UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

GISELDA BEZERRA CORREIA NEVES

DESENVOLVIMENTO DE UM APTASSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE MAMA TIPO HER2

Recife
2019

GISELDA BEZERRA CORREIA NEVES

DESENVOLVIMENTO DE UM APTASSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE MAMA TIPO HER2

Recife

2019

GISELDA BEZERRA CORREIA NEVES

DESENVOLVIMENTO DE UM APTASSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE MAMA TIPO HER2

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada a Saúde, Área de Concentração Biossensores, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título Doutor.

Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Co-Orientadora: Drª Danielly Santos Campos Ferreira

Recife

2019

Catalogação na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Neves, Giselda Correia Bezerra

Desenvolvimento de aptassensor eletroquímico para diagnóstico do câncer de mama tipo HER2 / Giselda Correia Bezerra Neves - 2019.

40 folhas: il., fig., tab.
Orientador: José Luiz de Lima Filho
Coorientadora: Danielly Santos Campos Ferreira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2019.
Inclui referências

1. Biossensor 2. Câncer de mama 3. Diagnóstico I. Lima Filho, José Luiz de (orient.) II. Ferreira, Danielly Santos Campos (coorient.) III. Título

681.2 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2020-024

GISELDA BEZERRA CORREIA NEVES

DESENVOLVIMENTO DE UM APTASSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE MAMA TIPO HER2

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada a Saúde, Área de Concentração Biossensores, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título Doutor.

Aprovada em: 09 / 12 / 2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho (Orientador)
Departarmento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins (Membro Interno)
Departarmento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Luiz Carlos Alves (Membro Interno)
Fundação Oswaldo Cruz
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Jones Oliveira de Albuquerque (Membro Externo)
Departamento de Estátisca e Informática Aplicada
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Prof. Dra. Priscila Gubert (Membro Externo)
Programa de Pós-Graduação em Química Pura e Aplicada - POSQUIPA
Universidade Federal do Oeste da Bahia - UFOB

Dedico este trabalho ao meu eterno e saudoso pai.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pelas oportunidades, alegria e força a mim concedidas.

Gostaria de agradecer a minha família pelo companherismo, parceria, apoio nas dificuldades e comemoração em cada vitória. Ricardo, Camila e Mariana, vocês são o meu porto seguro aqui nesta terra.

Um agradecimento especial a minha mãe e ao meu pai que me ensinaram os valores da vida. E aos meus irmãos e irmãs, sobrinhos e sobrinhas, sogro e sogra, cunhados e cunhadas por terem entendido a minha ausência, e por terem me dado suporte.

Agradeço imensamente ao meu orientador José Luiz de Lima Filho por ter depositado sua confiança e compreensão em mim e ser um exemplo de incentivo e força.

Agradeço ao Dr. George Telles por ter me apresentado ao Lika.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, que foram uma base sólida para desenvolver minha pesquisa.

Agradeço as minhas coordenadoras Dra. Wanuska Portugal e Dra. Fátima Ferreira por me concederem paz e felexibildade, alterando e adaptando a minha jornada de trabalho, sempre que necessário ao longo desses anos. Assim pude trabalhar e estudar com qualidade e cumprir minhas obrigações de estudante e profissional.

Minha eterna gratidão a todos que estiveram comingo neste trajeto.

Muito obrigada!

“Então a nossa boca se encheu de riso e a nossa língua de cântico; então se dizia entre as nações: Grandes coisas fez o Senhor a estes.
Grandes coisas fez o Senhor por nós, e por isso estamos alegres.”

Salmos 126:2,3

RESUMO

Cerca de 2.1 milhões de novos casos de câncer de mama (CM), com 630.000 mortes, foram estimadas para 2018 no mundo, sendo 60.000 novos casos com incidência no Brasil. Existem cinco subtipos principais de CM: Luminal A, Luminal B, Fator de Crescimento Epidérmico Humano do receptor-2 (HER2) positivo, triplo negativo não Basaloide e Basaloide. O intervalo ideal entre o diagnóstico e o tratamento deve ser de até 60 dias para melhor prognóstico, entretanto, atualmente no Brasil esse período atinge até 240 dias. O CM é diagnosticado através de rastreio por imagem, como ultrassonografia (USG) e mamografia. Esses meios apresentam algumas limitações. A mamografia tem sua detecção prejudicada em áreas com tecido mamário denso, então, associa-se com a USG para melhor visualização. Identificando uma imagem sugestiva de câncer, faz-se uma biopisa do tecido mamário, seguida de imunohistoquímica (HI) e hibridação in situ de fluorescência (FISH), para estudar o perfil do HER2, uma proteína muito importante para o crescimento, vida e morte programada da celula mámaria. O valor normal do HER2 no soro é de até 15ng/mL. Apesar dos métodos já estabelecidos, HI e FISH, para o diagnóstico, a possibilidade de desenvolvimento de um dispositivo de manuseio simples, rápido e menos invasivo, como os biossensores, será de grande ajuda no diagnóstico precoce do CM. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um aptassensor para detectar HER2 em soro humano. Os aptassensores eletroquímicos são biossensores que usam um aptâmero como elemento de biorreconhecimento. Eles analisam por voltametria o sinal resposta para a presença normal ou anormal de um analito em uma amostra biológica. Por sua vez, os aptâmeros são pequenos fragmentos de oligonucleotidios de DNA ou RNA de cadeia simples, produzidos para alvos específicos. O processo de desenvolvimento desse aptasenssor se deu da seguinte forma: um Aptâmero HER2 foi imobilizado por adsorção eletrostática na superfície de um eletrodo impresso em tela, modificado com poli-L-lisina. As medidas foram feitas por voltametria de pulso diferencial (DPV) usando azul de metileno como indicador químico redox da reação. A curva de calibração aprsentou um R2 = 0,9971 utilizando diferentes concentrações de proteína HER2 (10 - 60 ng / mL) diluidas em tampão PBS (pH 7,4), com um limite de detecção de 3,0 ng/mL. Mostrou boa reprodutibilidade, resultando em desvios padrão relativo (RSDs) de 3%. Permaneceu estável por 3 dias, com um RSDs de 2%. Ao realizarmos testes com o soro de uma mulher saudável, foi apresentado um pico de 6,72 μA. E ao testarmos com o soro de uma mulher com câncer de mama HER2 +, obtivemos um sinal de 2,65 μA. Isto denota o mesmo padrão encontrado quando da adição de proteína no soro controle (quando havia uma maior

concentração da proteína HER2 foi apresentado um sinal menor). Os testes foram caracterizados por calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e mostraram excelente afinidade e interação entre aptâmero e proteína. Os resultados revelaram uma ferramenta promissora e sensível, com potencial no auxílio do diagnóstico molecular do CM.

Palavras-chave: Biossensor. Câncer de mama. Diagnóstico.

