



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

**Desenvolvimento de genossensor eletroquímico e aplicativo para o diagnóstico de transtorno depressivo maior em idosos baseado na detecção do microRNA-184 em plasma humano**

**Aluno:** Pedro Henrique Gonçalves Guedes

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Graci Brito Madurro

**Co-Orientador:** Prof. Dr. João Marcos Madurro

**UBERLÂNDIA - MG**

**2019**



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

**Desenvolvimento de genossensor eletroquímico e aplicativo para o diagnóstico de transtorno depressivo maior em idosos baseado na detecção do microRNA-184 em plasma humano**

**Aluno:** Pedro Henrique Gonçalves Guedes

**Orientador:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Graci Brito Madurro

**Co-Orientador:** Prof. Dr. João Marcos Madurro

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

**UBERLÂNDIA - MG**

**2019**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

G924  
2019

Guedes, Pedro Henrique Gonçalves, 1994-  
Desenvolvimento de genossensor eletroquímico e  
aplicativo para o diagnóstico de transtorno depressivo maior  
em idosos baseado na detecção do microRNA-184 em  
plasma humano [recurso eletrônico] / Pedro Henrique  
Gonçalves Guedes. - 2019.

Orientadora: Ana Graci Brito Madurro.

Coorientador: João Marcos Madurro.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de  
Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di>.

2019.2086

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Madurro, Ana Graci Brito, 1967-, (Orient.).  
II. Madurro, João Marcos, 1961-, (Coorient.). III. Universidade  
Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e  
Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

“And if I fly, or if I fall  
Least I can say I gave it all.”

**RuPaul Andre Charles**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha mãe, Beatriz Gonçalves Mendes, *in memoriam*, por ter sido mãe e pai desde sempre e por me apoiar em todas as decisões que tomei. Obrigado por ter sido uma mulher guerreira, por ter lutado até o fim para ficar comigo e com minha irmã o máximo que pôde. Saiba que, em qualquer lugar que a senhora esteja, minha motivação todos os dias é te deixar orgulhosa a cada passo a ser tomado. A senhora realizou alguns sonhos, como: presenciar a minha conclusão do ensino médio; entrada na graduação; intercâmbio fora do país; finalização da graduação e início do mestrado. Agora, concluo mais esse ciclo, o mestrado, e sei que a senhora se sentiria tão orgulhosa de tudo que foi realizado neste trabalho. Muito obrigado por tudo. Para sempre te amarei, mamadi.

Agradeço às minhas irmãs Aliny Gracielly Gonçalves Guedes e Isis de Jesus Leão, assim como meus sobrinhos (Luís Otávio, Guilherme e Gabriel) e sobrinha (Maria Beatriz) por todo o suporte ao longo dos anos.

Agradeço à Professora Dra. Ana Graci Brito Madurro por ter não somente me recebido em seu laboratório, como também por ter aceitado minha ideia para esse projeto. Obrigado por ter sempre acreditado em mim e, principalmente, por ser essa pessoa incrível, atenciosa e humana. A senhora esteve presente e me deu a mão no momento mais obscuro da minha vida, a perda da minha mãe. Obrigado, também, por todos os bolos e tortas gostosas que a senhora e o Professor Dr. João Marcos Madurro nos trouxeram tantas vezes. Obrigado por tudo!

Agradeço ao meu noivo, Bernardo Alan de Freitas Duarte por todo o amor, suporte, compreensão e empatia desde sempre.

Agradeço à minha velha amiga e colega de trabalho Anna Clara Rios Moço por todo suporte profissional e emocional desde a graduação até agora. Obrigado por me tolerar, principalmente, naqueles dias de mal humor. Dayane yo, sempre.

Agradeço à Ana Paula Mendes Silva pelo apoio e amizade. Aninha, além de você ser uma exímia pesquisadora, você é uma pessoa muito especial. Obrigado por abraçar minha ideia ao juntar o seu projeto com a mesma, resultando no surgimento desse trabalho maravilhoso.

Agradeço à Jéssica Brussasco pela amizade à primeira vista e por ser uma amiga e parceira de trabalho muito dedicada. Obrigado por estar sempre ao meu lado,

por ser esse ser humano incrivelmente empático e, finalmente, por me apresentar sua irmã fantástica, Érica Brussasco.

Agradeço à Mônica Segatto, também conhecida como Monichemistry e Kylie, por sempre ter sido uma grande amiga e colega profissional. Obrigado por sua contribuição para esse trabalho e pela amizade.

Agradeço aos membros titulares da bancada evangélica, José Manuel Rodrigueiro Flauzino, Barbara Duarte Cunha, Luis Fernando Gabriel Luz, Allyson Leandro e Marcos Vinícius Ferreira por toda ajuda e suporte durante essa jornada. Ademais, agradeço aos outros membros do laboratório LAFIP-BIOSENS, João Afonso Neto, Carlos Petersen, Lívia Alves, Rafaela Peres, Ana Cristina Honorato, Sandro, Eduardo Pimentel e Ariadne Lacerda. O dia-a-dia fica mais fácil com a presença de vocês!

Agradeço à banca examinadora pela disponibilidade de participação e contribuição neste trabalho.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

### Lista de siglas e abreviaturas

**AFM:** *atomic force microscopy* (microscopia de força atômica)

**AGO:** *Argonaute* (argonauta)

**Au:** eletrodo de ouro

**BE:** brometo de etídio

**C<sub>DL</sub>:** capacitância da dupla camada elétrica

**CID-11:** Classificação Internacional de Doenças da décima primeira edição

**$\Delta E_p$ :** (delta) variação de potencial de pulso

**$\Delta E_s$ :** (delta) variação de potencial de amostragem

**$\Delta i$ :** (delta) variação de corrente de pico

**DICER:** endoribonuclease Dicer

**DNA:** *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

**DROSHA:** *DGCR8: DiGeorge syndrome critical region 8* (gene da região crítica 8 da síndrome DiGeorge)

**DSM-V:** *The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition*  
(Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais)

**E:** potencial elétrico

**E<sub>pa</sub>:** potencial de pico anódico

**E<sub>pc</sub>:** potencial de pico catódico

**EIE:** espectroscopia de impedância eletroquímica

**gRNA:** RNA genômico

**HDL:** high-density lipoproteins (lipoproteínas de alta densidade)

**i:** corrente elétrica

**IBGE:** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**i<sub>pa</sub>:** corrente de pico anódico.

**i<sub>pc</sub>:** corrente de pico catódico

**IUPAC:** *International Union of Pure and Applied Chemistry* (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

**kcal:** quilocaloria

**L:** litro

**μA:** microampere

**μL:** microlitro

**μm:** micrômetro

**μmol:** micromol

**microRNAs:** *Micro ribonucleic acid* (micro ácido ribonucleico)

**min:** minutos

**MIT:** *Massachusetts Institute of Technology* (Instituto de tecnologia de Massachusetts)

**mL:** mililitro

**a:** atto

**nmol:** nanomol

**mmol:** milimol

**mRNA:** *Messenger ribonucleic acid* (ácido ribonucleico mensageiro)

**ms:** milissegundos

**mV:** milivolt

**ng:** nanograma

**nm:** nanômetro

**ω:** (ômega) frequência utilizada para impedância

**Ω:** ohm

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**pb:** Pares de base

**Q:** elementos de fase constante

**R<sub>cr</sub>:** resistência a transferência de cargas

**RNAi:** ácido ribonucleico de interferência



**RNA POL II:** *ribonucleic acid polimerase II*

**RNAPOL III:** *ribonucleic acid polimerase III*

**Rq:** coeficiente de rugosidade média quadrática

**Rs:** resistência ôhmica da solução eletrolítica

**RT-qPCR:** *reverse transcription polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa)

**s:** segundo

**SNPs:** Single nucleotide polymorphisms (polimorfismo de nucleotídeo único)

**TDM:** Transtorno Depressivo Maior

**t<sub>p</sub>:** período de pulso

**UV:** irradiação ultravioleta

**V:** volt

**VC:** voltametria cíclica

**VPD:** voltametria de pulso diferencial

**W:** impedância de Warburg

**X<sup>2</sup>:** qui-quadrado

## Sumário

1	Introdução.....	13
1.1	O envelhecimento populacional e o transtorno depressivo maior (TDM).....	13
1.2	Transtorno depressivo maior em idosos.....	13
1.3	MicroRNAs.....	17
1.4	Biogênese dos microRNAs.....	19
1.5	MicroRNAs como biomarcadores para TDM.....	21
1.6	Métodos diagnósticos para TDM.....	25
1.7	Biossensores.....	27
1.8	Microscopia de força atômica e técnicas eletroquímicas.....	31
1.8.1	Microscopia de força atômica.....	31
1.8.2	Técnicas eletroquímicas.....	32
2	Objetivos.....	39
2.1	Objetivo geral.....	39
2.2	Objetivos específicos.....	39
3	Material e Métodos.....	40
3.1	Equipamentos e reagentes.....	40
3.2	Amostras biológicas.....	41
3.3	Biossensor eletroquímico.....	41
3.3.1	Pré-condicionamentos dos eletrodos de ouro.....	41
3.3.2	Otimização da concentração da sonda DEP1S.....	42
3.3.3	Imobilização da sonda de DNA (DEP1S) e detecção do alvo em plasma humano.....	43
3.3.4	Tratamento do plasma.....	45
3.3.5	Teste de especificidade.....	45
3.3.6	Detecção de pacientes idosos saudáveis e com transtorno depressivo maior.....	46
3.3.7	Construção da curva de calibração.....	46
3.3.8	Regeneração do bioeletrodo.....	47
3.3.9	Estabilidade do bioeletrodo.....	47
3.3.10	Análises de espectroscopia de impedância eletroquímica para o biossensor.....	48
3.3.11	Análises por Microscopia de força atômica.....	48

3.3.12 Desenvolvimento do aplicativo <i>DEPSENSOR</i> .....	48
3.3.13 Estatística e tratamento de dados.....	49
4 Resultados e Discussão.....	49
4.1 Seleção dos eletrodos de ouro.....	49
4.2 Otimização da concentração da sonda DEP1S.....	50
4.3 Tratamento do plasma.....	52
4.4 Teste de especificidade.....	54
4.5 Teste de interferência do plasma enriquecido com amostra de pacientes purificadas.....	56
4.6 Curva de calibração.....	57
4.7 Regeneração do bioeletrodo.....	59
4.8 Estabilidade do bioeletrodo.....	60
4.9 Validação do biossensor por espectroscopia de impedância eletroquímica.....	61
4.10 Microscopia de Força Atômica.....	64
4.11 Desenvolvimento do aplicativo <i>DEPSENSOR</i> .....	65
5 Conclusões.....	70
6 Perspectivas.....	71
7 Referências Bibliográficas.....	72

## RESUMO

A depressão consiste em uma desordem psiquiátrica ubíqua e comum em idosos, a qual provoca graves consequências. Os mecanismos genéticos envolvidos no transtorno depressivo maior (TDM) são complexos e envolvem inúmeros genes. Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas envolvidas na regulação pós-transcricional da expressão gênica. Idosos diagnosticados com TDM apresentam uma menor expressão do miRNA-184 em relação a idosos saudáveis, logo, esse miRNA pode ser utilizado como biomarcador para o diagnóstico de TDM. Os métodos diagnósticos do TDM dependem exclusivamente da identificação subjetiva clínica, baseada em sintomas e escalas variáveis. O presente trabalho introduz uma abordagem inovadora para o diagnóstico de TDM em idosos baseado no desenvolvimento de um biossensor eletroquímico, monitorando as respostas, utilizando voltametria de pulso diferencial (VPD) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) em amostras de plasma humano. Os resultados para VPD, utilizada para quantificação do miRNA, mostraram um aumento em cerca de duas vezes no valor de corrente de pico das amostras referentes a pacientes saudáveis, comparando-se com os doentes ao se monitorar o pico do intercalante de DNA, brometo de etídio. Para EIE, foi observado um aumento de 1,5 vezes da resistência à transferência de carga referente idosos saudáveis, ao se comparar com aqueles doentes. Além disso, os parâmetros analíticos do biossensor foram avaliados utilizando VPD, obtendo-se um limite de detecção experimental de  $10 \text{ amol L}^{-1}$ ; a resposta de corrente se manteve cerca de 72% de resposta durante os 50 dias avaliados de estabilidade; também exibiu ótima capacidade de regeneração, podendo ser regenerado cerca de 10 vezes após o uso inicial do bioeletrodo. Ademais, o aplicativo *DEPSENSOR* desenvolvido em linguagem Java para auxiliar no uso do sensor e apresentar informações sobre depressão. Assim, o biossensor desenvolvido no presente trabalho foi eficiente no diagnóstico de TDM em idosos, assim como, na quantificação acurada do miRNA-184 em amostras de plasma de pacientes saudáveis e diagnosticados com TDM.

**Palavras-chave:** Depressão maior, biossensor eletroquímico, TDM, diagnóstico de depressão, VPD, EIE, aplicativo DEPSENSOR.

## ABSTRACT

Depression consists of a ubiquitous psychiatric disorder and, in elderly, is the most common disease, causing serious consequences. The genetic mechanisms involved in major depressive disorder (MDD) are complex and involve innumerable genes. MicroRNAs (miRNAs) are small molecules involved in the post-transcriptional regulation of gene expression. Elderly diagnosed with MDD present down regulation of miRNA-184 expression compared to healthy elderly, then, this miRNA can be used as a biomarker for the MDD diagnosis. The MDD diagnostic methods depend primarily on clinical subjective identification, based on symptoms and variable scales. The present work introduces a new approach for the MDD diagnosis in elderly based on the development of an electrochemical biosensor, monitoring responses using differential pulse voltammetry (DPV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in human plasma samples. The DPV results, used for miRNA quantification, presented an increase of about twice in the peak current value of the samples for healthy patients, compared to patients with MDD when monitoring the DNA intercalator peak, ethidium bromide. For EIS, a 1.5 times increase in charge transfer resistance for healthy elderly subjects was observed compared to depressed patients. In addition, the analytical parameters of the biosensor were evaluated using DPV, obtaining an experimental detection limit of  $10 \text{ amol L}^{-1}$ ; the current response remained around 72% during the evaluated 50 days of stability; also it exhibited a great regeneration capacity, it was regenerated 10 times after the initial use of the bioelectrode. Moreover, the *DEPSENSOR* app was developed in Java in order to assist the sensor and it contains information about depression. Thus, the biosensor developed in the present study proved to be efficient in the diagnosis of MDD in elderly, as well as the accurate quantification of miRNA-184 in real plasma samples of healthy and depressed patients.

**Keywords:** Major depression, electrochemical biosensor, MDD, diagnosis of depression, DPV, EIS, DEPSENSOR app.

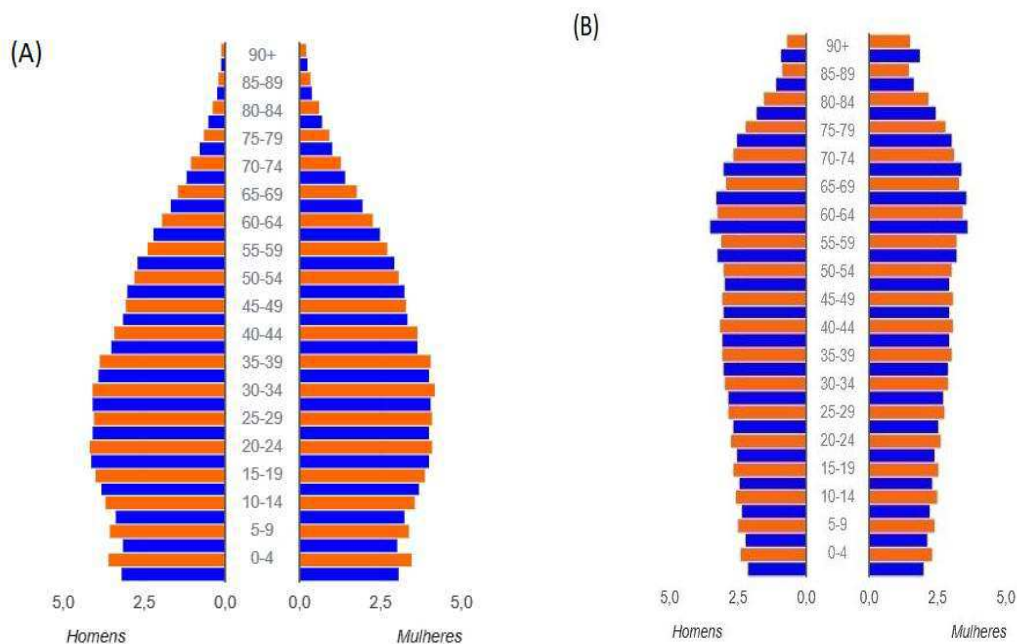
## 1 Introdução

### 1.1 O envelhecimento populacional e o transtorno depressivo maior (TDM)

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o índice de expectativa de vida ao nascer tem sido aumentado em todo o mundo ao longo da história da humanidade. Dados da OMS indicam que a proporção da população mundial com idade superior a 60 anos passará de 12% para 22% entre 2015 e 2050. Até 2020, o número de pessoas idosas ultrapassará o número de crianças de até 5 anos; sendo que 80% de todos os idosos viverão em países de baixa e média renda (OMS, 2018a).

O ritmo do envelhecimento da população mundial também está aumentando dramaticamente, sendo muito mais rápido do que no passado. Por exemplo, a França teve quase 150 anos para se adaptar a uma mudança de 10% para 20% na proporção da população que tinha mais de 60 anos. No entanto, lugares como Brasil, China e Índia terão pouco mais de 20 anos para fazer o mesmo (OMS, 2018a).

**Figura 1.** Ilustração da pirâmide etária para homens e mulheres do ano de 2018 (A) e 2060 (B) referentes ao Brasil e ao estado de Minas Gerais. (■) Brasil. (■) Minas Gerais.



Fonte: adaptado de Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (IBGE, 2019).

De acordo com os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) que estão ilustrados na Figura 1(A), nota-se que a porcentagem de homens na faixa de 60 – 64 anos é de 1,96 % e de mulheres é igual a 2,26 % no Brasil; por outro lado, o percentual de homens na idade entre 60 e 64 anos é de 2,23 % e de mulheres é 2,49 %, especificamente no estado de Minas Gerais. Com relação ao gráfico mostrado na Figura 1(B), representando os dados do ano de 2060, percebe-se que há um aumento da população idosa. No Brasil, a previsão da porcentagem de idosos no país aumenta para homens (3,25 %) e para mulheres (3,44 %); para Minas Gerais, há uma elevação do percentual de idosos comparando-se com o ano de 2018, sendo 3,33 % para homens e 3,56 % para mulheres (IBGE, 2019).

Uma vida mais longa promove oportunidades para as pessoas idosas e suas famílias, bem como para a sociedade de forma geral. Sabe-se que, qualquer tempo de vida adicional em uma dada população, representa a possibilidade de se haver novas atividades, câmbios de experiências, hábitos, tradições, aspectos culturais e educacionais entre gerações, culminando numa transmissão de conhecimentos numa escala vertical. Portanto, faz-se necessário ressaltar o papel do idoso como agente essencial nas famílias e comunidades (OMS, 2018a).

Por outro lado, o envelhecimento humano tem como característica ser um processo complexo, diversas vezes associados à desregulação de numerosos processos celulares e moleculares. Entre eles, destaca-se o encurtamento do comprimento dos telômeros, alteração na resposta ao dano ao DNA, perda da homeostase proteica, senescência celular e disfunção mitocondrial. Esses processos celulares e moleculares podem levar a uma variedade de doenças, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e doenças neurológicas, bem como um aumento do risco de mortalidade (LEVY et al., 2017).

O envelhecimento, de forma geral, resulta do impacto do acúmulo de uma ampla variedade de danos moleculares e celulares ao longo do tempo, levando a uma diminuição gradual da capacidade física e mental, um risco crescente de doença e, finalmente, a morte. Entretanto, essas alterações no organismo não são lineares nem consistentes, como por exemplo, enquanto algumas pessoas de 70 anos desfrutam de saúde e funcionamento corporal satisfatório, outras de mesma idade são frágeis e requerem ajuda significativa de outras pessoas (OMS, 2018a).

Do ponto de vista fisiológico, nota-se que o envelhecimento apresenta uma relação direta com o surgimento de Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNT), tais como: neoplasias, doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus* e doenças respiratórias, resultando em incapacidade funcional, modificações nos hábitos e, finalmente, alterações negativas na qualidade de vida do idoso (OLIVEIRA et al., 2018b).

De acordo com a OMS (2018), a depressão consiste em uma doença ubíqua, acometendo mais de 300 milhões de pessoas. É importante ressaltar que a depressão é diferente das flutuações de humor habituais e das respostas emocionais de curta duração aos desafios da vida cotidiana. A depressão tem a capacidade de se tornar um problema grave de saúde, especialmente quando duradoura e com intensidade moderada ou grave, podendo acarretar em baixa produtividade no trabalho e escola.

A depressão apresenta-se como fator de risco no que diz respeito a interferir de forma negativa em um prognóstico de doenças crônicas, prejudicando a qualidade de vida e a capacidade do indivíduo de responder ao tratamento dessas doenças. É possível observar que tanto as patologias crônicas podem agravar os sintomas depressivos, como a depressão pode antecipar tais patologias, ocasionando prejuízo na função cerebral ou por meio de alterações psicológicas e psicossociais (OLIVEIRA et al., 2018b).

## **1.2 Transtorno depressivo maior em idosos**

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V) (2014), os transtornos depressivos podem ser divididos em 5 classes, a saber: transtorno depressivo maior, o qual inclui episódio depressivo maior; transtorno disruptivo da desregulação do humor; transtorno depressivo persistente (distímia); transtorno depressivo induzido por substância/medicamento, transtorno depressivo devido a outra condição médica, transtorno depressivo especificado e transtorno depressivo não especificado; finalmente, transtorno disfórico pré-menstrual. Todos esses transtornos apresentam como característica comum a presença de humor triste, irritável ou vazio, podendo ser acompanhado por modificações cognitivas e somáticas



que têm a capacidade de alterar de forma significativa a capacidade funcional da pessoa. A principal diferença entre os mesmos consiste nos aspectos de duração, momento ou etiologia presumida (DSM-V, 2014).

O indivíduo com Transtorno Depressivo Maior (TDM), também chamado de depressão maior, sofre com episódios (alterações em funções neurovegetativas, na cognição e no afeto) diferentes com duração de no mínimo duas semanas, sendo que, geralmente, grande parte dos episódios apresenta duração consideravelmente superior (DSM-V, 2014). O TDM consiste em um transtorno de humor caracterizado por apatia e pensamento lento, que pode ser acompanhado por sintomas de retardo psicomotor, incluindo perda de interesse em atividades normais. Junto com o envelhecimento, as funções fisiológicas e psicológicas dos idosos ficam enfraquecidas, em particular, os órgãos sensoriais e o sistema nervoso envolvidos em atividades psicológicas podem sofrer alterações degenerativas (ZHANG; CHEN; MA, 2018).

Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, o TDM pode ser classificado de acordo com o especificador da gravidade, sendo dividido em: leve (poucos sintomas manejáveis, resultando em baixo prejuízo no funcionamento social ou profissional); moderado (prejuízo funcional ocasionado pelos sintomas pode ser leve ou grave); grave (sintomas não manejáveis e causam grave sofrimento, prejudicando no funcionamento social e profissional) com ou sem características psicóticas (alucinações e/ou delírios) (DSM-V, 2014).

O TDM resulta de uma interação complexa de fatores sociais, psicológicos e biológicos. As pessoas que passaram por eventos adversos da vida (desemprego, luto, trauma psicológico) têm maior probabilidade de desenvolver depressão. A depressão pode, por sua vez, levar a mais estresse e disfunção, piorando a situação de vida da pessoa afetada e a própria depressão. Além disso, a depressão pode levar ao suicídio. É observado que cerca de 800 mil pessoas morrem por suicídio todos os anos (OMS, 2018b).

