

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE MESTRADO DO CENTRO DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

CINTHYA MANOELLA LEITE DOS SANTOS



**Desenvolvimento de um biossensor
amperométrico de DNA para detecção do
Papilomavírus Humano.**

RECIFE-PE
MARÇO, 2008

Desenvolvimento de um biossensor amperométrico de DNA para detecção do Papilomavírus Humano.

Cinthya Manoella Leite dos Santos

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO
PROGRAMA DE MESTRADO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO, COMO PARTE DOS
REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS.

ORIENTADOR: PROF^o DR. JOSÉ LUIZ DE LIMA FILHO

CO-ORIENTADORA: PROF^a DR^a DANYELLY BRUNESKA GONDIM MARTINS

RECIFE –PE /2008

Santos, Cinthya Manoella Leite dos

Desenvolvimento de um biossensor amperométrico de DNA para detecção do Papilomavírus humano. / Cinthya Manoella Leite dos Santos. – Recife: O Autor, 2008.

64 folhas : il., fig. tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2008.

Inclui bibliografia.

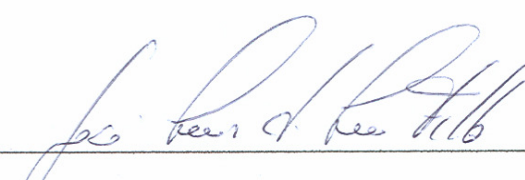
**1.Câncer Cervical 2.Papilomavírus Humano HPV-18 3.Biossensor
I. Título.**

616-006	CDU (2.ed.)	UFPE
616.1019	CDD (22.ED.)	CCB – 2008- 084

Desenvolvimento de um biossensor amperométrico de DNA para detecção do Papilomavírus Humano.

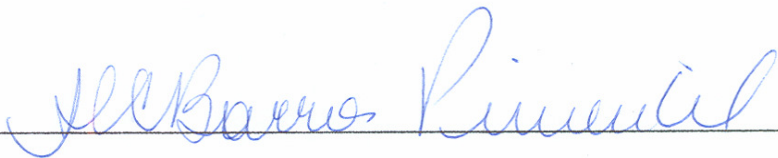
Cinthy Manoella Leite dos Santos

MEMBROS DA BANCA DE AVALIAÇÃO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO:



1º MEMBRO: PROFº. DR. JOSÉ LUIZ DE LIMA FILHO

2º MEMBRO: PROFª. DRª. DANYELLY BRUNESKA GONDIM MARTINS



3º MEMBRO: PROFª. DRª. MARIA DO CARMO PIMENTEL

1º SUPLENTE: PROFº. DR. PAULO ELEUTÉRIO DE SOUZA

2º SUPLENTE: PROFª. DRª. ANA PORTO

Este trabalho é dedicado a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a concretização de mais um dos meus objetivos, aos meus pais, irmãos, ao meu noivo, meus orientadores e aos meus amigos e familiares, que sempre me apoiaram e torceram pelo meu sucesso. Divido assim, com todos, os méritos desta nova conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu pai Manoel Acilon pelo apoio sempre dado em toda a minha vida estudantil e profissional. E a minha mãe Wanja Maria pelo apoio e ajuda, nunca negada, na aquisição dos meus materiais e impressões para os meus trabalhos e estudos.

Aos meus irmãos Caio, e Kelly, futura engenheira elétrica eletrotécnica, pelas conversas em relação à eletroquímica, que com certeza foram bastante proveitosos no meu aprendizado sobre a ciência elétrica.

Ao meu noivo Marcos pela compreensão quanto aos momentos dedicados a este trabalho e pelo incentivo para o meu crescimento profissional, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador José Luiz de Lima Filho que me proporcionou a oportunidade de ingresso na carreira científica e com quem aprendi bastante sobre biossensores.

A minha co-orientadora Danyelly Bruneska, pelos três anos de convivência desde a graduação. Com ela aprendi boa parte do que sei sobre ciência e o esforço e dedicação que ela requer. Ensinaamentos passados sempre, com bom humor, boa vontade e disciplina.

Ao amigo Roberto, cuja participação neste trabalho foi de crucial importância. Com seus conhecimentos em relação às medidas eletroquímicas e os meus em relação à biologia molecular, pudemos trocar informações de modo que ambos, aprendemos bastante e a parceria rendeu resultados.

A amiga Juliana, que apesar do seu curto tempo, sempre esteve disposta a me ajudar e tentar junto conosco interpretar os resultados.

A minha amiga Elaine, pela ajuda com experimentos e materiais, sempre dada de forma tranqüila e paciente, características que lhe são peculiares.

Aos meus amigos do grupo Prospecmol, Henrique pelas análises de Bioinformática, bastante úteis na otimização dos meus experimentos. Máira, Monique, Nathaly, Laís e Lucas. E aos meus novos amigos do Laboratório de biossensores Bela e Léo. A todos, obrigada pelos bons momentos de descontração nos intervalos dos experimentos que com certeza foram necessários para romper o estresse da busca de resultados.

A todos os amigos, familiares e funcionários do LIKA, cujos nomes não foram mencionados, mas cuja importância não se faz menor, o meu muito obrigada pelo apoio e contribuição, mesmo que indireta para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	<i>Página</i>
I. Introdução.....	10
1.1 Câncer do colo do útero.....	10
1.2 Papillomavírus Humano.....	14
1.2.1 Expressão de oncogenes.....	16
1.3 Métodos de Diagnóstico Citológico e Molecular.....	18
1.4 Biossensores.....	22
1.4.1 Interações.....	25
1.4.2 Técnicas de imobilização.....	27
1.4.3 Utilização da quitosana como molécula imobilizadora.....	28
1.4.5 Biossensores de DNA.....	30
1.4.6 Azul de metileno como mediador químico.....	33
1.5 Transdutores.....	34
II. Justificativas.....	38
III. Objetivos.....	39
3.1 Objetivo Geral.....	39
3.2 Objetivos Específicos.....	39
IV. Materiais e Métodos.....	40
4.1. Obtenção dos genes E6 do HPV-18 e E7 do HPV-16.....	40
4.2 Purificação dos genes	41
4.3 Análises de Bioinformática.....	41
4.4 Amostras clínicas.....	41
4.5 Construção dos Biossensores.....	42
4.6 Procedimento de utilização dos TIPS.....	43
4.7 Detecção dos sinais de hibridização.....	44
V. Resultados e Discussão.....	45
VI. Conclusão.....	58
VII. Perspectivas.....	59
VIII. Referências.....	60

RESUMO

O câncer cervical tem sido uma patologia grave no Brasil e no mundo com cerca de 18.680 mulheres infectadas anualmente. O Papilomavírus Humano (HPV) tem sido biologicamente associado ao desenvolvimento de lesões cervicais, devido a sua capacidade de infectar células epiteliais, e progressão ao câncer do colo de útero. O diagnóstico tardio pode inviabilizar o tratamento e levar a óbito muitas mulheres. Este diagnóstico poderia ser antecipado pelo uso de biossensores de DNA, que são dispositivos analíticos que resultam da integração entre uma sonda sequência específica e um sinal transdutor. Entre outras técnicas eletroquímicas, os biossensores amperométricos têm sido descritos como atrativos devido à sua simplicidade, baixos custos de instrumentação, possibilidade de realização em tempo real e geralmente alta sensibilidade. Neste trabalho, foi desenvolvido um genossensor para detecção de sequências do vírus HPV usando azul de metileno (AM) como mediador químico. Os sinais biológicos captados foram transduzidos por Voltametria de Pulso Diferencial (VPD). Os eletrodos de trabalho e referência foram produzidos através de técnica de impressão sob uma superfície de polivinil álcool. Os mesmos foram constituídos de carbono e Ag\AgCl, respectivamente. O eletrodo de trabalho foi modificado com quitosana para a imobilização de pequenas sequências de DNA para hibridização com uma sequência alvo. A sequência alvo usada para hibridização foi o gene E6 do HPV18, uma cadeia extensa com 500 pares de bases disponíveis para anelamento com sequências de 20 bases. Análises de bioinformática foram realizadas para verificar possíveis regiões de anelamento destas sequências curtas ao genoma viral. Os resultados demonstraram um aumento no sinal do AM quando a hibridização ocorreu, evidenciado pelo aumento dos picos de corrente de VPD analisados graficamente. As diferenças entre os sinais emitidos a partir de um eletrodo contendo reações de hibridização e outro isento das mesmas, foi usada para detectar sequências de DNA viral obtidas de amostras clínicas. Os resultados indicaram ser o método passível de aplicações em diagnósticos clínicos, e a técnica de impressão, um instrumento viável para a construção dos biossensores de DNA utilizando o azul de metileno como indicador de sinais de hibridização.

Palavras chave: Biossensor; Azul de metileno; HPV-18; câncer cervical.
e-mail: cinthyaml@yahoo.com.br

ABSTRACT

The cervical cancer has been a serious problem in Brazil and in the world with about 18.680 infected woman annually. The Human Papillomavirus (HPV) has been biologically associated with the development of cervical lesions, due to its capacity to infect epithelial cells and progress to cervical uterine cancer. The late screening may unviable the treatment, leading to death many woman. This screening could be earlier with the use of DNA biosensors, that are analytical devices that result from the integration of a sequence specific probe and a signal transducer. Among other electrochemical techniques, amperometric biosensors have been recently described as attractive due to their simplicity, low instrumentation costs, possibility for real time and generally high sensitivity. In this work a genosensor was developed for detection of DNA sequences of the virus HPV using methylen blue as chemical mediator. The biology signals were transducer by Diferencial Pulse Voltametric (DPV). The work and reference electrodes were constructed using imprinting technique on a polyvinyl alcohol support. They were made with carbon paste and Ag\AgCl respectively. The work electrode was modified with chitosan for the immobilization of short sequences of DNA for hybridization with another target sequence. The target sequence used for the hybridization was the gene E6 HPV-18, a long chain with 500 base pairs available for annealing with sequences with 20 bases. Bioinformatics analyses were realized to verify possible regions for annealing of the sequences in viral genome. The results demonstrated an increase in the signal of the methylene blue when the hybridization occurred, showed by the increasing in DVP current peaks, graphically analyzed. The differences between the signals emitted from, an electrode with hybridizations reactions and other without them, was used to detect viral DNA sequences from clinical samples. The reported findings indicate the possibility applications of the method in clinical screening, and confirm the imprinting technique as a viable instrument for construction of DNA biosensors using methylene blue as an indicator of hybridization signals.

Key Words: Biosensor; Methylene blue; HPV-18; Cervical cancer

LISTA DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura 1: Incidência de câncer em alguns países do mundo (Fonte: GLOBOCAN,2005)	12
Figura 2: Processo de replicação das partículas virais a partir de camadas basais do epitélio (Fonte: modificado a partir de http://www.research.leidenuniv.nl/index.php3?c=243).	14
Figura 3: Processo de replicação das partículas virais a partir de camadas basais do epitélio (Fonte: modificado a partir de http://www.research.leidenuniv.nl/index.php3?c=243).	17
Figura 4: Figura esquemática da técnica de coleta de células cervicais para o exame de Papanicolaou (Fonte: http://www.taringa.net/.../916254/Papanicolaou.html).	18
Figura 5: Desenho esquemático do trato genital feminino evidenciando o canal cervical e as regiões da endocérvice e ectocérvice (Fonte: modificado a partir de http://www.andre.sasse.com/colo.htm)	19
Figura 6: Citologia de células cervicais infectadas pelo Papilomavirus humano (Fonte: http://www.zambon.es/.../atlas/img_large/h4e047.jpg).	20
Figura 7: Etapas de realização da técnica de captura híbrida (Fonte: modificado a partir de: http://www.histeroscopia.med.br)	21
Figura 8: Esquema básico de um biossensor (Fonte: http://www.cin.ufpe.br/~acb/RelatoriosIC/RelatorioIC2.PDF).	24
Figura 9: Desenho esquemático da estrutura química da quitosana obtida a partir da carapaça de crustáceos (Fonte: http://www.eis.uva.es/~macromol/curso05-06/medicina/polimeros_biodegradables/polime5.gif)	28
Figura 10: Desenho esquemático da interação entre quitosana e a cadeia de DNA para formação do biossensor de DNA.	29
Figura 11: Desenho esquemático das etapas envolvidas na detecção de uma sequência específica de DNA hibridização utilizando um biossensor	30

eletroquímico de DNA (Modificado a partir de WANG, 2006).

Figura 12: Desenho esquemático de um fragmento de DNA dupla fita evidenciando os sítios de oxidação das bases Adenina e Guanina (aro em vermelho). 32

Figura 13: Desenho esquemático da estrutura química do azul de metileno (Modificado a partir de WANG *et al.*, 2005). 33

Figura 13: Desenho esquemático da estrutura química do azul de metileno (Modificado a partir de WANG *et al.*, 2005). 34

Figura 14: Área superficial de um TIP, evidenciando os eletrodos de referência e eletrodo de trabalho. 42

Figura 15 : Demonstração das etapas de construção do TIPs. 43

Figura 16: Corrida eletroforética em gel de agarose 0,8%. Linha 1: Padrão 1 Kb Plus (INVITROGEN), Linha 2: gene E6 HPV-18. 45

Figura 17: Gel de agarose 0,8%, evidenciando duas amostras de produtos de PCR. Linhas (1 e 2) Amplicon E7 de HPV-16, (3) Padrão 1 Kb Plus (INVITROGEN). 45

Figura 18: Foto do suporte de acrílico utilizado para acoplar um TIP e seus eletrodos devidamente conectados. 46

Figura 19: Análise gráfica dos picos de VPD utilizando quatro diferentes condições. 48

Figura 20: Desenho esquemático apresentando os sítios de hibridização do oligo 1 (barras em azul) e do oligo 2 (barras em vermelho) em relação a sequência viral do HPV-18. 49

Figura 21: Desenho esquemático apresentando os sítios de hibridização do oligo 1 (barras em azul) em relação a sequência viral do HPV-18. 51

Figura 22: Análise gráfica das curvas de VPD utilizando quatro diferentes condições 52

Figura 23: Esquema de reação entre o oligo imobilizado e o gene E6 do HPV-18 na superfície do eletrodo de trabalho (ET) e interações com o AM. 53

Figura 24: Esquema da imobilização do oligo na superfície do eletrodo de 54

trabalho (ET) e sua interação com o AM.

Figura 25: Esquema de reação entre o oligo imobilizado e o gene E7 do HPV-16 na superfície do eletrodo de trabalho (ET) e interações com o AM. 54

Figura 26: Análise gráfica das curvas de VPD utilizando cinco diferentes condições. 55

LISTA DE TABELAS

	<i>Página</i>
Tabela 1: Estimativa de novos casos de câncer no Brasil para cada 100.000 habitantes (INCA, 2008).	10
Tabela 2: Sequência e características dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene E6 de HPV-18 e E7 de HPV-16.	40
Tabela 3: Ciclos de realização das reações de PCR no aparelho Mastercycler Eppendorf	40
Tabela 4: Condições de utilização dos TIPs produzidos de acordo com o bioelemento imobilizado na superfície e a amostra de hibridização.	47
Tabela 5: Lista de tipos virais analisados quanto a possibilidade de hibridização dos oligos 1 e 2 frente as sequências gênicas virais.	50

I. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

Segundo a Organização Mundial de Saúde, o câncer do colo do útero constitui a segunda causa de morte mais freqüente entre as mulheres em todo o mundo, perdendo apenas para o câncer de mama. No Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número de casos novos chegará a 18.680 para cada 100.000 mulheres no ano de 2008 (Tabela 1). A região Nordeste ocupa o segundo lugar em número de casos com 4.720 casos para cada 100.000 sendo 21,6 % destes no Estado de Pernambuco.

Tabela 1: Estimativa de novos casos de câncer no Brasil para cada 100.000 habitantes (INCA, 2008).

Localização primária	Estimativa de casos novos		
	Masculino	Feminino	Total
Próstata	49.530	-	49.530
Mama Feminina	-	49.400	49.400
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.810	9.460	27.270
Cólon e Reto	12.490	14.500	26.990
Estômago	14.080	7.720	21.800
Colo do Útero	-	18.680	18.680
Cavidade Oral	10.380	3.780	14.160
Esôfago	7.900	2.650	10.550
Leucemias	5.220	4.320	9.540
Pele Melanoma	2.950	2.970	5.920
Outras Localizações	55.610	62.270	117.880
Subtotal	175.970	175.750	351.720
Pele Não-Melanoma	55.890	59.120	115.010
Todas as neoplasias	231.860	234.870	466.730

Estudos epidemiológicos apontam a associação do câncer cervical com a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV), além da relação com fatores como alimentação, tabagismo, higiene, promiscuidade e estado imunológico. As papilomavíroses constituem uma das doenças sexualmente transmissíveis mais prevalentes no mundo. Estima-se que mundialmente cerca de quinhentas mil a um milhão de pessoas estejam infectadas pelo vírus. Vale ressaltar, que apesar dos altos índices de prevalência da infecção viral, a mesma ainda é desconhecida pela maioria da população quanto à patogenia e modo de transmissão, favorecendo a disseminação do vírus. Este fato tem sido alvo de estudos psicosociais, que revelam que a maioria das mulheres, ao descobrirem a infecção, demonstra confusão, ansiedade e desinformação em relação à transmissão sexual do vírus, remetendo a questões de fidelidade nos relacionamentos (CUZICK *et al.*, 2006). Informações quanto aos métodos de prevenção e detecção podem ser de suma importância na epidemiologia da doença, que pode ter um bom prognóstico se diagnosticada e tratada oportunamente. Isso explica o fato de sua maior incidência ser observada em países subdesenvolvidos, onde não existem programas de prevenção e tratamento adequados. (INCA, 2008; ZUR HAUSEN, 2002).

Países desenvolvidos como EUA, Inglaterra, Finlândia e Canadá já possuem programas de prevenção do câncer do colo do útero, os quais se baseiam no diagnóstico precoce, permitindo assim o tratamento das lesões antes que as mesmas evoluam para a malignidade. Estes programas têm contribuído para uma considerável diminuição nos índices de incidência e mortalidade causados por câncer cervical, porém apesar de sua eficiência, requerem recursos financeiros, infra-estrutura, profissionais capacitados e mecanismos eficientes de diagnóstico e tratamento. Essas condições nem sempre são encontradas em países em desenvolvimento como Índia e Brasil (**Figura 1**) (SANKARANARAYANAN *et al.*, 2001).