ABSTRACT

About 2.1 million new cases of breast cancer (BC), with 630,000 deaths were estimated for 2018 worldwide, of which 60,000 new cases are indicative in Brazil. There are five major subtypes of BC: Luminal A, Luminal B, positive HER2, triple-negative non-Basaloid and Basaloid. The ideal interval between diagnosis and treatment should be up to 60 days for a better prognosis, however, currently in Brazil, this period reaches up to 240 days. BC is diagnosed by imaging, such as ultrasound (USG) and mammography. These means have some limitations, such as mammography, whose detection is impaired in areas with dense breast tissue, so it is associated with the USG. Identifying an image suggestive of cancer, a breast tissue biopsy is performed, followed by immunohistochemistry (HI) and fluorescence in situ hybridization (FISH) to study the profile of HER2, a very important protein for growth, life, and death. of the breast cell. The normal serum HER2 value is up to 15ng / mL. Despite established HI and FISH diagnostic methods, the possibility of developing a simple, rapid and less invasive handling device such as biosensors will be of great help in early diagnosis of BC. Aptamers are small fragments of single-stranded DNA or RNA oligonucleotides produced for specific targets. Electrochemical Aptasensors are biosensors that use an aptamer as a biorecognition element and voltammetry analyzes the response signal for the normal or abnormal presence of an analyte in a biological sample. This work aimed to develop an Aptasensor to detect HER2 in human serum. An HER2 Aptamer was immobilized by electrostatic adsorption on the surface of a poly-L-lysine modified screen-printed electrode. Measurements were made by differential pulse voltammetry (DPV) using methylene blue as the redox chemical reaction indicator. The calibration curve showed R2 = 0.9971 using different concentrations of HER2 protein (10 - 60 ng / mL) diluted in PBS buffer (pH 7.4) with a detection limit of 3.0 ng / mL. It showed good reproducibility, resulting in relative standard deviations (RSDs) of 3%. It remained stable for 3 days with a 2% RSDs. Serum tests were performed on a healthy woman with a peak of 6.72 μA. When testing the serum of a woman with HER2 + breast cancer, we obtained a 2.65 μA signal, denoting the same pattern found when adding protein to the control serum (when there was a higher concentration of HER2 protein showed a lower signal). It was characterized by isothermal titration calorimetry (ITC) and showed excellent affinity and interaction between aptamer and protein. The results revealed a promising and sensitive tool with the potential to aid the molecular diagnosis of BC.

Keywords: Biosensor. Breast cancer. Diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tipos de câncer mais incidentes estimados em 2018 no sexo feminino 17
Figura 2 - Representação da amplificação do Gene HER2.....20
Figura 3 - Mama com cancer e metastase para diverso orgãos. 21
Figura 4 - Esquema dos elementos do Biossensor..... 24
Figura 5 - Esquema de funcinamento do Aptassensor para HER2.....33

LISTA DAS ABREVIAÇÕES

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
A	Analito
CM	Câncer de mama
BC	Breast Cancer
D	Detector
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPV	Voltamentria de Pulso Diferencial
EB	Elemento de Biorreconhecimento
ECD	Domínio Extra Celular
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
f.	Folha
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Hibridação in Situ de Fluorescência
HER2	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano-2
HPV	Papiloma Vírus Humano
IH	Imunohistoquímica
ITC	Calorimetria de titulação isotérmica
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino
RE	Receptor de Estrógeno
RP	Receptor de Progesterona
RNA	Ácido ribonucleico
Selex	Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial
SUS	Sistema Único de Saúde
T	Transdutor
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
USG	Ultrassonografia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **15**
2 REVISÃO DA LITERATURA **17**
2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA 17
2.2 ESTRUTURA DA MAMA 17
2.3 CÂNCER DE MAMA 18
2.3.1 Subtipos principais do câncer de mama classificação molecular 18
2.3.2 Principais fatores de risco para o câncer de mama 21
2.3.3 Diagnóstico e tratamento do câncer de mama 22
3 BIOSSENSORES **24**
3.1 BIOSSENSORES QUANTO AO ELEMENTO DE BIORRECONHECIMENTO 25
3.2 TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO DO ELEMENTO DE BIORECONHECIMENTO 26
3.2.1 Método físico de imobilização do elemento de biorreconhecimento 27
3.2.2 Método químico de imobilização do elemento de biorreconhecimento 27
3.3 BIOSSENSORES QUANTO AO EVENTO DE BIORRECONHECIMENTO 27
3.3.1 Evento de biorreconhecimento por biocatalise 28
3.3.2 Evento de biorreconhecimento bioanalitico 28
3.4 BIOSSENSORES QUANTO AO TRANSDUTOR 28
3.4.1 Transdutores piezoelétricos 28
3.4.2 Transdutor óptico 28
3.4.3 Transdutor térmico 29
3.4.4 Transdutor eletroquímico 29
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES **32**
4.1 ARTIGO PUBLICADO 32
5 CONCLUSÃO **34**
REFERÊNCIAS **35**

1. INTRODUÇÃO

Em 2018, cerca de 2.1 milhões de novos casos de câncer de mama (CM), com 630.000 mortes, foram estimados para o mundo. Para o Brasil, este número foi de 60.000 novos casos de CM (IARC, 2018). O CM é uma doença com alta taxa de mortalidade entre as mulheres e tem natureza clínica heterogênea, isso dificulta o diagnóstico e tratamento. Existem cinco subtipos intrínsecos de CM conforme seu padrão de expressão gênica: Luminal A, Luminal B, HER2 positivo, triplo negativo não Basaloide e Basaloide (1) (Perou 2000).

O gene HER2 expressa uma proteína transmembranar também chamada de HER2. Essa proteína possui três domínios: um domínio extracelular (ECD), uma região transmembranar e um domínio intracelular de tirosina quinase; o ECD é liberado na corrente sanguínea quando a célula é lisada, podendo ser detectada, quando isso ocorre numa quantidade acima do normal caracteriza o subtipo de CM HER2 positivo, sendo considerado um tumor agressivo com um desfecho clínico muito ruim (ZHANG; XIAO, 2018). Quando a proteína HER2 chega no soro, sua concentração pode variar de (zero) 0 ng / mL a 15 ng/mL em mulheres saudáveis, e valores acima desse ponto são considerados anormais (VONDELING et al., 2018).

O intervalo ideal entre o diagnóstico e o tratamento deve ser de até 60 dias para melhor prognóstico. No Brasil, México e Índia, esse período atinge até 240 dias (MEDEIROS, 2015). Isso indica a necessidade de novas estratégias, como políticas públicas e técnicas, a fim de diminuir o tempo de diagnóstico.

Atualmente o CM é diagnosticado por meio de rastreio de imagens, como ultrassonografia e mamografia. Esses métodos apresentam algumas limitações, como a mamografia, cuja detecção é prejudicada em áreas com tecido mamário denso, podendo mascarar uma lesão já existente (TAGLIAFICO et al., 2018). A imunohistoquímica (IH) é recomendada para determinar a expressão de HER2 no tecido, seguida pela hibridação in situ de fluorescência (FISH) para avaliar a amplificação do gene HER2. Esses dois métodos de detecção são invasivos, porque são realizados num fragmento de tecido mámario retirados em biopsia, um exame muito doloroso e traumático (EFARED et al., 2018). A Siemens® tem um ensaio imunoenzimático (ELISA), aprovado pelo FDA em 2000, para a determinação da proteína HER2 no soro, porém, tem indicação médica apenas para monitorar o tratamento e o prognóstico do câncer de mama do tipo HER2, não sendo indicado para diagnóstico (CARNEY, 2007).

Apesar desses métodos já estabelecidos para o estudo do HER2, a possibilidade de desenvolver um dispositivo com manuseio simples, rápido, seguro e pontual, como um

biossensor (dispositivo que funciona como um sensor para detecção analítica), constituído por um elemento de Bioreconhecimento (EB) responsável por identificar o analito (A), a substância contida na amostra que será analisada. A reação entre o EB e A acontece na superficie de uma plataforma chamada de Transdutor (T). Esse componente identifica e transforma um sinal, gerado das reações entre EB e A, em um sinal mensurável, enviando para o componente Detector (D), informando a presença ou ausência do A em dados numéricos (MARQUES et al., 2014). O desenvolvimento desse dispositivo será de grande ajuda no diagnóstico do subtipo de CM HER2. A quantificação dessa molécula em amostras sorológicas é considerada um método promissor e menos invasivo para o diagnóstico precoce dessa doença.