É possível perceber que a chegada da velhice está relacionada a um aumento na taxa de mortalidade referente às tentativas de suicídio. A ideação suicida, critério de diagnóstico para TDM, é caracterizada por compreender desejos, pensamentos,

expressões e comportamentos relacionados a tentativas de retirar a própria vida sem a efetivação do ato (OLIVEIRA et al., 2018b).

A depressão representa um fator de risco para mortalidade em diversas doenças, por exemplo: insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral e câncer. Além disso, a depressão pode causar desregulação e supressão imunológica, podendo gerar um estado inflamatório crônico. O TDM pode ocasionar importante prejuízo funcional, variável resposta ao tratamento, altas taxas de recorrência, cronicidade e taxas elevadas de comorbidades médicas e mortalidade (MORA et al., 2018).

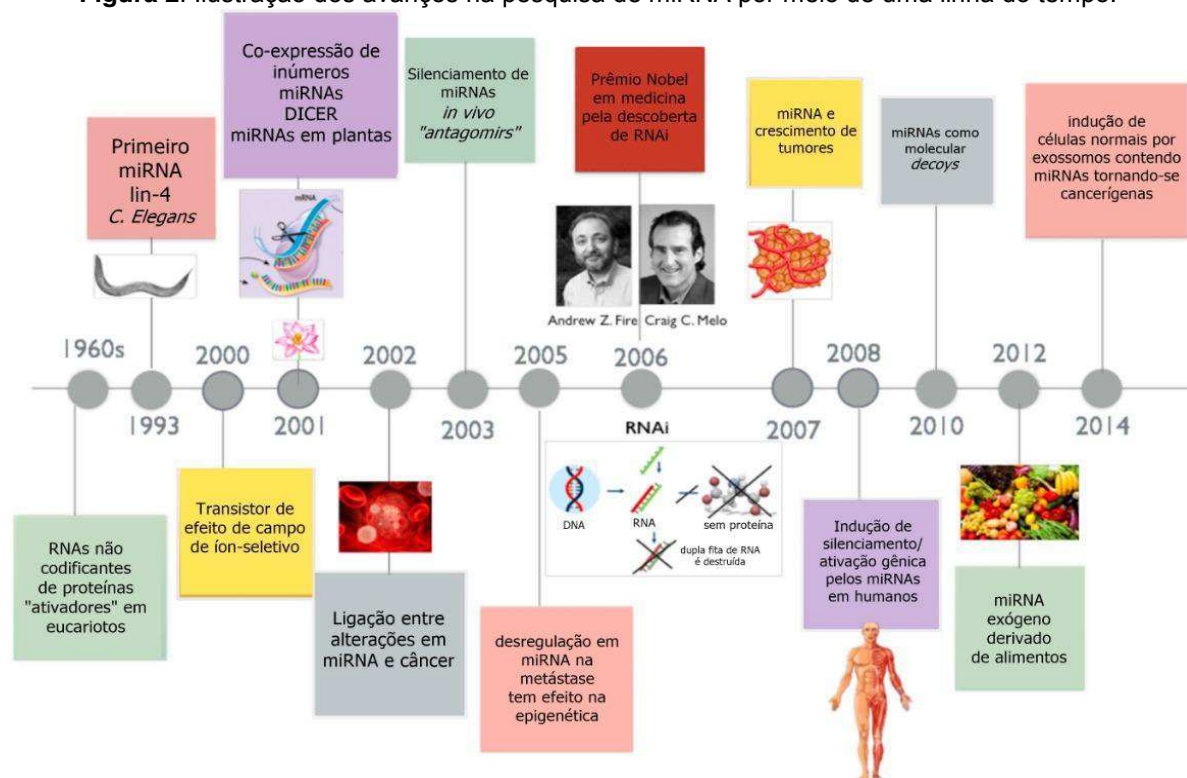
A seleção de biomarcadores exercem um importante papel no diagnóstico de transtornos depressivos. Demonstrou-se que inúmeros microRNAs (miRNAs) específicos, dinamicamente expressos durante a senescência, afetam o tempo de vida normal ao regular vias genéticas que são importantes para o envelhecimento normal (INUKAI et al., 2018). A literatura apresenta estudos que foram capazes de identificar alterações na expressão de miRNAs em indivíduos com depressão, tais como: miR-132, miR-let-7, miR-125a, miR-191, miR-499, miR-708, miR-1908, microRNA-124, miR-132, miR-16 e miR-124-3p (LIU et al., 2016; MENDES-SILVA et al., 2016; BANACH et al., 2017; HE et al., 2016; DWIVEDI, 2017; WANG et al., 2017; YUAN et al., 2018).

### **1.3 MicroRNAs**

A descoberta do primeiro microRNA, lin-4, ocorreu em 1993 pelos grupos Ambros e Ruvkun em *Caenorhabditis elegans* e revolucionou o campo da biologia molecular (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993). Anteriormente, o lin-4 foi caracterizado pelo laboratório de Horvitz como um dos genes que regulam o desenvolvimento temporal de larvas de *Caenorhabditis elegans* (CHALFIE, 1981). Ambros e Ruvkun prosseguiram com os experimentos para estudar lin-4 e, finalmente, descobriram que lin-4 não era um RNA codificador de proteínas, mas sim um pequeno RNA não codificante (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 2004). A partir desse momento, os miRNAs foram detectados em todos os sistemas de modelos animais e alguns mostraram-se

altamente conservados entre as espécies (FRIEDLÄNDER et al., 2014). Ademais, os avanços mais importantes relacionados a trajetória dos miRNAs podem ser observados na Figura 2.

**Figura 2.** Ilustração dos avanços na pesquisa de miRNA por meio de uma linha do tempo.



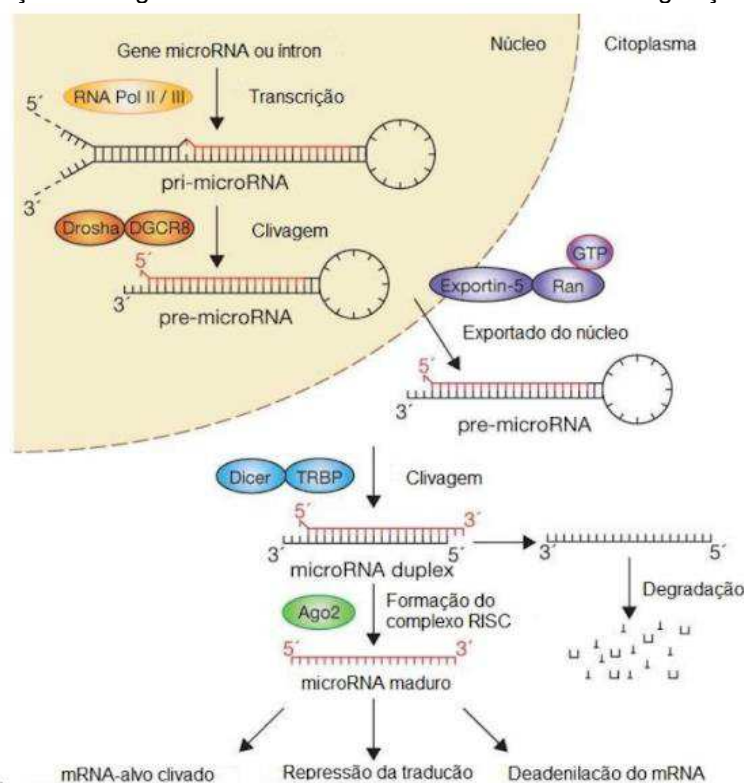
Fonte: adaptado de (KILIC et al., 2018).

Os miRNAs compõem uma importante classe de moléculas envolvidas na regulação da expressão gênica, constituídos de ácidos ribonucleicos (RNAs) de cadeia simples, altamente conservados e não codificantes, com aproximadamente 21 a 25 nucleotídeos de comprimento, que se ligam ao RNA mensageiro complementar (mRNA), por meio da regulação da degradação do mRNA, reprimem a tradução. Essas moléculas podem ser secretadas dentro das vesículas extracelulares pelas células, podendo atuar como mensageiros célula-célula, transportando informações entre as células (PEREIRA-DA-SILVA et al., 2018). Além disso, os miRNAs estão envolvidos em diversos processos celulares e são essenciais para o desenvolvimento animal, diferenciação celular e homeostase (GEBERT; MACRAE, 2019).

## 1.4 Biogênese dos microRNAs

A biogênese dos miRNAs começa com o processamento de transcritos realizado, principalmente, pela RNA polimerase II pós ou co-transcricionalmente (Figura 3). Grande parte dos miRNAs identificados são intragênicos e processados principalmente a partir de íntrons e relativamente poucos exons de genes codificadores de proteínas, enquanto que os restantes são intergênicos, sendo transcritos de maneira independente de um gene hospedeiro e regulados por seus próprios promotores (O'BRIEN et al., 2018).

**Figura 3.** Ilustração da biogênese do microRNA e de mecanismos de regulação do mRNA-alvo.



Fonte: (MENDES-SILVA, 2018).

A biogênese dos miRNAs pode ser classificada em duas vias, a saber: canônica e não-canônica. Na via de produção de miRNAs canônica (Figura 3), após a transcrição pela RNA polimerase II, é produzido transcrito que pode conter aproximadamente de 70 até 130 pares de base (pb) chamado microRNA primário (pri-miRNA) (KHAN; SUTHANTHIRAN; MUTHUKUMAR, 2019). Para se tornar maduro (miRNA), o pri-miRNA necessita de ser clivado, passando por dois eventos de

processamento subsequentes, sendo o primeiro no núcleo pela enzima RNase III denominada DROSHA e depois no citoplasma por outra enzima, denominada DICER. O evento nuclear é catalisado pelo complexo chamado de microprocessador, o qual compreende a enzima RNase do tipo III (DROSHA), a proteína de ligação ao RNA de dupla fita (RBP) DGCR8 (gene da região crítica 8 da síndrome DiGeorge) e proteínas associadas.

Como resultado, é observado a produção de moléculas denominadas miRNAs precursores (pré-miRNAs) que possuem cerca de 70 pb de tamanho (TREIBER; TREIBER; MEISTER, 2019), os quais são subsequentemente exportados para o citoplasma utilizando o receptor de exportação chamado exportin-5. No citoplasma, pré-miRNAs passam por um evento de processamento final, por outra enzima RNase tipo III, DICER, para dar origem ao *duplex* de miRNA. Posteriormente, os miRNA dupla-fita são então incorporados ao RISC (do inglês *RNA induced silencing complex*), complexo silenciador induzido por RNA, juntamente com uma família de proteínas denominada Argonauta (AGO), onde um filamento é selecionado (fita guia) para se tornar o miRNA maduro. Então, os miRNAs maduros são guiados para seus alvos específicos de mRNA por meio do emparelhamento de bases (GEBERT; MACRAE, 2019).

A fita guia é selecionada durante a etapa de carregamento da AGO, principalmente, com base na estabilidade termodinâmica relativa das duas extremidades do *duplex* do miRNA. A fita com a extremidade 5' relativamente instável é geralmente escolhida como a fita guia. Além disso, um determinante adicional para a escolha da cadeia é a primeira sequência nucleotídica, uma vez que as proteínas AGO selecionam a fita que contém uma uracila na posição 1. Após a escolha da fita, o filamento não escolhido denominado fita passageira é, então, liberada e degradada rapidamente (BARTEL, 2018).

Os microRNAs medeiam o silenciamento gênico pós-transcricional de genes alvo por meio da hibridização, preferencialmente, do miRNA maduro na região 3' não traduzida de mRNA alvo, com a região semente nos nucleotídeos 2 a 7 na extremidade 5' do miRNA sendo uma sequência crucial (LU; ROTHENBERG, 2018). Embora o pareamento estendido com o nucleotídeo 8 do sítio-alvo e/ou a presença de uma adenina na posição 1 seja extremamente benéfico e eficaz, há um subgrupo

de sítios funcionais que possui um pareamento imperfeito com a sequência semente, sendo também eficiente para o silenciamento. O mecanismo de regulação gênica por meio de miRNA é simples, e a presença de determinantes locais e globais modulam a eficácia da ligação e silenciamento do mRNA alvo (QUÉVILLON-HUBERDEAU; SIMARD, 2018).

Além da biogênese canônica descrita anteriormente, existem várias vias não-canônicas de biogênese de miRNA, tais como: um pré-miRNA de 7 metilguanossina (m<sup>7</sup>G-cap) pode ser gerado diretamente através da transcrição, contornando o processamento de DROSHA e exportado para o citoplasma (i); pode ser gerado um pequeno precursor de RNA (mirtron) por meio de *splicing* e desramificação de mRNA, também contornando o passo de processamento mediado por DROSHA, posteriormente, dobrado em pré-miRNA e exportado para o citoplasma (MICHLEWSKI; CÁCERES, 2019) (ii); alguns pequenos RNAs nucleolares podem ser clivados para produzir pré-miRNA (iii); pri-miRNA grupo II dependente de uridililtransferase produz pré-miRNA com uma das fitas na posição 3' mais curta que sofre monouridilação no citoplasma para processamento pela DICER em seguida (iv); e uma via independente da DICER consiste em um curto pré-miRNA é produzido pela DROSHA e é exportado diretamente e carregado para a proteína AGO sem o processamento de DICER (KHAN; SUTHANTHIRAN; MUTHUKUMAR, 2019) (v).

Inúmeros estudos relataram ter descoberto assinaturas de miRNA representativas de doenças em vários tecidos doentes, bem como: urina, soro, plasma e outros fluidos corporais em numerosas patologias, tornando-os candidatos apropriados à serem biomarcadores. Como muitos miRNAs são específicos do tecido, sua desregulação sistêmica no sangue periférico aponta para uma patologia (SUN; LERMAN, 2019; AGOSTINI et al., 2019; HESS et al., 2019; WANG et al., 2019b; WANG et al., 2019a).

## **1.5 MicroRNAs como biomarcadores para TDM**

Em 2008, duas equipes de pesquisa independentes identificaram a presença de miRNAs na corrente sanguínea (CHEN et al., 2008; GILAD et al., 2008). Desde

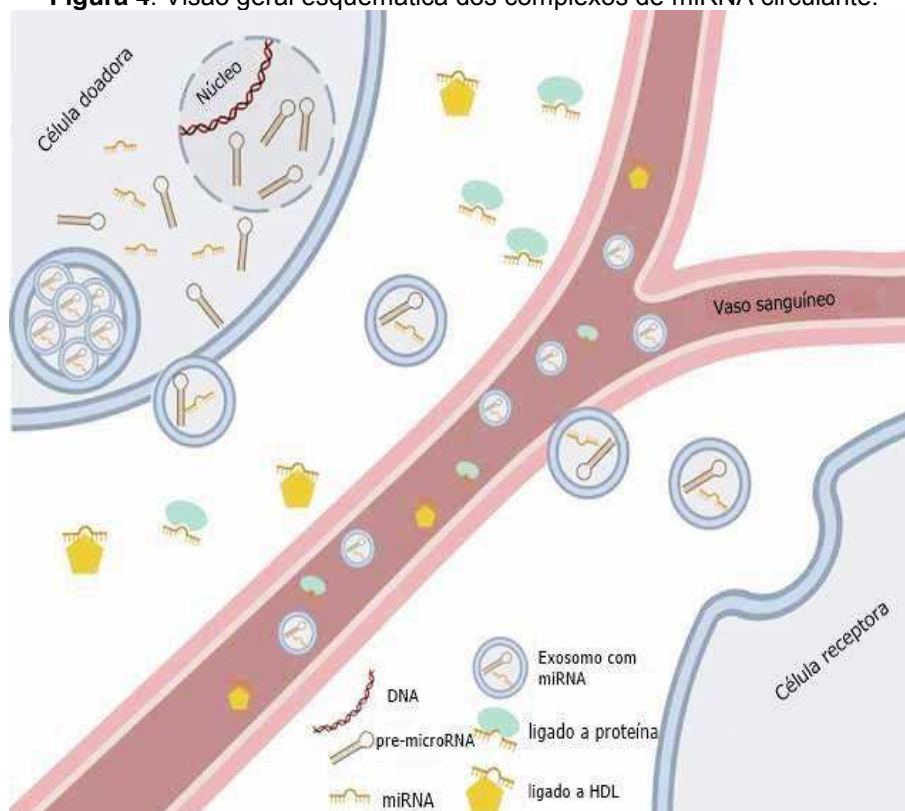
então, inúmeras sequências diferentes foram encontradas em plasma e soro derivados de humanos e animais. Pode ser observado que miRNAs circulantes foram associados a muitas doenças, levando à conclusão de que essas moléculas são “impressões digitais” para doenças específicas. Como os miRNAs foram denominados específicos para funções e doenças biológicas, eles logo se tornaram uma nova classe de biomarcadores e potenciais alvos para terapias (BENZ et al., 2016).

Para ser considerado um biomarcador, é necessário apresentar uma característica objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica. Biomarcadores têm como objetivo identificar características quantificáveis de processos biológicos (FOESSL; KOTZBECK; OBERMAYER-PIETSCH, 2019).

Um marcador biológico ideal tem alta especificidade e sensibilidade, é detectável por procedimentos de amostragem minimamente invasivos e sua concentração deve ser indicativa de um estado de doença (BUSCHMANN et al., 2016). Além disso, os biomarcadores diagnósticos podem ser utilizados com o intuito de avaliar o estado da doença, já os marcadores biológicos prognósticos são informativos a respeito do resultado da doença e, finalmente, os biomarcadores preditivos ajudam a determinar a eficácia do tratamento quando os grupos experimentais são comparados aos controles (CORREIA et al., 2017).

MiRNAs circulantes podem ser encontrados em várias formas na corrente sanguínea (Figura 4), sendo que 90% dos miRNAs extracelulares encontram-se ligados a proteínas AGO, formando complexos proteicos livres na corrente sanguínea. Os 10% restantes são encontrados de forma empacotada no interior de exossomos, dentro de corpos apoptóticos ou ligados a HDL (lipoproteína de alta densidade) (FOESSL; KOTZBECK; OBERMAYER-PIETSCH, 2019). Nota-se que a origem dos miRNAs circulantes é de difícil rastreamento. Por um lado, miRNAs circulantes podem ser derivadas de células sanguíneas mortas, especialmente no caso de miRNAs ligados a corpos apoptóticos, mas eles também podem ser ativamente secretados por células vivas (SOHEL, 2016).

**Figura 4.** Visão geral esquemática dos complexos de miRNA circulante.



Fonte: adaptado de (FOESSL; KOTZBECK; OBERMAYER-PIETSCH, 2019).

A elevada estabilidade dos miRNAs circulantes se deve ao fato de que os exossomos são vesículas impermeáveis para as RNases e de maneira alternativa, é possível observar que as proteínas AGO estão protegendo os miRNAs da ruptura enzimática. Como os miRNAs circulantes são estáveis por um certo tempo e facilmente acessíveis a partir de fluidos corporais, são candidatos ideais para seu uso como novos biomarcadores (FOESSL; KOTZBECK; OBERMAYER-PIETSCH, 2019).

Os miRNAs são excelentes biomarcadores, não apenas para fins de diagnóstico, mas também para estratificação de doenças e terapêutica. Também foi observado que a detecção de um pequeno número de miRNAs fornece mais informações sobre a doença do que o estudo da expressão de vários mRNAs. Um bom candidato a biomarcador é aquele que é específico para o distúrbio, pode ser detectado precocemente no processo da doença, acessível a partir do tecido periférico (não invasivo), estável, reprodutível e associado a um mecanismo conhecido. Há muitos desafios para identificar novos biomarcadores baseados em proteínas, devido à complexidade da estrutura de uma proteína e várias modificações pós-traducionais (AGRAWAL et al., 2018).



Os tecidos cerebrais e o líquido cefalorraquidiano são amostras biológicas ideais para pesquisas sobre transtornos neuropsiquiátricos. No entanto, a biópsia do tecido cerebral e as amostras de punção lombar não podem ser obtidas de maneira prática de pacientes deprimidos por questões éticas e de segurança. Em comparação, as amostras de sangue podem ser adquiridas com risco e custo mínimos e são comumente usadas em laboratórios clínicos. Assim, um teste de diagnóstico baseado em plasma para o diagnóstico de TDM seria clinicamente prático (PAN et al., 2018).

Os miRNAs desempenham um papel importante na regulação dos processos cerebrais e podem estar por trás de estados psicopatológicos, como a depressão (LOPEZ; KOS; TURECKI, 2018). Os primeiros estudos em humanos que exploraram a expressão de miRNAs em distúrbios psiquiátricos vieram de estudos *post-mortem*. Em 2007, foi relatado 16 miRNAs diferencialmente expressos no córtex pré-frontal de indivíduos que sofriam de esquizofrenia (PERKINS et al., 2007). Após esse estudo, nota-se o crescimento na investigação das alterações no perfil de expressão de miRNAs em cérebros de pessoas com transtorno depressivo maior. Em 2012, foi publicado o primeiro estudo que investigou as alterações na expressão de miRNAs em sangue periférico de pacientes com depressão comparando com controles saudáveis. Nesse estudo, os autores encontraram uma desregulação na expressão de 14 miRNAs em células mononucleares do sangue periférico de pacientes deprimidos ao se comparar com o controle, pacientes psiquiatricamente saudáveis (BELZEAUX et al., 2012).

Posteriormente, inúmeros estudos foram realizados em diferentes fluidos, células e tecidos que apontaram desregulação na expressão de miRNAs em pacientes depressivos (SMALHEISER et al., 2012; SMALHEISER et al., 2014; LOPEZ et al., 2014a; LOPEZ et al., 2014b; MAHEU et al., 2015; AZEVEDO et al., 2016; TORRES-BERRÍO et al., 2017; ROY et al., 2017; LOPEZ; KOS; TURECKI, 2018). Em destaque, SILVA e colaboradores (2019) descobriram por meio de sequenciamento de nova geração que o miRNA-184 está diferencialmente expresso em idosos diagnosticados com TDM. Esse miRNA está regulado de forma negativa nos pacientes depressivos, comparando-se com os idosos diagnosticados saudáveis. O achado foi comprovado com experimentos realizados após o sequenciamento por meio da técnica de RT-qPCR (do inglês: *Real-time reverse transcription polymerase chain reaction*).

Ademais, os miRNAs apresentam-se como biomoléculas atrativas para serem utilizadas como biomarcadores, devido à sua menor complexidade, especificidade de tecido e sem modificações pós-traducionais conhecidas. Eles são estáveis no sangue, na urina e nos tecidos e podem, portanto, servir como possíveis biomarcadores para muitas condições. No entanto, a precisa e exata medição de miRNA são desafiadoras. Um miRNA é uma sequência curta de nucleotídeos com conteúdo GC altamente variável, o que leva a diferentes propriedades de hibridização, tornando sua detecção muito exigente (BLONDAL et al., 2013).

Em suma, quantidades minúsculas de miRNAs presente no soro ou em outros fluidos corporais requerem uma tecnologia mais avançada, visando desenvolver técnicas robustas, precisas e altamente sensíveis para detecção de miRNAs. Apesar das limitações, a descoberta dos miRNAs abriu novos horizontes ao desvendar os mecanismos de várias doenças, possibilitando uma nova dimensão ao campo dos biomarcadores com aplicação para métodos diagnósticos (AGRAWAL et al., 2018).