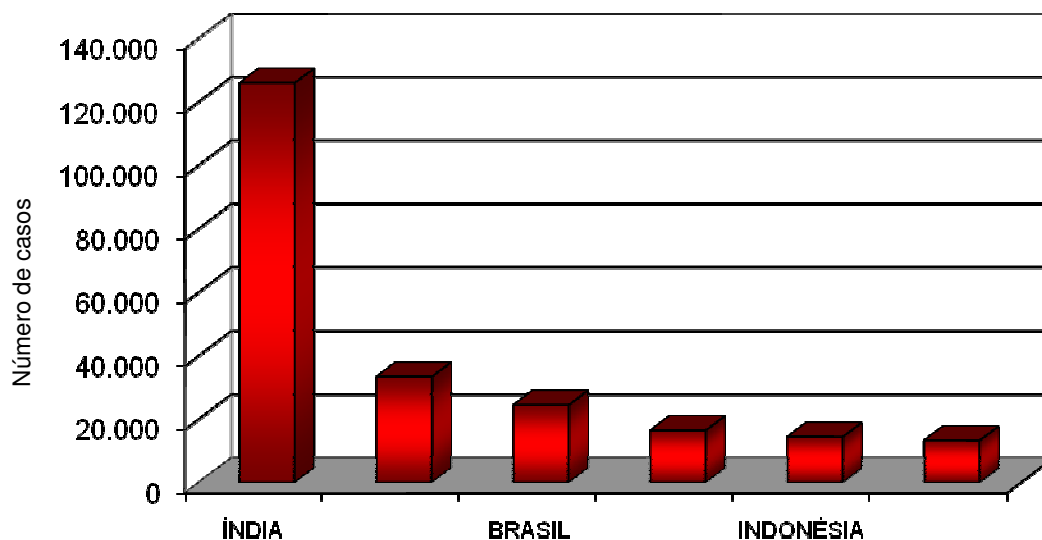


Figura 1: Incidência de câncer em alguns países do mundo (Fonte: GLOBOCAN, 2005).

Estudos realizados pela Agência Internacional de Pesquisas do Câncer (IARC), foram desenvolvidos através da investigação e análise de casos sob um protocolo padrão, no qual foram selecionadas 1000 mulheres recrutadas de 22 diferentes países, com verificação histológica de câncer cervical invasivo. As biópsias foram analisadas no laboratório central para detecção do DNA viral do HPV através de técnica de PCR e monitoração da presença de células malignas. Após a verificação das análises foi observada a presença do DNA-HPV em 99,7% dos tumores, o que demonstra ser o vírus HPV um fator causal necessário ao estabelecimento do câncer cervical (MUÑOZ *et al.*, 2006). A patogenia do vírus tem importante papel no desenvolvimento da neoplasia das células cervicais, na sua transformação em células cancerosas e no caráter evolutivo do câncer do colo do útero a partir de uma displasia cervical. Isso demonstra a importância da infecção cervical persistente por HPV como fator de risco para o desenvolvimento do câncer da cérvix, envolvendo mecanismos moleculares de integração viral ao genoma celular (CLIFFORD *et al.*, 2006).

Existe uma fase pré-clínica, sem sintomas, do câncer do colo do útero, em que a detecção de possíveis lesões precursoras é através da realização periódica do exame preventivo, realizado através de esfregaço citológico de raspados do colo uterino. Conforme a progressão da doença, os principais sintomas do câncer do colo do útero são

sangramento anormal ou intermenstrual, corrimento vaginal e lombalgia (HARRISON, 2000).

A infecção do trato genital inferior por HPV pode ter início com lesões condilomatosas do colo uterino e podem evoluir para neoplasia intraepitelial cervical (NIC), classificadas em graus I, II e III de acordo com padrões citológicos e histológicos. Esta lesão precede o carcinoma cervical invasivo sendo classificada, segundo o Sistema Bethesda, como lesão intraepitelial escamosa (LIE) de baixo grau, LIE de alto grau e carcinoma *in situ*. A fase que antecede o carcinoma cervical é caracterizada por uma gama de alterações, as quais acometem exclusivamente o epitélio de cobertura do útero, preservando o estroma do órgão. Estas lesões são chamadas intra-epiteliais escamosas, e apresentam evidências citológicas de neoplasia sem invasão através da membrana basal. Este quadro clínico pode permanecer inalterado por 10 a 20 anos, e posteriormente evoluir para carcinoma invasivo (QUEIROZ *et al.*, 2005; HARRISON, 1998).

O tipo de tratamento ao qual o paciente deverá ser submetido depende de fatores como estadiamento do tumor e fatores pessoais como idade e desejo de filhos no futuro. Dentre os tratamentos mais comuns para o câncer de colo de útero podemos citar: a cirurgia, a radioterapia, e a quimioterapia. O tratamento do carcinoma quando na fase *in situ* pode ser feito com a conização, que consiste na retirada de um segmento em forma de cone do tecido tumoral. Em estágios mais avançados da doença o tratamento pode ser feito com a combinação de radioterapia, quimioterapia e braquiterapia ou cirurgia de histerectomia radical para remoção do colo do útero, útero, parte da vagina, e linfonodos regionais (HARRISON, 2000).

Existem algumas estratégias de prevenção que devem ser adotadas no controle epidemiológico da doença, estas devem ser priorizadas nos serviços de atenção básica à saúde. A conscientização da população quanto ao uso de preservativos e a realização do exame preventivo do câncer do colo do útero, conhecido popularmente como exame de Papanicolaou, constituem estratégias de prevenção primária e secundária, respectivamente (INCA, 2008).

1.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Historicamente, os Papilomavírus (PVs) foram agrupados junto com os Poliomavírus formando a família Papovavírus. São vírus pequenos, não-envelopados, com um capsídeo icosaédrico e DNA circular de fita dupla. A divisão das duas ordens da família Papovavírus é realizada de acordo com a diferença de tamanho, sendo os Papilomavírus um pouco maiores (55nm) em relação aos Poliomavírus (45nm) (HERRERO, *et al.*, 2000).

Os Papilomavírus são perfeitamente adaptados aos seus tecidos de origem, infectando preferencialmente células epiteliais de pele e mucosas em diferenciação. Podem replicar nas camadas basais dessas células, as quais se ligam e penetram, explorando a estrutura celular em função da manutenção da infecção (HERRERO, *et al.*, 2000). Partículas virais penetram nas camadas basais inicialmente na forma epissomal, o genoma viral se replica e as mesmas infectam novas células. No decorrer deste processo, o genoma viral se integra ao genoma celular evoluindo para um processo de malignidade (Figura 2). Cada sorotipo viral, de acordo com a sua capacidade de infecção, apresenta tropismo preferencial voltado a regiões específicas do organismo humano, sendo esta uma das características observadas para dividi-los em níveis de risco.

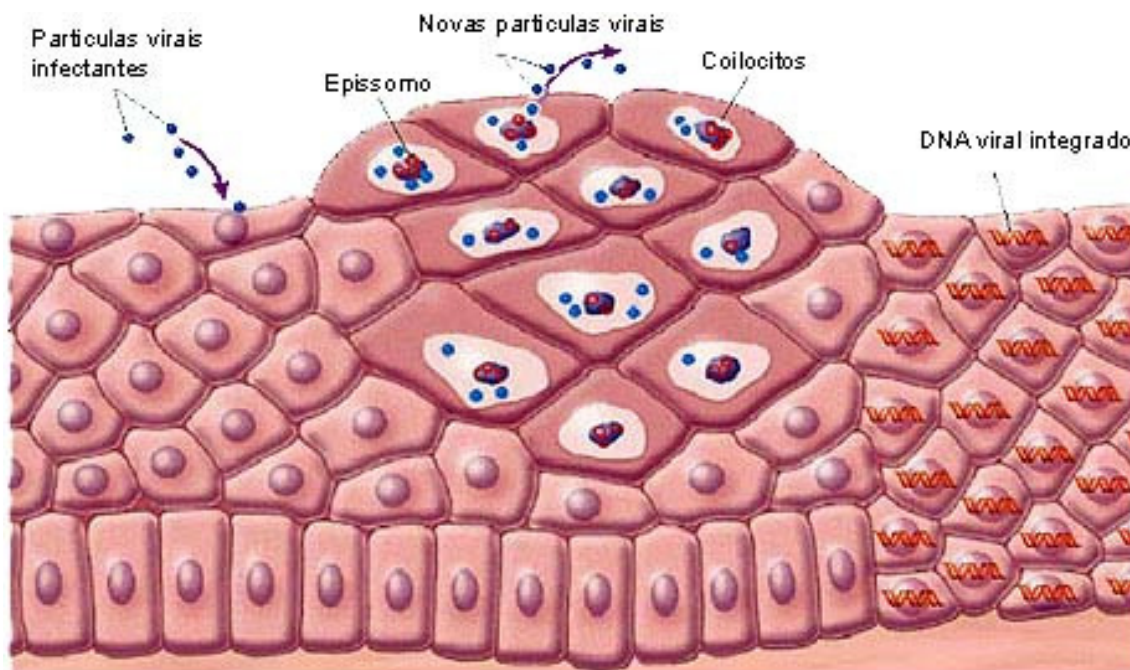


Figura 2: Processo de replicação das partículas virais a partir de camadas basais do epitélio (Fonte: modificado a partir de <http://www.research.leidenuniv.nl/index.php3?c=243>).

Mais de 100 tipos de HPVs já foram caracterizados molecularmente, destes cerca de 40 estão aptos a infectarem o trato genital e acredita-se que existam outros tipos ainda não descritos. Os tipos de maior importância clínica mais frequentemente relacionados com o carcinoma cervical, denominados de alto risco são HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59 e -68. Estudos de meta-análise incluindo mais de 14.500 casos, publicados na literatura até janeiro de 2006, demonstram que os sorotipos -16 e -18 respondem por 70% dos casos de câncer cervical no mundo, e os oito sorotipos mais frequentes (-16, -18, -45, -31, -33, -52, -58 e -35) por 90% (CLIFFORD *et al.*, 2006).

Diferentemente dos tipos de alto risco, alguns sorotipos não são relatados em associação com o câncer cervical, sendo considerados de baixo risco como -6, -11, -30, -42, -43 e -44 que estão principalmente associados a verrugas genitais e lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau (NIC I), não estão comumente associados à progressão dessas lesões (LEVI *et al.*, 2002).

As partículas virais possuem aproximadamente 8000 pares de bases, com cerca de 10 unidades de tradução ou “Open Reading Frames” (ORFs), que de acordo com a sua localização no genoma, são classificadas como regiões precoces, “early” (E), e regiões tardias, “late” (L). Os genes da região precoce expressam proteínas não estruturais envolvidas na transformação celular e necessárias para a replicação do DNA viral, tais como: E1, E2, E4, E5, E6, E7 E3e E8, sendo os dois últimos com função ainda pouco conhecida. As regiões tardias codificam as proteínas estruturais do capsídio, L1 e L2, expressas apenas em células infectadas produtivas. O gene L1 representa cerca de 80% de todas as proteínas virais. Nem todos os sorotipos relacionados com o câncer cervical expressam todos os genes, possuindo ainda em sua estrutura uma região regulatória designada de “Long Control Region” (LCR), em que não são encontradas ORFs, que varia de tamanho de acordo com os diferentes tipos de HPVs (ZUR HAUSEN, 2002).

A virulência dos HPVs é atribuída à expressão das suas oncoproteínas E5, E6 e E7, as quais, nos sorotipos de alto risco, como HPV-16 e HPV-18, estão relacionadas com a desorganização do ciclo celular. Estas proteínas de baixo peso molecular são capazes de interagir com uma variedade de proteínas reguladoras a fim de levar à imortalização celular e posterior transformação maligna. Algumas propriedades bioquímicas e moleculares são atribuídas a essas proteínas, dentre elas a capacidade de alterar o controle do ciclo celular,

inibir a apoptose e escapar da vigilância imunológica durante a progressão do câncer cervical (FINZER, *et al.*, 2002).

Deve-se enfatizar que nem todas as infecções persistentes por HPV culminam no desenvolvimento de câncer, pois já existem provas experimentais da existência de estratégias de vigilância que evitam o acúmulo de células malignas. Esta interrupção é decorrente da ablação da função e expressão das proteínas oncogênicas ou da eliminação de células infectadas via apoptose (FINZER *et al.*, 2002).

1.2.1. Expressão de oncogenes

O DNA do HPV encontra-se, inicialmente, no núcleo celular na sua forma episomal e durante a progressão das lesões integra-se ao genoma das células. Na integração do DNA viral ao genoma humano, parte do genoma viral é retirado e o restante é inserido no genoma humano, incluindo a região dos oncogenes E6 e E7 (Figura 3). Este fato permite a expressão contínua dos mesmos, dando origem a oncoproteínas virais de extrema relevância no processo de replicação viral, devido à sua interação com proteínas reguladoras do ciclo celular. As interações mais importantes já caracterizadas estão relacionadas ao complexo E6/p53 e E7/proteína do retinoblastoma (pRB), que promovem a degradação e a inativação destes fatores, respectivamente. A pRB e a p53 são moléculas cruciais no controle do ciclo celular e notadamente têm sua ação modificada em cânceres humanos (MUÑOZ *et al.*, 2005). Em sistemas experimentais, esta interação demonstra induzir à proliferação e eventualmente à imortalização e transformação maligna das células.

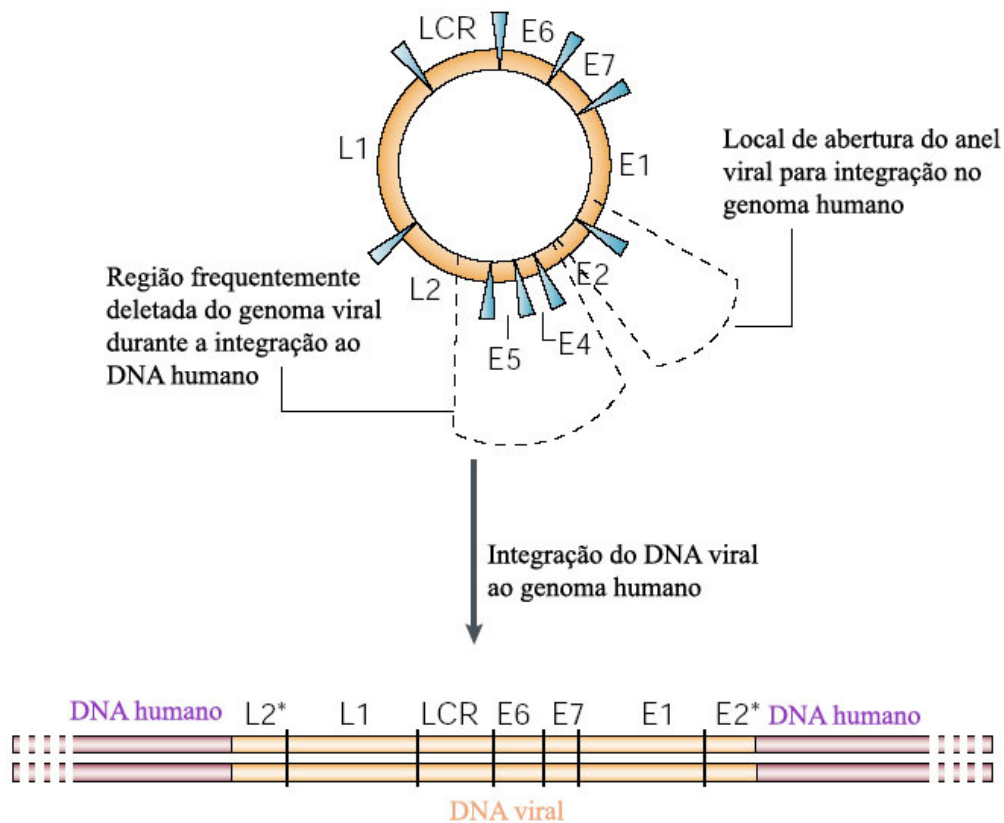


Figura 3: Processo de replicação das partículas virais a partir de camadas basais do epitélio (Fonte: modificado a partir de <http://www.research.leidenuniv.nl/index.php3?c=243>).

O p53 possui três funções principais, a contenção do crescimento celular fazendo com que um DNA danificado não seja replicado, o reparo deste DNA, que ocorre por intermédio da ativação de proteínas reparadoras e a morte celular através da apoptose, o último recurso para conter a progressão do ciclo celular e evitar a proliferação da célula contendo um DNA danificado. Em células infectadas pelo HPV o p53 sofre uma degradação proteolítica pela ação da E6, como consequência, o controle do ciclo celular é abolido e a diferenciação celular é retardada. Já o fator de supressão tumoral, pRB, é um membro das família das chamadas “proteínas de bolso” que incluem p107 e p130. Estas proteínas são assim denominadas por possuírem “bolsos” e funcionam como reguladoras negativas do ciclo celular, evitando a entrada na fase (CLERE *et al.*, 2007).

Outro gene ativado no processo de infecção viral corresponde à região E5, seu mecanismo de ação se dá pela formação de um complexo com o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) levando a uma desregulação desses receptores. A ativação

anormal dos EGFRs pode iniciar cascatas bioquímicas desencadeadoras da expressão exacerbada de uma variedade de proto-oncogenes. Além disso, a E5 pode estimular um rápido crescimento celular, prejudicando o controle do ciclo devido à sua capacidade de inibir o gene supressor de tumor p21. Embora a E5 tenha atividades significativas, estas são cessadas quando ocorre a integração ao genoma celular quando seu gene é deletado, fazendo com que a oncoproteína não seja expressa em cânceres cervicais (GIESWEIN *et al.*, 2003).

