J.; BERTHOLD, F.; NAGAKAWARA, A.; AMBROS, P. F.; MONCLAIR, T.; COHN, S. L.; PEARSON, A.D.; LONDON, W.B.; MATTHAY, K. K. Neuroblastoma in Older Children, Adolescents and Young Adults: A Report From the International Neuroblastoma Risk Group Project. **Pediatric Blood Cancer**. V.61, p.627–635, 2014.

OLIVEIRA-BRETT, A. M.; PIEDADE, J. A.; SILVA L.A.; DICULESCU, V. C. Voltammetric determination of all DNA nucleotides. **Analytical Biochemistry**. v.332, p.321-329, 2004.

OLIVEIRA-BRETT, A. M.; PIEDADE, J. A.; SERRANO, S. H. P. Electrochemical Oxidation of 8-Oxoguanine. **Electroanalysis**. v.12, p.969-973, 2000.

PACZESNY, S. Discovery and validation of graft-versus-host disease biomarkers Discovery and validation of graft-versus-host disease biomarkers. **Blood Journal**, v. 121, p. 585–594, 2013.

PARAÍSO, L. F.; PAULA, L. F.; FRANCO, D. L.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. Bioelectrochemical Detection of Alanine Aminotransferase for Molecular Diagnostic of the Liver Disease. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 9, p. 1286–1297, 2014.

REIMHULT, E'; GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VOROS, J. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, p. 1400–1458, 2008.

RODRIGUES, L. P.; FERREIRA, L. F.; MONTE, A. F. G.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Bioelectrode Applied to Diagnosis of Cardiac Disease. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. xx, p. 1–14, 2014.

RUSHWOETH, J. V.; AHMEDA, A.; GRIFFITHS, H. H.; POLLOCK, N. M.; HOOPER, N. M.; MILLNER, P. A.; A label-free electrical impedimetric biosensor for the specific detection of Alzheimer's amyloid-beta oligomers. **Biosensors and Bioelectronics**, v.56, p. 83–90, 2014.

SANTALUCIA, J. A unified view of polymer,dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest neighbor thermodynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.95, n.4, p.1460-1465, 1998.

SANTOS, T. A. P. Dos. Neuroblastoma : anjo e demónio da Oncologia Pediátrica Neuroblastoma : anjo e demónio da Oncologia Pediátrica. **Arquivos de Medicina**, 2010.

SANVICENS, N.; MANNEILLI, L.; SALVADOR, J-P.; VALERA, E. MARCO, M-P.; Biosensor for pharmaceuticals based on novel technology. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n.3, p.541-553, 2011

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J. e LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 489–511, 2012.

SAXENA, U.; CHACRABORTY, M, GOSWAMI, P. Covalente immobilization of cholesterol oxidase on self-assembled gold nanoparticles for highly sensitive

amperometric detection of cholesterol in real samples. *Biosensors and Bioelectronics*. v. 26, p.3037-3043, 2011.

SCHNEIDERMAN, J.; LONDON, W. B.; BRODEUR, G. M.; CASTLEBARRY, R. P.; LOOK, A. T.; COHN, S. L. Clinical significance of MYCN amplification and ploidy in favorable-stage neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 26, n. 6, p. 913–8, 2008.

SUN, J.; GAN, T.; LI, Y.; SHI, Z.; LIU, Y. Rapid and sensitive strategy for Rhodamine B detection using a novel electrochemical platform based on core-shell structured Cu@carbon sphere nanohybrid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. v.724, p.87–94, 2014.

TELES, F. R. R. e FONSECA, L. P. Trends in DNA biosensors. **Talanta**, v. 77, p. 606–623, 2008.

THEVENOT, D. R; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Technical report Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 16, p. 121–131, 2001.

VIEIRA, S. N.; FERREIRA, L. F.; FRANCO, D. L.; AFONSO, A. S.; GONÇALVES, R. A.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Electrochemical Modification of Graphite Electrodes with Poly (4-aminophenol). **Macromolecular Symposia**, p. 236–242, 2006.

WANG, J. Electrochemical nucleic acid biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 469, p. 63–71, 2002.

WESTERMARK, U. K.; WILHELM, M.; FRENZEL, A.; HENRIKSSON, M. A. Seminars in Cancer Biology The MYCN oncogene and differentiation in neuroblastoma. **Seminars in Cancer Biology**, v. 21, n. 4, p. 256–266, 2011.