Os aptameros são moléculas de DNA ou RNA de cadeia única com dobra tridimensional e servem como ligantes EB para um A específico (PFEIFFER; MAYER, 2016). Os aptasensores são biossensores que utilizam aptâmeros como o EB e apresentam alta sensibilidade e seletividade, boa estabilidade em ambientes complexos como, por exemplo, em amostras biológicas de sangue e soro, bem como resistência à desnaturação e degradação (CHUN et al., 2013). Os aptassensores eletroquímicos que detectam as reações eletroquímicas da interação entre o EB e A, são plataformas mais rápidas, baratas e sensíveis, com potencial para a aplicação no diagnóstico no ponto-cuidado, podendo assim orientar um tratamento em um menor espaço de tempo (PFEIFFER; MAYER, 2016). Sendo assim o objetivo desta Pesquisa é desenlvolver um Aptassensor para detectar a proteína HER2 no soro humano.

Visando responder o problema da pesquisa, tem-se como objetivo geral Desenvolver um aptassensor eletroquímico para detectar HER2 no soro humano, auxiliando no diagnóstico do câncer de mama tipo HER2. Mais especificamente, definiram-se os seguintes objetivos: a) produzir o Transdutor eletroquímico com 02 Eletrodos impressos de carbono e 01 Eletrodo Impresso de Cloreto de prata ; b) testar o Aptassensor com amostras sintéticas e biológica (soro humano), contendo a proteína HER2; c) realizar teste de especificidade e seletividade utilizando uma proteína não complementar ao Aptassensor; e d) avaliar a reprodutibilidade e estabilidade do aptassensor para detectar HER no soro.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

Quase 2.1 milhões de novos casos de câncer de mama, com cerca de 630.000 mortes, foram estimados para 2018 (IARC, 2018). No Brasil, o câncer de mama é o tipo de câncer mais comum e a principal causa de morte entre as mulheres. Para 2018, foram estimados 60.000 novos casos, e em 2017, foram registrados 17.000 óbitos no Brasil (SANTOS, 2018) como mostrado na Figura 1. Nas últimas três décadas a mortalidade devido ao CM aumentou bastante nas cinco macrorregiões brasileiras. Esse crescimento pode ser relacionado à diminuição da taxa de natalidade, ao sedentarismo e obesidade, e ao aumento da expectatica de vida, que eleva o índice de envelhecimento populacional (MIGOWSKI et al., 2018).

Tipos de câncer mais incidentes estimados em 2018 no sexo feminino

	Localização Primária	Casos	%
Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
	Cólon e Reto	18.980	9,4%
	Colo do Útero	16.370	8,1%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
	Glândula Tireoide	8.040	4,0%
	Estômago	7.750	3,8%
	Corpo do Útero	6.600	3,3%
	Ovário	6.150	3,0%
	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
	Leucemias	4.860	2,4%

Figura 1. Tipos de câncer mais incidentes estimados em 2018 no sexo feminino. Em destaque o câncer de mama que aparece em primiro lugar.Adaptado (INCA, 2018)

2.2. ESTRUTURA DA MAMA

As mamas são órgãos pares, que ficam localizadas na parede anterior do tórax, sobre os músculos Grande Peitoral. Externamente, cada mama, apresenta: Aureóla: (estrutura central da mama onde se projeta a papila); Papila: cada papila possui em torno de 15 a 20 lobos mamários separados por tecido fiborso; Lobos mamários: cada lobulo tem uma via de drenagem, que drenam em direção da papila, formando assim o sistema ductal. O Tecido parenquimatoso é o tecido funcional da mama composto pelo tecido glandular. O Tecido adiposo compõe todo o restante da mama. Observa-se que com o passar dos anos esse tecido glandular vai dando lugar

ao tecido adiposo.Tem como função principal a produção do leite para a amamentação (GEDDES, 2007).

2.3. CÂNCER DE MAMA

As células que formam o tecido mamário se multiplicam continuamente, e a maioria delas crescem e morrem de maneira ordenada e são repostas ao mesmo tempo em que crescimentos inapropriados são inibidos, o que mantem a boa funcionalidade do tecido (GEDDES, 2007).

Os principais mecanismos reguladores desse processo de crescimento têm a ver com proteínas. Essas proteínas têm a capacidade e função de estimular a multiplicação celular de forma ordenada, ou até mesmo reparar a célula antes da replicação evitando qualquer anomalia e ou mal formação (GODONE et al., 2018). Porém, se a célula desenvolver mecanismos autônomos de sobrevivência, isso pode gerar consequências fatais para o organismo. Acredita-se que todas as células de um tumor descendem de uma célula ancestral comum e normal que em algum momento, iniciou um processo de multiplicação desordenada e reprodução inapropriada, sofrendo sucessivas transformações antes de tornar-se completamente maligna (GOLDHIRSCH et al., 2011). Essas transformações malignas só serão possíveis se o tumor transpor os limites traçados pelo organismo (os fatores mecânicos e imunológicos) os quais inibem o crescimento e desenvolvimento neoplásico (VONDELING et al., 2018). Causando as mutações e amplificações gênicas (muitas e excessivas cópias de um gene), principalmente nos genes realcionados a proto-oncogenese (são genes que ajudam e beneficia o crescimento sadio das celulas), nos genes supressores do tumor e nos genes realcionados ao reparo do DNA das células, como, por exemplo, a amplificação de genes HER-2 localizado no braço longo do cromossomo 17q11-12 (Braço longo do cromossomo 17 banda 12 região 1 e sub-região 2), causam essas transformações nas células mamárias (INOUE; FRY, 2016). Então, caso o tumor de mama não seja detectado e tratado, ele desenvolve metástases, mais comumente nos ossos, pulmões e fígado (MIGOWSKI et al., 2018).

2.3.1. Subtipos principais do câncer de mama classificação molecular

O CM é uma doença de caráter clínico heterogêneo, devido a sua morfologia, prognóstico, potencial de metástase e as diferentes respostas ao tratamento. Quanto a classificação molecular existem cinco subtipos de CM intrínsecos conforme seu padrão de expressão gênica: Luminal A, Luminal B, HER2 positivo, Triplo negativo (não basaloide) e Basaloide (1). Abaixo, tabela

1, descrita com os subtipos de câncer de mama de acordo classificação molecular por IH (PEROU,2000):

Sub-tipo	Expressão
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2-
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2-
HER2 Positivo	RE-, RP- e HER2+
Basaloide	RE-, RP-, HER2-
Triplo Negativo não Basaloide	RE-, RP-, HER2-

Tabela 1- Representa a expressão dos receptores Hormonais para s cinco principais subtipos de Cancer de Mama.RE- Receptor Estrogeno; RP- Receptor Progesterona; Fonte: adaptada (PEROU,2000)

Os tumores Luminal A têm o melhor prognóstico e representam cerca de 30 a 40 % dos casos com relação aos outros quatro subtipos de câncer. Os tumores Luminal B têm um pior prognóstico quando compardos ao Luminal A, por seu maior índice de proliferação celular. Representa cerca de 10% dos tumores e é chamado de Luminal Híbrido quando expressa o HER2. O subtipo triplo negativo frequentemente também têm mutações nos genes BRCA1 (COELHO et al., 2018). O HER2 positivo apresenta mutações no braço longo dos cromossomo 17. Isso o torna o subtipo com o pior prognóstico, apresentando uma progressão rápida da doença e menor tempo de sobrevida dos pacientes com relação aos demais, (SERRA et al., 2014).

É recomendado para todos os casos de câncer mamário, que sejam avaliados o perfil dos receptores de estrógeno (RE), progesterona (RP), e receptor de fator de crescimento epidérmico HER-2 (GOLDHIRSCH et al., 2011).