1.3 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO E MOLECULAR

A principal estratégia utilizada para detecção de lesões precursoras e diagnóstico do câncer (prevenção secundária) no Brasil é através da realização do exame preventivo do câncer do colo do útero, também conhecido como exame de Papanicolaou. Os cientistas Papanicolaou e Babés detêm o mérito de descreverem a presença de células cancerosas nos esfregaços obtidos através de raspagem do colo do útero e de vislumbrar o interesse do método citológico no diagnóstico do câncer, através de suas publicações no ano de 1928 (Figura 4). O exame pode ser realizado em postos ou unidades de saúde, por profissionais capacitados (KOSS, 1997).

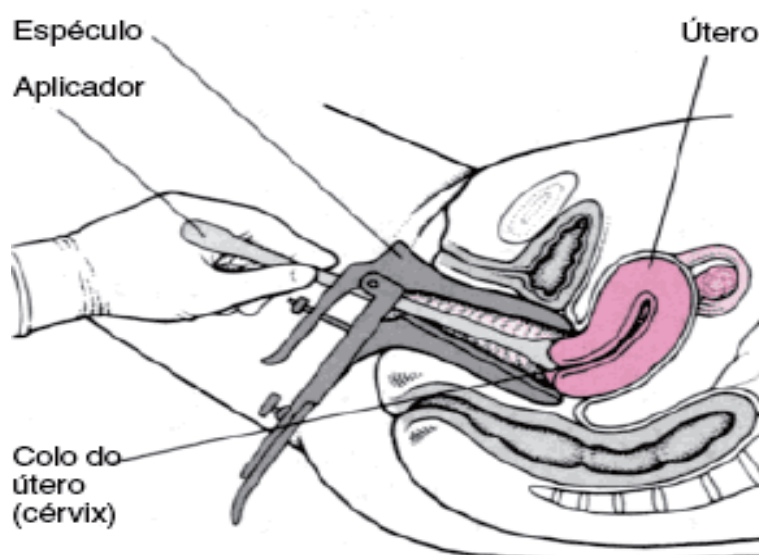


Figura 4: Figura esquemática da técnica de coleta de células cervicais para o exame de Papanicolaou (Fonte: <http://www.taringa.net/.../916254/Papanicolaou.html>).

Atualmente as terminologias recomendadas para os laudos citológicos devem seguir o Sistema Bethesda, implantado em 1988 e revisado no ano de 2001, que caracteriza as lesões precursoras como intraepiteliais escamosas de alto-grau (HSIL) ou baixo grau (LSIL). Essas lesões se desenvolvem predominantemente na zona de transformação ou junção escamocolunar, definida como a junção entre o epitélio escamoso e o colunar estratificado. O epitélio escamoso reverte à porção vaginal da cérvix, enquanto o epitélio colunar está presente na porção endocervical (Figura 5). Deste modo células desta região devem ser avaliadas no exame citológico.

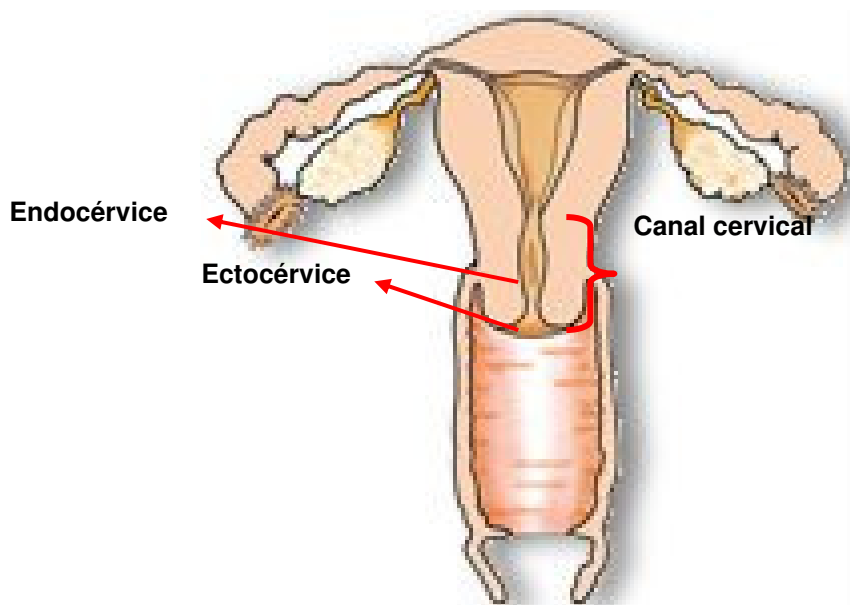


Figura 5: Desenho esquemático do trato genital feminino evidenciando o canal cervical e as regiões da endocérvice e ectocérvice. (Fonte: modificado a partir de <http://www.andre.sasse.com/colo.htm>)

A triagem deve ser feita nas mulheres ao iniciarem a atividade sexual ou aos 20 anos de idade. Após dois exames preventivos consecutivos com resultados negativos, o teste deverá ser repetido a cada 3 anos. Os esfregaços anormais ditam a necessidade da realização de uma biópsia cervical para estudo histopatológico, geralmente realizado sob colposcopia com o colo uterino corado com ácido acético a 3%, a qual mostra áreas anormais como manchas esbranquiçadas. Caso haja evidências de carcinoma *in situ*, realiza-se uma biópsia em cone, como tratamento terapêutico (HARRISON, 2000).

A presença de coilócitos em um exame citológico constitui um forte sinal indicativo de infecção por HPV, representando um valor preditivo positivo importante para essa infecção (Figura 6). Apesar de não ser considerado um método diagnóstico de HPV, a utilização do exame citológico na rotina, em programas de rastreamento de câncer do colo do útero, tem permitido uma diminuição importante nos índices de incidência e de mortalidade associada ao câncer cervical. Uma vez caracterizadas no exame, lesões ocasionadas pelo vírus, a infecção deve ser confirmada através de métodos moleculares que busquem a presença do DNA viral nas amostras cervicais. (FERENZCZY, *et al.*, 2002).

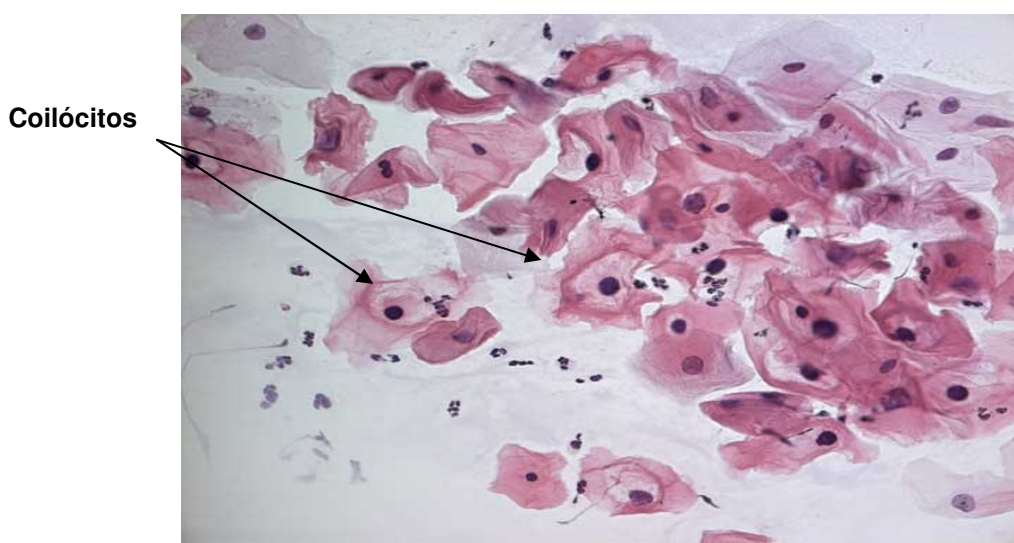


Figura 6: Citologia de células cervicais infectadas pelo Papilomavirus humano (Fonte: http://www.zambon.es/.../atlas/img_large/h4e047.jpg).

Diversas metodologias podem ser utilizadas para a pesquisa do DNA do HPV em amostras clínicas, cada uma com vantagens, desvantagens, sensibilidade e especificidade particulares. A escolha do método de diagnóstico depende muitas vezes da disponibilidade de equipamentos específicos, estrutura e verbas.

Dentre as técnicas de diagnóstico molecular disponíveis, a Captura Híbrida vem sendo bastante utilizada em protocolos de pesquisa e diagnósticos clínicos laboratoriais. Essa metodologia baseia-se na utilização de sondas específicas para a detecção de 18 tipos de HPVs agrupados de acordo com as sondas utilizadas: o grupo A possui sondas para cinco tipos considerados de baixo risco (-6, -11, -42, -43 e -44), e o grupo B contém sondas

para 13 tipos considerados de intermediário e/ou alto risco para o câncer cervical (-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59 e -68). O sistema funciona com o uso de uma microplaca contendo anticorpos monoclonais para captura dos híbridos, os quais são formados por sondas de RNA contidas em uma solução, as quais hibridizam com o DNA viral presente nas amostras. Os híbridos RNA\DNA imobilizados, reagem com conjugados de anticorpos específicos e fosfatase alcalina e são detectados por substrato quimioluminescente (Figura 7). A intensidade de luminescência denota a presença ou ausência do DNA alvo nas amostras analisadas. A técnica requer kits de detecção disponíveis comercialmente, que apesar de apresentar uma alta sensibilidade, não informa o tipo viral envolvido, apenas classificando-o como de alto e baixo risco. Os reagentes são de alto custo necessitando ainda de equipamentos para verificação da quimioluminescência (quimioluminômetro) o que onera significativamente a adoção do método (BORGES *et al.*, 2004).

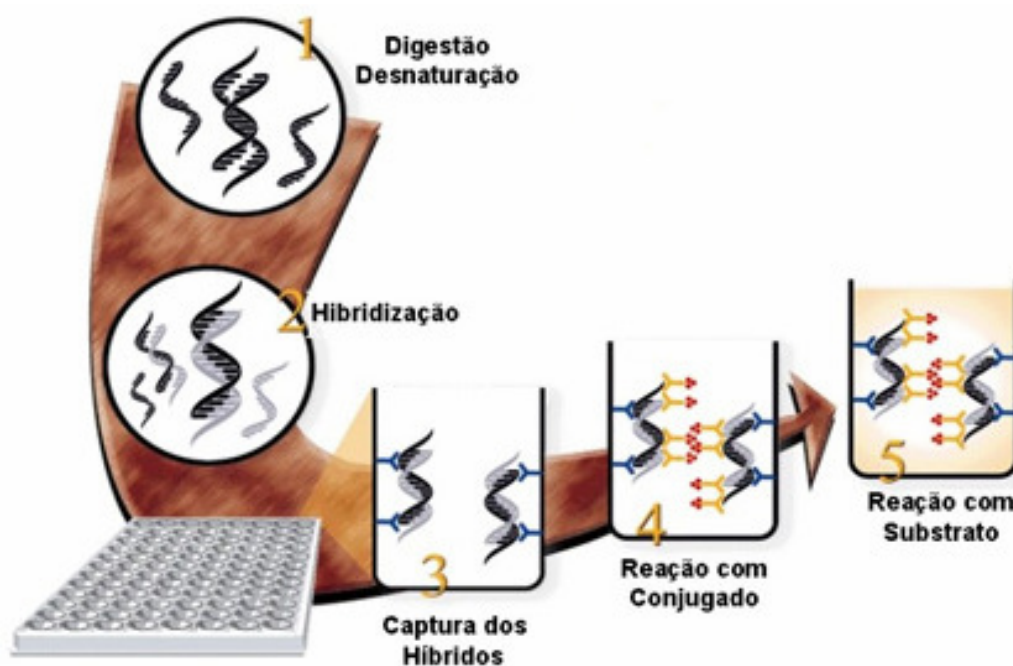


Figura 7: Etapas de realização da técnica de captura híbrida (Modificado a partir de: <http://www.histeroscopia.med.br>)

Outra metodologia aplicada na pesquisa e na tipagem de HPV, é a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). São descritos na literatura diversos oligonucleotídeos consenso, complementares a região L1 do genoma de HPV, a mais conservada entre os

diversos tipos, que permitem uma detecção ampla dos tipos de HPV's que infectam a região anogenital humana. Recentemente, foi desenvolvida uma metodologia associando a técnica de PCR e ELISA que utiliza uma mistura de sondas genéricas. O processo baseia-se na amplificação de DNA de HPV utilizando oligonucleotídeos complementares a região L1 do genoma viral, seguida de uma reação enzimática. Através dessa metodologia é possível detectar 13 tipos de HPV's de alto risco (-13, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59 e -68) (ROSSETTI *et al.*, 2006).

O método de PCR pode ser associado com o Polimorfismo de Fragmentos de DNA obtidos por Enzimas de Restrição (RFLP), possibilitando a descrição de até quatro sorotipos presentes de forma concomitante em uma amostra. A associação PCR\RFLP, requer além de oligonucleotídeos específicos, uma sequência de enzimas de restrição, além de equipamentos para realização e visualização de corrida eletroforética.

A sorotipagem de HPV também pode ser feita através do emprego de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para cada tipo viral, complementar à região das oncoproteínas E6 e E7, uma vez que essas são as regiões mais variáveis do genoma de HPV. A hibridização com sondas tipo-específicas é uma técnica bastante empregada e de alta especificidade, porém os custos com materiais, equipamentos como termociclador, a aquisição de oligonucleotídeos específicos e a necessidade de profissionais capacitados para o diagnóstico molecular, são fatores que dificultam a aplicação na rotina de laboratórios clínicos (CUZICK *et al.*, 2006).

As metodologias de diagnóstico disponíveis no mercado são de alta eficiência, porém ainda inacessíveis a uma maioria da população infectada. A utilização na saúde pública é limitada devido a fatores como o alto custo e a carência de profissionais especializados.

1.4 BIOSSENSORES

Os sensores químicos são caracterizados por um grupo de dispositivos capazes de reconhecerem moléculas biológicas específicas. Considerando o reconhecimento seletivo de biomoléculas, um biossensor pode ser definido como qualquer aparelho de medida que

incorpore uma espécie biológica como parte essencial do processo de reconhecimento. (DIAMOND, 1998).

Admitindo que princípios biológicos são amplamente utilizados para o reconhecimento molecular de substâncias, os biossensores podem ser aplicados nas mais diversas áreas: em diagnósticos clínicos, incluindo os testes rápidos para dosagens bioquímicas, no controle ambiental para a monitoração de substâncias como fenóis, pesticidas e metais pesados, na área industrial alimentícia para a análise de composição de alimentos, teor de contaminação microbiana, concentração de nutrientes e corantes, e na indústria de fermentações, na monitoração e controle contínuo da composição de biomassa, substrato, produtos e subprodutos presentes no meio (CAMMANN *et al.*, 1991)

As características de reconhecimento dos biossensores são geralmente determinadas por elementos seletivos presentes na membrana de reconhecimento. A análise da composição e da forma, tanto da amostra a ser detectada como da membrana de reconhecimento, são de grande importância para garantir o desempenho do sensor, relacionado a parâmetros como seletividade, sensibilidade, estabilidade, tempo de resposta e possibilidade de reutilização do mesmo. (DIAMOND, 1998).

A camada de reconhecimento biológico deve estar intimamente associada a um transdutor físico ou um eletrodo de referência, para que seja detectado o sinal de interação entre o analito desejado, contido na amostra biológica, e o bioelemento presente na superfície de detecção. Uma vez ocorrida a interação, o sinal deve ser amplificado de forma a ser facilmente detectado e amplificado por um transdutor (Figura 9). Para o desenvolvimento de um biossensor alguns fatores devem ser levados em consideração, como a seleção do bioelemento adequado ao analito a ser detectado, a escolha de um método de imobilização, a adequação de um transdutor, e considerações como a faixa de medição, linearidade e minimização de interferência, além da caracterização física do biossensor. Um dos exemplos mais conhecidos e bem sucedidos de biossensor, utilizado principalmente por pacientes diabéticos, é o de verificação da concentração de glicose já disponível comercialmente (SZUMINSKY, 1992).

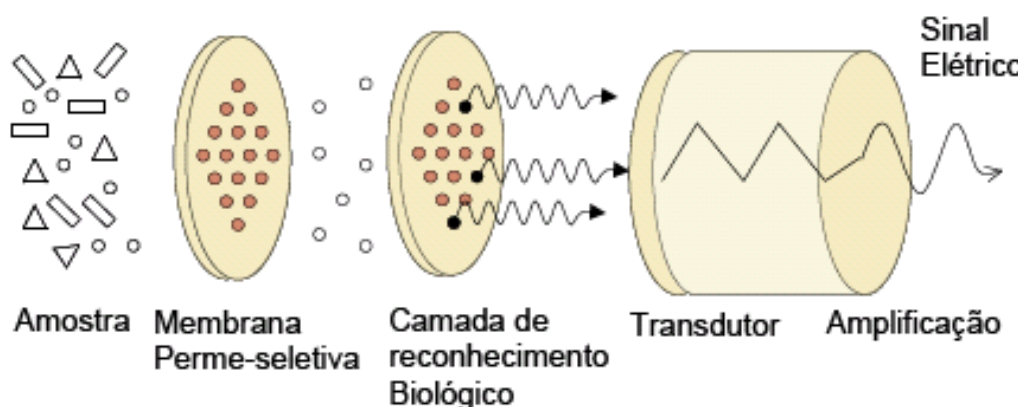


Figura 8: Esquema básico de um biossensor

(Fonte: <http://www.cin.ufpe.br/~acb/RelatoriosIC/RelatorioIC2.PDF>)

Ainda que um biossensor ideal não exista de fato, uma das características mais importantes está relacionada à elevada especificidade conferida pelo bioelemento seletivo a que está associado. Desta forma, para um bom desempenho é necessário, ao nível da superfície de reconhecimento, uma concentração adequada do bioelemento, baixas interações não específicas e a estabilidade da camada biológica. A capacidade discriminatória do biossensor está diretamente relacionada com a estrutura, a função do bioelemento e sua interação com o analito. Fatores interferentes, mesmo em concentrações significativamente superiores às moléculas a serem detectadas na amostra biológica, não devem exercer influência na especificidade da resposta (SPICHIGER-KELLER, 1998; SIGRIST & GAO, 1999).