## **1.6 Métodos diagnósticos para TDM**

Em decorrência da falta de dados laboratoriais empíricos suficientes, o diagnóstico do TDM depende exclusivamente da identificação subjetiva clínica, baseada em sintomas e escalas variáveis. Esse método consiste em uma avaliação abrangente por um profissional experiente, sendo restrito a observação subjetiva individual e falta de diagnósticos em tempo real (ZHU et al., 2018), resultando em uma alta taxa de erros de diagnóstico (PAN et al., 2018). Além disso, na prática rotineira, os clínicos geralmente utilizam o DSM-V e CID-11 (Classificação Internacional de Doenças 11ª edição) para auxiliar no diagnóstico, sendo desafiados por adequar as apresentações dos sintomas de seus pacientes, que estão em uma escala contínua da gravidade de depressão, a categorias diagnósticas rigorosas baseadas nesse manual (DSM-V, 2014). Devido a falta de um método de diagnóstico objetivo, menos da metade dos pacientes com TDM (em muitos países, menos de 10%) recebem tratamentos eficazes (PAN et al., 2018);

A literatura traz algumas abordagens que visam auxiliar no diagnóstico da depressão. Focando na apresentação de sintomas pelo paciente, nota-se um método de diagnóstico, rastreamento e classificação de sintomas depressivos, a fim de prever respostas a tratamentos específicos e orientar ajustes e intervenções adicionais ao tratamento. Este método consiste em realizar perguntas ao indivíduo sobre pelo menos um critério depressivo; registrar a(s) resposta(s) do(s) indivíduo(s) para pelo menos uma pergunta; pontuar as respostas do indivíduo de forma a determinar a existência ou não de depressão no indivíduo; fazer ao indivíduo mais perguntas sobre determinados grupos, padrões e/ou subtipos de depressão e pontuar as respostas de modo a determinar o subtipo e a gravidade da depressão no indivíduo (G. ROGER SPARHAWK, 2001). No entanto, os desafios dessa metodologia diagnóstica é a apresentação clínica de TDM, que é altamente heterogênea e possui comorbidade com outras doenças como ansiedade e fobia social. Entre os indivíduos com TDM, 57,5% também preenchem critérios para pelo menos um outro transtorno de humor. Da mesma forma, entre os indivíduos com fobia social, 14,9% preenchem critérios para TDM e 60% dos indivíduos que realizam tratamento para fobia social preenchem critérios para depressão (WERSEBE et al., 2018).

Outras metodologias já foram descritas, tais como: análises de amostra teste obtida de um paciente para a presença ou quantidade de um ou mais polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*), associados a genes nas vias bioquímicas relacionadas a adsorção, distribuição, receptor ou efector de serotonina (DIAMOND; BREMER, 2005); metodologia baseada na identificação de alterações em múltiplos neurotransmissores plasmáticos, sendo um estudo metabolômico direcionado (PAN et al., 2018); imunoensaios (BILELLO; PI, 2010); espectrometria de massa por dessorção/ionização por laser de superfície (SELDI-MS) (WANG; DORIN; COMANICIU, 2010); índice de diagnóstico de depressão usando recursos não lineares em sinais de eletroencefalograma (ACHARYA et al., 2015); método que utiliza sinais eletroencefalográficos ao utilizar padrões espaciais comuns de *Kernel Eigen-Filter-Bank* (LIAO et al., 2017); metodologia para o diagnóstico de depressão automatizado baseado em redes profundas para codificar a aparência e dinâmica facial (ZHU et al., 2018). No entanto, os métodos acima citados são dispendiosos, alguns subjetivos, caros, requerem muito tempo de trabalho e exigem

profissional altamente qualificado. Nesse sentido, uma abordagem diagnóstica objetiva para o TDM teria um valor clínico considerável (PAN et al., 2018).

Nesse sentido, os biossensores podem ser alternativas excelentes para diagnóstico do TDM devido às suas características como: alta sensibilidade, pequeno tempo de resposta, baixo custo, volume de amostra reduzido, sendo aplicados nas indústrias farmacêuticas (GHODSI; RAFATI; SHOJA, 2019), monitoramento ambiental (BILAL; IQBAL, 2019), indústria de alimentos (ZHOU et al., 2019) e detecção de doenças (RODOVALHO et al., 2018).

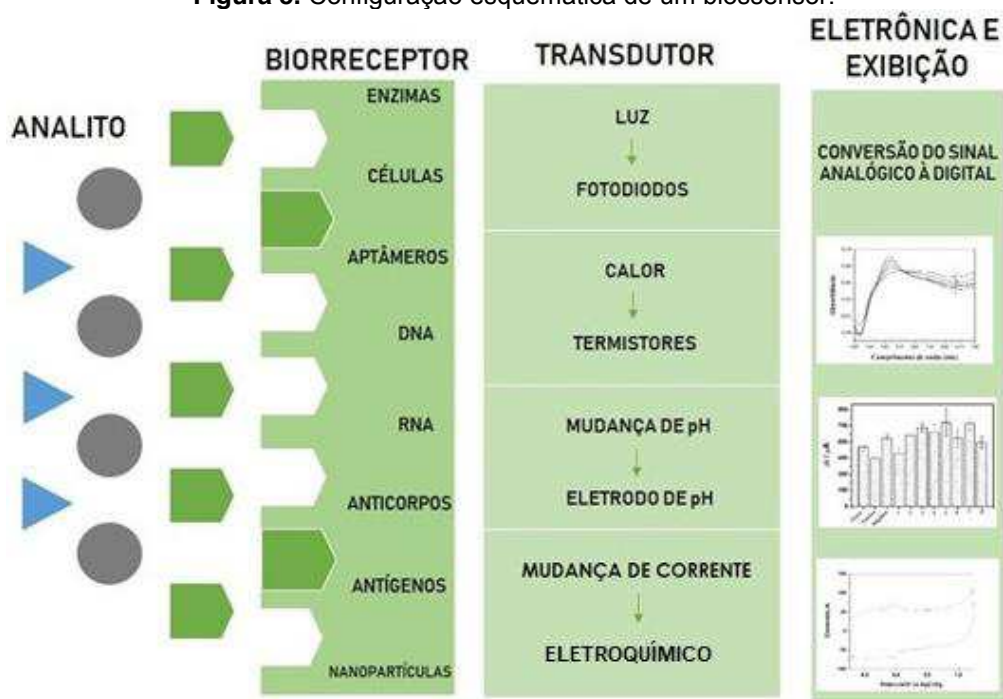
## **1.7 Biossensores**

Biossensores são dispositivos que contêm um elemento de biorreconhecimento que interage com um analito presente em uma amostra, levando a uma alteração da propriedade química/física, que um transdutor converte em um sinal mensurável. Além disso, um biossensor eletroquímico é definido, de acordo com a IUPAC, como “um dispositivo integrado autônomo, capaz de fornecer informações analíticas quantitativas ou semiquantitativas específicas, compreendendo três componentes essenciais: analito, biorreceptor e transdutor” (WONGKAEW et al., 2019).

Em relação ao biorreceptor, muitas vezes chamado de sonda, deve haver um componente que reconheça seletivamente o analito de interesse. Geralmente, isso requer um evento de ligação entre o elemento de reconhecimento e a molécula alvo. Além disso, é necessário que o sistema apresente alguma forma de elemento de transdução, o qual converte o evento de ligação bioquímica (biorreconhecimento) num sinal facilmente mensurável. Neste caso, pode ocorrer a geração de espécies eletroquimicamente mensuráveis, alguma alteração na condutividade, mudança na massa ou nas propriedades ópticas, como o índice de refração. Finalmente, deve haver métodos para detectar e quantificar a mudança física, como medir uma corrente elétrica ou uma alteração de massa ou óptica e convertê-la em informação útil (ALTINTAS, 2018).

Os biossensores podem ser classificados com base em várias perspectivas, no entanto, a classificação mais comumente utilizada baseia-se em dois fatores: o elemento de biorreconhecimento e a transdução do sinal (ALHADRAMI, 2018). A Figura 5 ilustra diferentes tipos de biossensores classificados com base nessas duas perspectivas.

**Figura 5.** Configuração esquemática de um biossensor.



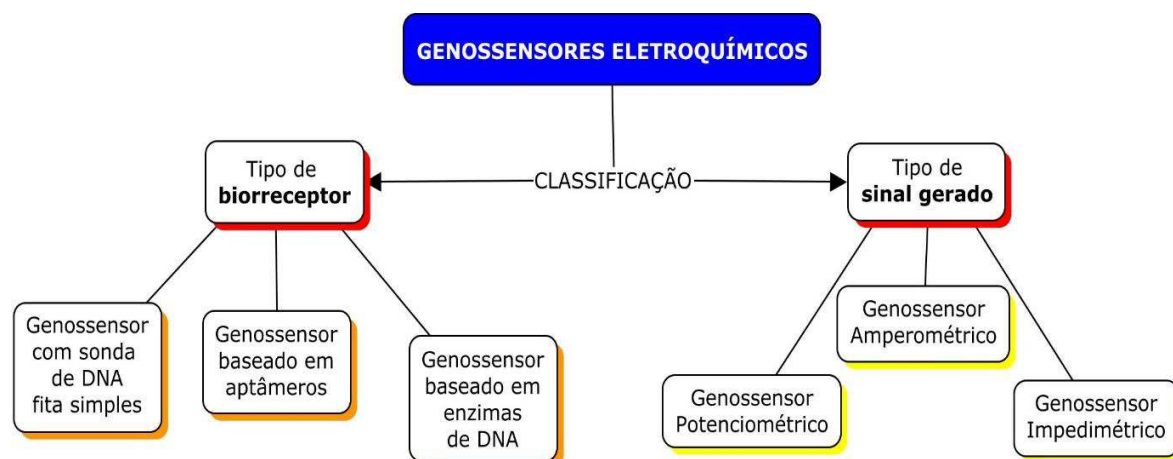
Fonte: adaptado de (MOÇO, 2018).

Os métodos eletroquímicos têm vantagens superiores devido ao seu baixo custo, seletividade e capacidade de miniaturização em comparação com a maioria das técnicas analíticas e, portanto, apresentam ampla utilização nos campos alimentícios, agrícolas, médicos e ambientais (KILIC et al., 2018). Os transdutores eletroquímicos fornecem informações na forma de um sinal elétrico, o qual é proporcional à concentração do analito e pode ser medido como corrente ou voltagem. Os transdutores eletroquímicos trabalham com o princípio de reações eletroquímicas que ocorrem na interface eletrodo-eletrólito (RAFIQUE et al., 2019).

Dentre as classes de biossensores eletroquímicos, destacam-se os genossensores. Um genossensor pode ser definido como um dispositivo contendo receptores biológicos em sua superfície que podem ser uma pequena sequência oligonucleotídica ou um aptâmero, ou ainda uma enzima de DNA (do inglês: DNAzymes) para a identificação do analito (GOUMI, 2017).

No caso dos genossensores eletroquímicos, a conversão direta da hibridização em um sinal elétrico reduz as complexidades e dificuldades relacionadas à conversão de sinal no sequenciamento genômico, detecção de mutação e identificação de patógenos. A construção e otimização de um genossensor eletroquímico em geral envolve os seguintes três estágios: imobilização da sonda de DNA (sequência de oligonucleotídeo) na superfície do eletrodo (i); hibridização da sonda com a sequência alvo (sequência complementar à sonda) (ii); marcação e leitura eletroquímica (iii). Os genossensores eletroquímicos podem ser classificados com base no tipo de sinal gerado e no tipo de sonda de DNA usada como bioreceptor (KUKRETI et al., 2018), como mostrado na Figura 6.

**Figura 6.** Classificação de genossensores de acordo com o tipo de receptor e o tipo de sinal gerado.



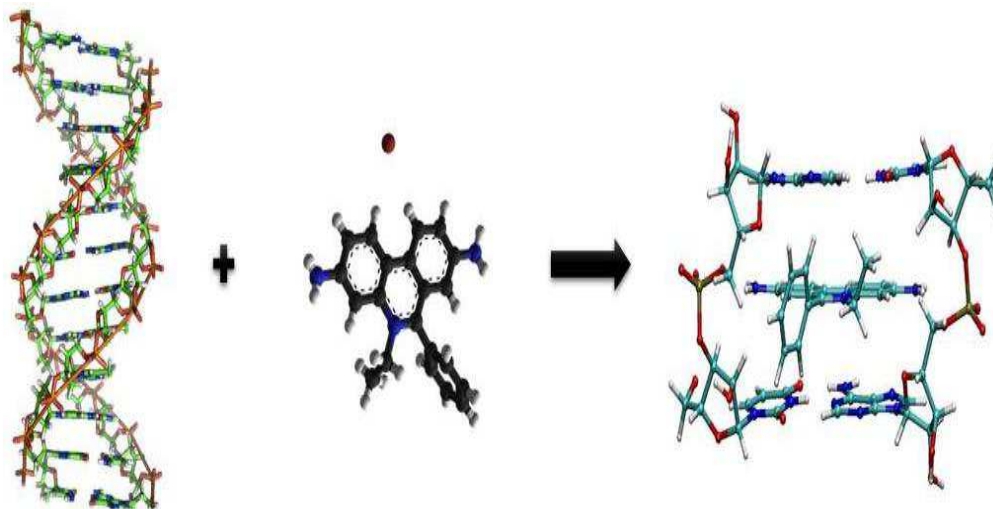
Fonte: adaptado de (KUKRETI et al., 2018).

Para construção dos genossensores eletroquímicos, inúmeras plataformas podem ser utilizadas, tais como: eletrodos de ouro (OLIVEIRA et al., 2018a); eletrodos impressos de carbono (INGROSSO et al., 2019); eletrodos impressos de nanotubos de carbono (FORTUNATI et al., 2019); eletrodos de carbono vítreo (GHOLIVAND; AKBARI, 2019); eletrodos impressos modificados com nanofibras de carbono (ERDEM; EKSIN, 2019); eletrodos de grafite (DE CASTRO et al., 2018). Os eletrodos de ouro são amplamente utilizados na eletroquímica, particularmente em eletroquímica molecular, graças à típica cinética rápida de reações de eletrotransferência e reações eletroquimicamente induzidas, sendo também fácil de serem funcionalizados com sonda específica para detecção do analito de interesse (SOJIC et al., 2016).

As principais formas de detecção de um analito de interesse podem ser divididas em direta ou indireta, monitorando-se a oxidação das bases nitrogenadas do DNA ou a resposta de um indicador, respectivamente. Quando o alvo encontra-se hibridizado com a sonda de DNA, os resíduos de guanina do miRNA alvo podem sofrer oxidação, o que pode levar a múltiplos produtos. A oxidação de guanina é considerada quimicamente irreversível, sem picos de redução correspondentes aparecendo em um voltamograma (LI; BATCHELOR-MCAULEY; COMPTON, 2010). Por outro lado, a detecção indireta pode compreender a utilização de intercalantes de DNA, como por exemplo, o brometo de etídio, para monitorar o pico de oxidação e/ou redução desses mediadores. Na maioria das vezes, os intercalantes são moléculas que se ligam ao *duplex* após a hibridização do miRNA alvo com a sonda de DNA imobilizada na superfície do eletrodo, criando um *heteroduplex* DNA-RNA, o qual é reconhecido pelo intercalante eletroativo que pode então ser oxidado ou reduzido (GILLESPIE; LADAME; O'HARE, 2019).

O brometo de etídio (BE) possui fórmula molecular  $C_{21}H_{20}N_3Br$ , nome IUPAC é brometo de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridínio, um derivado da fenantridina que é um composto cristalino vermelho-escuro solúvel em água e muito utilizado em biologia molecular (SULTHANA et al., 2018), sendo amplamente utilizado pelo baixo custo e por apresentar um aumento da intensidade de fluorescência quando intercalado entre os pares de base da estrutura da dupla hélice do DNA (Figura 7). A intercalação com a dupla fita do DNA ocorre devido à interação hidrofóbica, na qual uma molécula aromática é atraída para um ambiente hidrofóbico dos pares de bases do DNA a partir do meio hidrofílico. Além disso, uma propriedade interessante que o BE apresenta é o fato de ser uma molécula eletroquimicamente ativa (CASTRO, 2016).

**Figura 7.** Esquema representativo da estrutura molecular do DNA após intercalação do brometo de etídio.



Fonte: adaptado de (ERICH GROTEWOLD; CHAPPELL; KELLOGG, 2015).

## 1.8 Microscopia de força atômica e técnicas eletroquímicas

### 1.8.1 Microscopia de força atômica

A microscopia de força atômica (AFM, de *Atomic Force Microscopy*) é uma ferramenta útil para realizar medições diretas de forças intermoleculares com caracterização de resolução atômica que podem ser empregadas em um amplo espectro de aplicações como em pesquisas de materiais semicondutores, polímeros e biomateriais (SANTOS; CARVALHO, 2019).

O AFM é composto basicamente por um cantilever que pode ser chamado de ponta, ponteira ou sonda, o qual faz varreduras da superfície de uma determinada amostra em estudo, medindo a força de interação entre os átomos do cantilever e os da superfície da amostra. Em seguida, utilizando recursos computacionais do *software* do equipamento, os resultados são convertidos em imagens. As forças mencionadas podem ser de inúmeros tipos, no entanto, as principais consistem nas forças atrativas de Van der Waals e forças repulsivas advindas do princípio de exclusão de Pauli, ocorrendo a repulsão ao se aproximar os átomos do cantilever com os da amostra (REIFENBERGER, 2015).



Ademais, seu mecanismo de funcionamento consiste em um laser que incide na parte de trás do cantilever e sua deflexão é captada por um detector fotodiodo. De acordo com a varredura da superfície realizada pelo sistema, a ponteira sofre variações em sua posição vertical, conforme à topografia da amostra com o objetivo de manter uma posição constante no ponto em que o laser incide. Percebe-se que o movimento realizado pelo cantilever para cima ou para baixo é correspondente ao dado de altura que é utilizado na construção da imagem topográfica (SANTOS; CARVALHO, 2019).

Os modos de se obter imagens no AFM podem ser classificados como: contato, contato intermitente e não-contato, dependendo das forças entre a ponteira e a amostra. No modo contato, a ponta varre a superfície e as forças atuantes são repulsivas do tipo Van der Waals. Já no modo não-contato, como o nome sugere, a ponta não toca a superfície, e as forças de interação atuantes são de Van der Waals atrativas, mais fracas que no modo contato. Finalmente, operando-se no modo intermitente (*tapping mode*), a ponta varre a superfície da amostra com contato intermitente (REIFENBERGER, 2015).

### 1.8.2 Técnicas eletroquímicas

Técnicas eletroquímicas estão relacionadas com o estudo da interação entre propriedades elétricas e químicas, ou seja, as medidas de grandezas elétricas, como por exemplo, corrente, potencial ou carga e sua relação com parâmetros químicos. O uso de medições elétricas para fins analíticos pode ser observado em uma vasta gama de aplicações, incluindo monitoramento ambiental, controle de qualidade industrial ou análise biomédica (WANG, 2006).

É importante mencionar que as reações de oxidação e redução mostram-se fundamentais para as técnicas eletroquímicas, a corrente de interesse a ser monitorada é a corrente faradaica, oriunda dos processos redox na superfície do eletrodo. Os processos faradaicos são regulados por mecanismos de transferência de elétrons e transporte de massa (SVANCARA et al., 2012). A transferência eletrônica pode ser expressa de acordo com a Equação 1.

$$I = n F A j$$

Equação 1

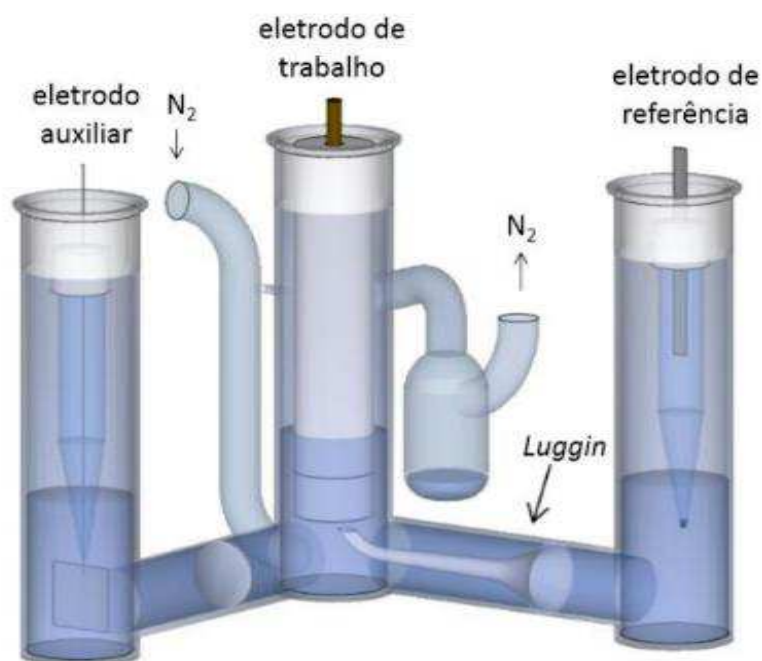
A Equação 1 enuncia a proporcionalidade entre corrente observada ( $I$ ), número de elétrons envolvidos na reação ( $n$ ), área do eletrodo ( $A$ ), constante de Faraday ( $F$ ) e fluxo de moléculas de analito ( $j$ ) (SVANCARA et al., 2012).

O transporte de massa é responsável por regular a movimentação eletrônica no meio reacional. Há três tipos de transporte: difusão (movimento espontâneo de acordo com a influência de um gradiente de concentração), convecção (movimento regiões de concentração) e migração (movimento de partículas carregadas ao longo do campo elétrico aplicado) (Wang, 2006).

Em análises voltamétricas, é desejada a minimização do transporte de massa por convecção e migração e a ampliação do transporte de massa por difusão, sendo os dois primeiros correspondentes aos processos não faradaicos. Logo, utiliza-se excesso de eletrólito suporte com o intuito de minimizar a formação de um campo elétrico que favoreceria a migração devido a um gradiente de cargas, mantendo-se também todo o aparato eletroquímico em repouso a fim de evitar a movimentação por convecção (Wang, 2006).

Para a realização de análises voltamétricas, geralmente, emprega-se uma célula eletroquímica convencional, a qual pode apresentar três eletrodos (Figura 8), a saber: eletrodo de trabalho, eletrodo auxiliar (também chamado contra-eletrodo) e eletrodo de referência. O eletrodo de trabalho é aquele em que ocorrerá a reação de interesse frente ao analito quando um potencial é aplicado. O eletrodo de referência, geralmente constituído de prata/cloreto de prata ( $Ag/AgCl$ ), apresenta como função de manter o potencial constante em relação ao eletrodo de trabalho. Desta forma, todas as medidas realizadas serão em função do potencial padrão  $Ag/AgCl$  (PACHECO et al., 2013). Finalmente, o contra-eletrodo, frequentemente de platina e tem a função de fechar o circuito elétrico na célula eletroquímica apresenta, facilitando a passagem de corrente entre o eletrodo auxiliar e o eletrodo de trabalho (WANG, 2006).

**Figura 8.** Representação esquemática de uma célula eletroquímica de três eletrodos. São destacadas as regiões de entrada e saída de gás nitrogênio, bem como o capilar de *Luggin*, que tem a função de aproximar os eletrodos de trabalho e referência.

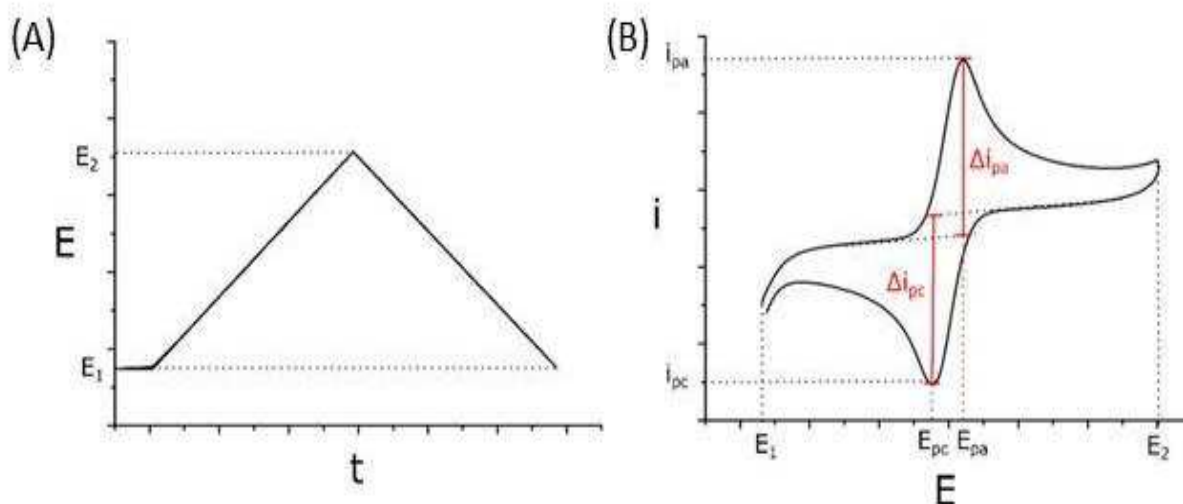


Fonte: (RODOVALHO, 2016).