HER2/neu é um proto-oncogene presente nas células normais que as ajudam em seu crescimento. Torna-se um oncogene quando uma célula tem muitas cópias deste gene, assim as células produzem proteína HER2 em excesso e o câncer é denominado HER2 positivo (NIXON; HANNOUF; VERMA, 2018), Conforme demonstrado na figura 2 abaixo:

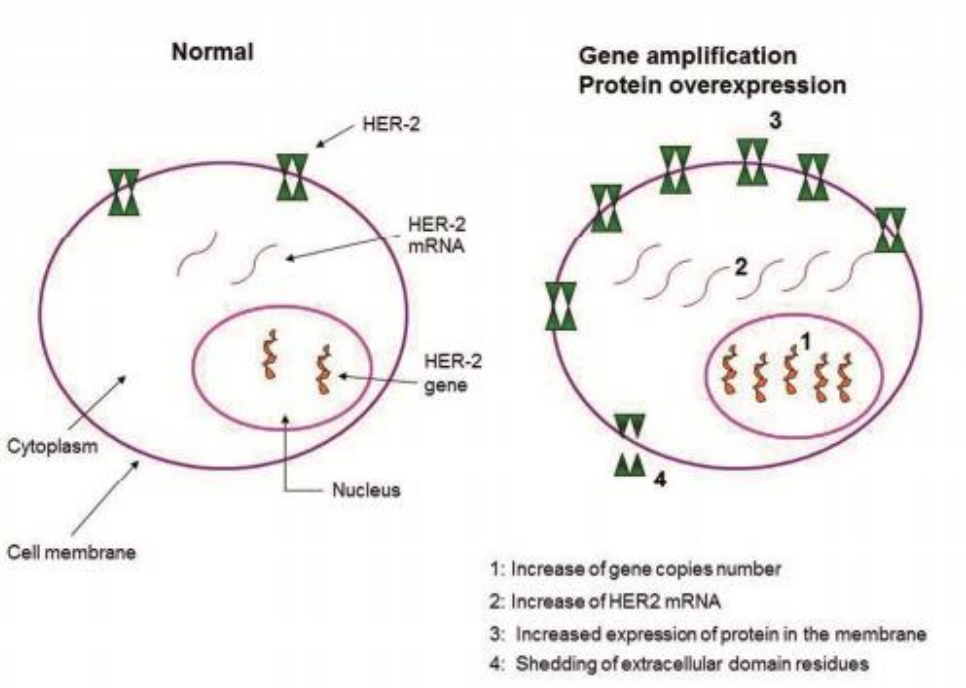


Figura 2 Representação da amplificação do Gene HER2. (1)Aumento do número de cópias do Gene HER2; (2) aumento do mRNA HER2; (3) Aumento da Proteína transmembrana HER2; (4) Liberação do Domíno Extra célular da proteína HER2 para o exterior da célula. Adaptado (LIN, 2012)

Essa proteína é produzida por um gene localizado no braço longo do cromossomo 17q11-12. A amplificação de genes HER2 é comum em tumores mamários humanos, esses receptores estão envolvidos na regulação, crescimento, sobrevivência, reparação do DNA antes da multiplicação, e também pela morte celular programada (NIXON; HANNOUF; VERMA, 2018). A proteína codificada pelo gene HER2 em amplificação proporciona um desenvolvimento e proliferação mais rápido para as células tumorais. Com isso os tumores tornam-se mais agressivos (LOO et al., 2011). O aumento da proteína HER2 no soro está relacionada com a carga tumoral, encontrando-se níveis mais altos nos tumores de mama no terceiro e quarto estágios, em que já há metástases (AMORIM et al., 2014), de acordo com a figua 3 abaixo demostrada.

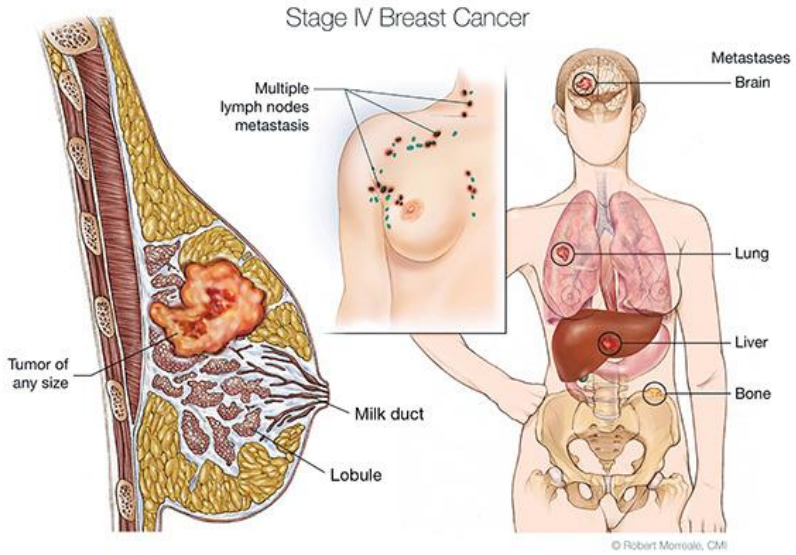


Figura 3 Mama com cancer e metastase para diverso orgãos. Mama com cancer e metastase para diverso orgãos. Bone- Osso; Liver-Fígado; Lung-Pulmão; Brain- Cerebro . Adaptado Bruce Blaus, 2016

2.3.2. Principais fatores de risco para o câncer de mama

O CM, como mostrado na Fig 3, ocorre pelo crescimento desordenado das células da mama a partir de alterações hereditárias ou adquiridas. Os principais fatores de risco para o seu desenvolvimento são:

- Idade a partir de 50 anos. Com o envelhecimento, o tecido glandular da mama vai dando lugar ao tecido adiposo (WENDER et al., 2017);
- Casos de CM na família, principalmente quando ocorreram com menos de 30 anos de idade (WENDER et al., 2017);
- Obesidade. Na juventude os ovários produzem a maior parte do estrogênio e o tecido adiposo produz apenas uma pequena quantidade. Porém, na menopausa, quando os ovários deixam de produzir estrogênio, o tecido adiposo passa a produzí-lo. Sendo assim, quanto maior o índice de tecido adiposo, maior é a produção de estrogênio, principalmente nesta fase da vida da mulher (CIRUELOS GIL, 2014);
- Etilismo. Acredita-se que o consumo de álcool leve a um aumento nos níveis de estrogênio plasmático (CHEN et al., 2011);
- Menarca precoce ou menopausa tardia; nuliparidade; e gestante idosa. Nessas condições a mulher fica mais tempo sob a exposição do estrogênio, portanto aumenta-se o a probabilidade de desenvolvimento do CM (WENDER et al., 2017).

2.3.3. Diagnóstico e tratamento do câncer de mama

O rastreamento do câncer de mama no Brasil é recomendado para mulheres acima de 50 anos, com exames de mamografia a cada dois anos. Através da mamografia se detecta um tumor que ainda não pode ser sentido através da palpação em até dois anos antes de seu aparecimento. A ultrassonografia é utilizada como complemento da mamografia, do exame físico e da anamnese, principalmente para diferenciar as lesões sólidas císticas. Por mostrar as margens irregulares numa massa sólida, os cistos e carcinomas são achados altamente sugestivos de malignidade (MIGOWSKI et al., 2018). Caso seja encontrada lesão sugestiva de CM é indicado uma biópsia, e o tecido removido é encaminhado para exame anatomopatológico. Esse, é de fundamental importância para determinar a natureza da lesão, e é considerado o exame padrão ouro para o diagnóstico e certeza do câncer (GODONE et al., 2018). É importante analisar o perfil do HER2 no fragmento do tecido mamário retirado durante a biópsia, este é um tipo de marcador molecular para fins de diagnóstico. A imuno-histoquímica (IH) é recomendada para a determinação da expressão de HER2 em tecidos seguida por fluorescência de hibridização in situ (FISH) para avaliar a amplificação do gene HER2 (SAADATI et al., 2019).

Porém, existe algumas limitações que incluem os resultados falso-positivos. Dificuldades de avaliação da coloração no IH, gerando ansiedade, realização desnecessária de exames complementares e resultados inconclusivos, promovem uma falsa tranquilidade para a paciente, bem como um falso diagnóstico e falta de tratamento adequado (TAYLOR).