Para a correlação entre o sinal obtido e à concentração ou atividade do analito, o biossensor deve ser dotado de elevada seletividade, a qual pode ser aumentada pela inclusão de etapas de purificação e de modificações químicas no processo analítico. As várias opções de processamento de sinais complexos têm contribuído para a seletividade de sensores modernos (RENIGNIER *et al.*, 1999).

O que determina o limite de detecção do biossensor, ou seja, sua sensibilidade, deve ser maximizada de modo a conferir ao dispositivo, habilidade em discriminar, com confiança e precisão, pequenas diferenças na concentração do analito. A seletividade do reconhecimento das moléculas presentes na amostra pelo componente biológico, aliada à

sensibilidade do transdutor, tem gerado grande número de trabalhos científicos na área de sensores.

Um biossensor ideal deve ter reduzido o seu tempo de resposta, o que possibilita sua aplicação na monitoração e detecção em tempo real da presença ou atividade de um determinado analito. Processos analíticos que apresentem um longo tempo de resposta devido a um processo cinético lento, por exemplo, podem limitar suas possíveis aplicações e impedem que as respostas sejam obtidas em tempo real. Adicionalmente deve possuir elevada estabilidade, tanto operacional como de armazenamento, o que depende significativamente do método de imobilização escolhido para o bioelemento (CABRAL *et al.*, 2003).

A possibilidade de reutilização é outra característica de idealidade, que, além de diminuir os gastos com reagentes, e conseqüentemente, o custo de cada ensaio, geralmente assegura maior reprodutibilidade aos resultados. Adicionalmente, deve possuir elevada estabilidade, tanto operacional, como de armazenamento, o que depende significativamente do método de imobilização escolhido para o bioelemento. A dificuldade de reutilização tem sido um problema recorrente em biossensores baseados, por exemplo, em reações imunológicas, pois a elevada afinidade da ligação antígeno-anticorpo não permite a sua separação após o evento de reconhecimento. Uma técnica referida para o desenvolvimento de imunossensores reversíveis e reutilizáveis emprega sobre um transdutor uma camada antigênica de reconhecimento que, por fotoisomerização, muda de um estado com propriedades antigênicas para outro sem essas propriedades, permitindo o desligamento com o anticorpo e a regeneração do antígeno ativo (WILLNER & WILLNER, 2001). Técnicas como esta, podem ser associadas à tecnologia de microtransdutores eletrônicos visando solucionar o problema da baixa estabilidade na reutilização dos dispositivos (CAMMANN *et al.*, 1991).

1.4.1 Interações

A função de um biossensor pode ser determinada, conforme o tipo de interação que ocorre entre a substância a ser determinada e o bioelemento escolhido para sua detecção

(RICCARDI *et al.*, 2002). A especificidade bioquímica do bioelemento confere ao dispositivo características de seletividade, estocagem e estabilidade, operacional e ambiental. Dependendo do analito vários elementos podem ser utilizados como sensores biológicos. Enzimas, anticorpos, microorganismos, DNA, receptores, organelas bem como células ou tecidos de plantas e animais, são exemplos de bioelementos que podem ser utilizados como sensores biológicos.

Na tentativa de obter sensibilidades mais altas, diversas técnicas de produção são aplicadas, como a aplicação da propriedade de reconhecimento específico de uma estrutura ao seu receptor, receptores individuais ou estruturas receptoras de organismos vivos podem ser imobilizados na superfície de um transdutor (DIAMOND, 1998). Porém o método apresenta desvantagens quanto à instabilidade do isolamento das moléculas receptoras no sistema de imobilização devido a problemas como labilidade e a temperatura (CAMMANN *et al.*, 1991).

Uma outra técnica empregada é a produção de biossensores enzimáticos baseados em oxidoredutases (peroxidases, oxidases e desidrogenases), embora seja limitada devido à instabilidade de muitas enzimas frente a variações de pH, processos inibitórios e temperatura ambiente. O problema tem sido solucionado parcialmente pela utilização de enzimas estáveis obtidas de microorganismos termofílicos e pela refrigeração e secagem a frio. Uma outra alternativa, encontra-se na utilização de microorganismos, que evita as etapas de purificação, e preserva a enzima em seu ambiente natural protegendo-a da inativação por agentes tóxicos externos, tais como, metais pesados, porém o uso de células é limitado devido maior tempo de resposta e pela redução da especificidade quando comparada a biossensores contendo a enzima pura (LUONG *et al.*, 1998; XIAO-HE, *et al.*, 2007).

Já os sensores que se utilizam, da alta seletividade decorrente do reconhecimento molecular dos anticorpos, ou imunossensores, operam através de componentes do sistema imunológico, por exemplo, imunoglobulinas, moléculas de MHC classes I e II e receptores. Um problema recorrente no desenvolvimento destes sensores encontra-se na dificuldade de reutilização, pois a elevada afinidade das ligações não permite a sua separação após o evento de reconhecimento.

Uma outra abordagem com relação aos bioelementos, surge da excepcional especificidade e habilidade inerente às moléculas complementares de DNA para duplicar, ou hibridizar, através do pareamento das bases nucleotídicas presentes nas cadeias. Novas tecnologias de biossensores têm sido intensivamente investigadas tendo em vista promissora rapidez e baixo custo do teste, baseando-se na imobilização de um filamento de DNA em diferentes transdutores físico-químicos que convertem o evento da hibridização num sinal elétrico ou óptico. A técnica pode constituir uma maneira relativamente simples de detectar seqüências marcadas de DNA em determinada amostra. As aplicações para essa tecnologia incluem a identificação de patógenos, monitoração da expressão de genes e diagnóstico de desordens genéticas.

1.4.2 Técnicas de imobilização

O processo de modificação química de um transdutor ou eletrodo necessário para verificação dos sinais de reconhecimento, ocorre essencialmente pela imobilização de uma espécie biológica na superfície do mesmo e é fundamental para a construção e especificidade do biossensor. A escolha do método de imobilização mais apropriado depende fundamentalmente do bioelemento, da natureza da superfície de adesão e do mecanismo de transdução. Além disso, alguns fatores como simplicidade e reprodutibilidade do método de imobilização, visando inclusive a produção do biossensor em larga escala, também devem ser levados em consideração (DIAMOND *et al.*, 1998).

Um dos principais métodos utilizados na construção de biossensores é através da ligação covalente, segundo a qual certos grupos químicos da biomolécula a ser imobilizada não essenciais para sua atividade biológica se ligam a suportes quimicamente ativos. Algumas vantagens deste método são dadas devido a forte ligação do elemento com a matriz, baixa resistência difusional, e estabilidade frente às pelas condições adversas do meio, porém podem comprometer a reutilização do suporte.

Os métodos que não envolvem uma ligação covalente ao suporte, baseados em adsorção, através de forças de Van der Waals, ligações por pontes de hidrogênio ou iônicas, porém apesar de possibilitarem a reutilização da matriz, podem apresentar desvantagens

como ligações não muito estáveis e influenciáveis pelas condições do meio como temperatura e pH. (DIAMOND, 1998)

1.4.3 Utilização da quitosana como molécula imobilizadora

Quitina e quitosana são copolímeros constituídos por unidades de N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina, em proporções variáveis, sendo o primeiro encontrado em maior quantidade na quitina e o segundo na quitosana [$\alpha(1\text{---}4)$ 2-amino-2-dioxi- β -D-glucano]. A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, sendo o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos, sua presença ocorre também em nematóides e na parede celular de fungos e leveduras.

A quitosana (Figura 9) pode ser obtida a partir da quitina através da desacetilação com álcalis sob altas temperaturas, podendo também ser naturalmente encontrada em alguns fungos como aqueles pertencentes aos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes* (SILVA *et al.*, 2006). É uma base fraca com um valor de pKa em torno de 6,2-7,0, do resíduo de D-glucosamina, sendo assim é insolúvel em pH neutro e alcalino. Constitui uma fibra natural, retirada na maioria das vezes de crustáceos como camarão, lagosta e caranguejo, e que possui inúmeras utilidades biotecnológicas, principalmente na área farmacológica, funcionando como componente de carreadores de drogas para a tecnologia de liberação controlada (“drug-delivery”). A quitosana tem sido utilizada na indústria para absorção de gordura, ou ainda no controle de algumas doenças de plantas (WEECHARANGSAN, *et al.*, 2008).

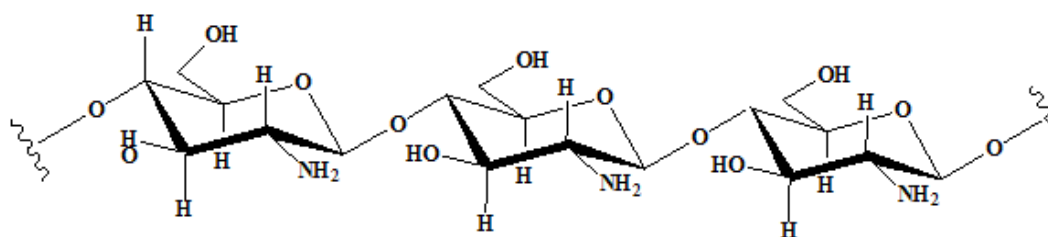


Figura 9: Desenho esquemático da estrutura química da quitosana obtida a partir da carapaça de crustáceos

(Fonte: http://www.eis.uva.es/~macromol/curso05-06/medicina/polimeros_biodegradables/polime5.gif)

As propriedades da quitosana permitem que a mesma seja utilizada como suporte para imobilização de DNA em superfícies de eletrodos de carbono vítreo através da interação eletrostática entre a quitosana policationica e o DNA polianiónico, formando um complexo estável. Após modificação química da superfície de um eletrodo carbono vítreo com quitosana, os grupos amina livres (NH_3^+) presentes no monômeros de quitosana se ligam eletrostaticamente aos grupamentos fosfato (PO_4^-) de uma cadeia de ssDNA nativo ou desnaturado, que se torna imobilizada na superfície do eletrodo (Figura 11).

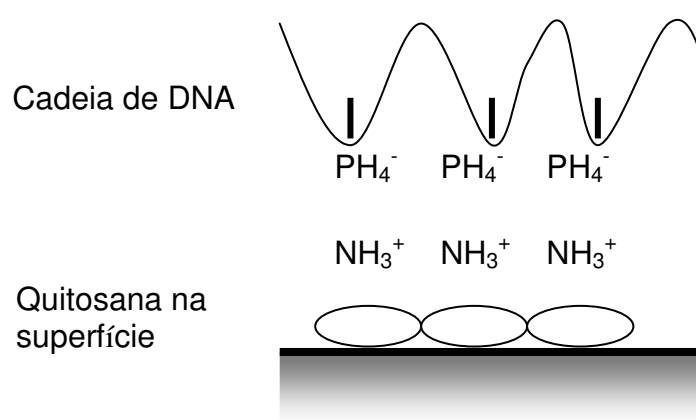


Figura 10: Desenho esquemático da interação entre quitosana e a cadeia de DNA para formação do biossensor de DNA.

Desta forma, uma segunda cadeia de ssDNA complementar e marcada, pode hibridizar com a cadeia imobilizada. A marcação da cadeia complementar pode ser realizada através de substâncias como ferroceno que funciona como um mediador químico o qual promove a transferência de elétrons. Outras substâncias já foram descritas como mediadores de reações redox como o azul de metileno, tetratiofulvaleno, 1,4-benzoquinina, promazina, ácido carboxílico do ferroceno, tornando possível detectar eletroquimicamente a reação de hibridização (TELES, *et al.*, 2007).

Entre as vantagens do uso da quitosana, está o fato desta formar um complexo firme com o DNA o que torna a imobilização bastante estável. Comparado com outros métodos de imobilização de DNA que utilizam monocamada de biotina, o uso de quitosana

não necessita de mercapto-DNA ou biotina-DNA, o que pode reduzir drasticamente os custos de detecção. A detecção de seqüências específicas de DNA do vírus da hepatite B foi realizada através de um biossensor eletroquímico de DNA contendo azul de metileno com indicador da reação de hibridização (MANDONG *et al.*, 2007).

1.4.4 Biossensores de DNA

Biossensores de DNA ou genossensores são dispositivos resultantes da interação entre uma sonda (seqüência específica), usualmente um oligonucleotídeo sintético curto, e um transdutor. A sonda, imobilizada na superfície de um transdutor, age como uma molécula de bioreconhecimento e reconhece o DNA alvo, enquanto o transdutor é o componente que converte o evento de bioreconhecimento em um sinal mensurável. A Figura 11 apresenta como ocorre a hibridização envolvendo a imobilização de uma sonda de nucleotídeo, ligando-se a uma seqüência complementar, um fragmento de DNA alvo (WANG, 2006).

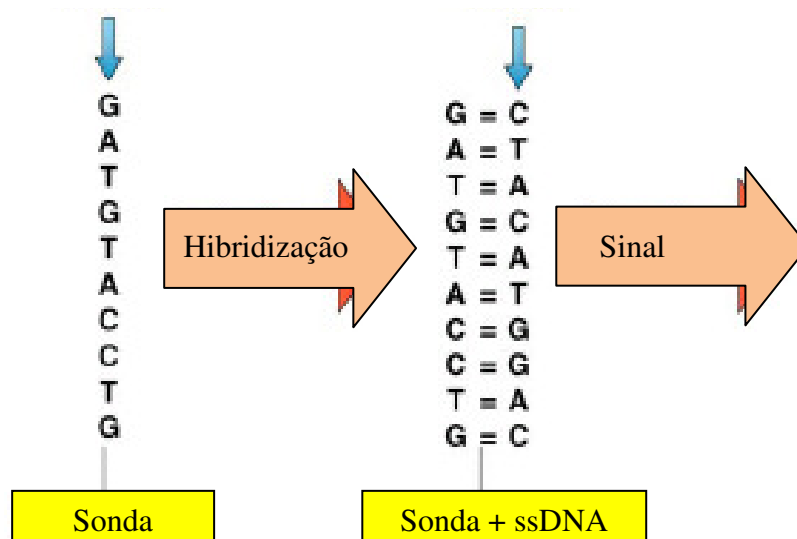


Figura 11: Desenho esquemático das etapas envolvidas na detecção de uma seqüência específica de DNA hibridização utilizando um biossensor eletroquímico de DNA (modificado a partir de WANG, 2006).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para obtenção de biossensores de DNA, e os métodos eletroquímicos e piezoelétricos têm se mostrado bastante atrativos devido a sua simplicidade, baixos custos de instrumentação, possibilidade de reação em tempo real e por geralmente apresentarem alta sensibilidade (LUCARELLI *et al.*, 2008). Os métodos convencionais para análise de seqüências genômicas específicas incluem a detecção direta de ácidos nucleicos ou hibridização, sendo a última mais usada rotineiramente em laboratórios de diagnóstico devido à sua maior simplicidade (PIVIDORI *et al.*, 2000).

A escolha do protocolo de imobilização mais apropriado depende das características do material transdutor, imobilizações químicas fortes são usualmente preferidas de modo a prevenir o desligamento das sondas do suporte. A hibridização de ácidos nucleicos na superfície de um transdutor (suporte sólido) é tanto mais forte e específica quanto maior for o grau de complementariedade entre as bases das duas cadeias que se ligam. A especificidade e estabilidade dessa ligação são máximas quando as duas cadeias são perfeitamente complementares. Entretanto, há uma carência de métodos para sua monitorização contínua da reação de hibridização, além da dificuldade em estimar a exata concentração de ácido nucleico imobilizado (CHAN *et al.*, 1997). O reconhecimento de moléculas incorporadas apresenta um elevado nível de seletividade, mas é vulnerável a condições extremas de variação de temperatura, pH e força iônica. Moléculas biológicas tais como enzimas, anticorpos e DNA podem ser fixados a uma matriz (WANG, 2006).

A atividade de moléculas imobilizadas depende da área superficial, porosidade, caráter hidrofílico da matriz imobilizadora, condições de reação e metodologia escolhida para a imobilização. As técnicas de imobilização de bioelementos normalmente utilizadas para desenho e desenvolvimento de biossensores são: adsorção, “entrapment”, “cross-linking” e ligação covalente (WANG, 2006).

O evento de hibridização é detectado por alguns indicadores, entretanto a forma mais atrativa de detecção é baseada em mudanças de eletroatividade na fita dupla de DNA após hibridização. Para tanto, drogas ou intercalantes de bases podem se inserir na dupla fita do DNA, gerando uma mudança eletroquímica no sistema que pode ser captada através de equipamentos transdutores (STEMPKOWSKA *et al.*, 2007). A maior parte dos métodos

se baseia na imobilização de fragmentos curtos de DNA de oligodeoxinucleotídeos na superfície de óxidos de metais, carbono vítreo ou polímeros (WANG *et al.*, 1998)

Grande parte dos biossensores com DNA são baseados na determinação de picos de oxidação de purinas, principalmente o pico da guanina ou guanosina, para monitorar o grau de danos oxidativos causados pelo DNA (Figura 12).