No campo dos biossensores eletroquímicos as técnicas de voltametria, como a voltametria cíclica (VC) e a voltametria de pulso diferencial (VPD), e a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) se destacam, pois, fornecem informações características da interface eletrodo-solução.

A voltametria cíclica consiste em varrer linearmente o potencial de um eletrodo de trabalho estacionário (em uma solução não agitada), usando uma forma de onda de potencial triangular (Figura 9A). Dependendo da informação procurada, ciclos únicos ou múltiplos podem ser utilizados. Durante a varredura de potencial, o potenciostato mede a corrente resultante do potencial aplicado. O gráfico de corrente-potencial resultante é denominado de voltamograma cíclico (Figura 9B) (JORGE HOYOS-ARBELÁEZ; VÁZQUEZ; CONTRERAS-CALDERÓN, 2017).

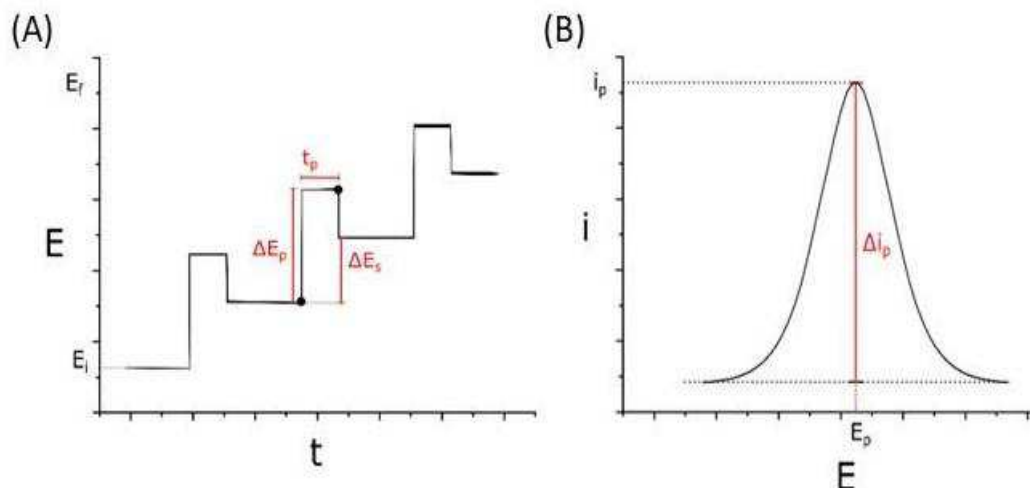
**Figura 9.** Representações gráficas da voltametria cíclica. A) Gráfico de potencial em função do tempo: em cada ciclo o potencial é variado linearmente de E1 a E2, em seguida retornando a E1. B) Voltamograma cíclico, com a corrente elétrica em função do potencial. Neste exemplo, é possível observar os picos de oxidação e redução. E: potencial elétrico; i: corrente elétrica;  $E_{pc}$ : potencial de pico catódico;  $E_{pa}$ : potencial de pico anódico;  $i_{pc}$ : corrente de pico catódico;  $i_{pa}$ : corrente de pico anódico. O delta ( $\Delta$ ) representa a variação de corrente de pico, com a subtração da corrente de pico pela corrente na base do pico



Fonte: (RODOVALHO, 2016).

A voltametria de pulso diferencial (VPD) é uma técnica extremamente útil para medir os níveis de traços de espécies orgânicas e inorgânicas. Na voltametria de pulso diferencial, pulsos de magnitude fixa sobrepostos a uma rampa de potencial linear são aplicados ao eletrodo de trabalho (Figura 10A). A corrente é medida duas vezes, pouco antes da aplicação do pulso e novamente no final da vida útil do pulso (após ~ 40 ms, quando a corrente de carga decaiu). A primeira corrente é subtraída instrumentalmente da segunda, e essa diferença de corrente é plotada em relação ao potencial aplicado.

**Figura 10.** Representações gráficas da voltametria de pulso diferencial. A) Gráfico de potencial em função do tempo: são aplicados pulsos periódicos de potencial. Os pontos destacados representam a amostragem de corrente para um pulso. B) Voltamograma de pulso diferencial, com a corrente elétrica em função do potencial. Neste exemplo, é possível observar um pico de oxidação. E: potencial elétrico; i: corrente elétrica;  $\Delta E_p$ : variação de potencial de pulso;  $\Delta E_s$ : variação de potencial de amostragem;  $t_p$ : período de pulso;  $\Delta i_p$ : variação de corrente de pico.



Fonte: (RODOVALHO, 2016).

O voltamograma de pulso diferencial resultante consiste em picos de corrente, cuja altura é diretamente proporcional à concentração dos analitos correspondentes (Figura 10B) (WANG, 2006). Essa técnica é excelente para aplicação em biossensores uma vez que apresenta uma alta sensibilidade, pois a corrente resultante é obtida por meio da diferença entre a corrente faradaica (desejada) e a corrente não-faradaica (interferente) (SKOOG et al., 2006).

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é baseada na lei de Ohm (equação 1), a qual enuncia uma relação linear entre a corrente ( $i$ ) e a diferença de potencial ( $U$ ) existente em um circuito elétrico, sendo a resistência ( $R$ ) o fator de proporcionalidade.

$$i = U/R \quad \text{(Equação 2)}$$

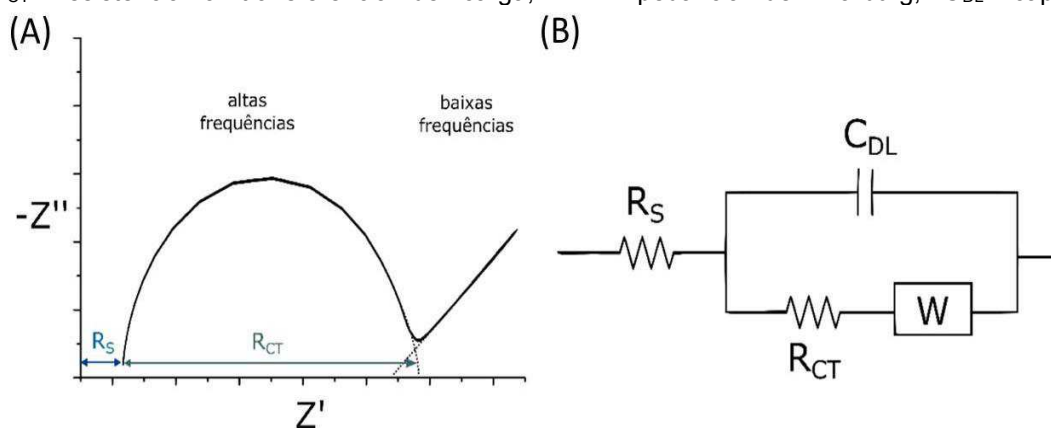
É possível observar que a EIE é expressa na forma de um número complexo, sendo que a resistência dada em ohms é o componente real, ao passo que a reatância capacitiva compreende o componente imaginário (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015).

Além disso, a EIE consiste na resistência complexa encontrada quando uma corrente flui através de um circuito que apresenta combinações de resistores, capacitores ou indutores. A EIE envolve a aplicação de um sinal de tensão senoidal

perturbante de pequena amplitude (a uma frequência  $\omega$ ) na célula eletroquímica e a medição da resposta da corrente é efetuada.

Os processos eletroquímicos que ocorrem na interface eletrodo-solução podem ser modelados usando componentes do circuito eletrônico equivalente que correspondem aos espectros de impedância experimentais (Figura 11B). Isso inclui a capacitância da dupla camada elétrica ( $C_{DL}$ ), a resistência ôhmica da solução eletrolítica ( $R_s$ ), resistência a transferência de cargas ( $R_{CT}$ ), e a impedância de Warburg ( $W$ ) resultante da difusão de íons da solução em massa para a superfície do eletrodo (WANG, 2006).

**Figura 11.** Espectroscopia de impedância eletroquímica. A) Diagrama de Nyquist, destacando as regiões de altas e baixas frequências, além dos cálculos de componentes da impedância. B) Circuito equivalente que serve de modelo para explicar os dados experimentais.  $R_s$ : resistência da solução;  $R_{CT}$ : resistência à transferência de carga;  $W$ : impedância de Warburg;  $C_{DL}$ : capacitância.



Fonte: (RODOVALHO, 2016).

O espectro de impedância faradaico resultante (gráfico de Nyquist) corresponde à dependência do número imaginário ( $Z''$ ) em função do número real ( $Z'$ ) (Figura 11A), e apresenta informações sobre a interface eletrodo-solução. Geralmente, os gráficos de Nyquist incluem uma região semicírculo situada no eixo, seguida por uma linha reta (WANG, 2006). Em altas frequências a impedância de Warburg é pequena, sendo que as partículas que difundem não se movem a distâncias maiores e, em baixas frequências a difusão das partículas é maior, aumentando a impedância de Warburg, identificada por uma linha com um ângulo de  $45^\circ$  na região de baixa frequência.

Além das técnicas eletroquímicas, outras abordagens, como o uso da internet e de aplicativos de informação, podem ser utilizadas com o intuito de ampliar a aplicabilidade dos biossensores. Tendências recentes no campo de sensores químicos e biossensores têm destacado a importância da simplicidade e do baixo

custo para expandir as tecnologias de sensoriamento às pessoas, inclusive para aquelas em ambientes remotos ou com poucos recursos (HOGAN; ELTON; LOKE, 2019). Esses sistemas aproveitam os sensores já incorporados ao telefone ou usam sensores externos ao telefone (WOOD et al., 2019).

A literatura reporta diversos avanços no campo da pesquisa que envolvem a utilização de interfaces eletrônicas e biossensores baseados em *smartphones*, tais como: monitoramento da concentração de  $\beta$ -D-glicose utilizando-se dispositivo de detecção eletroquímica baseado em *smartphone* e biossensor baseado em papel (FUJIMOTO et al., 2017); determinação de  $\beta$ -cetona (GUO, 2017) e nível lipídico sanguíneo (FU; GUO, 2018) utilizando-se testes com tiras descartáveis com dispositivo eletrônico conectado a um *smartphone*; finalmente, MIN e colaboradores (2018) desenvolveram uma plataforma baseada em *smartphone* para o diagnóstico precoce de sepse. Sendo assim, esses dispositivos funcionam como uma plataforma portátil para registrar, analisar, controlar e exibir os resultados. Nesse sentido, sensores móveis e aplicativos de smartphones apresentam-se como alternativas plausíveis para explorar a capacidade computacional e conectiva para criar um diagnóstico integrado.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

- Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico e aplicativo para o diagnóstico de transtorno depressivo maior (TDM) em idosos baseado na detecção do miRNA-184 utilizando amostras de plasma humano.

### 2.2 Objetivos específicos

- Imobilizar sonda de DNA (DEP1S) específica sob a superfície dos eletrodos de ouro;
- Executar tratamento térmico e óptico do plasma humano para posterior utilização no biossensor;
- Avaliar a especificidade do biossensor;
- Aplicar amostras de plasma de idosos saudáveis ou de idosos diagnosticados com transtorno depressivo maior sobre o sistema desenvolvido e avaliar as alterações eletroquímicas (VPD e EIS) e topografia da superfície (AFM);
- Estudar a variação da concentração do miRNA-184 no plasma humano e construir uma curva de calibração do biossensor;
- Avaliar a regeneração do biossensor;
- Avaliar a estabilidade em função do tempo para o biossensor;
- Desenvolver aplicativo para *smartphones* com o intuito de auxiliar na utilização do biossensor e triagem das amostras.



### 3 Material e Métodos

#### 3.1 Equipamentos e reagentes

Todas as soluções foram preparadas a partir de reagentes de grau analítico, sem purificação prévia e solubilizadas em água deionizada ultrapura (resistividade de 18,2 MΩ cm, Gehaka), a qual foi desoxigenada com gás nitrogênio ultrapuro por borbulhamento (1,0 min mL<sup>-1</sup>), para garantir que o oxigênio não interfira nas medidas eletroquímicas. As análises voltamétricas foram realizadas em um potenciostato (CHI Instruments). A temperatura e concentração das soluções encontram-se indicadas após sua citação ao longo o texto. Os reagentes utilizados foram de padrão analítico e estão listados na Tabela 1:

**Tabela 1.** Reagentes utilizados.

Reagentes	Fórmula química	Fonte	Pureza %
Ácido sulfúrico	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma	98%
Brometo de etídio	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> BrN <sub>3</sub>	Vetec	95%
Cloreto de potássio	KCl	Neon	99%
Cloreto de hexaminrutênio (II)	[Ru(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ]Cl <sub>3</sub>	Sigma	99,9%
Fosfato de sódio dibásico	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Synth	99%
Fosfato de sódio monobásico	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Synth	99%

Com o objetivo de garantir a redução da interferência provocada pela presença de oxigênio, todas as soluções utilizadas neste trabalho para fins eletroquímicos foram deaeradas por meio de borbulhamento lento de gás nitrogênio ultrapuro, sendo 1 minuto de borbulhamento com N<sub>2</sub> gasoso para cada mL de solução preparada. Além disso, todos os testes eletroquímicos foram realizados em célula eletroquímica de 3 eletrodos, possuindo três compartimentos (Figura 8) acoplados a um potenciostato. Os eletrodos utilizados foram: eletrodo de trabalho de ouro com diâmetro de 2,0 mm, eletrodo de referência de Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup> (KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup>) e eletrodo auxiliar de platina.

### 3.2 Amostras biológicas

As amostras de miRNA total extraídas de diferentes pacientes foram cedidas pelo Laboratório de Genética (LABGEN) da Universidade Federal de Uberlândia. A solução estoque dos oligonucleotídeos (DEP1S - sonda modificada com enxofre na extremidade 5', miRNA-184 DEP2 - alvo específico e os controles negativos: RNA genômico (gRNA) do vírus Zika e oligonucleotídeo BRCA (do inglês *Breast Cancer*) e troponina I, foram mantidos na concentração 1,0 mmol L<sup>-1</sup> em água deionizada, ultrapura.

As sequências dos oligonucleotídeos podem ser vistos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Sequências dos oligonucleotídeos utilizados no presente trabalho.

Oligonucleotídeo	Sequência	Fonte
DEP1S	5'-(HS)ACCCTTATCAGTTCTCCGTCCG-3'	DNA express
DEP2	5'- CGGACGGAGAACUGAUAAGGGU-3'	DNA express
BRCA	5'-CGAAGACCAGATAAATCCATT-3'	Exxtend

### 3.3 Biossensor eletroquímico

#### 3.3.1 Pré-condicionamentos dos eletrodos de ouro

O pré-condicionamento dos eletrodos de ouro (Au) foi realizado para garantir uma área de trabalho homogênea e boa reprodutibilidade dos resultados. Para o pré condicionamento, os eletrodos de ouro foram tratados com ultrassom em solução de etanol 70 % (v/v), durante dez minutos e, em sequência, lavados com água deionizada. Em seguida, foram polidos mecanicamente em uma flanela 100 % algodão embebida em suspensão de alumina 0,3 µm (Micropolish A, Buehler) em água deionizada. Para retirar alumina remanescente, os eletrodos foram tratados com ultrassom em água deionizada por 1 minuto. Na sequência, uma solução de ácido

sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  foi gotejada sobre a superfície do eletrodo, o suficiente para cobrir a superfície de 2 mm de diâmetro do eletrodo de trabalho (ouro), impedindo assim a formação de óxidos sob a mesma e preservando o polimento para as etapas subsequentes.

A seguir foi realizado o pré-condicionamento eletroquímico da superfície do eletrodo utilizando-se a técnica de voltametria cíclica em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ . Nesta etapa, os eletrodos são polidos eletroquimicamente (oxidando e/ou reduzindo impurezas/interferentes que estejam na superfície do Au). Após esta etapa, os voltamogramas resultantes são colocados em gráfico e somente os padronizados, ou seja, aqueles com áreas similares ao perfil padrão do eletrodo de ouro (Figura 13), são escolhidos para os próximos procedimentos.

Com o pré-condicionamento eletroquímico em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  realizado, é necessário a determinação da linha de base de cada eletrodo. Essa linha de base é fundamental, uma vez que contribui para o pré-condicionamento dos eletrodos em um  $\text{pH} = 7,4$  para a imobilização da sonda (Au/DEP1S). Por outro lado, é essencial para determinação da corrente de pico, após a detecção final, pois essa linha de base será subtraída do voltamograma obtido nos estudos posteriores, visando retirar o efeito da corrente capacitiva, evidenciando a corrente faradaica, a qual é a de interesse para o presente trabalho. Logo, foi conduzida uma voltametria de pulso diferencial com os seguintes parâmetros: potenciais de  $+0,0 \text{ V}$  e  $+0,8 \text{ V}$ , com 6 varreduras na velocidade de  $30 \text{ mV s}^{-1}$ , incremento de pulso igual a  $0,006 \text{ V}$  e período de pulso de  $0,2 \text{ s}$ , tendo como eletrólito suporte uma solução tampão fosfato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7,4$ ).

### **3.3.2 Otimização da concentração da sonda DEP1S**

A otimização da concentração da sonda DEP1S foi conduzida com o objetivo de obter a melhor resposta de corrente para o bioeletrodo (Au/DEP1S). Para esta análise, três concentrações de sonda foram testadas:  $0,1$ ,  $2$ , e  $10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . Para tanto, foram gotejados  $3,0 \text{ } \mu\text{L}$  da solução de sonda na superfície dos eletrodos e realizada uma detecção direta. O pico de oxidação das bases nitrogenadas guanina e adenina foi monitorado, utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial com

janela de potencial de +0,6 V a +1,4 V e velocidade de 30 mV s<sup>-1</sup>, incremento de pulso igual a 0,006 V e período de pulso de 0,2 s, tendo como eletrólito suporte uma solução tampão fosfato de sódio (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH = 7,4).

### **3.3.3 Imobilização da sonda de DNA (DEP1S) e detecção do alvo em plasma humano**

Após a etapa de pré-condicionamento dos eletrodos de ouro e otimização da concentração da sonda, iniciou-se a etapa de construção do bioeletrodo por meio da imobilização da sonda de DNA (DEP1S) na concentração otimizada. A imobilização de DEP1S (Au/DEP1S) foi realizada por meio do gotejamento de 3,0 µL de solução da sonda (2,0 µmol L<sup>-1</sup>) sobre a superfície do eletrodo. Os eletrodos foram hermeticamente acondicionados, com o objetivo de manter a solução contendo a sonda de DNA em volume constante na superfície dos eletrodos de ouro, durante 30 minutos, em temperatura ambiente.

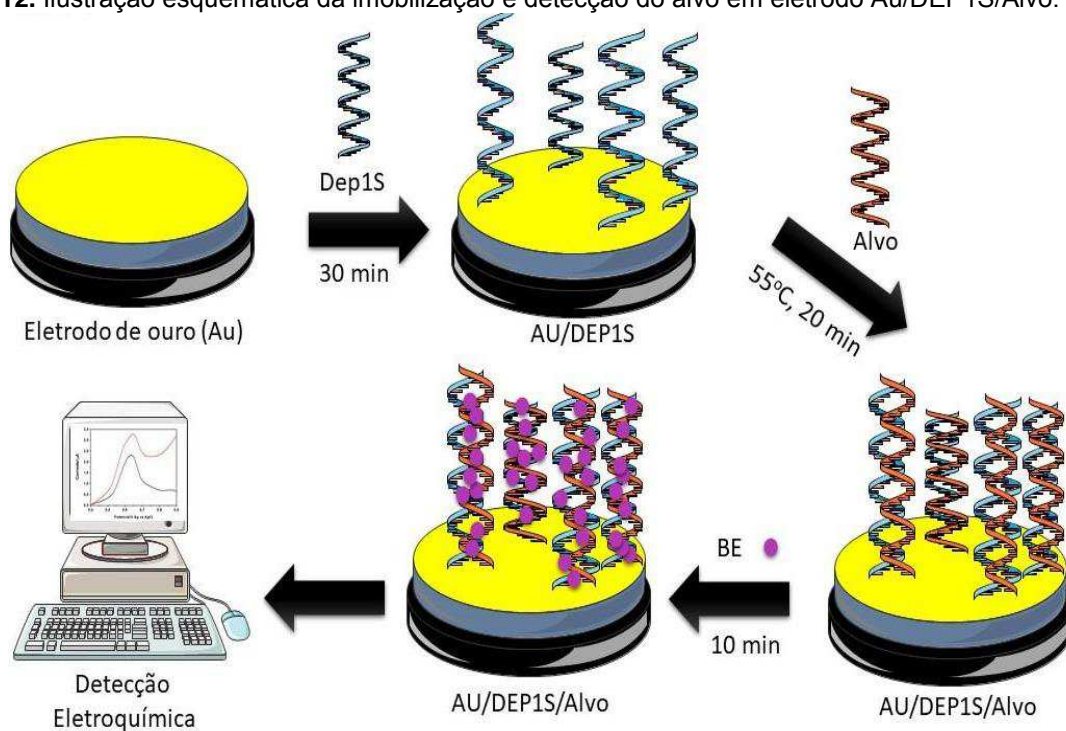
A imobilização da sonda ocorreu de forma eficiente, pois é conhecido na literatura que o ouro possui boa afinidade com átomos de enxofre (ASHWELL et al., 2011). DEP1S possui uma modificação com grupamento tiol na extremidade 5', a qual garante interação efetiva entre a superfície dos eletrodos de ouro com a sonda de DNA. Posteriormente, os eletrodos foram lavados por imersão sob agitação em solução tampão fosfato de sódio (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4), sob agitação, por 7 segundos, para retirada de oligonucleotídeos não imobilizados na superfície do eletrodo.

Para a detecção do alvo, foram gotejados 5,0 µL de plasma enriquecido com miRNA-184 (10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup>) sobre o bioeletrodo (Au/DEP1S), e o processo de hibridização foi efetuado em temperatura de 55 °C durante 15 minutos. Após este procedimento, foi realizada lavagem dos eletrodos por imersão sob agitação em solução tampão fosfato de sódio (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4) sob agitação por 7 segundos, visando remover moléculas-alvo que não hibridizaram na superfície do eletrodo. Em seguida, o intercalante de DNA brometo de etídio (BE) foi utilizado para averiguar se houve o evento de hibridização, sendo gotejado 4,0 µL de brometo de etídio (100,0 µmol L<sup>-1</sup>) sobre a superfície (Au/DEP1S: miRNA-184). Os eletrodos modificados com

biomoléculas (Au/DEP1S: miRNA-184) foram hermeticamente acondicionados, com o objetivo de manter a solução de intercalante com volume constante na superfície dos eletrodos de ouro, durante 10 minutos, em temperatura ambiente e no escuro, uma vez que o BE é fotossensível. Após o tempo de incubação das biomoléculas, os eletrodos foram lavados por imersão sob agitação em solução tampão fosfato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4), sob agitação, por 7 segundos e a detecção indireta eletroquímica foi conduzida utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial com os mesmos parâmetros da linha de base: janela de potencial de +0,0 V a +0,8 V e velocidade de  $30 \text{ mV s}^{-1}$ , tendo como eletrólito suporte uma solução tampão fosfato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH = 7,4). O pico de oxidação do brometo de etídio foi monitorado.