A monitorização do HER2 através do método Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), já é reconhecida pelo Food and Drug Administration® (FDA), porém, ainda é uma técncia complexa que precisa de laboratórios e profissionais bastante especializados. Além disso, com os altos investimentos financeiros, essa técncia demostra que no soro humano de uma pessoa saudável a concentração de HER2 varia de 0 ng/mL a 15 ng/mL, e acima deste ponto é considerado superexpressão. Podendo, então, ser CM, há uma análise dos resultados juntamente com a história e a clínica da paciente. Cada marcador tumoral tem um valor de referência determinada, então taxas acima do valor dessa referência, apresentadas por pacientes, devem ser investigadas.(VONDELING et al., 2018).

Atualmente já existe medicamento específico para o CM HER2: o Transtuzumab. Considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um dos medicamentos essenciais ao combate do CM tipo HER2 Positivo. É disponibilizado pelo Sistema único de

Saúde (SUS) no Brasil, com a incorporação dessa terapia através da Portaria Conjunta SAS/SCTIE nº 4, publicada em 01 de fevereiro de 2018, que atualiza as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas da doença.

É necessário mais estudos na área diagnóstica, bem como desenvolvimentos de novos dispositivos analíticos, tais como os biossensores, a fim de realizar um diagnóstico incial e tratamento precoce da doença, haja vista que já existe medicamento específico para tal. Na tabela 2 estão dsipostas algumas publicações sobre uso dos aptassesnores na detecção do HER2, e no Capítulo 3 desta tese os Biossesnores serão expostos com mais detalhes.

Tabela 2 com Biossensores para detecção do HER2

Tipo de Biossensor	Amostra Analisada	*Tempo	Limite de detecção	Referência
1-Aptassensor Eletroquímico	Proteina HER2 em soro Humano	4’	3ng/mL	(Bezerra , 2019)
2-Aptassensor Eletroquímico	Proteina HER2 Diluida/água ultrapura	60’	5ng/mL	(CHUN et al., 2013)
3-Aptassensor Eletroquímico	1% soro bovino fetal	30’	10^{-12} M (0.14 ng/mL)	(SALIMIAN; KÉKEDY-NAGY; FERAPONTOVA, 2017)

*Tempo: Inclui apenas a medição do Sinal

O Aptassensor 1- Detecta o HER2 no soro humano em 4 minutos e com 3ng/mL de limite de detecção, 2 detecta o HER2 em água em 60 minutos com limite de detecção de 5ng/mL, já o 3 detecta o HER2 diluido em soro bovino em trinta minutos num limite de 0,14 ng/mL. O número 1 por ser detectado em soro humano apresenta uma importância clinica viável para o diagnóstico do HER2, com relação aos 2 e 3 que utilizaram como amostra a água e o soro bovino

3. BIOSSENSORES

Biossensor é um dispositivo que funciona como um aparelho de detecção analítica. Constituído por um EB responsável por identificar o A, a substância contida na amostra que será analisada, a reação entre o EB e A, acontece na superficie de uma plataforma chamada de T. Esse componente identifica e transforma um sinal, gerado das reações entre EB e A, em um sinal mensurável, enviando para o componente D, e informando a presença ou ausência do A em dados numéricos (SHASHAANI et al., 2016). A Figura 4 apresenta um esquema dos elementos que compõem um biossensor.

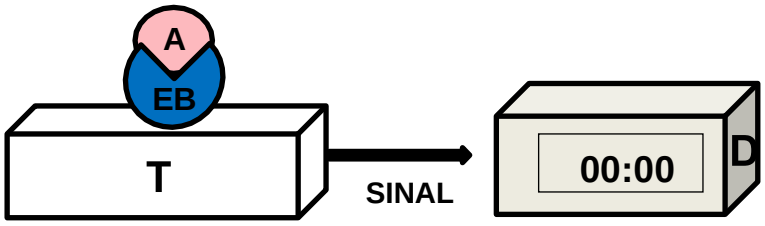


Figura 4 Esquema dos elementos do Biossensor. (A) Analito, (EB) Elemento de Biorreconhecimento (T) Transdutor,(D) Detector Fonte:(Autora, 2019)

Existem vários tipos de biossensores, e geralmente a nomenclatura atribuída a cada um deles depende do tipo de elemento de biorreconhecimento (enzima, aptamer, anticorpo, microbio, ácido nucleiocos) e do tipo de transdutor (eletroquímico, piezoeletricos, acústicos, ópticos, térmico) utilizados (OLIVEIRA et al., 2015).

Por serem dispositivos pequenos e permitirem uma análise rápida, como por exemplo os biossensores eletroquímicos, podem ser portáteis e de pronto uso, tendo a possibilidade de serem usados em diversos ambientes (MITTAL et al., 2017). Deste modo, esses dispositivos têm sido bastante utilizados em diferentes áreas, como indústrias de alimentos e farmacêuticas, na agricultura, saúde e forense. Quando esses setores necessitam de métodos analíticos rápidos, seguros e confiáveis, com resultados em tempo real, e precisando utilizar apenas pequenas quantidades de amostras, em que uma gota muitas vezes já é suficiente, em que encontram-se os analitos de interesse com alta seletividade e especificidade (ZHU et al., 2017).

3.1. BIOSSENSORES QUANTO AO ELEMENTO DE BIORRECONHECIMENTO

O Elemento de Biorreconhecimento é capaz de detectar a presença e a concentração de um analito específico numa amostra a ser analisada (JUSTINO et al., 2015).

- ANTICORPO: também chamado de Imunossensor. Aqui o elemento de biorreconhecimento é um anticorpo e possui uma superfície complementar à estrutura tridimensional do antígeno específico, formando complexos antígeno/anticorpo e gerando um sinal detectável. Seu uso como elemento de biorreconhecimento é baseado na reação imunológica, na extrema sensibilidade e especificidade das interações entre o complexo antígeno/anticorpo, como, por exemplo, o Imunossesnor para câncer (SAADATI et al., 2019);
- ENZIMA: Biossensor Enzimático. Nesse caso o elemento de biorreconhecimento é uma enzima extremamente específica para detectar seu alvo através da emissão de sinais durante a reação com consumo ou formação de novos produtos quando da interação enzima-substrato. Um exemplo de sensor enzimático é o que utiliza a enzima urease, muito útil no monitoramento da indústria alimentícea para detecção de níveis de ureia no leite de vaca (RAMESH et al., 2015);
- ÁCIDOS NUCLÉICOS: São os Genossensores. Dispositivos resultantes da interação entre uma sonda de um oligonucleotídeo sintético curto que funciona como o elemento de biorreconhecimento sendo capaz de detectar sua sequência de DNA complementa através do processo de hibridização. Um exemplo de um genosensor já desenvolvido é para detectar HPV (CAMPOS-FERREIRA et al., 2016);
- MICROBIOLÓGICO: Biossensores microbiológicos, baseados na detecção dos sinais emitidos durante o funcionamneto metabólico dos organismos vivos, tais como bactérias, fungos e vírus. Como por exemplo o biossensor para o Ebola (TEMBO et al., 2019);
- APTÂMEROS: Chamado de Aptassensor. Os aptâmeros ou anticorpos sintéticos, são pequenos fragmentos de oligonucleotidios de DNA ou RNA de cadeia simples, produzidos por meio de um processo de seleção, conhecido como "SELEX”. Assim, diversas sequências de aptâmero são identificados e em seguida sintetizadas quimicamente no laboratório de forma mais rápida e menos dispendiosa, sem os problemas tradicionais associados com a produção de anticorpos recombinantes. Os aptâmeros podem ser aplicados em diversas áreas, incluindo diagnósticos, terapêutica,

forense e biodefesa (MANUSCRIPT; CHEMISTRY, 2009). Eles apresentam algumas vantagens com relação aos demais elementos de biorreconecimento, como:

a) Os aptâmeros são capazes de excelente discriminação do alvo. Por esse motivo podem ser usados como elemento de biorreconhecimento para Biossensores (CORTEZ et al., 2012);

b) São resistentes a mudanças bruscas de temperatura. Eles podem ser desnaturados e renaturados várias vezes sem alterar sua estrutura funcional. Essa característica favorece seu uso como elemento de biorreconhecimento, devido ao fato de que ao longo dos experimentos necessitamos congelar e descongelar o aptâmero por diversas vezes (CAI et al., 2018);

c) Kits de aptâmeros baseados em diagnóstico foram desenvolvidos para a detecção de micotoxinas e aflatoxinas, toxinas que contaminam alimentos (CAI et al., 2018).

