

PLATAFORMA BIOSSENSORA PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO CÂNCER DE MAMA

Mirella Monteiro Silva¹; José Luiz de Lima Filho²

¹Estudante do Curso de Biomedicina - CCB – UFPE; E-mail: mirellamonteiros@gmail.com,

²Docente/pesquisador do Depto de Bioquímica – CCB – UFPE. E-mail: joseluiz60@gmail.com.

Sumário: O Câncer de mama é a neoplasia que mais afeta as mulheres em todo o mundo. Esta alta incidência muitas vezes ocorre devido a falhas nos métodos de triagem existentes atualmente. A sobrevivência de pacientes acometidas por este câncer está correlacionada com a detecção precoce. Portanto, métodos de detecção precoce ajudariam a aumentar o número de sobreviventes. Pensando nesta problemática estão sendo desenvolvidos os biossensores, que são ferramentas analíticas que incorporam biomoléculas a um transdutor para criar uma superfície que permita a medição qualitativa e/ou quantitativa de um analito específico. Para isto, foram utilizados eletrodos impressos modificados por nanocompósitos, como polímeros e materiais condutores que são capazes de promover a ligação do DNA na superfície do eletrodo e melhorar sua condutividade. Além disso, foi utilizado como biorreceptor um microRNA específico para as fases iniciais do câncer de mama, selecionado através de ferramentas de bioinformática. Neste sentido, é proposto um biossensor capaz de realizar detecção rápida e sensível do câncer de mama utilizando os microRNAs satisfazendo a necessidade de ferramentas “point-of-care” em diagnóstico médico, reduzindo o tempo entre o diagnóstico e tratamento.

Palavras-chave: biossensores; câncer de mama; nanocompósito; microRNA.

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma patologia caracterizada pelo desequilíbrio do sistema de regulação do crescimento e morte das células mamárias. Esta neoplasia é a forma mais comum e a causa mais frequente de morte por câncer em mulheres no mundo (ELENIUS et al, 2014; OMS, 2015). Para atender esta demanda, os biossensores podem ser utilizados por serem específicos e sensíveis, o que faz com que estes dispositivos possuam os requisitos necessários para a detecção do câncer de mama (HUANG et al., 2014). Um biossensor é definido como um dispositivo bioanalítico que incorpora um analito associado com o reconhecimento molecular ou integrado com um transdutor físico (NORTON, 2015). Algumas modificações podem ser realizadas na plataforma biossensora utilizando nanocompósitos, como polímeros e materiais condutores, que são capazes de promover a ligação do DNA na superfície do eletrodo e melhorar sua condutividade, respectivamente (CAMPOS-FERREIRA et al., 2013). Os miRNAs tem atraído enorme atenção, pois estão sendo utilizados como biomarcadores no prognóstico e risco de doenças, bem como na classificação de diferentes tipos de câncer. O conceito de utilização de biomarcadores no desenvolvimento de sensores para diagnóstico fará com que esses dispositivos sejam altamente sensíveis e mais aplicáveis para o diagnóstico precoce do câncer (LABIB e BEREZOVSKI, 2015). É grande a necessidade da medicina personalizada em desenvolver novos e mais rápidos, detectores para o reconhecimento de biomarcadores, cumprindo a necessidade de ferramentas de “point-of-care”, eliminando a demanda de tempo entre visita médica, requisição e realização dos exames, retorno ao médico e só então início do tratamento (IANESELLI, 2014).