A Figura 12 apresenta um esquema que ilustra de maneira didática e representativa as etapas essenciais do preparo do biossensor.

**Figura 12.** Ilustração esquemática da imobilização e detecção do alvo em eletrodo Au/DEP1S/Alvo.



Fonte: Autor, 2019.

### 3.3.4 Tratamento do plasma

O plasma humano apresenta composição complexa, incluindo diversos miRNAs livres, os quais podem interferir na detecção do alvo complementar do presente trabalho (miRNA-184). Nesse sentido, foi necessário realizar um tratamento com radiação ultra-violeta e temperatura elevada com o intuito de degradar os miRNAs presentes na amostra, obtendo um plasma mais puro para ser utilizado como branco nos testes de interferência, estabilidade, regeneração e curva de calibração.

Para tanto, o plasma obtido foi diluído 10 vezes em água deionizada autoclavada. A seguir, 2,0 mL do plasma diluído foi adicionado a microtubos, que foram submetidos ao tratamento térmico, sob temperatura constante de 100 °C, durante 30 minutos e, em seguida, foram retirados do forno e colocados expostos em luz ultravioleta por 30 minutos, em temperatura ambiente. É importante ressaltar que os microtubos devem ser hermeticamente lacrados para que não ocorra perda de volume e, por conseguinte, alteração na concentração da solução. Finalmente, uma detecção indireta utilizando BE e voltametria de pulso diferencial foi realizada.

### 3.3.5 Teste de especificidade

Com o objetivo de comprovar que o sistema proposto é específico, um teste de especificidade foi realizado. Um plasma enriquecido com miRNA-184 ( $0,032 \text{ nmol L}^{-1}$ ) foi utilizado como controle positivo. Já para o controle negativo, foram utilizados RNA genômico do vírus Zika e oligonucleotídeo BRCA, ambos na mesma concentração que o controle positivo. Além disso, como o plasma é um fluido corporal complexo, rico em proteínas, foi testada a especificidade do bioeletrodo frente a concentração da troponina i de um indivíduo saudável ( $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ).

Após o pré-condicionamento e imobilização da sonda, foram gotejados  $5,0 \mu\text{L}$  do alvo (controles positivo ou negativo) sobre o bioeletrodo e o processo de hibridização foi efetuado em temperatura de 55 °C durante 15 minutos. Após este procedimento, foi realizada a lavagem dos eletrodos por imersão sob agitação em solução tampão fosfato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4) sob agitação por 7 segundos, visando remover moléculas-alvo que não hibridizaram na superfície do eletrodo.

Posteriormente, a detecção indireta utilizando BE e voltametria de pulso diferencial foi executada.

### **3.3.6 Detecção de pacientes idosos saudáveis e com transtorno depressivo maior**

A discriminação de pacientes idosos saudáveis dos idosos com TDM é crucial para a verificação do funcionamento e eficácia do presente biossensor. Para isso, miRNA total ( $0,4 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) extraído do plasma de pacientes saudáveis (controle negativo) e com TDM (controle positivo) foi submetido ao teste de hibridização. Após os eletrodos serem pré-condicionados, a sonda foi imobilizada, e foram gotejados  $5 \mu\text{L}$  de miRNA total ( $0,4 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) na superfície do eletrodo, a hibridização foi conduzida na temperatura de  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  por 15 minutos.

Em seguida, foi realizada a lavagem dos eletrodos por imersão em solução tampão fosfato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7,4$ ) sob agitação por 7 segundos, visando remover alvos que não se ligaram. Finalmente, a detecção indireta utilizando voltametria de pulso diferencial foi realizada.

### **3.3.7 Construção da curva de calibração**

Visando a obtenção dos parâmetros quantitativos do biossensor, a curva de calibração deve ser construída. Com o objetivo de verificar se o bioeletrodo é sensível à variação da concentração, o plasma tratado e diluído em 10 vezes, foi enriquecido com diferentes concentrações de miRNA ( $10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $10^{-10,5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $10^{-13,5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $10^{-15} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $10^{-17} \text{ mol L}^{-1}$ ). Posteriormente,  $5,0 \mu\text{L}$  de cada solução foram adicionados na superfície do bioeletrodo e a detecção indireta foi conduzida. Posteriormente, os dados foram utilizados para construção de uma curva analítica e sua regressão linear, sendo determinada a equação da reta, utilizando o *software Origin 7*.

### **3.3.8 Regeneração do bioeletrodo**

Para avaliar a capacidade de regeneração do bioeletrodo, foi criado um protocolo como descrito a seguir. Após a imobilização da sonda de DNA DEP1S e a detecção indireta do alvo presente no plasma tratado, que foi inicialmente diluído em 10 vezes e posteriormente enriquecido até a concentração de  $10^{-13,5}$  mol L<sup>-1</sup> de miRNA-184, os eletrodos estavam prontos para o início do procedimento de regeneração. Esse procedimento visa garantir a remoção de alvos, moléculas ou resíduos acumulados durante o processo da detecção anterior. O protocolo consiste em, logo após a detecção indireta, submeter os eletrodos a um procedimento de lavagem por imersão em solução tampão fosfato de sódio (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH = 7,4) sob agitação por 30 segundos. Em seguida, os eletrodos são imersos em água deionizada e submetidos a um tratamento térmico a 90 °C por 5 minutos, visando o rompimento da dupla fita de DNA construída entre sonda e alvo. Contudo, a sonda deve ser preservada sobre a superfície do bioeletrodo, ou seja, a sonda permanecerá ligada à superfície dos eletrodos enquanto o alvo lixiviará na água deionizada. Após esse procedimento, os eletrodos de ouro estão prontos para as próximas detecções. Ao final de cada detecção, o protocolo de regeneração é iniciado da mesma forma e repetido até que a resposta do bioeletrodo seja alterada.

### **3.3.9 Estabilidade do bioeletrodo**

Com o objetivo de avaliar o comportamento do biossensor frente ao armazenamento, sua resposta eletroquímica após interação com amostras positivas foi avaliada periodicamente por meio da detecção indireta, monitorando a oxidação do intercalante de DNA brometo de etídio por voltametria de pulso diferencial. Seguindo a primeira leitura (dia zero), foram feitas novas leituras após 10, 20, 30, 40 e 50 dias. O armazenamento foi realizado a 8 °C, em recipientes hermeticamente fechados. As amostras consistiam em plasma tratado e diluído 10 vezes que foi enriquecido na concentração de  $10^{-13,5}$  mol L<sup>-1</sup> de miRNA-184.



### **3.3.10 Análises de espectroscopia de impedância eletroquímica para o biossensor**

Para as análises de espectroscopia de impedância eletroquímica, os experimentos foram realizados para a diferenciação da sonda (DEP1S) na concentração de  $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , do alvo ( $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), assim como para detectar o miRNA-184 em amostras de pacientes saudáveis e depressivos diluídas em plasma humano. As medidas foram realizadas em solução aquosa de cloreto de hexaminrutênio (II) ( $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , contendo  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl), em potencial aplicado de  $-0,15 \text{ V}$ , faixa de frequência de  $100 \text{ kHz}$  a  $0,1 \text{ Hz}$  e amplitude de  $5 \text{ mV}$ . Para as medidas e análises dos gráficos, foi utilizado o *software Nova 2.1.3* provido pelo potenciostato AUTOLAB (PGSTAT302).

### **3.3.11 Análises por Microscopia de força atômica**

As análises morfológicas do biossensor foram realizadas por Microscopia de Força Atômica (AFM) na etapa de detecção de pacientes saudáveis e depressivos. As análises topográficas foram realizadas no microscópio Hitachi modelo AFM5100N no modo de contato intermitente com cantilever de silício de constante de mola  $1.0 \text{ N/m}$  com frequência de  $0,38 \text{ Hz}$ . Para cada eletrodo, foram analisadas três áreas diferentes.

### **3.3.12 Desenvolvimento do aplicativo *DEPSENSOR***

O aplicativo foi desenvolvido em um *software web* chamado **App Inventor** que se trata de um *software* desenvolvido pelo *Google* e, atualmente, mantida pela universidade americana *Massachusetts Institute of Technology* (MIT) que permite o desenvolvimento de aplicativos *Android* usando um navegador da *Web* e um telefone ou emulador (simulador de um telefone) conectados.

A plataforma de criação foi desenvolvida com uma programação em blocos e linguagem java, sendo possível selecionar uma variedade de componentes para o aplicativo em produção, montando blocos que especificam como os componentes

devem se comportar. Toda criação do aplicativo é feita de forma visual, juntando peças com peças, como um quebra-cabeça.

O *software App Inventor* possui a parte de *designer*, nesta parte da ferramenta é possível trabalhar com a aparência do aplicativo, também é feita através de blocos de funcionalidades simples sendo possível escolher componentes na interface do usuário como botões, imagens, caixas de texto.

As funcionalidades do aplicativo, como botões e abertura de telas também é realizada na parte de programação em blocos, permitindo produzir os devidos comandos para todos os componentes adicionados ao aplicativo. O aplicativo aparece no emulador ou no próprio *smartphone* à medida que é adicionado peças a ele, para que seja possível seu projeto à medida que você cria.

Após o projeto ser finalizado, é produzido um aplicativo executável para a instalação em outros celulares.

### **3.3.13 Estatística e tratamento de dados**

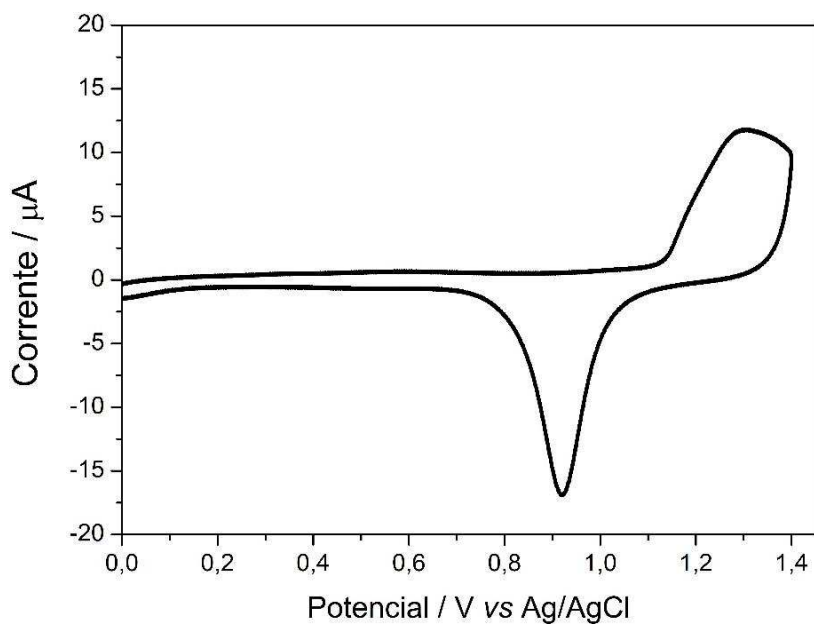
Para o presente trabalho, todos os voltamogramas e histogramas foram elaborados por meio da utilização do *software Origin 7*. Os experimentos eletroquímicos foram conduzidos em triplicata e, quando não mencionado no texto, a média aritmética com seu respectivo desvio padrão foram apresentados em histogramas. Com o objetivo de manter desvios-padrão baixos, todos os resultados com desvios-padrão superiores a 10% da média foram descartados. Os voltamogramas apresentados foram subtraídos de suas respectivas linhas de base, sendo os picos alinhados verticalmente e alturas dos mesmos foram obtidas obtidas pela ferramenta de integração do *software Origin 7*, a variação de corrente de pico ( $\Delta i_p$ ) foi obtida pela altura calculada nos gráficos de corrente por potencial elétrico, utilizando o esse mesmo *software*.

## **4 Resultados e Discussão**

### **4.1 Seleção dos eletrodos de ouro**

O perfil eletroquímico dos eletrodos de ouro sem modificação obtidos após o procedimento de pré-condicionamento utilizando a técnica de voltametria cíclica em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  é apresentado na Figura 13.

**Figura 13.** Voltamograma cíclico do Au em eletrólito suporte  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com velocidade de  $30 \text{ mV s}^{-1}$ .

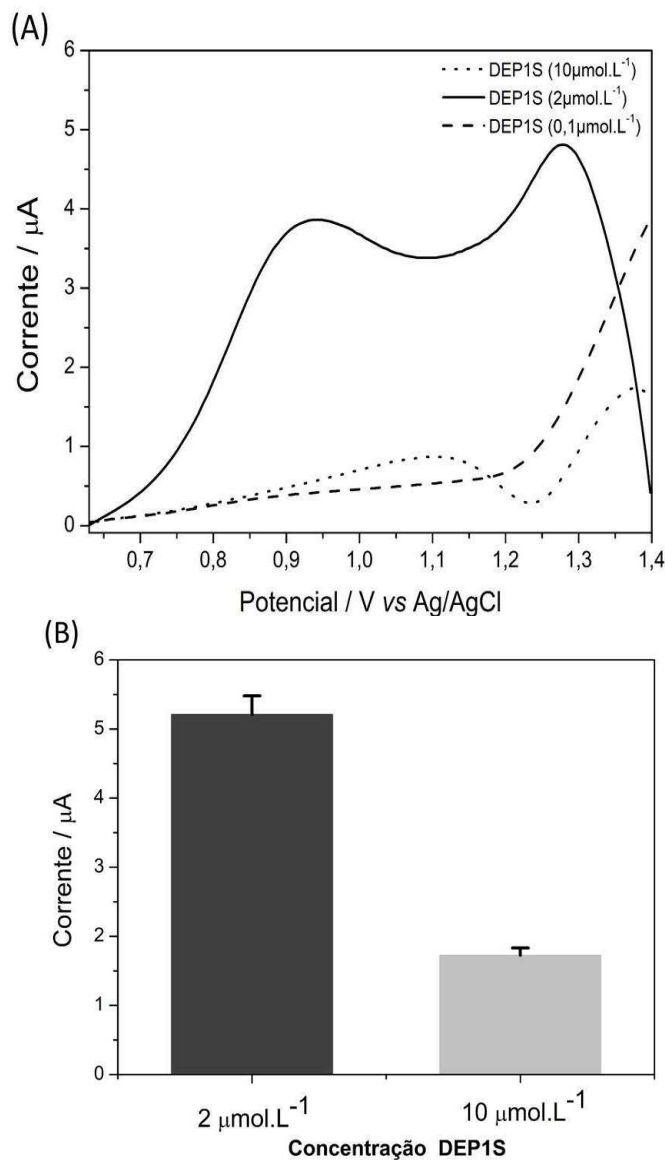


Com o objetivo de realizar os experimentos e obter uma reprodutibilidade satisfatória, somente os eletrodos que apresentaram perfil semelhante ao ilustrado na Figura 13 foram utilizados.

#### 4.2 Otimização da concentração da sonda DEP1S

A Figura 14 apresenta os voltamogramas representativos e histograma referentes a otimização da concentração da sonda DEP1S utilizada neste trabalho.

**Figura 14.** Resposta eletroquímica da otimização da concentração da sonda de DNA (DEP1S). A) Voltamogramas de pulso diferencial, velocidade:  $30 \text{ mV s}^{-1}$  e eletrólito suporte solução tampão fosfato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7,4$ ). B) Histograma com média e desvio-padrão referente aos valores das correntes de pico ao se monitorar a oxidação da adenina das concentrações  $0,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  (---),  $2,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  (—) e  $10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  (- -).



A Figura 14A mostra a otimização da concentração de DEP1S em três valores diferentes:  $0,1$ ,  $2,0$  e  $10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . A avaliação do processo oxidativo mostrou que os picos de oxidação da guanosina e adenosina ocorrem, geralmente, em torno de  $+0,9 \text{ V}$  e  $+1,2 \text{ V}$  (vs.  $\text{Ag/AgCl/Cl}^-$  ( $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ), respectivamente. Observou-se que na concentração  $2,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  foi obtido um incremento na amplitude de resposta de corrente de pico quando comparado a concentração  $10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  DEP1S, sugerindo que o aumento na concentração da sonda DEP1S promove uma passivação da

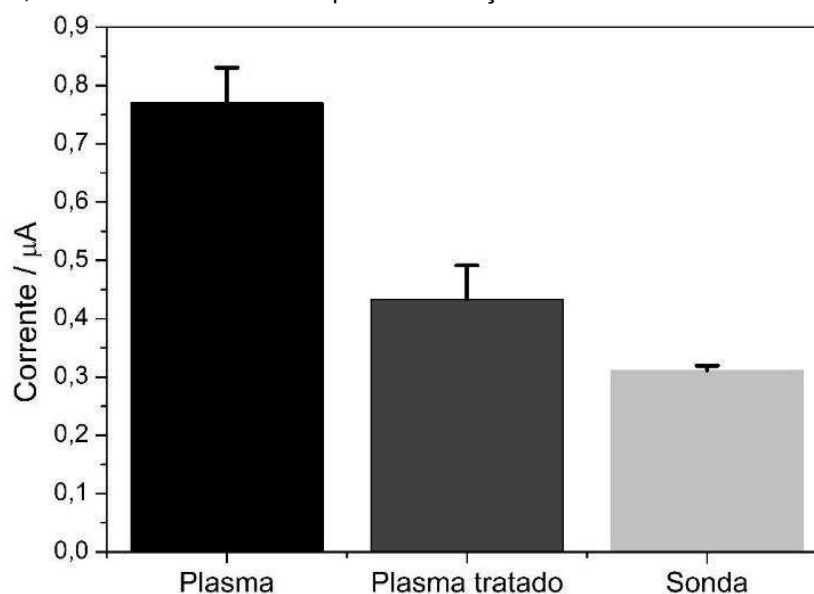
superfície do eletrodo de ouro. Foi observado que para o eletrodo de ouro modificado com  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  DEP1S, o pico de oxidação das bases guanosina e adenosina foram deslocados para potenciais mais anódicos,  $+1,1 \text{ V}$  e  $+1,35 \text{ V}$  respectivamente, indicando aumento de resistência a transferência de carga sobre a superfície (Au/DEP1S). Na concentração de  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  da sonda de DNA não foi possível identificar os picos de oxidação da guanosina e adenosina.

A Figura 14B mostra um histograma referente aos valores das correntes de pico para a oxidação da adenosina nas concentrações  $2,0$  e  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Para  $2,0$  e  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  foram obtidos os valores médios de corrente de pico de  $5,21$  e  $1,7 \mu\text{A}$ , respectivamente, mostrando que o primeiro valor de corrente de pico é  $3,1$  vezes superior ao segundo. Isso indica que a imobilização de DEP1S foi mais eficaz na concentração de  $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , sendo esta a concentração de sonda escolhida para o preparo do biossensor baseado em detecção de miRNA para diagnóstico de transtorno depressivo maior em idosos.

### **4.3 Tratamento do plasma**

A Figura 15 apresenta, em forma de histograma com média e desvio padrão, os valores das correntes de pico referentes ao plasma sem tratamento (plasma), plasma tratado e sonda.

**Figura 15.** Resposta eletroquímica em forma de histograma com média e desvio-padrão referente ao teste do tratamento do plasma térmico e exposição em luz UV. Experimento foi realizado em eletrólito suporte solução tampão fosfato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7,4$ ), utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial, velocidade:  $30 \text{ mV s}^{-1}$ . O pico de oxidação do brometo de etídio foi monitorado.



Para análises com as amostras biológicas, foi utilizado plasma humano diluído 10 vezes em água deionizada e autoclavada. Nota-se que o RNA pode ser facilmente danificado por hidrólise catalisada por altas temperaturas, irradiação ultravioleta (UV), ácido ou base e por degradação enzimática (IBBERSON et al., 2009). Embora o RNA seja mais resistente à irradiação ultravioleta do que o DNA, a UV pode causar vários tipos de danos, incluindo modificação fotoquímica, reticulação e oxidação nessa molécula (KUBISTA et al., 2012). Portanto, foi necessário submeter o plasma a um tratamento térmico e exposição em luz UV para degradação de possíveis microRNAs presentes naturalmente na amostra para que este possa ser utilizado para a construção do biossensor.

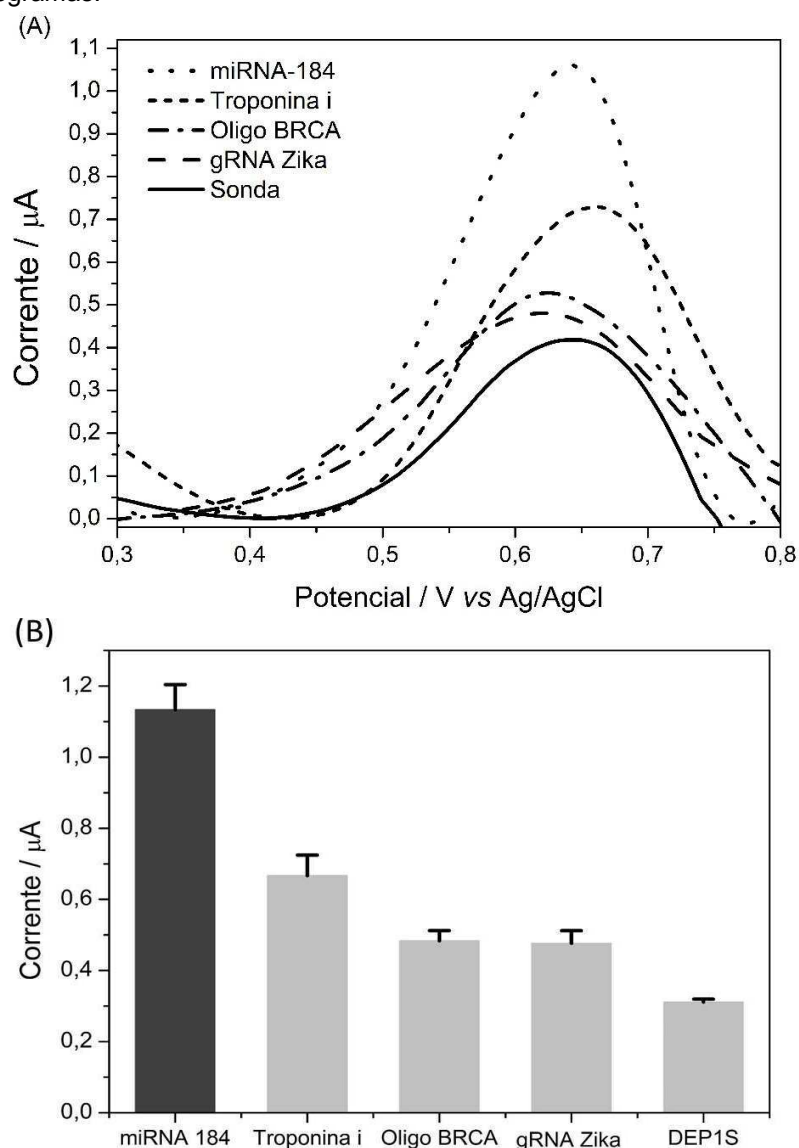
Após o experimento eletroquímico utilizando plasma sem e com tratamento, a Figura 15 mostra que foi possível verificar o valor de corrente de pico obtido para cada item submetido ao teste, monitorando o valor de corrente do pico de oxidação do brometo de etídio, o qual intercala preferencialmente quando a sonda (DEP1S) se liga ao alvo (miRNA-184), formando um *duplex*. Foi observado que, após o tratamento do plasma, o valor de corrente para a oxidação do brometo de etídio torna-se mais próximo do valor obtido para a sonda. Desta maneira, foi possível concluir que o tratamento térmico combinado com a UV foi adequado, uma vez que abaixou o valor

da corrente cerca de 1,8 vezes do plasma, permitindo assim, a utilização do plasma tratado para o enriquecimento tanto de amostras reais como do miRNA purificado.