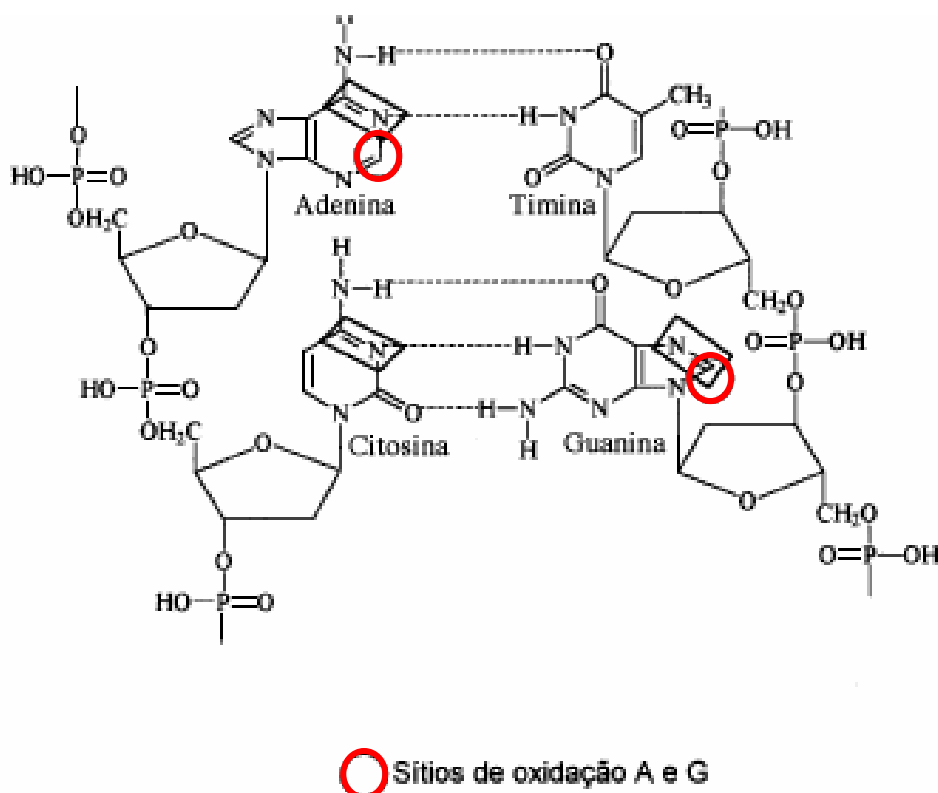


Figura 12: Desenho esquemático de um fragmento de DNA dupla fita evidenciando os sítios de oxidação das bases Adenina e Guanina (aro em vermelho).

Picos de guanina de decâmeros contendo quatro resíduos de guanina são movidos em torno de 20mV para potenciais mais negativos comparados com uma cadeia com dois resíduos de guanina. Sinais de guanina e adenina são influenciados pela estrutura do DNA e esta propriedade é usada na detecção de danos no mesmo (STEMPKOWSKA *et al.*, 2007). Alguns artigos relatam que derivados das bases timina e citosina são oxidados eletroquimicamente em eletrodos de carbono, mas eles geram respostas em altos potenciais

positivos, com altos valores de pH e apenas em condições específicas, com o uso de sonovoltametria. A detecção de bases pirimidicas é possível apenas quando as mesmas se encontram em altas concentrações, cerca de dez vezes maiores do que concentrações de bases purínicas (DICULESCU, *et al.*, 2005).

Alguns aspectos das fases pré-analítica e analítica da reação devem ser observados, como o pré-tratamento específico das amostras pode ser usado para aumentar o campo de eventos de hibridização e conseqüentemente a sensibilidade da detecção. Muitos protocolos requerem que as amostras sejam previamente tratadas antes da hibridização. Os tratamentos incluem: a redução da complexidade da amostra, a separação de possíveis moléculas interferentes, a geração de uma marcação na fita simples de DNA e a ruptura de estruturas secundárias termodinamicamente estáveis, que podem inibir o processo de reconhecimento na interface. Entretanto, a premissa mais comum no pré-tratamento das amostras está relacionada ao tamanho da sonda, que deve ser o mais curto possível de modo a não prolongar o processo analítico (LUCARELLI *et al.*, 2008).

1.4.5 Azul de Metileno como mediador químico

Mediador químico é um composto redox de baixo peso molecular que tem por principal função promover a transferência de elétrons entre o centro redox de um composto e a superfície do eletrodo de trabalho. A taxa de redução do mediador é medida amperometricamente através de sua oxidação no eletrodo, o mesmo deve estar firmemente ligado ao eletrodo, de tal modo que o mantenha eletroquimicamente ativo e capaz de reagir com o bioelemento (Turner *et al.*, 1989)

O azul de metileno (AM), corante orgânico redox fenotiazínico descoberto por Heinrich Caro em 1876, tem recebido uma considerável atenção quanto a sua utilização como indicador redox (Figura 13).

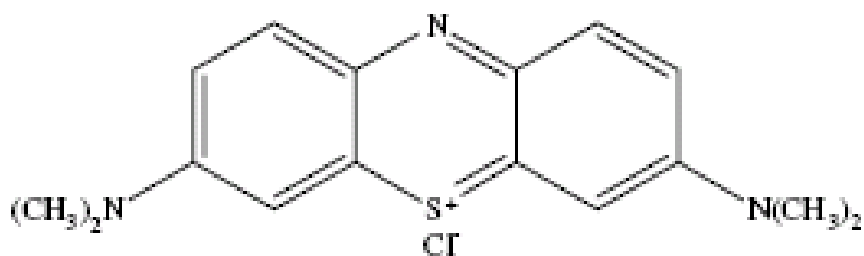


Figura 13: Desenho esquemático da estrutura química do azul de metileno (Modificado a partir de WANG *et al.*, 2005).

Devido às suas propriedades fotoquímicas, têm sido desenvolvidos estudos visando sua aplicação na inativação de bactérias e vírus, em células fotogalvânicas e, mais recentemente, na preparação de eletrodos quimicamente modificados. Foi descrito por Yang *et al.* (2002), a interação entre o azul de metileno e as bases de guanina presentes em um eletrodo modificado com DNA, alternando seqüências de bases de guanina e citosina. (KARA *et al.*, 2002). A detecção da hibridização é realizada pela imersão do eletrodo modificado com DNA (cadeia simples), de seqüência de bases conhecida, na solução do polinucleotídeo a ser detectado. Após hibridização, o eletrodo é transferido para outro compartimento contendo AM como indicador de hibridização. A eletroatividade do AM é detectada através da sua interação com as guaninas livres. Tal interação têm sido descrita como eletrostática, entretanto o mecanismo exato ainda não foi interpretado de forma significativa (WANG, 2007). A hibridização pode ser constatada por meio da variação dos valores de corrente ou potencial, medida por cronopotenciometria ou voltametria (cíclica ou de varredura linear). Estas alterações são produzidas devido ao comportamento eletroquímico do AM frente ao DNA híbrido formado (MADONG *et al.*, 2007; LASCALEA *et al.*, 1999).

1.4.6 Transdutores

A reação que ocorre entre o DNA imobilizado e o DNA alvo acoplado ao mediador químico é traduzida em corrente elétrica pelo transdutor. De acordo com o transdutor

utilizado, o biossensor pode ser classificado como eletroquímico (potenciométrico, amperométrico e condutimétrico), óptico (medida de luminescência, fluorescência, elipsimetria, etc.), detector de massa (relaciona a oscilação da frequência dos cristais piezoelétricos com variação da massa).

Uma vez que o DNA alvo foi capturado na superfície de um sensor, muitas são as formas de transdução do evento de bioreconhecimento. Uma das características mais atrativas do sensor eletroquímico e piezoelétrico é promover uma potência eletrônica direta, utilizando equipamentos de transdução de sinal, compactos e com custos relativamente razoáveis (LUCARELLI *et al.*, 2008).

Os transdutores são aparelhos eletrônicos que, uma vez ligados ao suporte de imobilização de um biossensor, convertem uma variação físico-química provocada pela reação biológica ou bioquímica, em sinal elétrico que é transferido para um detector. Os transdutores podem ser classificados em: eletroquímicos (amperométricos, condutimétricos e potenciométricos), térmicos, ópticos ou baseados em variações de massa (piezoelétricos). Apesar dessa variedade, os três tipos principais de transdutores que apresentam potencialidades para aplicações comerciais são: os eletroquímicos, os piezoelétricos e os ópticos (TELES, 2006).

Os transdutores piezoelétricos são aqueles que utilizam materiais naturais ou artificiais, como quartzo, turmalina e sulfato de lítio, que geram carga elétrica quando submetidos a uma deformação, esta é a chamada propriedade piezoelétrica. Os cristais quando sujeitos a estresse mecânico polarizam-se, provocando a vibração do cristal com uma frequência oscilatória fixa, a qual depende da composição, da espessura e do ângulo de corte do cristal. O princípio de funcionamento de biossensores piezoelétricos baseia-se no fato de a frequência de ressonância de um cristal normalmente diminuir quando o analito se liga especificamente à molécula imobilizada na superfície do cristal (CHANG AND CHEN, 2008; SILVA, 2004; DIAMOND, 1998).

Os transdutores ópticos são baseados em alterações de propriedades ópticas de algumas substâncias em resposta à reação bioquímica para detecção do analito. Como em reações luminescentes o produto de interesse é a luz, esta pode ser detectada através de fibra óptica. Este é um dos fundamentos mais convenientes para transdutores utilizados no desenvolvimento de biossensores baseados em bioluminescência e quimiluminescência.

Bioluminescência, emissão de luz por organismos vivos, é um caso especial de quimioluminescência onde uma proteína, geralmente uma enzima (luciferase), está envolvida. A luz captada em uma fibra óptica pode ser monitorada em uma determinada propriedade como absorbância, fluorescência, atividade óptica ou luminescência. Quando a luz incide em uma amostra biológica, as moléculas da amostra absorvem certos comprimentos de onda, dependendo do número e tipo de moléculas presentes, em seguida, é medido o espectro de luz dispersa ou que atravessa a amostra, e comparado com um sinal de calibração, de modo a determinar a concentração do analito (SETHI, 1994).

Para a utilização comercial em biossensores, os transdutores mais utilizados são os eletroquímicos, nos quais são observadas mudanças ocorridas nas propriedades elétricas de uma solução. O princípio de funcionamento dos transdutores amperométricos é o emprego da medida do fluxo de corrente elétrica produzida em uma célula eletroquímica sob um potencial elétrico fixo, sendo a corrente gerada por reação redox na superfície sensível, proporcional à concentração do analito quando em contato com a camada de reconhecimento biológico (WANG *et al.*, 1999). Os potenciométricos estão relacionados ao potencial de oxido-redução da reação eletroquímica e os condutimétricos, estão relacionados à variação da magnitude da condutância elétrica da solução química em análise (RICCARDI *et al.*, 2002; WILSEY, 2003).

Os transdutores amperométricos operam por aplicação de um potencial constante entre os eletrodos de trabalho e referência, sendo medida a corrente resultante da reação redox do analito. Enquanto a potenciometria descreve o sistema eletroquímico no equilíbrio, isto é na ausência de corrente, a amperometria desloca esse equilíbrio e relaciona o número de elétrons transferidos, ao longo da interface eletrodo\solução, com a concentração do analito, medindo a velocidade da reação redox. A corrente gerada pelo potencial aplicado, resulta da transferência eletrônica entre o eletrodo de trabalho e a solução eletrolítica e é diretamente proporcional à concentração das espécies eletroativas.(SETHI, 1994 ; DIAMOND, 1998).

Algumas técnicas amperométricas podem ser utilizadas, tendo em vista possibilidade de análise qualitativa de um analito. Para este fim, têm sido amplamente utilizadas a voltametria cíclica, que consiste na aplicação de uma rampa linear de potencial sucessivamente crescente e decrescente (ou vice-versa), e a voltametria de pulso, na qual

após a manutenção do potencial em um certo valor, este é instantaneamente aumentado e em seguida novamente mantido, sendo a corrente verificada ao fim de um tempo ideal escolhido de modo a otimizar o processo (DIAMOND, 1998). O equipamento necessário para uma análise voltamétrica é essencialmente formado por uma célula eletroquímica, na qual os eletrodos são imersos em solução eletrolítica, e um potenciostato, aparelho eletrônico que controla o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho e permite medir a corrente que o atravessa (SILVA, 2004)

II. JUSTIFICATIVAS

O câncer do colo do útero tem sido um tema de constante preocupação governamental devido à elevada incidência, principalmente nas regiões mais pobres do Brasil e do mundo. Devido às dificuldades relacionadas à detecção do vírus e tendo em vista que os métodos disponíveis são limitados e de alto custo, um número considerável de mulheres infectadas são acometidas por lesões iniciais que acabam evoluindo para um carcinoma cervical invasivo. Dentro deste contexto, surge a possibilidade de desenvolvimento de um biossensor capaz de detectar a presença do vírus em uma determinada amostra biológica, permitindo a seleção de terapia adequada, precocemente à evolução das lesões.

Devido a sua sensibilidade, modernos sensores eletroquímicos de bioafinidade como os de DNA, enzimáticos e imunológicos vêm sendo descritos como promissores no auxílio do diagnóstico do câncer. Atualmente ainda não foi descrito um biossensor com todas as características de idealidade, entretanto, os biossensores têm sido amplamente aplicados em diagnósticos clínicos laboratoriais, apresentando confiabilidade e coerência nos resultados. Apesar disso, o alto custo dos dispositivos ainda limita a utilização do método em sistemas de saúde pública. A técnica de impressão surge como perspectiva para a resolução desta problemática, uma vez que não necessita de equipamentos dotados de alta complexibilidade tecnológica para sua execução, reduzindo significativamente os custos de produção dos biossensores, e conferindo vantagens para aplicações clínicas. Um genossensor de detecção do Papillomavírus Humano permitirá a realização de diagnósticos de forma simples, eficaz, segura e de baixo custo, através de dispositivos de alta sensibilidade e especificidade e eventualmente portáteis, permitindo o manuseio em consultórios médicos e o transporte para unidades de atenção básica à saúde.

III. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de um biossensor de DNA para utilização no diagnóstico do Papilomavírus Humano através de dispositivos (TIPs) portáteis constituídos de eletrodos de tinta de carbono modificados com quitosana, produzidos através de técnica de impressão sob uma superfície formada por tiras de polivinil álcool (PVA).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenvolver um protocolo de utilização dos TIPs;
2. Imobilizar seqüências de DNA no eletrodo de trabalho modificado com quitosana;
3. Detectar a reação de hibridização entre a amostra e a cadeia complementar através de sinais produzidos pela interação com o azul de metileno;
4. Detectar os sinais eletroquímicos da reação de hibridização através de Voltametria de Pulso Diferencial;
5. Demonstrar graficamente os sinais obtidos através das variações na hibridização do DNA
6. Utilizar amostras clínicas para verificação da sensibilidade do biossensor.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS GENES E6 DE HPV-18 E E7 DE HPV-16

O gene E6 de HPV-18 foi amplificado através de reações em cadeia da polimerase (PCR) a partir do plasmídeo pGEM.E6Nde, enquanto que para amplificação do gene E7 do HPV-16 foi utilizado plasmídeo pGEM.E7Nde, ambos a 100µg/µl. Os oligonucleotídeos utilizados na reação estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Sequência e características dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene E6 de HPV-18 e E7 de HPV-16.

Oligos	Sequência	Fornecedor	Características
Oligo 1 FE6 (Sense)	5' GGT ACC ATG GCG CGC TTT GA 3'	INVITROGEN	100pmoles/ µl, Tm 64°C
Oligo 2 RE6 (Anti-sense)	5' GGG CCC TAC TTG TGT TTC TCT 3'	INVITROGEN	100 pmoles/µl, Tm 64°C
Oligo 3 FE7 (Sense)	5' GAA TTC ATG CAT GGA GAT ACA CC 3'	INVITROGEN	100pmoles/ µl, Tm 66°C
Oligo 4 RE7 (Anti-sense)	5'TCT AGA TTA TGG TTT CTG AG 3'	INVITROGEN	100 pmoles/µl, Tm 54°C

A amplificação (Oligo 10 pmoles; MgCl 50 µM; Tampão 1x; dNTP 2,5 mM; Platinum Taq 2,5 U; H₂O Milli-Q para completar 25 µl) foi realizado em Mastercycler Eppendorf (Gradient) sob as seguintes condições representadas na **Tabela 3**.

Tabela 3: Ciclos de realização das reações de PCR no aparelho Mastercycler Eppendorf.

Ciclo Mastercycler Gradient
1°) 1 min à 95°C; 2°) 30 seg à 95°C; 3°) 20 seg à TM 4°) 1 min à 72°C; 5°) Go to 2° 40x; 6°) 1 min à 72°C 7°) 4°C ∞;

Os produtos de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose à 0,8%. As amostras foram misturadas a uma solução de Stop mix (azul de bromofenol 0,5%, EDTA pH 8,0 100nM e glicerol 50%) e comparados ao padrão Ladder Kb Plus (50ng/μl) (INVITROGEN). O gel foi visualizado em transiluminador com auxílio de um intercalador de DNA brometo de etídio (5μg/ml).

4.2 PURIFICAÇÃO DOS GENES

Uma vez obtidos os genes E6 e E7, o fragmento correspondente ao gene foi purificado a partir do gel de agarose utilizando colunas filtrantes do Kit Wizard DNA Gel and PCR products purification (Promega). O resultado da purificação foi visualizado em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, irradiado em transiluminador e fotodocumentado.

4.3 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

O software CLC Combined Workbench 3.6.1 foi utilizado para busca de sítios de hibridização dos oligos ao genoma de diferentes tipos de HPV. Foram utilizados os genomas dos 11 HPVs com genomas disponíveis no banco de dados local do grupo Prospecmol (Grupo de Prospecção Molecular e Bioinformática), obtidos a partir do site NCBI. Os oligos 1 e 2 foram testados com auxílio da ferramenta “Find Binding sites on sequence” que permite ao usuário determinar os parâmetros de hibridização, número de *mismatches* e número de bases consecutivas na região 3’

4.4 AMOSTRAS CLÍNICAS

As amostras clínicas foram cedidas pelo setor de virologia do Laboratório de Imunopatologia Keiso Azami – Universidade Federal de Pernambuco. Sendo as mesmas,

obtidas a partir da extração do DNA contido em células provenientes de raspados do colo do útero e avaliadas quanto à presença do genoma viral através de técnica de RFLP.