O padrão ouro para a detecção de pequenas moléculas é a espectrometria de massa, porém essa técnica necessita de laboratórios com equipamentos altamente específicos e caros, além de profisisonais com um alto grau de treinamento para operá-los corretamente (FANG et al., 2016). Os aptassensores aparecem como excelentes alternativas de análise, por possuir sensibilidade e seletividade similares à espectrometria de massa, e com vantagens sobre esse método porque podem ser usadas de forma simples e no local onde a amostra foi coletada, conferindo a esse dipositivo a portabilidade (WANG et al., 2016).

3.2. TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO DO ELEMENTO DE BIORECONHECIMENTO

A escolha da técnica da imobilização do elemento de biorreconhecimento no transdutor é uma etapa muito importante e conduz a um biossensor eficiente, simples, reprodutível e estável. É necessário que o EB tenha sítio ativo para que possa reagir ou interagir com o analito a ser detectado. As principais estratégias de imobilização podem ser descritas por métodos físicos (adsorção, oclusão ou encapsulamento) e químicos (ligação covalente e ligação cruzada) (MEDEIROS et al., 2012).

Um biossensor ideal precisa ser de fácil manipulação e armazenamento, tendo uma estocagem que mantenha sua validade por muito tempo, sendo assim o tipo de imobilização pode afetar a ação e estabilizadade do elemento de biorreconhecimento interferindo na precisão da detecção, repetibilidade e reprodutiviade das medições e resultados (AHUJA et al., 2007).

Encontrar a técnica de imobilização mais adequada depende da natureza do EB, do T e do método de detecção empregado. Uma estratégia muito eficaz que está sendo utilizada atualmente é o emprego de polímeros condutores que modificam a superfície do transdutor utilizado como plataforma de interface de reações entre o EB e A, favorecendo e mantendo uma imobilização mais adequada e eficaz, o principal papel dessa modificação é prever e controlar a natureza das reações que ocorrem na interface (EDWARDS; PORTER, 2007).

3.2.1. Método físico de imobilização do elemento de biorreconhecimento

- Adsorção: Baseado em ligações fracas (forças de Van-der-Waals e interações eletrostáticas e hidrofóbicas). Muito eficaz por não afetar a atividade biológica do EB. Apesar da simplicidade e eficácia, pode ter baixa estabilidade, por estarem fracamente ligadas ao T, podendo ocorrer facilmente uma dessorção. Nada que impeça o funcionamento do biossensor (GODA; MIYAHARA, 2012).
- Encapsulamento: Consiste no confinamento do EB em matrizes tridimensionais. É de fácil execução. Não ocorre alteração da atividade biológica durante o procedimento de imobilização. Pode proteger o componente biológico de mudanças na temperatura, pH, força iônica e composição química (ÖZDEMIR; ARSLAN; ARSLAN, 2012)

3.2.2. Método químico de imobilização do elemento de biorreconhecimento

- Ligação Covalente: As ligações covalentes entre um grupo funcional do EB, na superfície do suporte sólido T pode obter um controle mais preciso da imobilização, tornando-a mais segura e estável (YADAV et al., 2012).
- Ligação Cruzada: A Ligação ocorre entre o EB e a matriz de reticulação onde o mesmo será imobilizado. Apesar de simples tem uma elevada perca de atividade biológica.(LIU et al., 2013)

3.3. BIOSSENSORES QUANTO AO EVENTO DE BIORRECONHECIMENTO

Segundo o evento de biorreconhecimento interação entre o EB e A, os EB podem ser divididos em dois grupos (MEDEIROS et al., 2012), conforme descritos abaixo:

3.3.1. Evento de biorreconhecimento por biocatalise

Os biocatalisadores como, por exemplo, as enzimas que interagem com o A catalisando essa reação e transformando um composto em outro. Ou seja, EB transforma o alvo em outro produto e essa tranformação é captada e registrada pelo transdutor (RAMASAMY et al., 2014).

3.3.2. Evento de biorreconhecimento bioanalitico

Nesse caso o EB se liga ao A específico sem haver reação. A ligação ocorre por uma alteração conformacional da biomolécula e/ou mudança nas propriedades do meio através de uma ligação específica e seletiva entre o EB e A, formando assim um reação que é captada e detectada pelo T. (RAMASAMY et al., 2014).

3.4. BIOSSENSORES QUANTO AO TRANSDUTOR

Os transdutores são dispositivos que transformam um sinal biológico, proveniente da interação entre o EB e o A, num sinal mensurável, a depender da natureza desse transdutor e do evento de biorreconhecimento, como um sinal eletroquímico, emissão de calor, emissão de onda ou um campo eletromagnético. Destacamos a seguir os principais tipos de transdutores utilizados como platafroma de transdução para os biossensores (SOUZA et al., 2011).

3.4.1. Transdutores piezoelétricos

Determinados cristais quando deformados liberam cargas elétricas que se acumulam em suas faces. Essas cargas significam uma tensão elétrica que pode ser detectada por um circuito externo. Os Cristais de quartzo são bastante aplicados nesse tipo de transdutor, sendo capazes de detectar variações em frequêcia de ressonâcnia magnética a medida que ocorre proporcionalmente variação de massa na quantidade do analito presente no sistema (WANG et al., 2011).

3.4.2. Transdutor óptico

São baseados na medição da luz emitida como um resultado de uma reação química ou biológica entre o EB e A. A detecção do analito é realizada através da detecção da radiação

ótica, como absorção, índice de refração, fluorescência, fosforescência e comprimento de onda um processo luminescente (BREMER; ROTH, 2015).

3.4.3. Transdutor térmico

Também chamados de sensores Calorimétricos. Detectam um sinal baseados no calor que é liberado entre as reações bioquímicas do EB com o A. Esse tipo de biossensor foca a absorção ou liberação do calor dessas reações (LEE; LEE; KOH, 2012).

3.4.4. Transdutor eletroquímico

São os sensores mais utilizados no monitoramento e diagnósticos clínicos e apresentam muitas vantagens, tais como: são mais econômicos, sensíveis, rápidos e são portáteis. Nesse tipo de T uma ou mais reações químicas produzem ou consomem eletróns ou íons que provocam alterações nas propriedades elétricas das amostras onde estão o A a ser detectado (FREITAS; NOUWS; DELERUE-MATOS, 2019).

Os Transdutores eletroquímicos impressos com três trilhas de eletrodos, por exemplo, são compostos por um eletrodo de referência serigrafado por tinta de cloreto de prata (Ag/AgCl), um eletrodo auxiliar ou contra-referência e um eletrodo de trabalho serigrafado por tinta condutora de carbono. A superfície desses eletrodos serve como um condutor iônico. No Eletrodo de referência aplica-se um potencial conhecido, que é constante e estável. O contra-eletrodo promove o equilíbrio da corrente, evitando que as correntes geradas numa reação eletroquímica tenham um desequilibrio, assim, protegem o eletrodo de referência. O eletrodo de trabalho é o local onde são depositadas o EB e A. Dessa reação eletroquímica é gerado um sinal proveniente da reação química que ocorre na interface do eletrodo de trabalho (MEHRVAR; ABDI, 2005).