#### 4.4 Teste de especificidade

A Figura 16 apresenta os voltamogramas representativos e histograma referentes à detecção de alvos negativos (troponina I, oligonucleotídeo BRCA, gRNA do vírus Zika) e alvo positivo (miRNA-184) com o objetivo de mostrar a especificidade do bioeletrodo.

**Figura 16.** Resposta eletroquímica do teste de especificidade realizado em eletrólito suporte solução tampão fosfato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7,4$ ), monitorando o pico de oxidação do brometo de etídio antes e após a incubação com as diferentes amostras (positiva e negativas). A) Voltamogramas de pulso diferencial, velocidade:  $30 \text{ mV s}^{-1}$ . B) Histograma com média e desvio-padrão obtidos pela análise dos voltamogramas.



Neste experimento foi utilizado o plasma tratado e enriquecido com os controles positivo (miRNA-184) e negativos (troponina I, BRCA e gRNAZika). A amostra específica miRNA-184 ( $0,032 \text{ nmol L}^{-1}$ ) apresentou valor de corrente igual a  $2,0 \mu\text{A}$ . Com exceção da troponina I que foi mantida na concentração de  $1 \text{ ng L}^{-1}$ , a qual é a concentração presente no plasma de pessoas saudáveis e sem problemas cardíacos, todos os alvos negativos testados foram diluídos para a mesma concentração do miRNA-184 ( $0,032 \text{ nmol L}^{-1}$ ), possibilitando a comparação dos valores de corrente entre os mesmos. Na Figura 16A, é possível observar que todos os controles negativos apresentaram corrente inferior ao do miRNA-184 e próximos ao valor da sonda ( $0,31 \mu\text{A}$ ), diferenciando a resposta de corrente de pico e indicando que o biossensor é seletivo.

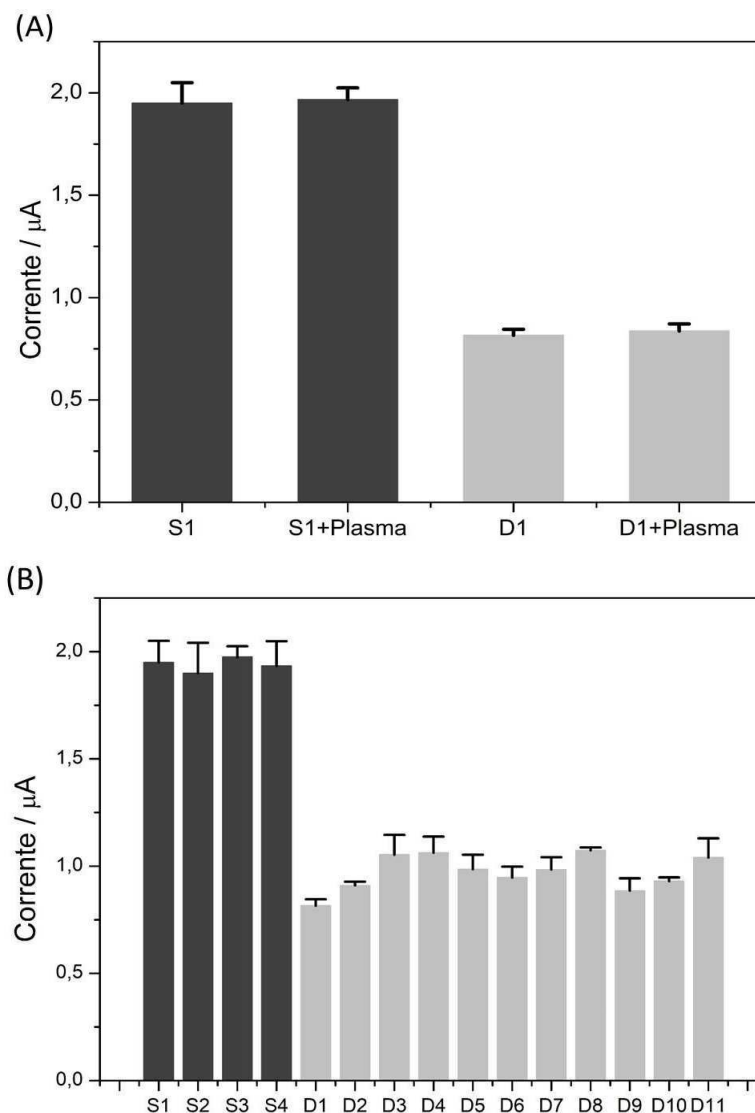
A Figura 16B mostra em forma de histograma, os valores das médias de corrente de pico e seus respectivos desvios-padrão referentes aos controles negativos testados. O valor de corrente para o oligonucleotídeo BRCA foi igual a  $0,52 \mu\text{A}$  que é 3,8 vezes menor que o alvo positivo. Da mesma maneira, o gRNA do vírus zika apresentou valor de corrente de  $0,477 \mu\text{A}$ , sendo 4,19 vezes menor que a do miRNA 184. Por outro lado, o valor de corrente obtido para troponina I foi de  $0,67 \mu\text{A}$ , sendo a mais aproximada do alvo positivo que, mesmo assim, apresentou corrente 2,98 vezes mais alta. O motivo desta proteína apresentar um valor de corrente um pouco mais elevado pode ser explicado pelo fato de que a mesma possui apenas 210 aminoácidos, e no resíduo de cisteína exposta na posição 80 há um átomo de enxofre (UNIPROT, 2019), o qual pode interagir com a superfície do eletrodo de ouro, pela quimissorção entre o grupamento tiol exposto no resíduo de aminoácido cisteína e a superfície dos eletrodos de ouro. Além disso o brometo de etídio pode interagir com compostos aromáticos presentes na estrutura da troponina I, com isso, aumentando o sinal da corrente.



#### 4.5 Teste de interferência do plasma enriquecido com amostra de pacientes purificadas

A Figura 17 mostra o histograma dos valores da média de corrente de pico e seus respectivos desvios-padrão do teste de interferência do plasma com as amostras de pacientes.

**Figura 17.** Resposta eletroquímica em forma de histogramas do teste de interferência e detecção indireta de amostras de pacientes saudáveis (S) e depressivos (D) com e sem plasma. A) Histograma com média e desvio-padrão referente ao teste de interferência utilizando amostras de pacientes (saudáveis e depressivos) purificadas com e sem plasma. B) Histograma com média e desvio-padrão da detecção indireta de amostras de pacientes (saudáveis e depressivos) diluídas em água. Experimentos realizados em eletrólito suporte solução tampão fosfato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7,4$ ), voltametria de pulso diferencial, velocidade:  $30 \text{ mV s}^{-1}$ . O pico de oxidação do brometo de etídio foi monitorado.



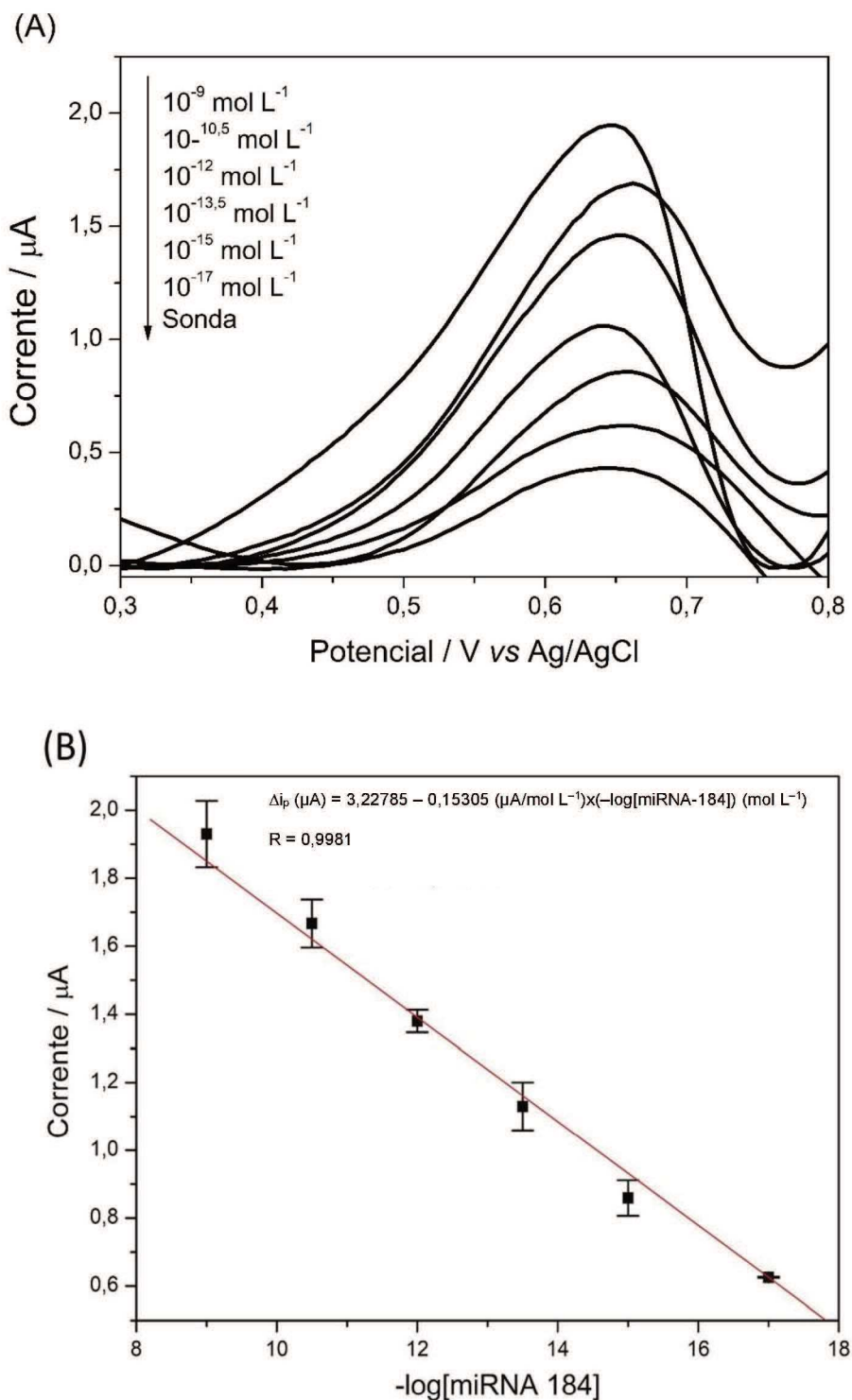
Com o intuito de comprovar que os componentes do plasma não resultam em elevada interferência no valor da corrente, foram utilizadas amostras purificadas dos mesmos pacientes (saudável e depressivo) para o teste com e sem enriquecimento do plasma. Na Figura 17A, observa-se que o valor de corrente para a amostra do paciente depressivo sem enriquecimento foi de 0,82  $\mu\text{A}$  e o com o enriquecimento foi de 0,84  $\mu\text{A}$ , sendo  $\Delta i = 0,02 \mu\text{A}$ . O mesmo procedimento foi realizado para amostra do paciente saudável que sem enriquecimento foi obtido 1,95  $\mu\text{A}$  de corrente e com o enriquecimento foi de 1,90  $\mu\text{A}$ , sendo  $\Delta i = 0,05 \mu\text{A}$ . Logo, é possível observar que as amostras de ambos pacientes testados com o plasma acrescido estão dentro do valor do desvio padrão das amostras sem enriquecimento, não havendo diferenças significativas no valor da corrente de pico de oxidação do brometo de etídio. Dessa forma, concluiu-se que é possível a utilização do plasma tratado.

Na Figura 17B é apresentado o histograma com os valores de corrente em média e desvio padrão para pacientes (saudáveis e depressivos) testados pelo presente biossensor. Foi observado que houve grande diferença entre os valores de corrente dos pacientes saudáveis e depressivos. Foram analisados quatro (04) pacientes saudáveis e onze (11) pacientes depressivos e todos os experimentos foram realizados em triplicata. Para os plasmas de pacientes saudáveis foram observados valores de corrente cerca 2 vezes superiores quando comparado aos dos pacientes com depressão. Logo, a presente trabalho foi capaz de diferenciar, utilizando amostras reais, idosos saudáveis e depressivos.

#### **4.6 Curva de calibração**

A Figura 18A mostra os voltamogramas de pulso diferencial referentes à detecção indireta do miRNA-184 adicionado no plasma em diferentes concentrações e a resposta linear incluindo parâmetros da análise de regressão da curva analítica.

**Figura 18.** Respostas eletroquímicas referentes à detecção indireta do miRNA-184 adicionado no plasma em diferentes concentrações e a resposta linear incluindo parâmetros da análise de regressão da curva analítica. A) Voltamogramas de pulso realizados em eletrólito suporte solução tampão fosfato de sódio (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH = 7,4), voltametria de pulso diferencial com velocidade: 30 mV s<sup>-1</sup>, monitorando o pico de oxidação do brometo de etídio. B) Relação entre a concentração de -log[miRNA-184] em plasma calculada a partir dos voltamogramas e corrente (pico de oxidação do BE monitorado), com equação de reta  $\Delta i (\mu A) = 3,22785 - 0,15305 (\mu A/mol L^{-1}) \times (-\log[miRNA-184]) (mol L^{-1})$  e R = 0,9981.

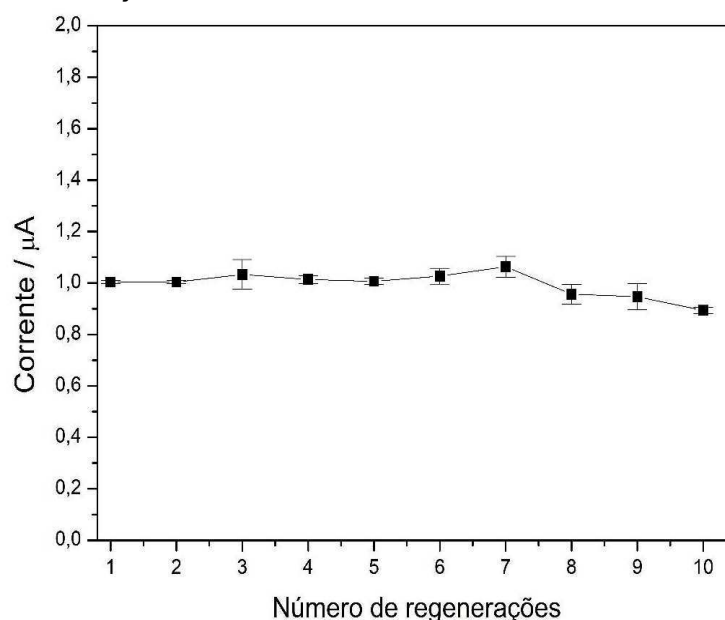


Na Figura 18B, é mostrado um gráfico da curva de calibração do bioeletrodo, observando que, com a diminuição da concentração de miRNA-184 no plasma, o valor de corrente diminui, indicando que o bioeletrodo é capaz de responder a diferentes concentrações do alvo positivo com um coeficiente  $R = 0,9981$  e equação da reta  $\Delta i$  ( $\mu\text{A}$ ) =  $322785 - 0,15305$  ( $\mu\text{A}/\text{mol L}^{-1}$ )  $\times (-\log[\text{miRNA-184}]$ ) ( $\text{mol L}^{-1}$ ), sendo o limite de detecção experimental, ou seja, a concentração mínima detectada igual a  $10 \text{ amol L}^{-1}$ . Portanto, o presente trabalho mostra-se eficiente para quantificar a concentração do miRNA-184 em plasma.

#### 4.7 Regeneração do bioeletrodo

A Figura 19 mostra em forma de histograma a capacidade de regeneração do bioeletrodo do presente trabalho.

**Figura 19.** Resposta eletroquímica em forma de gráfico (médias e desvios-padrão do  $\Delta i$ ) de detecções indiretas mostrando a capacidade de regeneração do bioeletrodo. Concentração utilizada do miRNA-184 foi de  $10^{-13,5} \text{ mol L}^{-1}$ . Experimentos foram conduzidos em eletrólito suporte solução tampão fosfato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7,4$ ), voltametria de pulso diferencial com velocidade:  $30 \text{ mV s}^{-1}$ , monitorando o pico de oxidação do brometo de etídio.



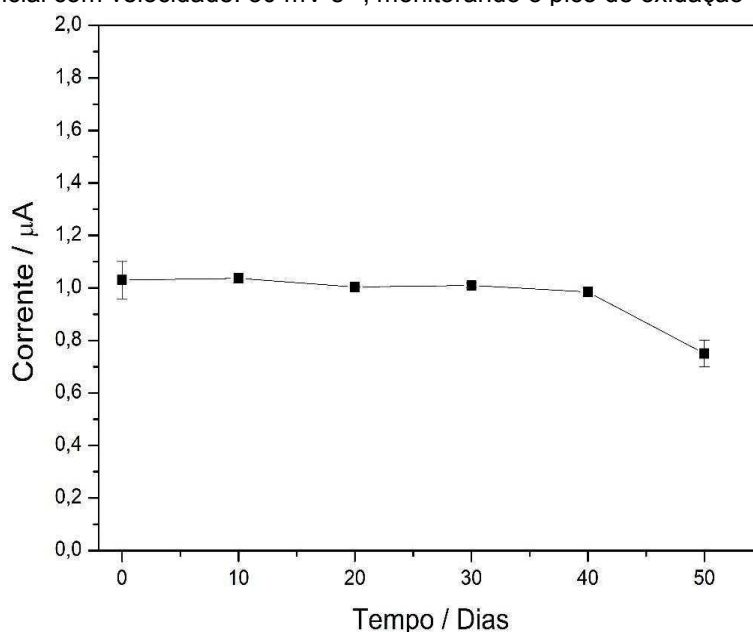
A partir da Figura 19, é possível observar que a resposta foi mantida até a 7ª. detecção (valor de corrente igual a  $1,0 \mu\text{A}$ ) e manteve cerca de 90% no valor de resposta de corrente a partir da 8ª. detecção, mostrando capacidade de reuso com eficiência de 100% até 7 vezes. Uma das justificativas para essa excelente resposta

do biossensor, é pelo fato da sonda de DNA DEP1S ser modificada na extremidade 5' com um grupamento tiol, propiciando uma interação covalente (tiol-ouro) estável (40-50 kcal/mol) (DI FELICE; SELONI, 2004; TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951).

#### 4.8 Estabilidade do bioeletrodo

A Figura 20 mostra em forma de gráfico (médias se desvios-padrão do  $\Delta i$ ) a estabilidade do bioeletrodo.

**Figura 20.** Resposta eletroquímica em forma de gráfico (médias e desvios-padrão do  $\Delta i$ ) de detecções indiretas mostrando o valor da corrente em função do número de dias de armazenamento do biossensor a 8 °C e a seco. Concentração utilizada do miRNA-184 foi de  $10^{-13.5}$  mol L<sup>-1</sup>. Experimentos foram conduzidos em eletrólito suporte solução tampão fosfato de sódio (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH = 7,4), voltametria de pulso diferencial com velocidade: 30 mV s<sup>-1</sup>, monitorando o pico de oxidação do brometo de etídio.



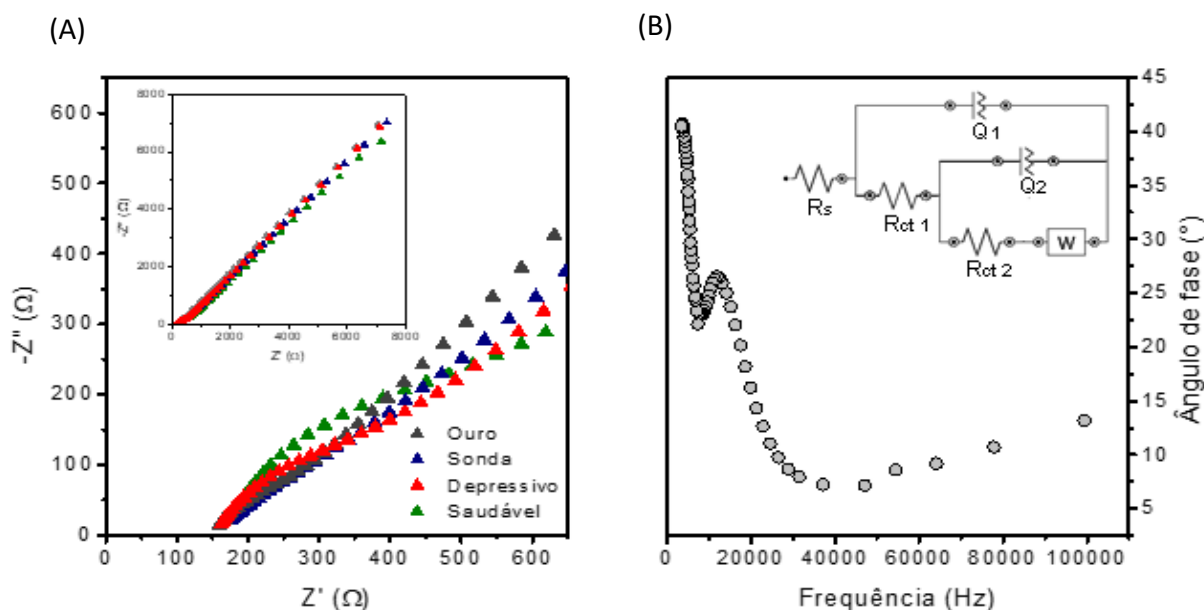
A estabilidade do bioeletrodo (Figura 20) foi avaliada por meio da detecção indireta, com intervalo de 10 dias entre cada análise e estocados durante 50 dias. É possível observar que o bioeletrodo manteve sua resposta de corrente de pico de oxidação até 40 dias. Em 50 dias de detecção o biossensor manteve cerca de 72% de resposta de corrente de oxidação. Portanto, o presente biossensor mostra-se

atrativo para uma possível comercialização, já que obteve excelente estabilidade em até 40 dias.

#### 4.9 Validação do biossensor por espectroscopia de impedância eletroquímica

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica foi utilizada para melhor compreensão dos fenômenos eletroquímicos de interface das superfícies (Au, Au/DEP1S, Au/DEP1S:saudável, Au/DEP1S:depressivo, cujos resultados estão apresentados na Figura 21.

**Figura 21.** Diagramas de Nyquist (a) e gráfico de Bode (b) obtidos por espectroscopia de impedância eletroquímica em solução KCl ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) contendo cloreto de hexaminrutênio (II) ( $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ), para o eletrodo de ouro descoberto e sensibilizado com DEP1S, antes e após a adição de amostras de plasma depressivo e saudável. Parâmetros: faixa de frequência de 100 kHz a 10 mHz, amplitude de 10 mV e potencial de meia-onda.



Os dados obtidos pelos diagramas de Nyquist (Figura 21A) e de Bode (Figura 21B) permitem a equiparação com um circuito equivalente, ao qual simula os fenômenos de interface eletrodo-solução. O modelo de circuito obtido apresentou os seguintes componentes:  $R_s$ , relativo a resistência causada pela solução eletrolítica; uma vez que o gráfico de Bode apresenta dois patamares, foram adicionadas duas resistências a transferência de carga,  $R_{CT}$ , que estão relacionadas ao processo do composto redox com a superfície do eletrodo; consequentemente, foram adicionados

dois elementos de fase constante,  $Q$ , que estão relacionados ao carregamento da dupla camada elétrica nas interfaces, em substituição ao componente de capacitância ( $C_{DL}$ ), devido a camada irregular da superfície dos eletrodos; por fim, a impedância de Warburg foi adicionada, devido ao perfil inclinado próximo a  $45^\circ$  após o segundo semicírculo no diagrama de Nyquist, que implica dizer que o sistema está sendo limitado pelo processo difusional. O circuito proposto apresentou um valor de  $X^2$  (qui-quadrado) adequado, da ordem de  $10^{-2}$ , significando que o circuito representa os fenômenos eletroquímicos observados.