4.5 CONSTRUÇÃO DOS BIOSSENSORES

Os biossensores foram construídos na forma de tiras (TIPs) de polivinil álcool (PVA), sendo a área dos mesmos calculada e adaptada segundo a metodologia descrita por Mandong *et al.*, e disposta de acordo com a figura 14:

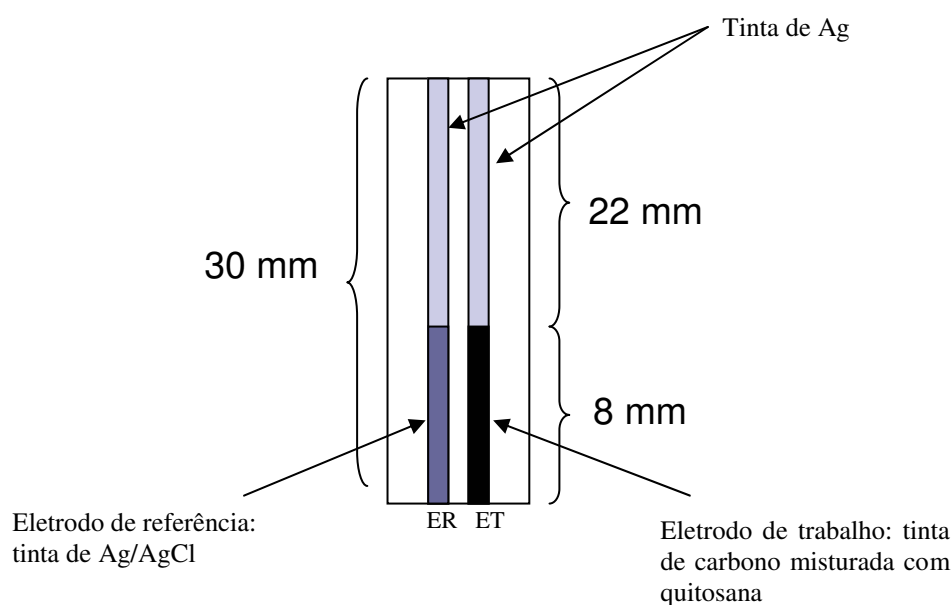


Figura 14: Área superficial de um TIP, evidenciando os eletrodos de referência e eletrodo de trabalho.

As linhas condutoras dos TIPs foram impressas na superfície com Tinta de Prata (ACHENSON) e secas em estufa a 60 °C por 30 min. O eletrodo de referência (ER) foi impresso com tinta de Ag/AgCl (ACHENSON). E para a impressão do eletrodo de trabalho (ET), foi preparada uma mistura de tinta de carbono com 5% peso/volume de quitosana, extraída de carapaça de camarão, produzida pelo Prof^o Ranilson, pesquisador do Laboratório de Enzimologia do Departamento de Bioquímica da UFPE. Os TIPs foram

novamente secos em estufa a 60°C, por 30 min. Em seguida, a área do eletrodo de trabalho foi lavada com solução de acetato de sódio 2% e os TIPs armazenados em dessecador. A impressão foi realizada na sequência demonstrada na figura 15:

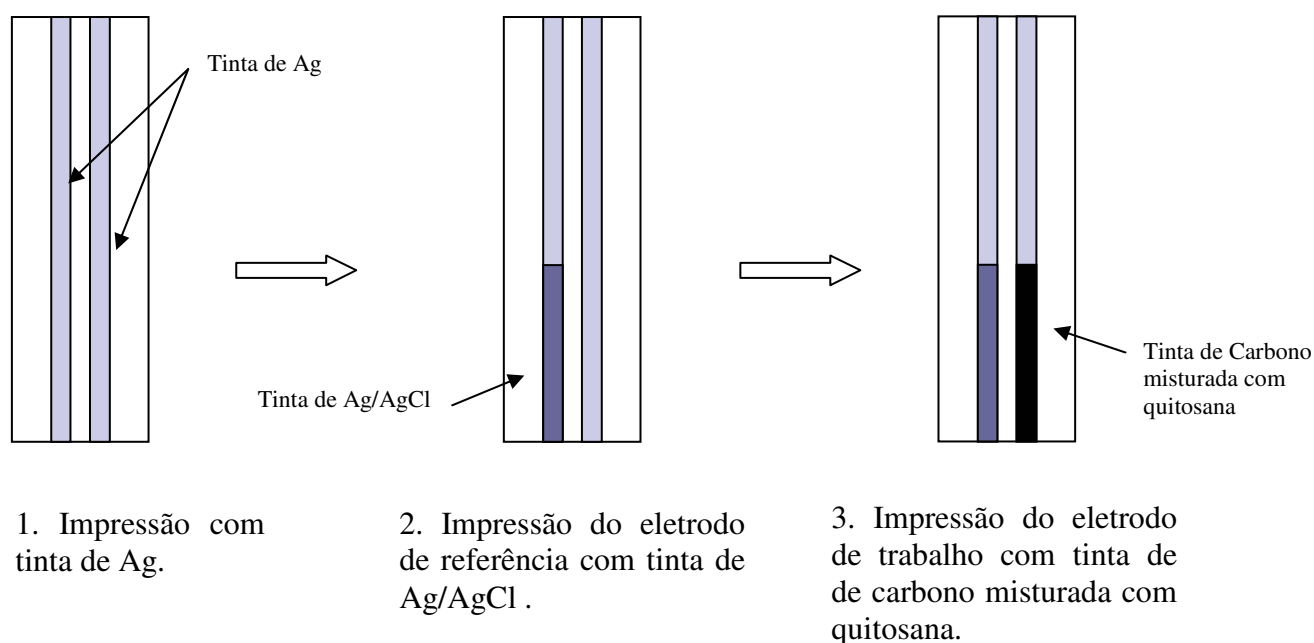


Figura 15 : Demonstração das etapas de construção do TIPs.

4.6 PROCEDIMENTO DE UTILIZAÇÃO DOS TIPs

Cada TIP foi inicialmente lavado com água ultrapura, em suas superfícies foram colocados 0,75µl [75 pmoles] de cada um dos oligos 1 e 2. Os TIPs foram deixados a 22°C por 30 min e posteriormente foram realizadas 3 lavagens em tampão fosfato (NaCl 0,3 mM, tampão fosfato salino 10 mM pH 7,0). O gene E6 do HPV-18 foi desnaturado sob incubação a 94°C por 3 min em aparelho Mastercycler Gradient. 1,0 µl deste material foi depositado na superfície do eletrodo de trabalho e incubado por 15 min a 22°C para a reação de hibridização. Em seguida, o TIP foi lavado em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,0

por 10 seg, para remoção do DNA não hibridizado. Como indicador de hibridização, na superfície do ET foram colocados 2,0µl de solução de azul de metileno (Azul de Metileno 20mM com 20mMde NaCl) e aguardado um tempo de 5 min sem a aplicação de nenhum potencial. Após esta etapa, o TIP foi lavado em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,0 por 5 seg e imediatamente encaminhado para verificação dos sinais. Todos os procedimentos foram realizados a temperatura de 22°C.

4.7 DETECÇÃO DOS SINAIS DE HIBRIDIZAÇÃO

Os sinais eletroquímicos do azul de metileno foram verificados através de Voltametria de Pulso Diferencial em equipamento Potenciostato AUTOLAB com o *software* GPES, versão 4.9. Cada TIP foi acoplado a um suporte de acrílico desenvolvido e adaptado, de modo a acoplá-lo facilitando a sua imersão em uma célula eletroquímica contendo 6ml de tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,0. Foi aplicada uma varredura de potenciais entre -4,0 e 0,0 , com amplitude de 10 mV e *scan rate* de 20mV/s. Os gráficos foram construídos e repetidos em intervalos de 30 segundos e em seguida plotados sob uma mesma escala utilizando o *software* Sigma Plot.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

OBTENÇÃO DOS GENES E6 DE HPV-18 E E7 DE HPV-16

O gene E6 de HPV-18 foi amplificado e purificado, sendo visualizado em corrida eletroforética sob a forma de um fragmento bem definido, situado na faixa de 500 pares de bases correspondente a região de interesse do genoma viral, previamente analisado na base de dados NCBI, e livre de regiões inespecíficas, como demonstrado na figura 16.

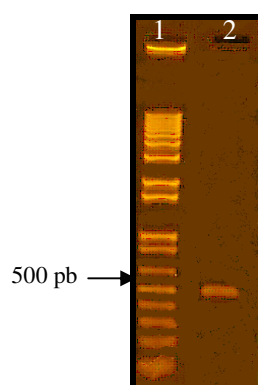


Figura 16: Corrida eletroforética em gel de agarose 0,8%. Linha 1: Padrão 1 Kb Plus (INVITROGEN), Linha 2: gene E6 HPV-18.

Os processos de amplificação e purificação foram também realizados para a obtenção de uma sequência não complementar aos oligos imobilizados, correspondente ao gene E7 do HPV-16. A amostra foi visualizada em corrida eletroforética, estando o gene situado na faixa de 300 pares de bases, como verificado na base de dados do NCBI (Figura 17).

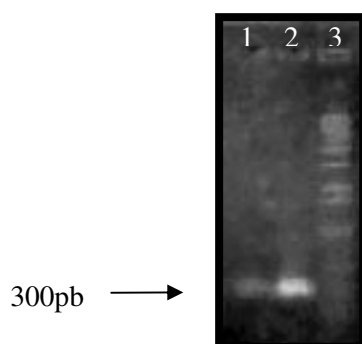


Figura 17 : Gel de agarose 0,8%, evidenciando duas amostras de produtos de PCR. Linhas (1 e 2) Amplicon E7 de HPV-16, (3) Padrão 1 Kb Plus (INVITROGEN).

Os oligonucleotídeos 1 e 2 utilizados no processo de amplificação do gene E6 de HPV-18 foram utilizados para produção do biossensor amperométrico para detecção do HPV. O gene E6 amplificado foi utilizado como controle positivo, enquanto que o gene E7 de HPV-16 foi utilizado como sequência não complementar.

ANÁLISE DE RESPOSTA DO BIOSENSOR CONTENDO 2 OLIGOS

No processo de análise, cada TIP foi imerso em uma célula eletroquímica contendo tampão Tris-HCl. Para facilitar a imersão foi desenvolvido um suporte de acrílico, no qual o TIP foi acoplado e seus eletrodos conectados ao potenciostato para análise da VPD (Figura 18).

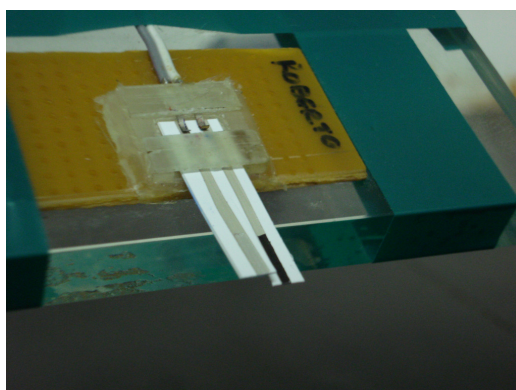


Figura 18: Foto do suporte de acrílico utilizado para acoplar um TIP e seus eletrodos devidamente conectados.

Após a preparação do eletrodo com Ag/AgCl e pasta de carbono, foram realizados testes de resposta do biossensor frente a diferentes sequência virais. Para tanto, foram considerados o conteúdo de cada TIP e a presença do mediador químico, de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4: Condições de utilização dos TIPs produzidos de acordo com o bioelemento imobilizado na superfície e a amostra de hibridização.

TIPs	Conteúdo
Tipo 1	Sem material genético, apenas com AM
Tipo 2	Contendo os oligos 1 e 2 com AM
Tipo 3	Contendo os oligos 1 e 2, o gene E6 HPV-18 e o AM
Tipo 4	Contendo os oligos 1 e 2, o gene E7 HPV-16 e o AM

A cada teste realizado, um TIP T1 foi selecionado para controle, não sendo depositado sobre o mesmo nenhum material genético, mas apenas o mediador químico AM. Nos demais TIPs foram imobilizados, através da interação com a quitosana presente na superfície do ET, os oligos 1 e 2, específicos para o gene E6 do HPV-18. O oligo 1 apresenta 7 guaninas em sua composição, que estão disponíveis para a atividade do AM, enquanto que o oligo 2 apresenta 5 guaninas presentes. A adição de seqüências de ssDNA de E6 de HPV-18 e E7 de HPV-16 resultou em diferentes respostas (Figura 19). Ao ser adicionada a seqüência complementar E6 do HPV-18 no TIP T3, foi possível verificar um acúmulo de AM traduzido graficamente por um pico máximo de corrente na ordem de $2\mu\text{A}$. O diferencial de corrente observado entre o biossensor apenas contendo os oligos e com a seqüência alvo da E6 de HPV-18 foi de $1,0\mu\text{A}$. Este comportamento evidencia a reação de hibridização, uma vez que as seqüências imobilizadas são capazes de anelarem com a seqüência do gene depositada na superfície do ET. Todos os picos foram observados na faixa de potencial entre -0,3 e -0,2V.

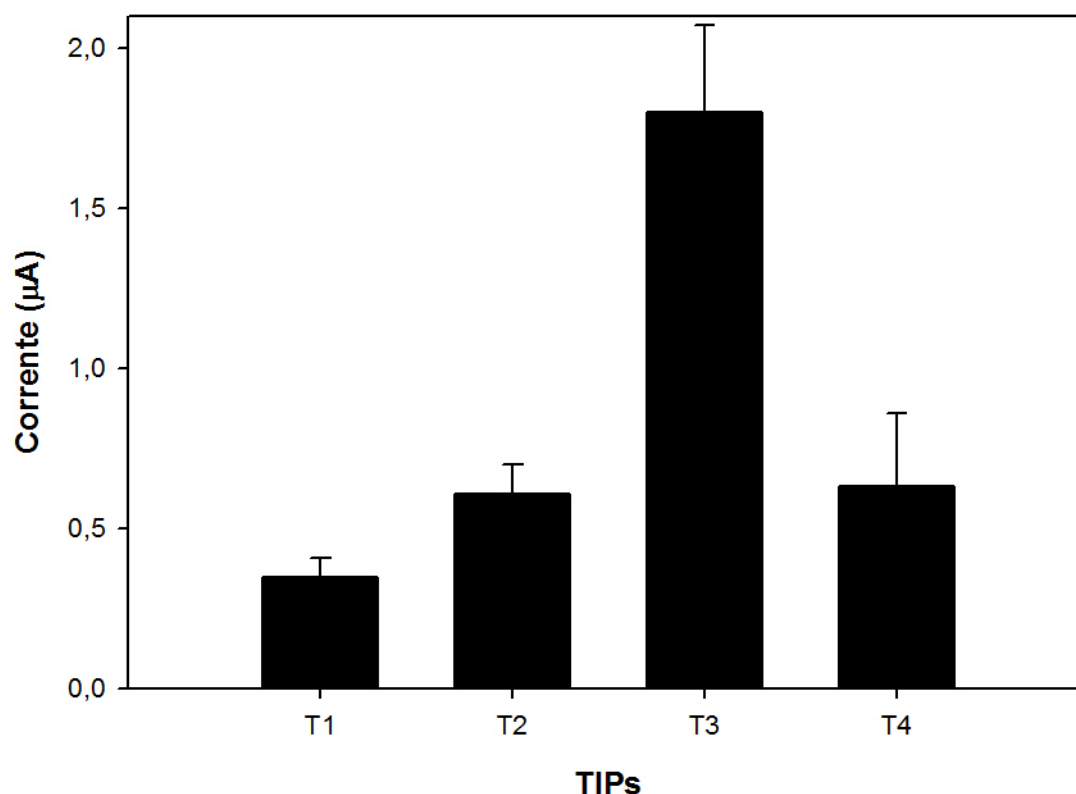


Figura 19: Análise gráfica dos picos de VPD utilizando quatro diferentes condições: (T1) TIP com quitosana e azul de metileno; (T2) TIP com oligos 1 e 2 aderido à superfície de quitosana e adicionado azul de metileno; (T3) TIP contendo oligos 1 e 2 imobilizados em quitosana adicionado da sequência amplificada do gene E6 de HPV-18 e do azul de metileno; (T4) TIP contendo oligos 1 e 2 imobilizados em quitosana adicionado da sequência amplificada do gene E7 de HPV-16 e do azul de metileno.

Também é possível observar a redução dos sinais nos eletrodos contendo a sequência não complementar E7 HPV-16, que apesar da capacidade de anelamento em algumas bases, não evidencia sinais significativos quando comparado aos sinais de hibridização do gene E6 do HPV-18, cujos oligos imobilizados são específicos.

Visando determinar a eletroatividade da reação de hibridização isenta de mediador químico, alguns testes foram realizados na ausência do mesmo, onde nenhum sinal foi verificado. Isso demonstra a atividade do AM e os sinais evidenciados proporcionalmente ao seu acúmulo nas reações.

ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA DAS SEQUÊNCIAS UTILIZADAS

Visando estabelecer um melhor desempenho do biossensor a baixo custo foi realizada uma análise de resposta do biossensor com os oligos 1 e 2 imobilizados *in silico* sobre a sequência de DNA do HPV-18 (Figura 20). Tais estudos revelaram que o oligo 1 é capaz de hibridizar em 16 diferentes regiões dentro do genoma viral, com complementariedade entre 9 e 10 bases, exceto uma das possibilidades que apresentou apenas 3 bases complementares. A hibridização *in silico* utilizando o oligo 2 resultou em reconhecimento e apenas 11 regiões do genoma viral, com complementaridade variando de 6 a 11 bases.