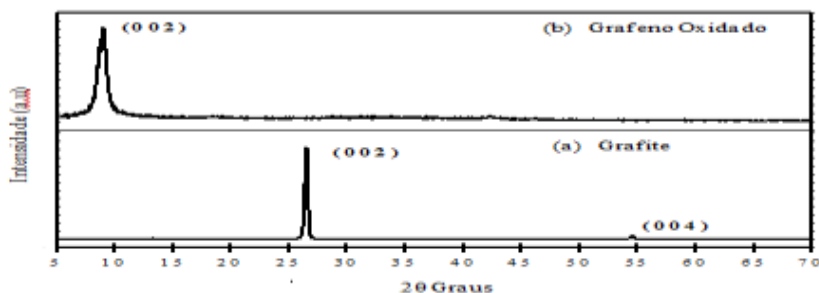
MATERIAIS E MÉTODOS

Para análise genética e seleção do microRNA foram utilizadas ferramentas de bioinformática, onde foram utilizados filtros para encontrar um microRNA que fosse específico para o câncer de mama em estágios iniciais. Feito isso, as linhas condutoras foram impressas na superfície do poliestireno (PS). O eletrodo de referência foi impresso com tinta de Ag/AgCl, sobreposta a uma linha condutora, e seco em estufa a 60°C. O eletrodo de trabalho e auxiliar constituídos de pasta de carbono foram impressos sobrepostos a segunda e terceira linha condutora. Em seguida, os eletrodos foram lavados com ácido sulfúrico 0,1% e depois com água ultra pura e secos em estufa a 60 °C. Posteriormente, para a síntese do grafeno foi utilizado o método de Hummer's modificado (TANG et al., 2013). Após ser oxidado, o grafeno foi levado a um forno para que ocorresse sua redução. Feito isso, uma solução de Pirrol (0,05 M) foi preparada e usada na formação do nanocompósito, onde foi utilizado 700 µL da solução de pirrol e 300 µL de solução de grafeno (1mg/ml). A formação da camada de poli-pirrol, em conjunto com o grafeno, foi realizada através de eletropolimerização por voltametria cíclica, aplicando-se um potencial de varredura de -1.8V a 2.0V, por 10 ciclos, a uma velocidade de varredura de 100 mVs⁻¹. Após a modificação, foi avaliado o melhor tempo de imobilização (15; 30; 45 e 60 minutos) e concentração da sonda (0,5; 0,75; 1; 1,5 e 2µM). No eletrodo modificado com o nanocompósito foi colocado 5 µL da sonda de DNA, apenas no eletrodo de trabalho, em temperatura ambiente (23°C). Em seguida, a molécula alvo do microRNA foi adicionada sobre o transdutor imobilizado com a sonda e incubada por 10 minutos à uma temperatura de anelamento de 52°C. Após a imobilização e processo de hibridização, uma solução 500µM de azul de metileno em tampão Tris-HCl (20 mM, pH 7,0) foi acumulada no eletrodo de trabalho modificado durante 5 min. A medição foi realizada em Voltametria de Pulso Diferencial (DPV) com tampão Tris-HCl para a redução eletroquímica do azul de metileno utilizando o equipamento potenciostato e como interface software NOVA 1.10.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizados filtros em bancos de dados, onde foi possível a análise e escolha de um biomarcador que fosse expresso em fases iniciais no câncer de mama, o miRNA 155. Após a análise de bioinformática duas sequências foram utilizadas miRNA 155 “probe”: 5’- ACC CCT ATC ACG ATT AGC ATT AA - 3’ e miRNA 155 “target”: 5’ – UUA AUG CUA AUC GUG AUA GU – 3’. Foi possível observar as propriedades estruturais do grafite e grafeno oxidado através da difração de raios-X. A figura 1 mostra o difratograma do grafite (a), com picos característicos (002) em $2\theta = 26.53^\circ$ e (004) em $2\theta = 54.60^\circ$, a localização e intensidade dos picos indicando a formação de grupos funcionais de oxigênio. Esses grupos são característicos do processo de esfoliação do pó de grafite a grafeno oxidado, comprovando assim a formação do mesmo.

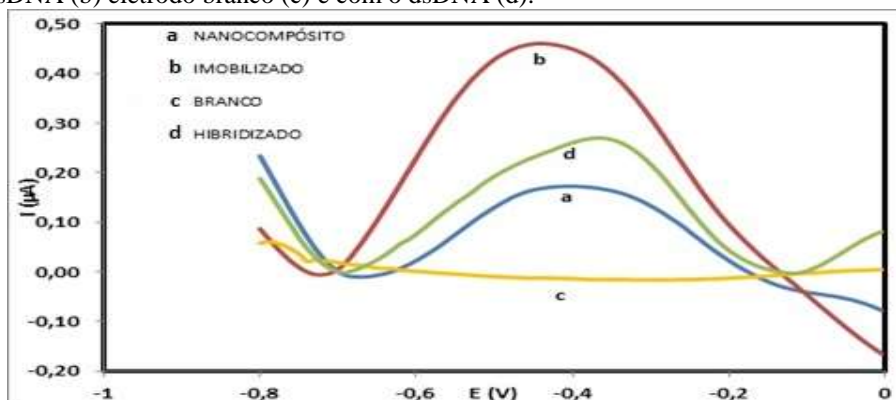
Figura 1. Difratograma do grafite (a) e do grafeno oxidado (b).