Ao observar os perfis dos semicírculos no diagrama de Nyquist (Figura 21A), é observado que o eletrodo de ouro puro, apresenta perfil característico a um capacitor, havendo um desvio na angulação da reta, devido a rugosidade do eletrodo. Quando a sonda de DNA foi imobilizada na superfície do eletrodo de ouro (Au/DEP1S), assim como antes ou após interação com plasma de pacientes depressivos ou saudáveis, os fenômenos de carregamento da dupla camada elétrica e a resposta eletroquímica frente a aplicação da onda senoidal de baixa frequência foi perturbada e observou-se o aparecimento de um semicírculo, resultante da resistência à transferência de carga da espécie eletroativa, promovido pela deposição das camadas de biomoléculas.

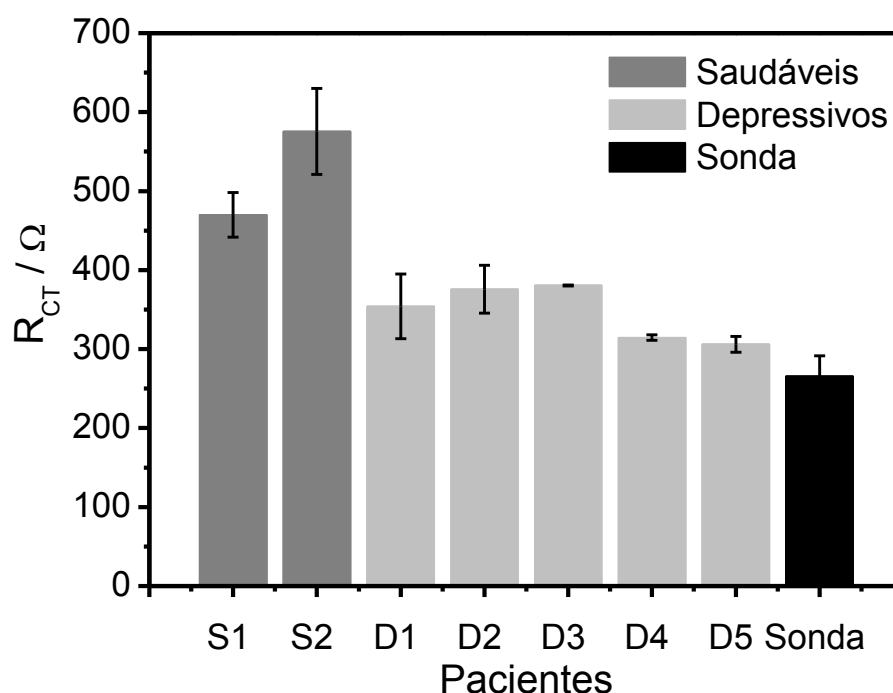
A hibridização de DEP1S e o miRNA-184 foi evidenciada pelo aumento observado na resistência à transferência de carga promovida pela presença da amostra de plasma oriunda de pacientes depressivos (Au/DEP1S/Depressivo). Os resultados de impedância obtidos indicam que na presença da biomolécula alvo, pode ser formado um material mais compacto sobre a superfície do sensor, resultando em um aumento na resistência, comparando-se com somente a imobilização da sonda DEP1S, o que é compatível com a hibridização das fitas.

Na presença de plasma de pacientes saudáveis (Au/DEP1S/Saudável), o semicírculo observado apresenta uma resistência à transferência de carga superior quando comparado ao eletrodo contendo sonda (Au/DEP1S) e ao eletrodo após interação sonda-plasma depressivo. Este fato está condizente com os resultados de voltametria de pulso e, pode ser atribuído ao fato de que o plasma de pacientes saudáveis contém uma quantidade bastante elevada de miRNA-184, quando comparado ao plasma de pacientes depressivos. Esta quantidade elevada de miRNA-

184 provoca um impedimento na superfície do eletrodo, o que aumenta a resistência a transferência de carga, dado pelo aumento da circunferência do semicírculo.

Os valores de resistência à transferência de carga ( $R_{CT}$ ) obtidos com o circuito equivalente estão apresentados na forma de gráfico de barras, Figura 22, e foram utilizados para analisar os diferentes grupos experimentais.

**Figura 22.** Gráfico de barras representando os valores obtidos de resistência à transferência de carga ( $R_{CT}$ ) obtidos por meio da espectroscopia de impedância eletroquímica para os diferentes grupos experimentais.



Os valores médios obtidos de resistência à transferência de carga foram de  $(26 \pm 3) \times 10^1 \Omega$ ,  $(35 \pm 7) \times 10^1 \Omega$ ,  $(52 \pm 3) \times 10^1 \Omega$  para Au/DEP1S, Au/DEP1S/Depressivos, Au/DEP1S/Saudáveis, respectivamente, reforçando o fato já discutido acima de maior quantidade de biomolécula alvo. A superfície Au/DEP1S/Depressivos apresentou aumento de resistência a transferência de carga de cerca de 1,3 vezes, em comparação com Au/DEP1S. Além disso, é possível observar um aumento de  $R_{CT}$  de 1,5 vezes para do valor referente ao  $R_{CT}$  de Au/DEP1S/Saudáveis quando comparado a Au/DEP1S/depressivos. Este decréscimo nos valores de  $R_{CT}$  após a interação com o alvo específico (microRNA-184) sugere alteração conformacional na estrutura do microRNA-184 após a interação com a plataforma (Au/DEP1S), melhorando a transferência eletrônica para o hexaminrutênio (II). Em outra vertente, a interação Au/DEP1S/microRNA-184 promove aumento de cargas negativas, provenientes do

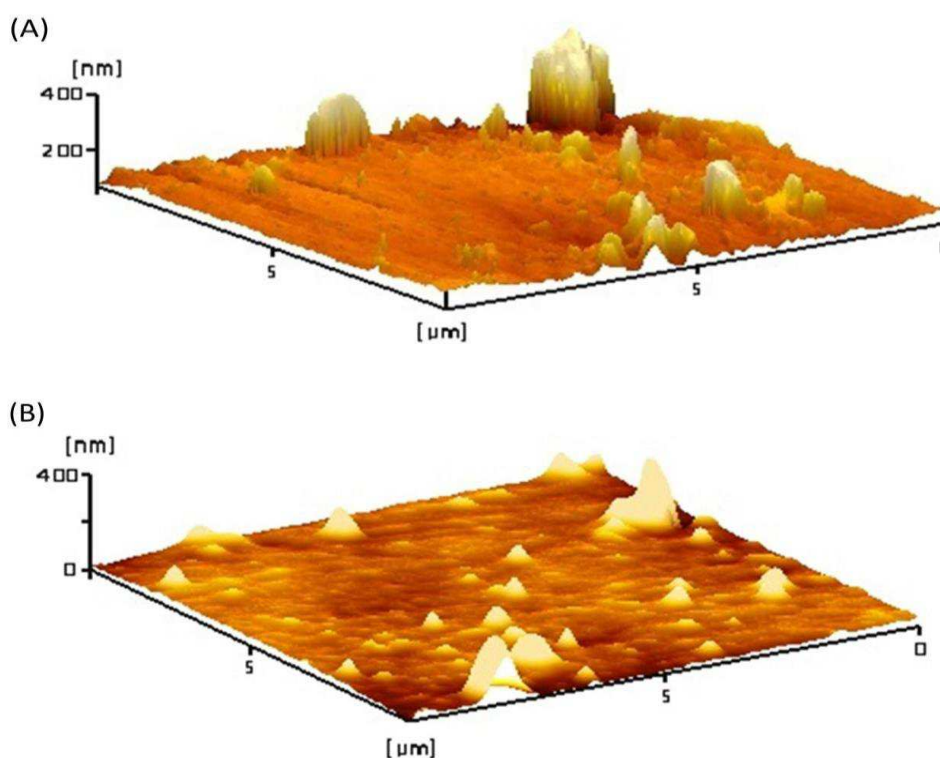


grupamento fosfato, em pH 7,4 , do alvo específico (microRNA-184) sobre a superfície, facilitando a interação com hexaminrutênio (II) que possui carga positiva, promovendo o decréscimo nos valores de resistência a transferência de carga. Também fica evidente que o biossensor proposto consegue diferenciar concentrações de alvo, uma vez que as amostras analisadas pertenciam a diferentes pacientes com ou sem depressão maior.

#### 4.10 Microscopia de Força Atômica

A Figura 23 apresenta as imagens de microscopia de força atômica para detecção dos eletrodos contendo interação com amostras de pacientes, destacando o aspecto topográfico das superfícies após adição de plasma enriquecido com amostras de paciente saudável e paciente depressivo.

**Figura 23.** Microscopias de força atômica da superfície do biossensor após interação com o plasma de pacientes. A) Saudável B) Depressivo. As leituras foram realizadas no modo contato intermitente.

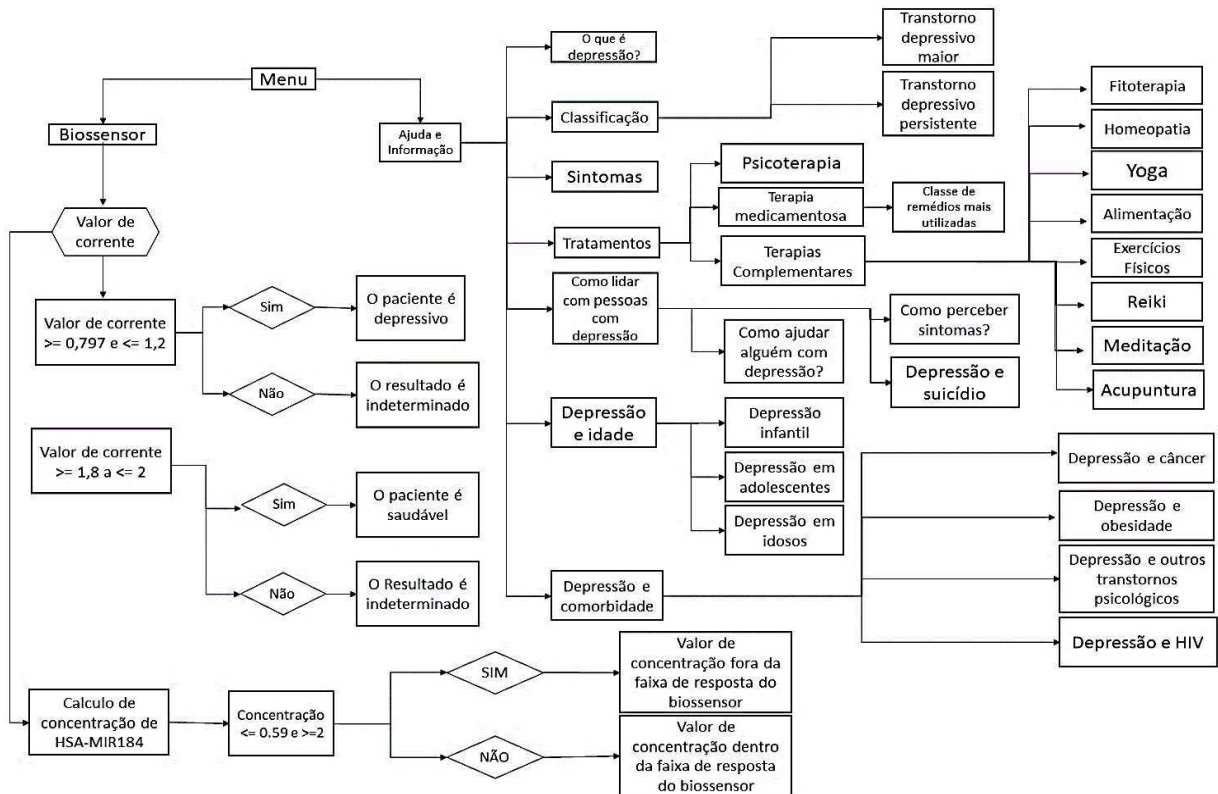


Pode ser observado que, no ponto de vista topográfico, ocorrem alterações na rugosidade ao se analisar o coeficiente de rugosidade média quadrática ( $R_q$ ) das amostras. A análise referente a amostra do paciente saudável Au/DEP1S/Saudável (Figura 23A) apresentou  $R_q = (50,5 \pm 0,7)$  nm. Já o  $R_q$  obtido para o paciente com transtorno depressivo maior Au/DEP1S/Depressivo (Figura 23B) foi  $(7,49 \pm 0,6)$  nm. Portanto, a rugosidade média quadrática após adição do plasma enriquecido com amostra do idoso saudável foi 6,75 vezes maior comparando-se com o valor de  $R_q$  obtido da amostra do idoso depressivo. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que pacientes saudáveis apresentarem maior concentração de miRNA-184 do que os portadores de TDM (SILVA et al., 2019), logo a interação do analito de interesse com a sonda DEP1S é maior nos saudáveis, levando uma maior formação de *duplex* de DNA, sugerindo o aumento da rugosidade observada. Esse mesmo comportamento foi observado por Ferreira e colaboradores (2018) na elaboração de um genossensor baseado em polímero para a detecção e quantificação de *Streptococcus pneumoniae* em amostras de DNA genômico; resultado semelhante foi obtido por Castro e colaboradores (2014) na preparação de um genossensor para detecção da sequência específica de DNA do vírus da hepatite B. Em contrapartida, os indivíduos com TDM possuem esse miRNA-184, mas em concentração inferior do que os saudáveis, logo, há a presença de formação da dupla fita (Au/DEP1S/miRNA-184) menor quantidade.

#### **4.11 Desenvolvimento do aplicativo *DEPSENSOR***

A Figura 24 ilustra um fluxograma simplificado que ilustra todas as opções de telas com as informações.

Figura 24. Fluxograma de telas do aplicativo *DEPSENSOR*.



Na Figura 24, é possível observar todos os botões confeccionados para a elaboração do aplicativo *DEPSENSOR*. Pode ser observado que cada botão abre a opção de telas de acordo com a informação que o usuário busca, sendo dividido em “Ajuda e Informação” e “Biossensor”. Cada um desses botões será explorado a seguir.

A Figura 25 apresenta a primeira tela criada do aplicativo *DEPSENSOR* e simulada em um visor de *smartphone*.

Figura 25. Tela inicial do aplicativo *DEPSENSOR*.

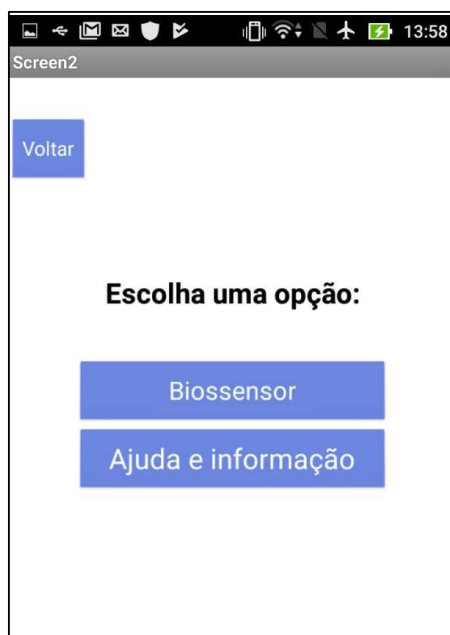


A primeira tela do aplicativo *DEPSENSOR* foi criada com o objetivo de oferecer ajuda aos usuários (Figura 25). A imagem da tela que aparece como ícone do aplicativo foi cuidadosamente desenvolvida, utilizando uma imagem contendo desenhos de mãos simbolizando um pedido de ajuda (mostrado na parte inferior dentro do círculo) e um desenho de uma mão que simboliza a oferta do apoio (parte superior dentro do círculo). Nota-se que a cor amarela que aparece na parte inferior foi inserida de maneira proposital, uma vez que essa cor está associada à luta contra o suicídio presente na campanha denominada Setembro Amarelo; visto que, tentativas de suicídio e até mesmo a conclusão desse ato está, inúmeras vezes, associado aos transtornos de humor, tais como a depressão maior (PONSONI et al., 2018).

A campanha Setembro Amarelo apresenta como missão a conscientização sobre a prevenção do suicídio, tendo como objetivo informar, conscientizar e alertar a população sobre a realidade do suicídio no Brasil e no mundo com ênfase nas maneiras de prevenção. Essa campanha acontece no mês de setembro e teve início no ano de 2015, tendo como forma de expressão a decoração na cor amarela de locais públicos e particulares (ORGANIZAÇÃO SETEMBRO AMARELO, 2016).

Além disso, é possível observar que ao se clicar no botão “Menu” (Figura 25), o aplicativo abre uma segunda tela que mostra as opções que o mesmo fornece, como ilustrado na Figura 26.

**Figura 26.** Tela “Menu” do aplicativo *DEPSENSOR*.



A tela “Menu” fornece duas opções para o usuário do aplicativo (Figura 26). A primeira se destina aqueles que adquiriram a plataforma do biossensor. A segunda opção do aplicativo, o botão “Ajuda e informação”, foi criada para fornecer diversos tipos de informações relevantes sobre a depressão. A Figura 27 ilustra o funcionamento das duas opções dessa tela.

**Figura 27.** Tela da plataforma do aplicativo *DEPSENSOR* com foco no botão “Biossensor” desenvolvido para auxiliar no diagnóstico de transtorno depressivo maior em idosos. A) Tela após o clique no botão “Biossensor”. B) Simulação da inserção de um valor de corrente obtida em um experimento que resultará no diagnóstico de uma paciente idoso saudável. C) Simulação da inserção de um valor de corrente obtida em um experimento que resultará no diagnóstico de um paciente idoso depressivo.

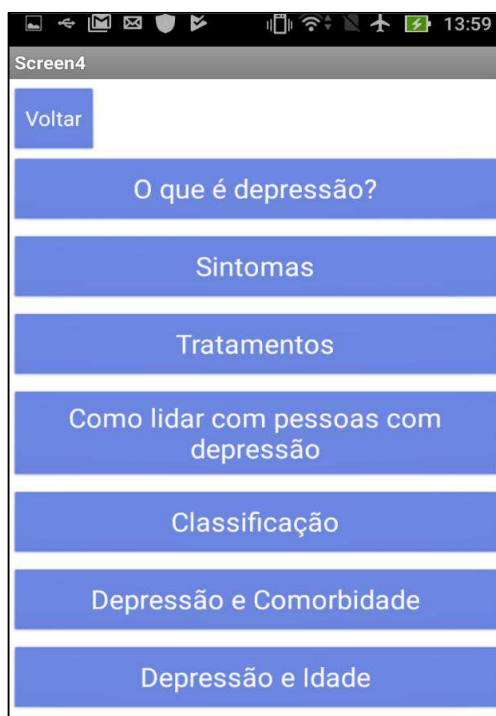


A Figura 27 mostra que ao clicar no botão “Biossensor”, o aplicativo abre a tela que, após inserir o valor de corrente obtido no experimento no campo “Digite o valor de corrente”, é efetuada o cálculo da concentração de miRNA-184, utilizando a curva de calibração do biossensor desenvolvida no presente trabalho, e informar o diagnóstico do paciente (depressivo ou saudável).

A título de demonstração, observa-se que, na Figura 26B, foi obtido o valor de corrente igual a 1,89  $\mu\text{A}$  em um suposto experimento, e ao se inserir esse número na caixa “Digite o valor de corrente” e pressionar “Calcular”, o *DEPSENSOR* informa o diagnóstico do paciente escrito em vermelho “O paciente é saudável”; e calcula a concentração do miRNA-184 presente na amostra e informa “1.8151E-9 mol L<sup>-1</sup>”. Já na Figura 27C é ilustrado a obtenção de um valor de corrente de 1,10  $\mu\text{A}$ ; esse valor é inserido no campo “Digite o valor de corrente” e o botão “Calcular” foi pressionado; neste caso, o diagnóstico do paciente idoso é dado como “O paciente é depressivo” e a quantidade de miRNA-184 também é mostrada como “1,2513E-14 mol L<sup>-1</sup>”.

A segunda opção da tela “Menu”, “Ajuda e informação”, após ser selecionada abre a seguinte tela ilustrada na Figura 28.

**Figura 28.** Tela de “Ajuda e informação” do aplicativo *DEPSENSOR*.



Com o intuito de informar a sociedade e ajudar aqueles que apresentam depressão ou que convivem com pessoas que vivem com a doença, o aplicativo *DEPSENSOR* conta com uma tela de ajuda e informação (Figura 28). Nessa tela, são encontradas diversas informações sobre a doença. O botão “O que é depressão?” define o que é e quais são as principais formas como ela se manifesta; já em “Sintomas” nota-se os principais sintomas presentes nessa enfermidade; em “Tratamentos” são apresentadas diferentes abordagens que oferecem maneiras de lidar e buscar ajuda; o botão “Como lidar com pessoas com depressão” oferece suporte para todos que buscam ajudar as pessoas com essa doença, sendo de suma importância pois inúmeras pessoas não sabem como oferecer ajuda às pessoas que sofrem com esse transtorno de humor; a opção de “Classificação” informa sobre os diferentes tipos de depressão; em “Depressão e Comorbidade”, é possível observar a relação da dessa doença com outras enfermidades; por fim, “Depressão e Idade” conta com informações sobre a manifestação do transtorno depressivo em diferentes idades.

## **6 Conclusões**

Em conformidade com o objetivo geral do trabalho, foi desenvolvido com êxito um biossensor eletroquímico e aplicativo para diagnóstico de TDM em idosos, utilizando a detecção do biomarcador miRNA-184 em amostras de plasma humano.

A sonda de oligonucleotídeos DEP1S específica ao microRNA-184 foi imobilizada com sucesso nos eletrodos de ouro. A especificidade da sonda foi comprovada utilizando RNA genômico do vírus Zika, oligonucleotídeo BRCA e proteína troponina I.

A metodologia, combinando o tratamento térmico e exposição em luz UV, foi eficaz na degradação de possíveis microRNAs presentes naturalmente nas amostras utilizadas, possibilitando o posterior enriquecimento com miRNA-184 purificado, permitindo a mimetização de sistemas biológicos reais.

Amostras de pacientes idosos saudáveis e idosos com TDM foram utilizadas para validação do biossensor por meio de voltametria de pulso diferencial. Nessa técnica, a utilização de intercalante do *duplex* de DNA, o brometo de etídeo, permitiu

a diferenciação entre os pacientes de maneira indireta, ou seja, monitorando o pico de oxidação do brometo de etídeo. Ainda, monitorando o pico de oxidação do brometo de etídeo, o bioeletrodo foi capaz de responder a diferentes concentrações de miRNA-184 no plasma, possibilitando a construção da curva de calibração com limite de detecção de  $10 \text{ amol L}^{-1}$ . Assim, o presente trabalho mostra-se eficiente para quantificar a concentração do miRNA-184 em plasma.

O presente biossensor foi capaz de diferenciar pacientes saudáveis e depressivos utilizando a espectroscopia de impedância eletroquímica. Foi observado um aumento na resistência à transferência de carga nos pacientes saudáveis, comparando-se com os depressivos, em concordância com os resultados obtidos utilizando voltametria de pulso diferencial.

A capacidade de reuso do biossensor foi possível em 7 vezes, sem perda na resposta de corrente de pico de oxidação. Esses dados demonstram que o presente biossensor pode ser utilizado várias vezes até o descarte, contribuindo para redução de custos em uma possível fabricação e inserção no mercado. Além disso, outro fator crucial para o desenvolvimento comercial dessa plataforma é a sua estabilidade, uma vez que a resposta de corrente frente ao tempo manteve-se praticamente a mesma por cerca de 50 dias.

Em face da inexistência de métodos diagnósticos moleculares para o TDM e elevado número de pessoas acometidas mundialmente, este trabalho mostrou-se pioneiro e importante na área diagnóstica, apresentando um biossensor para detecção de biomarcador do TDM com apresentou boa sensibilidade, especificidade, baixo limite de detecção e utilização de volume reduzido de amostra.