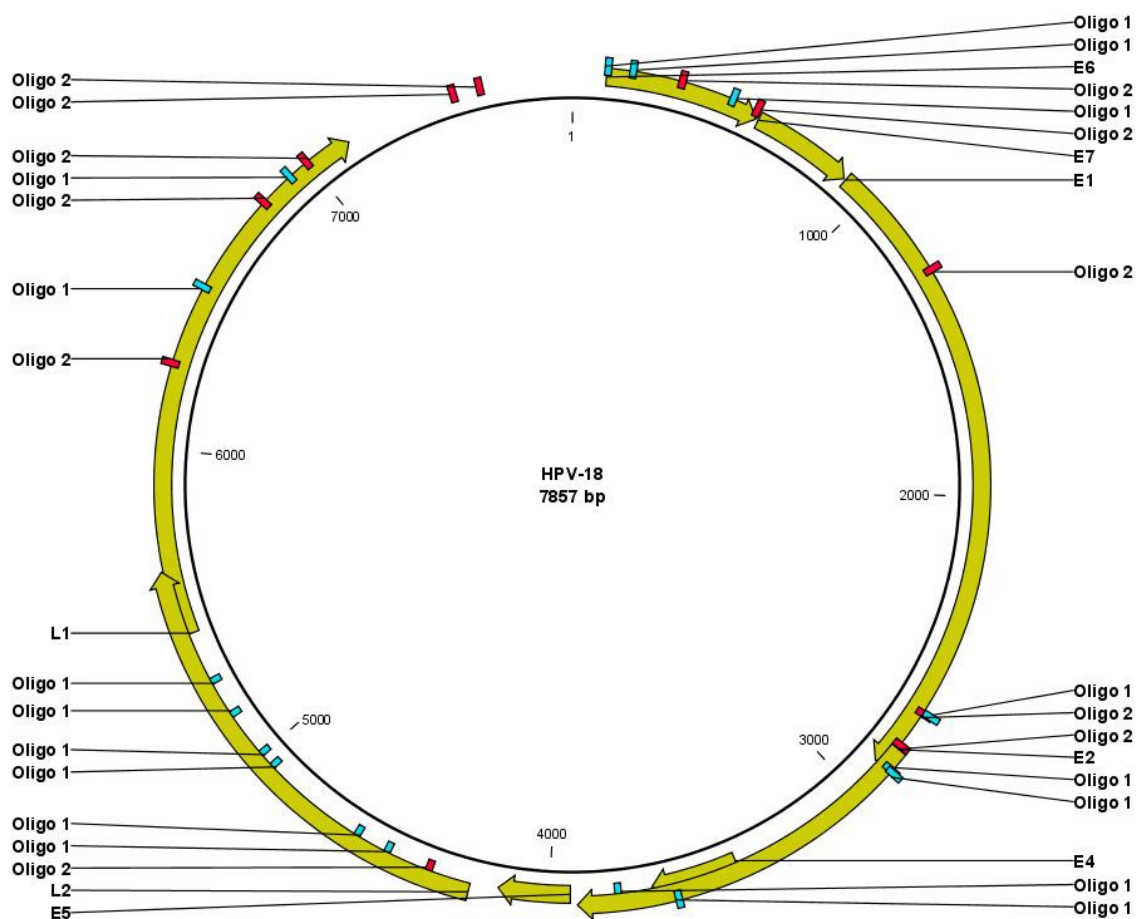


Figura 20: Desenho esquemático apresentando os sítios de hibridização do oligo 1 (barras em azul) e do oligo 2 (barras em vermelho) em relação a sequência viral do HPV-18.

Considerando as possibilidades de anelamento de ambos os oligos em outros tipos virais, foram realizados testes *in silico* utilizando seqüências dos tipos de HPV de alto risco mais encontrados em amostras clínicas de pacientes infectados. Foram utilizados os genomas dos 11 HPVs que correspondem a mais de 90% dos casos de infecção por HPV tanto para baixo quanto para alto risco ao câncer do colo do útero. Estes genomas estavam disponíveis no banco de dados local do grupo Prospecmol (Grupo de Prospecção Molecular e Bioinformática).

O oligo 1 foi capaz de hibridizar em 108 regiões enquanto que o oligo 2 apresentou potencial de anelamento com 158 diferentes regiões dos HPV analisados (Tabela 5).

Tabela 5: Lista de tipos virais analisados quanto a possibilidade de hibridização dos oligos 1 e 2 frente as seqüências gênicas virais.

Tipo viral	Hibridização do oligo 1	Hibridização do oligo 2
HPV-06	10	10
HPV-11	6	16
HPV-16	7	13
HPV-18	15	11
HPV-31	9	14
HPV-33	11	9
HPV-43	10	21
HPV-44	12	16
HPV-45	7	14
HPV-55	10	15
HPV-59	11	19

Desta forma, os testes posteriores foram realizados apenas com a imobilização do oligo 1 que apresentavam maior poder de hibridização com o HPV-18 e menor números de regiões de anelamento em 9 dos outros 10 HPVs testados. A figura 21 apresenta as 15 possibilidades de hibridização apenas do oligo 1 em relação ao HPV-18.

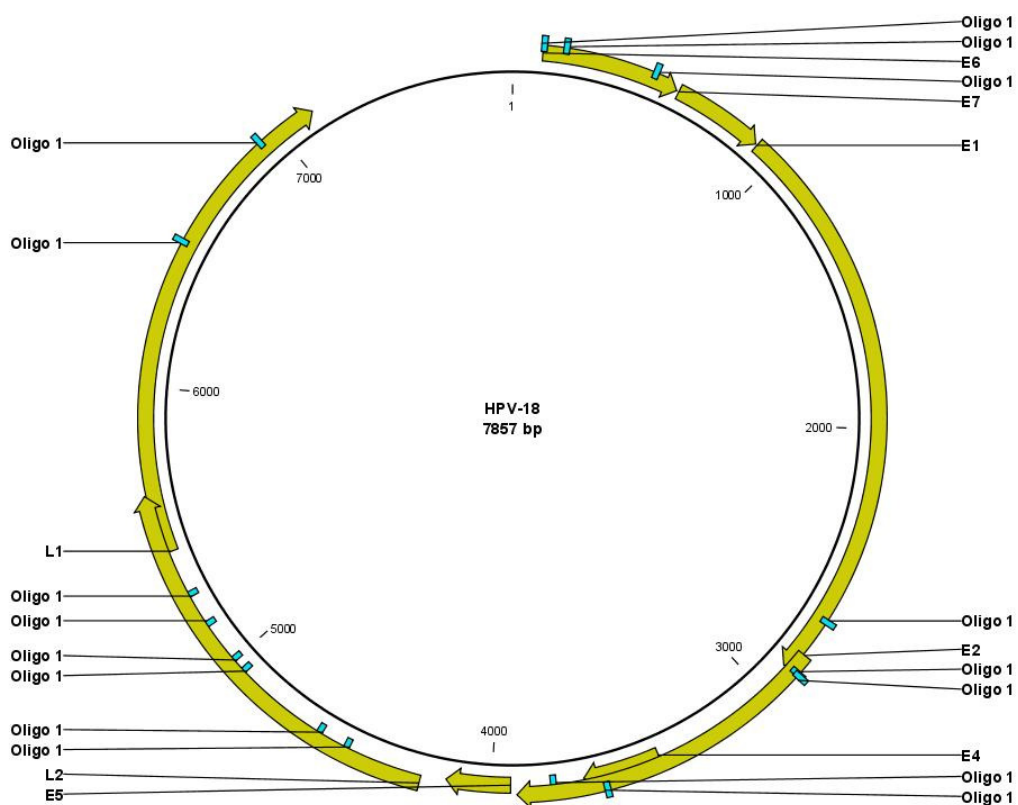


Figura 21: Desenho esquemático apresentando os sítios de hibridização do oligo 1 (barras em azul) em relação a sequência viral do HPV-18.

A aplicação de um único oligo na superfície do ET além de permitir reduzir os ruídos causados por interferente, pode possibilitar a redução dos custos de materiais.

ANÁLISE DE RESPOSTA DO BIOSENSOR COM AMOSTRAS LABORATORIAIS

TIPs contendo apenas com o oligo 1 foram produzidos para realização de testes de emissão de resposta do biossensor. Os resultados demonstrados na Figura 22 foram reproduzidos sucessivas vezes apresentando as mesmas características gráficas.

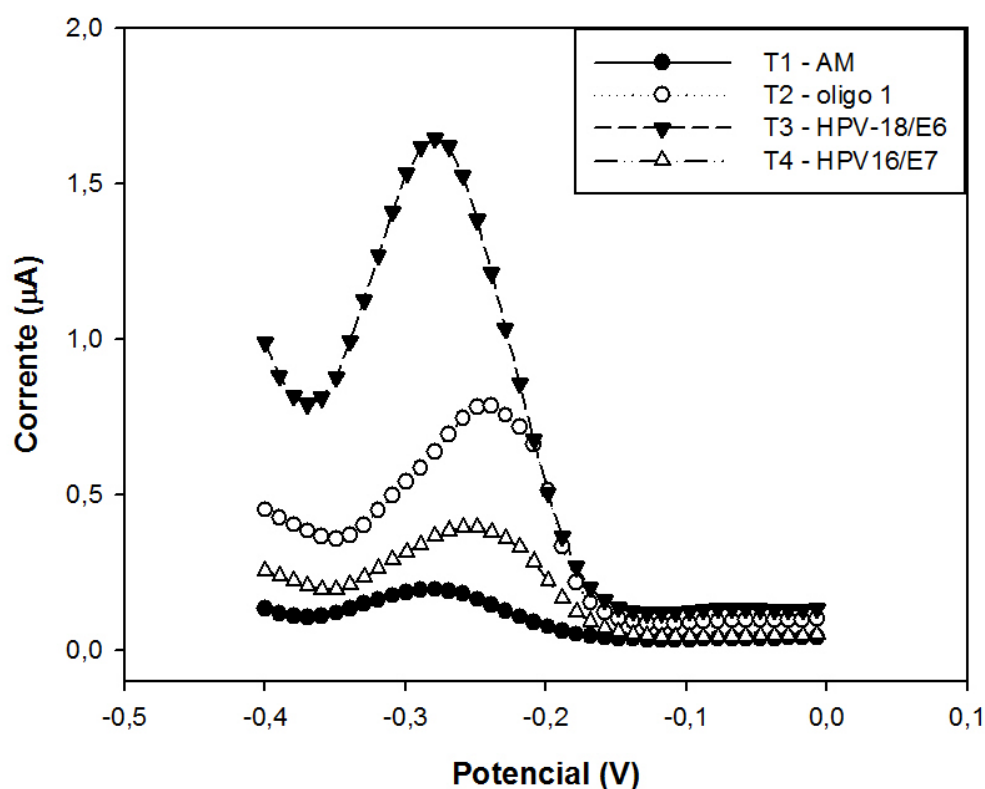


Figura 22: Análise gráfica das curvas de VPD utilizando quatro diferentes condições: (T1) TIP com quitosana e azul de metileno; (T2) TIP com oligo 1 aderido a superfície de quitosana e adicionado azul de metileno; (T3) TIP contendo oligo 1 imobilizado em quitosana adicionado da sequência amplificada do gene E6 de HPV-18 e do azul de metileno; (T4) TIP contendo oligo 1 imobilizado em quitosana adicionado da sequência amplificada do gene E7 de HPV-16 e do azul de metileno.

O diferencial de $1,0\mu\text{A}$ entre os picos de corrente observados no TIP contendo de sequências hibridizadas e TIPS contendo apenas o oligo1 imobilizado foi semelhante ao relatado por Ederm et al. (2000), em testes realizados para pequenas sequências do vírus da hepatite B. Porém, o pico de corrente verificado pelo autor, foi superior em sequências não hibridizadas. Este diferencial é consideravelmente superior quando é observada uma maior

disposição de guaninas imobilizadas, como demonstra Yang et al. (2002), cuja diferença observada entre os picos foi de 50 μ A ao serem analisadas sondas com cerca de 12 guaninas.

Diversas pesquisas utilizando a voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial e relatam a redução dos sinais de AM frente às reações de hibridização, resultante da redução na disponibilidade de guaninas livres após o evento de hibridização, uma vez que são imobilizadas sondas perfeitamente complementares à sequência do analito, geralmente constituído de sequências curtas constituídas por cerca de 20 pares de bases. Este tipo de resposta já foi observado na detecção de pequenas sequências do vírus da hepatite B (Manong et al. 2007), no desenvolvimento de genossensores para pequenas sequências de DNA (Kara et al. 2002) e na detecção de pequenas sequências do vírus TT, um vírus humano hepatotrópico (Meric et al. 2002).

O gene E6 HPV-18 possui cerca de 500 pares de bases, deste modo, após separação, apenas uma pequena porção da cadeia ssDNA pode hibridizar com o oligo imobilizado. O restante da cadeia permanece disponível para o acúmulo de AM (Figura 23). Tendo em vista que a porção restante não hibridizada da cadeia é bastante longa em relação ao tamanho dos oligos, um maior acúmulo de AM foi verificado nos TIPs cuja superfície continha reações de hibridização, fenômeno decorrente da alta afinidade do azul de metileno por bases de guanina livres (Kerman et al., 2002).

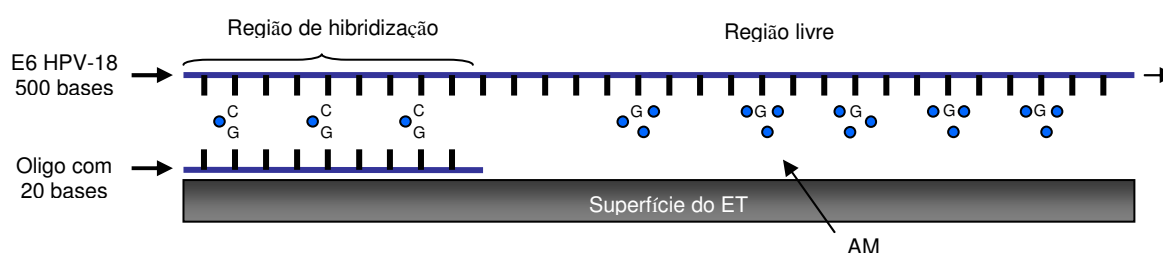


Figura 23: Esquema de reação entre o oligo imobilizado e o gene E6 do HPV-18 na superfície do eletrodo de trabalho (ET) e interações com o AM.

O mesmo não ocorreu em TIPs T2, contendo apenas oligos e AM, onde os sinais reduziram significativamente. Este fato ocorreu devido à proporção de bases livres ser bem menor, quando comparada à hibridização com o gene E6 HPV-18 (Figura 24).

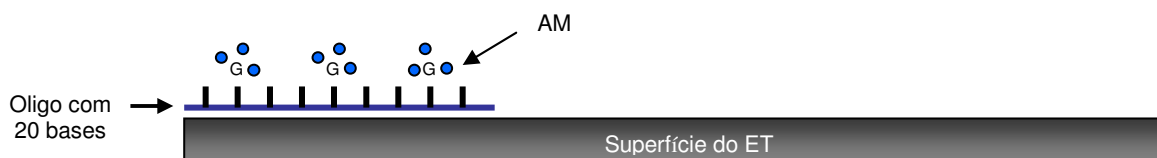


Figura 24: Esquema da imobilização do oligo na superfície do eletrodo de trabalho (ET) e sua interação com o AM.

A verificação do nível de resposta do biossensor contendo o oligo 1 imobilizado foi comprovada ao se observar uma redução dos sinais obtidos na hibridização com o gene E6 HPV-18 em relação à corrente observada após adição da sequência do gene E7 HPV-16, não complementar à sequência dos oligos imobilizados. Tais evidências foram observadas graficamente na análise das curvas de VPD, observando-se as mudanças nos picos de corrente do AM obtidos com TIPS contendo amostras e hibridizadas (T4) e não hibridizadas em uma dada faixa de potencial (T2) (Figura 22).

A Figura 25 apresenta o desenho esquemático do que pode ter ocorrido na superfície do eletrodo.

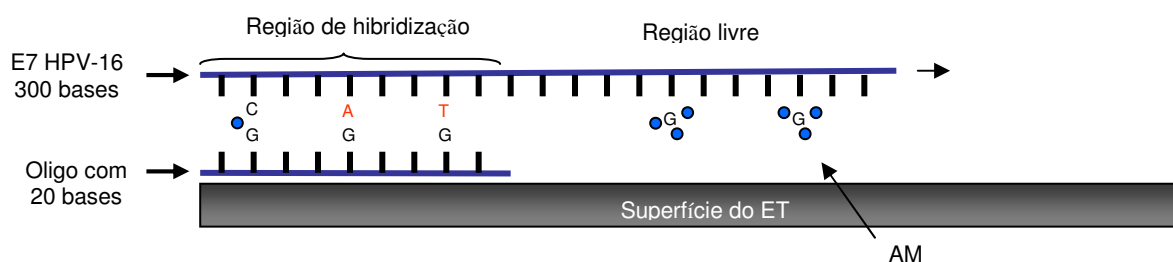


Figura 25: Esquema de reação entre o oligo imobilizado e o gene E7 do HPV-16 na superfície do eletrodo de trabalho (ET) e interações com o AM.

Os resultados obtidos demonstraram uma resposta mais clara quando comparada ao perfil observado em TIPs contendo a adição de dois oligonucleotídeos na superfície do

eletrodo, o qual pode aumentar a possibilidade de anelamento entre as bases dos dois oligos imobilizados.

ANÁLISE DE RESPOSTA DO BIOSSENSOR COM AMOSTRAS CLÍNICAS

Visando determinar a aplicabilidade do método em diagnósticos clínicos, foram realizados testes com seqüências gênicas, extraídas de raspados de lesões do colo uterino. As seqüências virais inseridas no genoma humano no processo infeccioso foram capturadas pelos oligos imobilizados evidenciando picos de corrente na ordem de 1,0 μA . Este pico foi significativamente reduzido quando testadas amostras, isentas de seqüências virais, como demonstrado na figura 26.

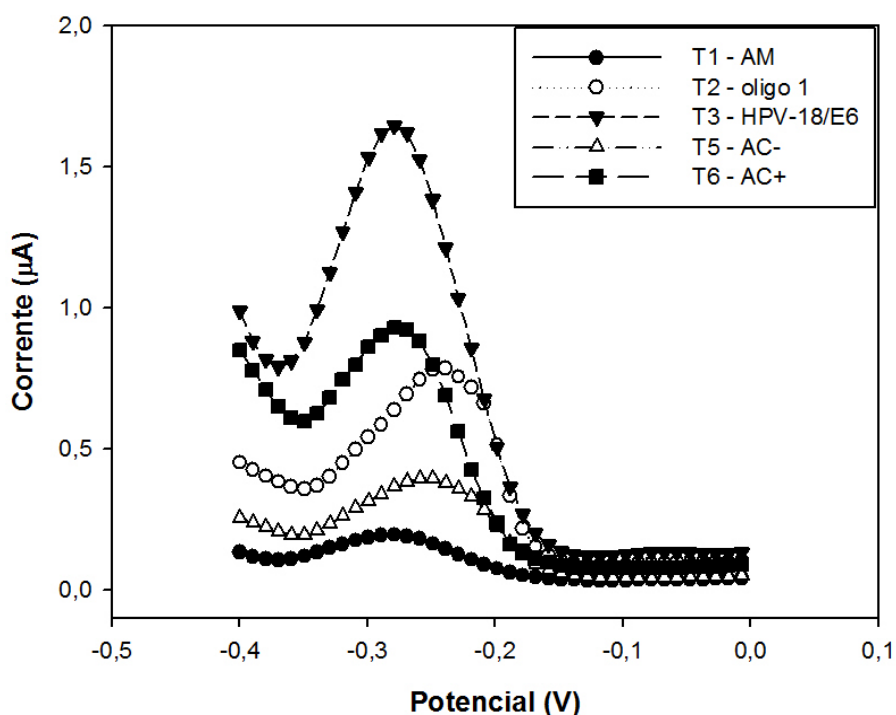


Figura 26: Análise gráfica das curvas de VPD utilizando cinco diferentes condições: (T1) TIP com quitosana e azul de metileno; (T2) TIP com oligo 1 aderido a superfície de quitosana e adicionado azul de metileno; (T3) TIP contendo oligo 1 imobilizado em quitosana adicionado da seqüência amplificada do gene E6 de HPV-18 e do azul de metileno; (T4) TIP contendo oligo 1 imobilizado em quitosana adicionado da seqüência gênica de uma amostra clínica negativa; (T5) TIP contendo oligo 1 imobilizado em quitosana adicionado da seqüência gênica de uma amostra clínica positiva.