Posteriormente a modificação do eletrodo, foram realizados testes para analisar a capacidade do nanocompósito em promover a imobilização da sonda. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e através da DPV podemos observar que o

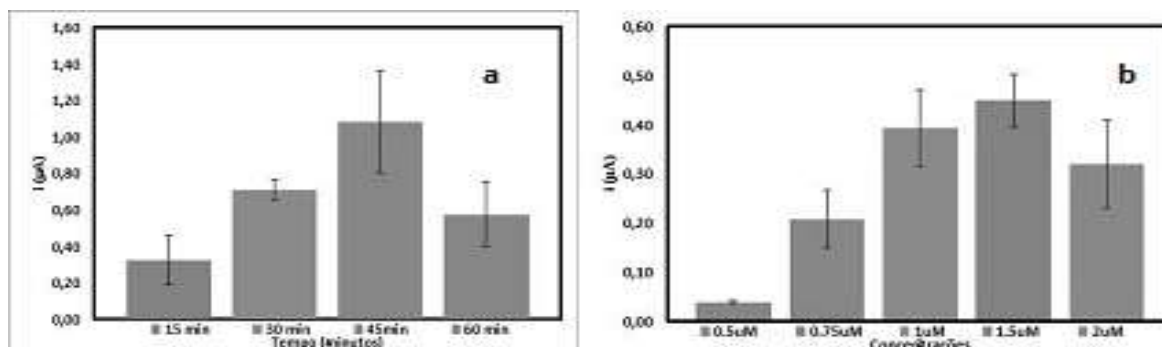
eletrodo branco não apresentou pico de redução (Figura 2c). Já o eletrodo modificado com o nanocompósito apresentou pico de redução de $0,17 \mu\text{A}$ (Figura 2a). O eletrodo com nanocompósito após a imobilização da sonda promoveu um aumento de pico ainda maior, apresentando $0,49 \mu\text{A}$ (Figura 2b). Esse aumento é justificado devido à eletroatividade das guaninas presente na sonda, quando a fita simples está imobilizada, as guaninas da sonda ficam livres para reduzir. Isto comprova que a sonda foi imobilizada com sucesso no eletrodo. De forma contrária, quando ocorre a hibridização, as guaninas não estão mais livres fazendo com que o pico de corrente diminua, apresentando $0,27 \mu\text{A}$ (Figura 2d).

Figura 2: Voltamograma apresentando o comportamento do eletrodo modificado com o nanocompósito (a), com o ssDNA (b) eletrodo branco (c) e com o dsDNA (d).



Na Figura 3a observa-se o histograma dos picos de corrente do tempo de imobilização. Dos tempos testados (15 a 60 minutos), o de 45 minutos mostrou melhor desempenho, com pico de corrente em $1,08 \mu\text{A}$, onde também é possível verificar que com 15 minutos não foi tempo suficiente para que ocorresse a imobilização completa. Por outro lado, com 60 minutos de imobilização, o sinal volta a decair, devido a ocorrência de interações inespecíficas. O teste de concentração da sonda avalia o comportamento do eletrodo através da redução do azul de metileno. Das concentrações testadas ($0,5$ a $2 \mu\text{M}$) a que apresentou melhor resposta foi a de $1,5 \mu\text{M}$ (Figura 3b). Conforme se observa no gráfico, há um aumento do pico de corrente a medida em que aumenta-se a concentração, até que se obtém um pico máximo. Pode notar-se que a concentração de $1,5 \mu\text{M}$ apresentou o melhor sinal eletroquímico ($0,49 \mu\text{A}$), que corresponde à saturação do eletrodo.

Figura 3 Leituras realizadas através de DPV. **3a:** Histograma da variação do tempo; **Figura3b:** Histograma da variação das concentrações da sonda na imobilização.