Finalmente, o aplicativo desenvolvido *DEPSENSOR* para *smartphones* mostrou-se útil no auxílio, não só da utilização do biossensor, mas também para fornecer suporte às pessoas que buscam melhor entendimento sobre essa doença que apresenta grande impacto na sociedade.

## 7 Perspectivas

- Aplicação do biossensor em um  $n$  amostral maior;
- Miniaturização do sistema proposto no presente trabalho.



## 8 Referências Bibliográficas

ACHARYA, U. R. et al. A Novel Depression Diagnosis Index Using Nonlinear Features in EEG Signals. **European Neurology**, v. 74, n. 1–2, p. 79–83, 2015.

<https://doi.org/10.1159/000438457>

AGOSTINI, S. et al. Serum miRNAs Expression and SNAP-25 Genotype in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 11, 2019.

<https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00052>

AGRAWAL, S. et al. The miRNA Mirage: How Close Are We to Finding a Non-Invasive Diagnostic Biomarker in Endometriosis? A Systematic Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, 599, 2018.

<https://doi.org/10.3390/ijms19020599>

ALHADRAMI, H. A. Biosensors: Classifications, medical applications, and future prospective. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 65, n. 3, p. 497–508, 2018.

<https://doi.org/10.1002/bab.1621>

ALTINTAS, Z. **Biosensors and Nanotechnology: Applications in Health Care Diagnostics**. 1ª ed. EUA: Wiley, 2018. 400 p.

<https://doi.org/10.1002/9781119065036>

ASHWELL, G. J. et al. Self-Assembly of Amino–Thiols via Gold–Nitrogen Links and Consequence for in situ Elongation of Molecular Wires on Surface-Modified Electrodes. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 10, p. 4200–4208, 17, 2011.

<https://doi.org/10.1021/jp200006j>

AZEVEDO, J. A. et al. The microRNA network is altered in anterior cingulate cortex of patients with unipolar and bipolar depression. **Journal of Psychiatric Research**, v. 82, p. 58–67, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.07.012>

BANACH, E. et al. Dysregulation of miR-499, miR-708 and miR-1908 during a depression episode in bipolar disorders. **Neuroscience Letters**, v. 654, p. 117–119, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.06.019>

BARTEL, D. P. Metazoan MicroRNAs. **Cell**, v. 173, n. 1, p. 20–51, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>

BELZEAUX, R. et al. Responder and nonresponder patients exhibit different peripheral transcriptional signatures during major depressive episode. **Translational Psychiatry**, v. 2, n. 11, p. e185, 2012.

<https://doi.org/10.1038/tp.2012.112>

BENZ, F. et al. Circulating MicroRNAs as biomarkers for sepsis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 1, 2016.

<https://doi.org/10.3390/ijms17010078>

BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Microbial-derived biosensors for monitoring environmental contaminants: Recent advances and future outlook. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 124, p. 8–17, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.01.032>

BILELLO, J.; PI, Y. H. **Diagnosing and monitoring depression disorders based on multiple biomarker panels**. WO n° 2009/111595 A9, 4 mar. 2008, 4 fev. 2010.

BLONDAL, T. et al. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. **Methods**, v. 59, n. 1, p. S1–S6, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.09.015>

BUSCHMANN, D. et al. Toward reliable biomarker signatures in the age of liquid biopsies - how to standardize the small RNA-Seq workflow. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 13, p. 5995–6018, 2016.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkw545>

CASTRO, Ana C. Honorato et al. Preparation of genosensor for detection of specific DNA sequence of the hepatitis B virus. **Applied Surface Science**. Elsevier, v. 314, p.273-279, 2014. Elsevier BV.

<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.06.084>

CASTRO, A. C. H. DE. **Deteção do gene do vírus da hepatite B e antígeno CA125 para o tumor do ovário: uma plataforma específica para diagnóstico point-of-care.** Universidade Federal de Uberlândia - Dissertação defendida no Programa de pós-graduação em genética e bioquímica, Cidade: Uberlândia, 111 fls, 2016.

<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/18900>

CHALFIE, M. Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*. **Cell**, v. 24, n. 1, p. 59–69, 1981.

[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90501-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90501-8)

CHEN, X. et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. **Cell Research**, v. 18, n. 10, p. 997–1006, 2008.

<https://doi.org/10.1038/cr.2008.282>

CORREIA, C. N. et al. Circulating microRNAs as Potential Biomarkers of Infectious Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1–18, 2017.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00118>

DE CASTRO, A. C. H. et al. A new genosensor for meningococcal meningitis diagnosis using biological samples. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 22, n. 8, p. 2339–2346, 2018.

<https://doi.org/10.1007/s10008-018-3940-0>

DIAMOND, C.; BREMER, T. **Diagnostic markers of depression treatment and methods of use thereof.** US nº 2005/0069936 A1, 4 set. 2004, 31 mar. 2005.

DI FELICE, R.; SELLONI, A. Adsorption modes of cysteine on Au(111): Thiolate, amino-thiolate, disulfide. **The Journal of Chemical Physics**, v. 120, n. 10, p. 4906–4914, 2004.

<https://doi.org/10.1063/1.1645789>

DSM-V. AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - DSM-5**, 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 992 p.

<https://doi.org/10.5007/1807-1384.2014v11n2p96>

DWIVEDI, Y. microRNA-124: a putative therapeutic target and biomarker for major depression. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 21, n. 7, p. 653–656, 2017.

<https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1328501>

ERDEM, A.; EKSIN, E. Zip nucleic acid based single-use biosensor for electrochemical detection of Factor V Leiden mutation. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 288, p. 634–640, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.03.008>

ERICH GROTEWOLD; CHAPPELL, J.; KELLOGG, E. A. **Plant Genes, Genomes and Genetics**. 1<sup>a</sup> ed. EUA: Wiley, v 3. 2015. 259 p.

FERREIRA, Fábio P. et al. A novel polymer-based genosensor for the detection and quantification of *Streptococcus pneumoniae* in genomic DNA sample. **Polymer Engineering & Science**. Wiley, v. 58, n. 8, p.1308-1314, 8 set. 2017.

<https://doi.org/10.1002/pen.24707>

FOESSL, I.; KOTZBECK, P.; OBERMAYER-PIETSCH, B. miRNAs as novel biomarkers for bone related diseases. **Journal of Laboratory and Precision Medicine**, v. 4, p. 2, 2019.

<https://doi.org/10.21037/jlpm.2018.12.06>

FORTUNATI, S. et al. Single-Walled Carbon Nanotubes as Enhancing Substrates for PNA-Based Amperometric Genosensors. **Sensors**, v. 19, n. 3, 588, 2019.

<https://doi.org/10.3390/s19030588>

FRIEDLÄNDER, M. R. et al. Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. **Genome Biology**, v. 15, n. 4, p. R57, 2014.

<https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-4-r57>

FUJIMOTO, T. et al. Portable Electrochemical Sensing System Attached to Smartphones and Its Incorporation with Paper-based Electrochemical Glucose Sensor. **International Journal Of Electrical And Computer Engineering (ijece)**. Institute of Advanced Engineering and Science, v. 7, n. 3, p.1423-1429, 2017.

<https://doi.org/10.11591/ijece.v7i3.pp1423-1429>

FU, Y.; GUO, J. Blood Cholesterol Monitoring With Smartphone as Miniaturized Electrochemical Analyzer for Cardiovascular Disease Prevention. **IEEE Transactions On Biomedical Circuits And Systems**. Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE), v. 12, n. 4, p.784-790, 2018.

<https://doi.org/10.1109/tbcas.2018.2845856>.

G. ROGER SPARHAWK, J. **Method of diagnosing, tracking, and treating depression**, 2000. US n° 09/506660, 17 fev. 2000, 27 nov. 2001.

GEBERT, L. F. R.; MACRAE, I. J. Regulation of microRNA function in animals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 1, p. 21–37, 2019.

<https://doi.org/10.1038/s41580-018-0045-7>

GHODSI, J.; RAFATI, A. A.; SHOJA, Y. A novel biosensor based on horseradish peroxidase trapped in silica Sol-Gel / MWCNTs matrix for methyldopa determination in medical and pharmaceutical samples. **Advances in nanochemistry**. n. October 2018, p. 6–11, 2019.

<https://doi.org/10.22126/anc.2019.3242.1003>

GHOLIVAND, M.-B.; AKBARI, A. A sensitive electrochemical genosensor for highly specific detection of thalassemia gene. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 129, p. 182–188, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.01.017>

GILAD, S. et al. Serum MicroRNAs Are Promising Novel Biomarkers. **PLoS ONE**, v. 3, n. 9, p. e3148, 2008.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003148>

GILLESPIE, P.; LADAME, S.; O'HARE, D. Molecular methods in electrochemical microRNA detection. **Analyst**, v. 144, n. 1, p. 114–129, 2019.

<https://doi.org/10.1039/c8an01572d>

GOUMI, Y. EL. Electrochemical Genosensors: Definition and Fields of Application. **International Journal of Biosensors & Bioelectronics**, v. 3, n. 5, p. 353–355, 2017.

<https://doi.org/10.15406/ijbsbe.2017.03.00080>

GUO, J. Smartphone-Powered Electrochemical Dongle for Point-of-Care Monitoring of Blood  $\beta$ -Ketone. **Analytical Chemistry**. American Chemical Society (ACS), v. 89, n. 17, p.8609-8613, 2017.

<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02531>

HE, S. et al. Alterations of microRNA-124 expression in peripheral blood mononuclear cells in pre- and post-treatment patients with major depressive disorder. **Journal of Psychiatric Research**, v. 78, p. 65–71, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.03.015>

HESS, J. et al. A Five-MicroRNA Signature Predicts Survival and Disease Control of Patients with Head and Neck Cancer Negative for HPV Infection. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 5, p. 1505–1516, 2019.

<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0776>

HOGAN, C.; ELTON, D.; LOKE, S. **Mobile Voltammetric Analysis**. US nº 2019 / 0072513 A1. 13 set. 2018, 7 mar. 2019.

HOYOS-ARBELÁEZ, J; VÁZQUEZ, M.; CONTRERAS-CALDERÓN, J. Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages: A review. **Food Chemistry**. V. 221, p. 1371-1381, 2017.

<https://doi.org/10.1037/0033-2909.126.1.78>

IBBERSON, D. et al. RNA degradation compromises the reliability of microRNA expression profiling. **BMC Biotechnology**, v. 9, p. 1–9, 2009.

<https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-102>

IBGE. **Projeção da população do Brasil e das Unidades da Federação**.

Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/index.html>>.

Acesso em: 13 mar. 2019.

INGROSSO, C. et al. Au nanoparticle in situ decorated RGO nanocomposites for highly sensitive electrochemical genosensors. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, n. 5, p. 768–777, 2019.

<https://doi.org/10.1039/C8TB02514B>

INUKAI, S. et al. A microRNA feedback loop regulates global microRNA abundance during aging. **RNA**, v. 24, n. 2, p. 159–172, 2018.

<https://doi.org/10.1261/rna.062190.117>

KARUNAKARAN, C.; RAJKUMAR, R.; BHARGAVA, K. Introduction to Biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, Elsevier, p. 1-68, 2015.

KHAN, Z.; SUTHANTHIRAN, M.; MUTHUKUMAR, T. MicroRNAs and Transplantation. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 39, n. 1, p. 125–143, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.cll.2018.10.003>

KILIC, T. et al. microRNA biosensors: Opportunities and challenges among conventional and commercially available techniques. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 99, p. 525–546, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.007>

KUBISTA, M. et al. RNA quality matters. **European Pharmaceutical Review**, v. 17, n. 6, 2012.

KUKRETI, S. et al. Emerging Trends in Advanced Nanomaterials Based Electrochemical Genosensors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 31, p. 3697–3709, 2018.

<https://doi.org/10.2174/1381612824666181109154919>

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–854, 1993.

[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)

LEE, R.; FEINBAUM, R.; AMBROS, V. A short history of a short RNA. **Cell**, v. 116, p. S89–S92, 2004.

[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00035-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00035-2)

LEVY, D. et al. Age-associated microRNA expression in human peripheral blood is associated with all-cause mortality and age-related traits. **Aging Cell**, v. 17, n. 1, p. e12687, 2017.

<https://doi.org/10.1111/accel.12687>

LI, Q.; BATCHELOR-MCAULEY, C.; COMPTON, R. G. Electrochemical Oxidation of Guanine: Electrode Reaction Mechanism and Tailoring Carbon Electrode Surfaces To Switch between Adsorptive and Diffusional Responses. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 21, p. 7423–7428, 2010.

<https://doi.org/10.1021/jp1021196>

LIAO, S.-C. et al. Major Depression Detection from EEG Signals Using Kernel Eigen-Filter-Bank Common Spatial Patterns. **Sensors**, v. 17, n. 6, 1385, 2017.

<https://doi.org/10.3390/s17061385>

LIU, Y. et al. Increased miR-132 level is associated with visual memory dysfunction in patients with depression. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 12, p. 2905–2911, 2016.

<https://doi.org/10.2147/NDT.S116287>

LOPEZ, J. P. et al. Regulatory role of miRNAs in polyamine gene expression in the prefrontal cortex of depressed suicide completers. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 01, p. 23–32, 2014a.

<https://doi.org/10.1017/S1461145713000941>

LOPEZ, J. P. et al. miR-1202 is a primate-specific and brain-enriched microRNA involved in major depression and antidepressant treatment. **Nature Medicine**, v. 20, n. 7, p. 764–768, 2014b.

<https://doi.org/10.1038/nm.3582>

LOPEZ, J. P.; KOS, A.; TURECKI, G. Major depression and its treatment. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 31, n. 1, p. 7–16, 2018.

<https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000379>

LU, T. X.; ROTHENBERG, M. E. MicroRNA. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 141, n. 4, p. 1202–1207, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08.034>

MAHEU, M. et al. MicroRNA regulation of central glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) signalling in depression. **Translational Psychiatry**, v. 5, n. 2, p. e511–e511, 2015.

<https://doi.org/10.1038/tp.2015.11>



MENDES-SILVA, A. P. et al. Shared Biologic Pathways Between Alzheimer Disease and Major Depression: A Systematic Review of MicroRNA Expression Studies. **The American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 24, n. 10, p. 903–912, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.jagp.2016.07.017>

MENDES-SILVA, A. P. **Expressão do microRNA 184 em idosos com depressão maior: uma perspectiva translacional**. Universidade Federal de Minas Gerais - Dissertação defendida no Programa de pós-graduação em medicina molecular, Cidade: Belo Horizonte, 140 fls, 2018.

<http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/BUOS-B56JZY>

MICHLEWSKI, G.; CÁCERES, J. F. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. **RNA**, v. 25, n. 1, p. 1–16, 2019.

<https://doi.org/10.1261/rna.068692.118>

MIN, J. et al. Integrated Biosensor for Rapid and Point-of-Care Sepsis Diagnosis. **Acs Nano**, American Chemical Society (ACS), v. 12, n. 4, p.3378-3384, 2018.

<https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08965>

MOÇO, A. C. R. **Métodos diagnósticos para o vírus Zika: genossensor eletroquímico baseado em nanocompósito polimérico e plataforma óptica e colorimétrica usando nanopartículas de ouro e prata**. Universidade Federal de Uberlândia - Dissertação defendida no Programa de pós-graduação em genética e bioquímica, Cidade: Uberlândia, 98 fls, 2018.

<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/20919>

MORA, C. et al. Blood biomarkers and treatment response in major depression. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 18, n. 6, p. 513–529, 2018.

<https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1470927>

O'BRIEN, J. et al. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p. 1–12, 2018.

<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>

OLIVEIRA, D. A. et al. Application of nanomaterials for the electrical and optical detection of the hepatitis B virus. **Analytical Biochemistry**, v. 549, p. 157–163, 2018a.

<https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.03.023>

OLIVEIRA, J. M. B. DE et al. Aging, mental health, and suicide. An integrative review. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 21, n. 4, p. 488–498, 2018b.

<https://doi.org/10.1590/1981-22562018021.180014>

OMS. **Ageing and health**, 2018a. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>>. Acesso em: 13 mar. 2019a.

OMS. **Depression**, 2018b. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/depression#>>. Acesso em: 14 mar. 2019.

ORGANIZAÇÃO SETEMBRO AMARELO. **O suicídio**. 2016. Disponível em: <<http://www.setembroamarelo.org.br/>>. Acesso em: 02 jun. 2019.

PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

<https://doi.org/10.5935/1984-6835.20130040>

PAN, J.-X. et al. Diagnosis of major depressive disorder based on changes in multiple plasma neurotransmitters: a targeted metabolomics study. **Translational Psychiatry**, v. 8, n. 1, artigo número 130, 2018.

<https://doi.org/10.1038/s41398-018-0183-x>

PEREIRA-DA-SILVA, T. et al. Circulating microRNA profiles in different arterial territories of stable atherosclerotic disease: a systematic review. **American journal of cardiovascular disease**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

<https://doi.org/10.2160-200X/AJCD0070193>

PERKINS, D. O. et al. microRNA expression in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia and schizoaffective disorder. **Genome Biology**, v. 8, n. 2, R27, 2007.

<https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r27>

PONSONI, A. et al. Self-reported inhibition predicts history of suicide attempts in bipolar disorder and major depression. **Comprehensive Psychiatry**, v. 82, p. 89–94, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.comppsy.2018.01.011>

QUÉVILLON-HUBERDEAU, M.; SIMARD, M. J. A guide to microRNA-mediated gene silencing. **FEBS Journal**, v. 286, p. 642–652, 2018.

<https://doi.org/10.1111/febs.14666>

RAFIQUE, B. et al. Electrochemical DNA biosensors: a review. **Sensor Review**, v. 39, n. 1, p. 34–50, 2019.

<https://doi.org/10.1108/SR-08-2017-0156>

REIFENBERGER, R. **Fundamentals of Atomic Force Microscopy**, 4. ed. USA: WORLD SCIENTIFIC, 2015, 340 p.

<https://doi.org/10.1142/9343>

RODOVALHO, V. DE R. **Biossensor baseado em peptídeo mimético ligante de imunoglobulina G: uma plataforma para diagnóstico de artrite idiopática juvenil**. Universidade Federal de Uberlândia - Dissertação defendida no Programa de pós-graduação em genética e bioquímica, Cidade: Uberlândia, 82 fls, 2016.

<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/17922>

RODOVALHO, V. R. et al. Peptide-based electrochemical biosensor for juvenile idiopathic arthritis detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 100, p. 577–582, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.10.012>

ROY, B. et al. Identification of MicroRNA-124-3p as a Putative Epigenetic Signature of Major Depressive Disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 4, p. 864–875, 2017.

<https://doi.org/10.1038/npp.2016.175>

SANTOS, N. C.; CARVALHO, F. A. **Atomic Force Microscopy**. Springer: New York, 2019, 369 p.

<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8894-5>

SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH, **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8ª Edição norte-americana, São Paulo-SP: Thomson, 2006. 1026 p.

SILVA, J. R. DA C. et al. Brain-enriched MicroRNA-184 is downregulated in older adults with major depressive disorder: A translational study. **Journal of Psychiatric Research**, v. 111, p. 110–120, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2019.01.019>

SMALHEISER, N. R. et al. MicroRNA Expression Is Down-Regulated and Reorganized in Prefrontal Cortex of Depressed Suicide Subjects. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, e33201, 2012.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033201>

SMALHEISER, N. R. et al. Expression of microRNAs and Other Small RNAs in Prefrontal Cortex in Schizophrenia, Bipolar Disorder and Depressed Subjects. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, e86469, 2014.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086469>

SOHEL, M. H. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. **Achievements in the Life Sciences**, v. 10, n. 2, p. 175–186, dez. 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.als.2016.11.007>

SOJIC, N. et al. Essential Role of Electrode Materials in Electrochemiluminescence Applications. **ChemElectroChem**, v. 3, n. 12, p. 1990–1997, 2016.

<https://doi.org/10.1002/celec.201600602>

SULTHANA, R. et al. Adsorption of ethidium bromide from aqueous solution onto nutraceutical industrial fennel seed spent: Kinetics and thermodynamics modeling studies. **International Journal of Phytoremediation**, v. 20, n. 11, p. 1075–1086, 2018.

<https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1365331>

SUN, I. O.; LERMAN, L. O. Urinary microRNA in Kidney Disease: Utility and Roles. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 316, n. 5, p.785-793, 2019.

<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00368.2018>

SVANCARA, I. et al. **Electroanalysis with Carbon Paste Electrodes**, 1a edição, CRC Press, 2012, 666 p.

<https://doi.org/10.1201/b11478>

TORRES-BERRÍO, A. et al. DCC Confers Susceptibility to Depression-like Behaviors in Humans and Mice and Is Regulated by miR-218. **Biological Psychiatry**, v. 81, n. 4, p. 306–315, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.08.017>

TREIBER, T.; TREIBER, N.; MEISTER, G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 1, p. 5–20, 2019.

<https://doi.org/10.1038/s41580-018-0059-1>

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, p. 55, 1951.

<https://doi.org/10.1039/df9511100055>

UNIPROT. UniProtKB - P19429 (TNNI3\_HUMAN), 2019. Disponível em: <<https://www.uniprot.org/uniprot/P19429>> . Acesso em 10 junho 2019.

WANG, L.; DORIN, A.; COMANICIU, C. **System and method for molecular diagnosis of depression based on boosting classification**. US nº 7707134, 11 jan. 2006, 27 abr. 2010.

WANG, J. **Analytical Electrochemistry**, 2ª ed. New York: John Wiley & Sons. 2006.

WANG, Q. et al. Downregulation of microRNA-124-3p suppresses the mTOR signaling pathway by targeting DDIT4 in males with major depressive disorder. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 41, p. 493-500, 2017.

<https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3235>

WANG, W. et al. Circulating microRNA-92a level predicts acute coronary syndrome in diabetic patients with coronary heart disease. **Lipids in Health and Disease**, v. 18, n. 1, p. 22, 22 dez. 2019a.

<https://doi.org/10.1186/s12944-019-0964-0>

WANG, Y. et al. Serum Exosomal microRNA Let-7i-3p as Candidate Diagnostic Biomarker for Kawasaki Disease Patients with Coronary Artery Aneurysm. **IUBMB Life**, v. 71, p. 891-900, 2019b.

<https://doi.org/10.1002/iub.2015>

WERSEBE, H. et al. Well-being in major depression and social phobia with and without comorbidity. **International Journal of Clinical and Health Psychology**, v. 18, n. 3, p. 201–208, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ijchp.2018.06.004>

WONGKAEW, N. et al. Functional Nanomaterials and Nanostructures Enhancing Electrochemical Biosensors and Lab-on-a-Chip Performances: Recent Progress, Applications, and Future Perspective. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 1, p. 120–194, 2019.

<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00172>

WOOD, C. S. et al. Taking connected mobile-health diagnostics of infectious diseases to the field. **Nature**, v. 566, n. 7745, p. 467–474, 2019.

<https://doi.org/10.1038/s41586-019-0956-2>

YUAN, H. et al. Circulating microRNAs as biomarkers for depression: Many candidates, few finalists. **Journal of Affective Disorders**, v. 233, p. 68–78, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jad.2017.06.058>

ZHANG, Y.; CHEN, Y.; MA, L. Depression and cardiovascular disease in elderly: Current understanding. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 47, p. 1–5, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jocn.2017.09.022>

ZHOU, J. et al. Quantification of shellfish major allergen tropomyosin by SPR biosensor with gold patterned Biochips. **Food Control**, 2019, 35 p.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.02.041>

ZHU, Y. et al. Automated Depression Diagnosis Based on Deep Networks to Encode Facial Appearance and Dynamics. **IEEE Transactions on Affective Computing**, v. 9, n. 4, p. 578–584, 2018.

<https://doi.org/10.1109/TAFFC.2017.2650899>