Os resultados obtidos diferem das evidências relatadas por Madong et al. (2007) e Meric et al. (2002), que demonstram picos de corrente superiores em amostras humanas negativas para o vírus da hepatite B (HBV), em relação a amostras positivas. Estes trabalhos avaliam seqüências virais curtas, (20 bases) amplificadas por PCR a partir de amostras clínicas. As diferenças dos resultados obtidos, podem ser explicadas devido à utilização de toda a seqüência gênica presente na amostra clínica, sem a realização de processos de amplificação, tendo em vista que seqüências consideravelmente extensas em relação aos oligos imobilizados, podem ser encontradas nas amostras positivas. As mesmas disponibilizam para a ação do mediador uma maior quantidade de guaninas.

Este fato não é observado na análise de uma amostra negativa, a qual por não ser capaz de anelar com o oligo imobilizado evidencia sinais reduzidos, com picos de corrente em torno de $0,4\mu\text{A}$, próximos, aos testes controle, isentos de material genético. A presença de pequenas seqüência de DNA, resultantes do processo de extração do DNA por método químico, pode ter resultado na redução do sinal a valores comparáveis ao biossensor sem a imobilização do oligo, uma vez que estas seqüência poderiam se depositar sobre as sondas de forma mais fácil.

O pico de corrente observado com a hibridização da seqüência específica E6 HPV-18 ocorre na faixa de $1,7\mu\text{A}$, diferindo em $1,0\mu\text{A}$ do pico verificado com oligos imobilizados, nos quais a corrente chega a $0,7\mu\text{A}$. Ao contrário do que foi descrito por Madong et al. (2002) e Lin et al. (2007), a hibridização é observada em correntes inferiores em $0,5\mu\text{A}$ em relação aos eletrodos onde a reação não ocorre. Este fato pode ser explicado pela extensa região da seqüência do gene alvo deixando uma grande proporção de guaninas livres, quando comparadas ao número de guaninas nas seqüências imobilizadas.

As reações ocorrem na mesma faixa de potencial descrito para biossensores, de -0,4 a -0,2 sendo observado nos eletrodos com apenas os oligos, um pequeno deslocamento de -0,2 para aproximadamente -0,25, este fato pode ser atribuído a fatores como, pequenas variações de área e densidade de superfície do eletrodo, condições experimentais, e variações na concentração do material realmente imobilizado (Meric et al. 2002 e Lin et al., 2007). Os picos de corrente entre apenas as sondas imobilizadas e uma amostra negativa,

diferiram em 0,3 μA , inferiores do que foi descrito por Meric et al. (2002), de 5,0 μA , possivelmente devido à um aumento na proporção de guaninas disponibilizadas.

VI. CONCLUSÃO

Biossensores de DNA para a detecção de hibridização do vírus HPV-18 podem ser constituídos de eletrodos dispostos na forma de TIPs em uma superfície de PVA, utilizando a quitosana para a imobilização e orientação dos oligos em um eletrodo de trabalho de tinta de carbono. O protocolo de utilização dos TIPs contendo azul de metileno foi capaz de detectar pequenas seqüências de ssDNA do gene E6 de HPV-18. Na amperometria, o biossensor demonstrou sensibilidade na distinção entre uma amostra contendo o gene viral e uma seqüência não-complementar, levando em consideração a diferença entre os picos de corrente obtidos através de Voltametria de Pulso Diferencial.

Com os resultados apresentados foi possível comprovar a eficácia e seletividade do método frente a amostras clínicas, sendo realizada a distinção entre uma amostra positiva e uma negativa, quanto a presença do genoma viral que pôde ser traduzida através dos picos de corrente decorrentes de processos de hibridização.

VII. PERSPECTIVAS

Visando verificar a sensibilidade do método, novos testes deverão ser realizados, variando a concentração das amostras e utilizando seqüências de novos oligos. Averiguando-se a seletividade dos mesmos na identificação viral. Novas análises de bioinformática serão realizadas investigando-se as possibilidades de sorotipagem, análises de carga viral e a identificação de possíveis reações cruzadas. Deverão ser realizados novos testes com amostras humanas de raspado de secreções do colo uterino, após a extração do DNA, que já tenham sido previamente diagnosticadas através de diferentes técnicas para a detecção viral.

Além disso, novos estudos de otimização do processo de produção deverão ser desenvolvidos permitindo à produção dos TIPS em larga escala e de forma industrial aplicando aos mesmos, as mais diversas tecnologias. Visando a aplicabilidade do método em sistemas de saúde pública e proporcionando um diagnóstico prático e seguro, que pode ser solicitado precocemente para pacientes apresentando sinais clínicos característicos da infecção pelo HPV.

VI. REFERÊNCIAS

- Figura: Biossensor. Disponível em:
<<http://www.cin.ufpe.br/~acb/RelatoriosIC/RelatorioIC2.PDF>>
Acesso em 13 de fevereiro de 2008.
- BORGES, S. C. V.; MELO, V. H.; MORTOZOA, G.; ABRANCHES, A.; NETO, J. B. L.; TRIGUEIRO, M. C., 2004. Taxa de detecção do Papillomavirus Humano pela Captura Híbrida II, em mulheres com Neoplasia Intra-epitelial Cervical. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, 26 (2): 105-110.
- CABRAL, J.M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. 2003. **Engenharia Enzimática**. Lisboa: Lidel – Edições Técnicas Ltda.
- CAMMAN, K.; LEMKE, U.; ROHEN, A.; SANDER, J.; WILKEN, H.; WINTER, B., 1991. Chemical sensors and biosensors – principles ad applications. **Angewandle Chemie International Edition in English**, 30: 516-539.
- CHAN, V.; GRAVES, D. J.; FORTINA, P.; McKENZIE, S. E., 1997. Adsorption and surface diffusion of DNA oligonucleotides at liquid-solid interfaces. **Langmuir**, 13: 320-329.
- CHANG, F. M; CHENG, Y. C., 2008. A frequency assessment expert system of piezoelectric transducers in paucity of data. **Expert Systems with Applications**, 34: 2747-2753.
- CLERE, N.; BERMONT, L.; FAUCONNT, S.; LASCOMBE, I.; SAUNIER, M.; VETTORETTI, L.; PLISSONIER, M. L.; MOUGIN, C., 2007. The papillomavirus type 18 E6 oncoprotein induces Vascular Endothelial Growth Factor 121 (VEGF 121) transcription from the promoter through a p53-independent mechanism. **Experimental Cell Research**, 323, 3239-3250.
- Figura: Coilocitos. Disponível em: <http://www.zambon.es/.../atlas/img_large/h4e047.jpg> Acesso em: 10 de janeiro de 2008.
- Figura: Colo uterino. Disponível em:
<<http://www.anatpat.unicamo.br/lamneo8.html>>
Acesso em: 10 de janeiro de 2008.
- CUZICK, J.; MAYRAND, M. H.; RONCO, G.; SNIJDERS, P.; WARDLE, J. Chapter 10: New dimensions in cervical cancer screening. **Vaccine**, S3\90-S3\97, 2006.
- DIAMOND, D.1998. **Principles of Chemical and Biological Sensors**. Toronto: Jonh Wiley & Sons.

-
- DICULESCU, V. C.; CHIORCEA PAQUIM, A. M.; OLIVEIRA BRETT, A. M., 2005. Electrochemical analysis of natural and synthetic polynucleotides. **XVIII International Symposium on Bioelectrochemistry and Bionergetics of the Bioelectrochemical Society**, Coimbra, Portugal, 19-24.
 - EDERM, A.; KERMAN, K.; MERIC, B.; AKRCA, U. S.; OZSOZ, M., 2000. Novel hynridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus. **Analytica Chimica Acta**, 422:139-149.
 - FERENCZY, A.; FRANCO, E.L., 2002. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. **Lancet Oncology**, 3:11-16.
 - FINZER, P.; LEMARROY, A.A.; ROSL, F., 2002. The role of human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 in apoptosis. **Cancer Letters** 188: 15-24.
 - GIESWEIN, C. E.; SHAROM, F. J.; WILDEMAN, A. G., 2003. Oligomerization of the e5 protein of human papillomavirus type 16 occurs through multiple hydrophobic regions. **Virology**, 313, 415-426.
 - HARRISON, T.R. *Distúrbios neoplásicos*. **Medicina Interna**, 14ª Ed., vol. 1, The McGraw-Hill Companies, Rio de Janeiro, p.650, 1998.
 - HARRISON, T.R. *Hematologia e Oncologia*. **Manual de Medicina**, 15ª Ed., The McGraw-Hill Companies, Rio de Janeiro, p.323-324, 2000.
 - HERRERO, R.; HILDESHEIM, A.; BRATTI, C. *et al.* Population based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Rural Costa Rica. **J Nalt Cancer Inst**, v.92, p.464-474, 2000.
 - INCA 2008. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/>> Acesso em: 15 de abril janeiro de 2008.
 - Figura: Infecção HPV. Disponível em: <<http://www.research.leidenuniv.nl/index.php3?c=243>> Acesso em: 28 de fevereiro de 2008.
 - KARYAKIN, A. A.; VULKY, M.; LUKACHOVA, L. V.; KARYAKINA, E. E.; ORLOV, A. V.; KARPACHOVA, G. P.; WANG, J.,1999. **Analitical Chemistry**. 71: 2534-2540.
 - KARA, P.; KERMAN, K.; OZKAN, D.; MERIC, B.; ERDEM, A.; OZKAN, Z.; OZSOZ, M., 2002. Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue ana DNA. **Eletrochemistry communications**, 4; 705-709.

-
- KOSS, G.L.; GOMPEL, C. 1997. Introdução, histórico e desenvolvimento do método. **Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas**, 1ª Ed. Brasileira, p. 02-03.
 - LA-SCALEA, M. A.; SERRANO, S. H. P.; GUTZ, I. G. R., 1999. Eletrodos modificados com DNA: Uma nova alternativa em eletroanálise. **Química Nova**, vol.22 n.3.
 - LEVI, J.E.; FERNANDES, S.; TATENO, A.F.; MOTTA, E.; LIMA, L.P.; NETO, J.E.; PANNUTI, C.S., 2004. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. **Gynecologic Oncology**, v. 92, p.225-231.
 - LIN, X.; WU, P.; ZHANG, Y.; XIA, X., 2007. Electrochemical DNA biosensor for the detection of short DNA species of Chronic Myelogenous Leukemia by using methylene blue. **Talanta**, 72:468-171.
 - LUCARELLI, F.; TOMBELLI, S.; MINUNNI, M.; MARRAZZA, G.; MASCINI, M., 2008. Electrochemical and piezoelectrical DNA biosensors for hybridization detection. **Analytica Chimica Acta**, 609: 139-159.
 - LUONG, J.H. T.; MULCHANDANI, A.; GUILBAULT, G. G., 1988. Developments and applications of biosensors. **Trends in Biotechnology**, 6: 310-316.
 - MADONG, G.; YANQUING, L; HONGXIA, G; WU XIAOQIN, W; LIFANG, F., 2007. Electrochemical detection of short sequences related to the hepatitis B virus using MB on chitosan-modified CPE. **Bioelectrochemistry**, 70: 245-249.
 - MERIC, B.; KERMAN, K.; OZKAN, D.; KARA.; ERNSOY, S.; AKARCA, U. S.; MASCINI, M.; OZSOZ, M., 2002. Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT virus from PCR amplified real samples by using methylene blue. **Talanta**, 56: 837-846.
 - MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; GONZÁLEZ, A. B.; GISSMANN, L., 2006. Chapter 1: HPV in etiology of human cancer. **Vaccine**, S31-S310.
 - PIVIDORI, M. I.; MERKOÇI, A.; ALEGRET, S., 2000. Dot-Blot amperometric genosensor for detecting a novel determinant of β -lactamase resistance in *Staphylococcus aureus*. **Analyst**, 126: 1551-1557.
 - QUEIROZ, D. T.; PESSOA, S. M. F.; SOUZA, R. A., 2005. Infection by Human Papillomavirus (HPV): doubts and challenges. **Acta**, 18(2): 190-6.
 - REGNIER, F. E.; HE, B.; LIN, S.; BUSSE, J., 1999. Chromatography and electrophoresis on chips: critical elements of future integrated, microfluidic analytical systems for life science. **Trends in Biotechnology**, 17: 101-106.
-

-
- RICCARDI, C. S.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H., 2002. Imunossensor amperométrico. **Química Nova**, vol.25 n.2 .
 - ROSSETI, M. L.; SILVA, C. M. D.; RODRIGUES, J. J. S., 2006. Papilomavírus Humano. **Doenças Infecciosas Diagnóstico Molecular**. 1ª Ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 135-145
 - SANKARANARAYANAN, R.; BUDUKH, A.M.; RAJKUMAR, R., 2001. Effective screening programmes for cervical cancer in low middle-income developing countries. **Bulletin of World Health Organization**, v.79, p. 954-952.
 - SETHI, R. S., 2004. Transducer aspects of biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, 9: 243-264.
 - SIGRIST, H.; GAO, H.1999. Biosensors@CSEM, **Chimia**, 53:81-86.
 - SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. L., 2006. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, Vol. 29, n. 4 , 776-785.
 - SILVA, J.J.B. Desenvolvimento de biossensores eletroquímico e piezoelétrico de DNA para diagnósticos clínicos. **Tese de Doutorado**: Universidade Federal de Pernambuco, 2004.
 - SPICHIGER-KELLER, U. E., 1998. **Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications**. Weinheim: Wiley VCH Verlag GmbH.
 - STEMPKOWSKA, I.; LIGAJ, M.; JANOWSKA, J.; LANGER, J.; FILIPIAK, M., 2007. Eletrochemical response of oligonucleotides on carbon paste electrode. **Bioelectrochemistry**, 70: 488-494.
 - SZUMINSKY, N. J.; JORDAN, J.; POTTGEN, P. A.; TALBOTT, J. L., 1992. Method and Apparatus for Amperometric Diagnostic Anlysis. **United States Patent**, n. 5,108, 564, 28 de Abril.
 - Figura: Técnica de coleta de células cervicais para o exame de Papanicolaou. Disponível em: <www.taringa.net/.../916254/Papanicolaou.html> Acesso em: 10 de janeiro de 2008.
 - TELES, F. R. R.Desenvolvimento de um bissensor para detecção e identificação do vírus da dengue em fluidos biológicos. **Tese de doutoramento**: Universidade Federal de Pernambuco.
 - TELES, F. R. R.; PRAZERES, D. M. F.; LIMA-FILHO, J. L., 2007. Eletroquímica detection of a dengue-related oligonucleotide sequence using ferrocenium as a hibridization indicator. **Sensors**, 7: 2510-2518.

-
- Figura: Vírus HPV. Disponível em:
<http://www.virology.net/Big_Virology/EM/papillo.gif> Acesso em: 17 de julho de 2005.
 - WAN, J., 2006. Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**, 21: 1887-1892.
 - WANG, J. 1999. Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 19: 47-53.
 - WANG, J.; CAI, X.; JANSSEN, M.; BALAKRISHMAN, M., 1996. Adsorptive stripping potentiometry of DNA at electrochemically pretreated carbon paste electrodes. **Electroanalysis**, 20.
 - WANG, Y.; ZHOU, A., 2007. Spectroscopic studies on the binding of methylene blue with DNA by means of cyclodextrin supramolecular systems. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, 190: 121-127.
 - WANG, S.; ZHU, Z.H.; COOMES, A.; HAGHSERSCHT, F.; LU, G. Q., 2005. The physical and surface chemical characteristics of activated carbons and the adsorption of methylene from waste water. **J. Collid. Interf. Sci.**, 284, 440-444.
 - WEECHARANGASAN, W.; OPANASOPIT, W.; NGAWHIRUNPAT, T.; APIRAKARAMWONG, A.; ROJANARATA, T.; RUKTANONCHAI, U.; LEE, R. J., 2008. Evaluation of chitosan salts as non-viral gene vectors in CHO-K1 cells. **International journal of Pharmaceutics**, 348, 161-168.
 - WILLNER, I.; WILLNER, B. 2001. Biomaterials integrated with electronic elements: in route to bioelectronics. **Trends in Biotechnology**, 19: 222-230.
 - WILSEY, C. D.; BURKE, D. W., 2003. Amperometric Biosensor Test Strip. **United States Patent**, n. 6,541,216, 01 de Abril.
 - XIAO-HE, Y.; QIANG, Y.; HAO, Y.; LI, W.; YU-QUAN, C., 2007. Performance and Mechanism of Screen-Printed Carbon Paste Electrode Glucose Biosensors Based on Functional Carbon Black **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, V. 35, 12;1751-1755.
 - YANG, W.; OZSOZ, M.; HIBBERT, D. B.; GOODING, J. J., 2002. Evidence for the direct interaction between methylene blue and guanine bases using DNA-modified carbon paste electrodes. **Electroanalysis**, 14, n.18, 1299-1302.
 - ZUR HAUSEN, H., 2002. Papillomaviruses and Cancer: from basic studies to clinical application. **Nat.Rev.Cancer** 2, 342-350.
-