Os testes de limite de detecção foram feitos através de técnica VDP onde foi possível mostrar uma curva de concentração-alvo variando de 1×10^{-7} a 1×10^{-11} molar, como pode ser observado na figura 4. A partir dos dados obtidos na curva de

concentração-alvo foi possível obter a equação de regressão do sistema sendo dada por $\text{Log } C = -0,036x + 0,652$ com $R^2 = 0,9614$ (Figura 5). A detecção limite do sistema foi calculada utilizando 3σ , onde σ é o desvio padrão da amostra branca, com um $n = 10$ amostras. Através deste cálculo, foi possível obter o valor do limite de detecção de 6 pM.

Figura 4: Gráfico da curva de concentração-alvo para mostrar a concentração limite, variando de 1×10^{-7} a 1×10^{-11} molar.

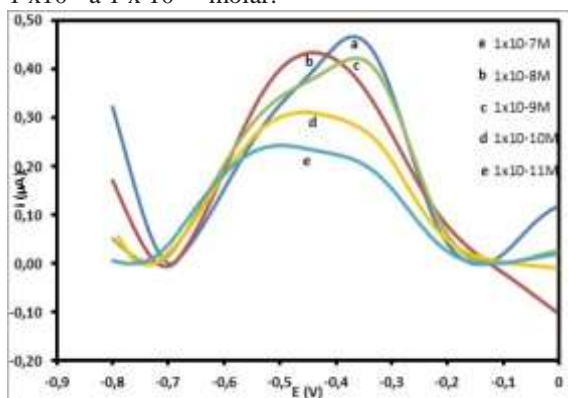
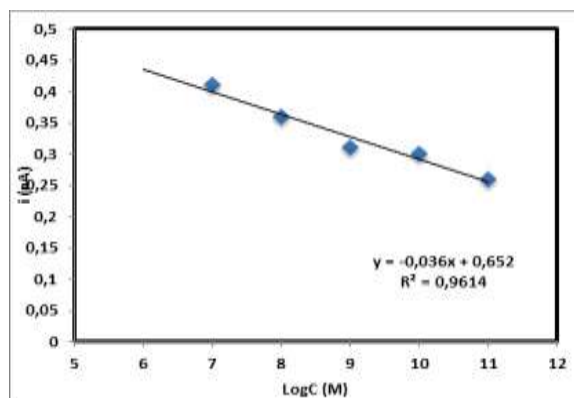


Figura 5: Gráfico da reta de inclinação da detecção limite obtida pelo biossensor.



CONCLUSÕES

O presente trabalho desenvolveu um biossensor que demonstrou ser sensível e específico para detecção precoce do miRNA155. Onde, no futuro este poderá auxiliar no diagnóstico precoce podendo assim aumentar a chance de sobrevivência de pacientes acometidas pelo câncer de mama.

AGRADECIMENTOS

CNPq, FACEPE, FINEP, CAPES.

REFERÊNCIAS

- CAMPOS-FERREIRA, D. S. et al. Electrochemical DNA biosensor for human papillomavirus 16detection in real samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 804, p. 258– 263, 2013.
- ELENIUS, K. et al. ERBB4 Promoter Polymorphism Is Associated with Poor Distant Disease-Free Survival in High-Risk Early Breast Cancer. **Plos One**, v. 9, p. 1-5, 2014.
- HUANG, H. et al. An ultrasensitive electrochemical DNA biosensor based on graphene/ Au nanorod/polythionine for human papillomavirus DNA detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, p. 442–446, 2014.
- IANESELLI, L.; GRENCI, G.; CALLEGARI, C.; TORMEN, M. e CASALIS, L. Development of stable and reproducible biosensors based on electrochemical impedance spectroscopy: Three-electrode versus two-electrode setup. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 55, p. 1–6, 2014.
- LABIB, M. e BEREZOVSKI, M. V. Electrochemical sensing of microRNAs: Avenues and paradigms. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, p. 83–94, 2015.
- NORTON, M. L. e GREEN, N. S. Interactions of DNA with graphene and sensing applications of graphene field-effect transistor devices: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 853, p. 127–142, 2015.
- OMS, Organização Mundial da Saúde. **Breast cancer: prevention and control**. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index1.html> . Acessado em 09 de junho de 2015.
- TANG, W. et al. Graphene/polypyrrole intercalating nanocomposites assupercapacitors electrode. **Electrochimica Acta**, v. 112, p. 44– 52, 2013.



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