Abaixo estão descritos as principais categorias de biossensores que utilizam transdutores eletroquímicos conforme preconiza (WANG et al., 2008).

- Transdutor Condutimétricos: Mede as alterações da condutividade iónica. Produzem ou consomem espécies iônicas, alterando a quantidade de portadores de carga móvel no eletrólito;
- Transdutor Amperométrico: Mede a corrente resultante da oxiredução eletroquímica de uma espécie eletroativa A sob um potencial constante entre o eletrodo de trabalho

e o eletrodo de referência;

- Transdutor Voltamétrico: Mede a corrente resultante da oxiredução eletroquímica de uma espécie eletroativa A sob um potencial com variação controlada entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência. O resultado do pico de corrente é proporcional;
- Transdutor Potenciométrico: Mede a diferença de potencial entre o eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho, quando não há corrente significativa fluindo entre eles;
- Transdutor por Impedância: Mede e analisa as propriedades de resistividade e capacitividade de materiais em excitação provocado por frequência aplicada ao sistema.

Dentre os biossensores que utilizam transdutores eletroquímicos por técnicas voltamétricas, os mais utilizadas são por voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial. O parâmetro ajustado na voltametria é o potencial (E) e o medido é a corrente resultante (i). O registro da corrente em função do potencial se da através da transferência de elétrons durante a oxirredução, e é chamado de voltamograma, podendo ser relacionada com a quantidade de analito presente na amostra. Para tanto o analito ser capaz de sofrer a reação redox na faixa do potencial estudado (SCHOLZ, 2010). As técnicas mais utilizadas estão definidas abaixo:

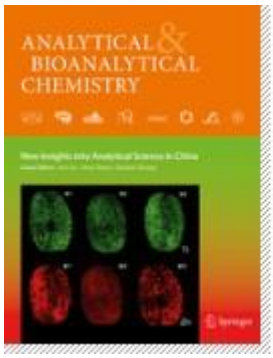
- Voltametria Ciclica: Nessa técnica o eletrodo é submetido a um varrimento de potencial linear, com velocidade constante que vai desde o início ao fim. O potencial inicial não causa alteração na reação eletroquímica. A medida que esse potencial vai aumentando para regiões negativas, acontece a redução do composto que está presente na reação, gerando assim um pico de corrente proporcional à concentração do composto presente. Então, assim que o potencial atingir um valor que o composto sofreu a redução, esse potencial é varrido no sentido contrário até alcançar o valor inicial (BARD 2001).
- Voltametria de Pulso Diferencial: Essa técnica ocorre por meio de aplicação de pulsos, com potencial que vai crescendo numa amplitude fixa, em curtos intervalos de tempo no eletrodo de trabalho, gerando um pico de corrente. Assim a corrente é lida duas vezes: uma antes da aplicação do pulso (S1) e outra no final do pulso (S2). O resultado do valor final da corrente é a diferença entre a corrente faradaica (S2 – corrente desejável) essa corrente é o resultado da interação entre o EB e o A e a corrente capacitiva (S1- ruído do sistema) essa corrente não é desejável, poque não reflete a

interação entre EB e A. É importante que o pico de corrente esteja livre de ruído no final, (SCHOLZ 2010).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. ARTIGO PUBLICADO

1618-2650	ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY (ONLINE)	A2
1618-2642	ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY (PRINT)	A2



Analytical and Bioanalytical Chemistry

Editors: A.J. Baeumner; H. Cui; G. Gauglitz; G. Hopfgartner; L. Mondello; M.C. Moreno-Bondi; D.C. Muddiman; S. Szunerits; Q. Wang; S.A. Wise
Chair Editor: Adam T. Woolley

ISSN: 1618-2642 (print version)
ISSN: 1618-2650 (electronic version)

Journal no. 216

Analytical and Bioanalytical Chemistry
https://doi.org/10.1007/s00216-019-02040-5

Read Online

RESEARCH PAPER

Check for updates

Electrochemical aptasensor for the detection of HER2 in human serum to assist in the diagnosis of early stage breast cancer

Giselda Bezerra[1] · Carolina Córdula[1] · Danielly Campos[1] · Gustavo Nascimento[1] · Natália Oliveira[1] · Maria Aparecida Seabra[1] · Valeria Visani[1] · Sampaio Lucas[1] · Iasmim Lopes[1] · Joana Santos[1] · Francisco Xavier Jr[1] · Maria Amélia Borba[1] · Danyelly Martins[1] · José Lima-Filho[1]

Received: 4 May 2019 / Revised: 7 July 2019 / Accepted: 17 July 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-019-02040-5

Abstract

Human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) is an important biomarker in the diagnosis and prognosis of breast cancer. This work aimed to develop an aptasensor to detect HER2 in human serum. HER2 aptamer was immobilized by electrostatic adsorption on the surface of a homemade screen-printed electrode modified with poly-L-lysine. Measurements were made by differential pulse voltammetry using methylene blue as a redox indicator. A calibration curve was constructed (R2 = 0.997) using different concentrations of HER2 protein (10–60 ng/mL) in PBS buffer (pH 7.4), with a detection limit of 3.0 ng/mL. The aptasensor showed good reproducibility with relative standard deviations (RSDs) of 3% and remained stable for 3 days with an RSD around 2%. When the tests were performed with serum from a healthy woman, a peak of 6.72 μA was found without the addition of the protein. When we tested the serum of a woman with HER2+ breast cancer, we obtained a signal of 2.65 μA; the same pattern was found when adding to protein in serum control, i.e., the higher the concentration of protein, the lower the signal. The aptasensor was characterized by scanning electron

microscopy and isothermal titration calorimetry (ITC), showing excellent interaction between aptamer and target protein. The results revealed a promising and sensitive tool capable of detecting HER2 protein in human serum with albumin depletion, aiding in the molecular diagnosis of breast cancer.

Figura 5. Graphic abstract

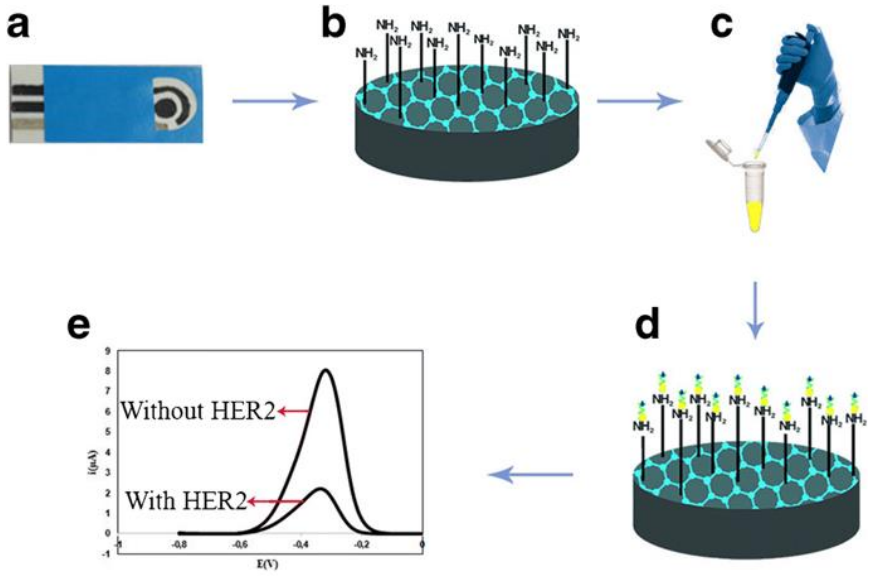


Figura 5 Esquema de funcinamento do Aptassensor para HER2. Esquema de funcinamento do Aptassensor para HER2 . (a) Transdutor com 02 eletrodos de carbono e 01 eletrodo de prata; (b) Superficie do eletrodo de trabalho ampliada e modificada com um filme de Poli- L-Lisina; (c) Pipetagem do Elemento de Biorreconhecimento e da Proteína HER2 na superficie de (b); (d) Imobilização Elemento de Biorreconhecimento e Intereação entre o Alvo HER2 ; (e) Resultado da leitura do aptassensor na presença e ausência do Alvo. (Fonte . Autora, Recife 2019)

5. CONCLUSÃO

O novo sensor desenvolvido é capaz de detectar a proteína HER2 no soro, com limite de detecção de 3 ng/mL em apenas 4 minutos. De forma seletiva e específica, provada quando utilizamos uma mólecula não específica, a insulina, para desafiar o sistema, o sensor fez a distinção e não detctou a moléculo, que foi escolhida porque está aumentada no soro em casos de câncer de mama. O sensor também possibilita rastrear o tratamento de portadoras de CM tipo HER2 através da comparação entre o valor de até 15ng/mL encontrado no soro de mulheres saudáveis. Conseguindo identificar o aumento ou diminuição da concentração do HER2, norteando a equipe de saúde assistente para a tomada de decisão. Assim, o sensor tem um grande potencial para auxiliar no diagnóstico precoce e monitoramento contínuo do CM tipo HER2 positivo. Aparece como um importante coadjuvante do método atual de diagnóstico, já que pode ser usado de forma simples e portátil, sendo também menos, e mais rápida com relação ao tempo resposta.

REFERÊNCIAS

AHUJA, T; MIR, I; KUMAR, D. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. Biomaterials, [s.l.], v. 28, n. 5, p.791-805, fev. 2007. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.046.

AMORIM, Maria et al. The overexpression of a single oncogene (ERBB2/HER2) alters the proteomic landscape of extracellular vesicles. Proteomics, [s.l.], v. 14, n. 12, p.1472-1479, 15 maio 2014. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201300485.

ARKAN, Elham et al. A novel antibody–antigen based impedimetric immunosensor for low level detection of HER2 in serum samples of breast cancer patients via modification of a gold nanoparticles decorated multiwall carbon nanotube-ionic liquid electrode. Analytica Chimica Acta, [s.l.], v. 874, p.66-74, maio 2015. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.03.022.

BOLLELLA, Paolo et al. Beyond graphene: Electrochemical sensors and biosensors for biomarkers detection. Biosensors And Bioelectronics, [s.l.], v. 89, p.152-166, mar. 2017. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.03.068.

BREMER, Kort; ROTH, Bernhard. Fibre optic surface plasmon resonance sensor system designed for smartphones. Optics Express, [s.l.], v. 23, n. 13, p.17179-17184, 23 jun. 2015. The Optical Society. http://dx.doi.org/10.1364/oe.23.017179.

CAMPOS-FERREIRA, Danielly S. et al. Electrochemical DNA biosensor for the detection of human papillomavirus E6 gene inserted in recombinant plasmid. Arabian Journal Of Chemistry, [s.l.], v. 9, n. 3, p.443-450, maio 2016. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.05.023.

CARNEY, Walter P. Circulating oncoproteins HER2/neu, EGFR and CAIX (MN) as novel cancer biomarkers. Expert Review Of Molecular Diagnostics, [s.l.], v. 7, n. 3, p.309-319, maio 2007. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1586/14737159.7.3.309.

CHEN, Wendy Y. et al. Moderate Alcohol Consumption During Adult Life, Drinking Patterns, and Breast Cancer Risk. Jama, [s.l.], v. 306, n. 17, p.1884-1890, 2 nov. 2011. American Medical Association (AMA). http://dx.doi.org/10.1001/jama.2011.1590.

CHUN, Limin et al. Electrochemical detection of HER2 using single stranded DNA aptamer modified gold nanoparticles electrode. Sensors And Actuators B: Chemical, [s.l.], v. 186, p.446-450, set. 2013. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.06.046.

COELHO, Aline Silva et al. Hereditary predisposition to breast cancer and its relation to the BRCA1 and BRCA2 genes: literature review. Revista Brasileira de Análises Clínicas, [s.l.], v. 50, n. 1, p.787-792, 2018. Revista Brasileira de Analises Clinicas. http://dx.doi.org/10.21877/2448-3877.201800615.

CORTEZ, Célia Martins et al. Interactions of aptamers with sera albumins. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, [s.l.], v. 95, p.270-275, set. 2012. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2012.04.053.

EFARED, Boubacar et al. The Assessment of HER2 Gene Status by Fluorescence In Situ Hybridization in Invasive Breast Carcinomas With Equivocal HER2 Immunostaining: Experience From a Single Institution. International Journal Of Surgical Pathology, [s.l.], v. 26, n. 7, p.593-599, 9 abr. 2018. SAGE Publications. http://dx.doi.org/10.1177/1066896918767546.

ELETXIGERRA, U. et al. Amperometric magnetoimmunosensor for ErbB2 breast cancer biomarker determination in human serum, cell lysates and intact breast cancer cells. Biosensors And Bioelectronics, [s.l.], v. 70, p.34-41, ago. 2015. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2015.03.017.

EMAMI, Mahdi et al. An electrochemical immunosensor for detection of a breast cancer biomarker based on antiHER2–iron oxide nanoparticle bioconjugates. The Analyst, [s.l.], v. 139, n. 11, p.2858-2866, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC). http://dx.doi.org/10.1039/c4an00183d.

FANG, Huiling et al. Determination of 1,25-dihydroxyvitamin D 2 and 1,25-dihydroxyvitamin D 3 in human serum using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Journal Of Chromatography B, [s.l.], v. 1027, p.19-26, ago. 2016. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.04.034.

FREITAS, Maria; NOUWS, Henri P. A.; DELERUE-MATOS, Cristina. Electrochemical Sensing Platforms for HER2-ECD Breast Cancer Biomarker Detection. Electroanalysis, [s.l.], v. 31, n. 1, p.121-128, 27 nov. 2018. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/elan.201800537.

GEDDES, D. Inside the Lactating Breast: The Latest Anatomy Research. Journal Of Midwifery & Women's Health, [s.l.], v. 52, n. 6, p.556-563, nov. 2007. Wiley. http://dx.doi.org/10.1016/j.jmwh.2007.05.004.

GIL, Eva Maria Ciruelos. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in estrogen receptor-positive breast cancer. Cancer Treatment Reviews, [s.l.], v. 40, n. 7, p.862-871, ago. 2014. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2014.03.004

GODA, Tatsuro; MIYAHARA, Yuji. Interpretation of Protein Adsorption through Its Intrinsic Electric Charges: A Comparative Study Using a Field-Effect Transistor, Surface Plasmon Resonance, and Quartz Crystal Microbalance. Langmuir, [s.l.], v. 28, n. 41, p.14730-14738, out. 2012. American Chemical Society (ACS). http://dx.doi.org/10.1021/la302977s

GODONE, R.l.n. et al. Clinical and molecular aspects of breast cancer: Targets and therapies. Biomedicine & Pharmacotherapy, [s.l.], v. 106, p.14-34, out. 2018. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.066.

GOLDHIRSCH, A. et al. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. Annals Of Oncology, [s.l.], v. 22, n. 8, p.1736-1747, ago. 2011. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdr304.

INGH, Seema et al. A quantum dot–MUC1 aptamer conjugate for targeted delivery of protoporphyrin IX and specific photokilling of cancer cells through ROS generation. Integrative Biology, [s.l.], v. 8, n. 10, p.1040-1048, 2016. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1039/c6ib00092d.

INOUE, Kazushi; FRY, Elizabeth A.. Novel Molecular Markers for Breast Cancer. Biomarkers In Cancer, [s.l.], v. 8, p.25-42, jan. 2016.

LEE, Wonhee; LEE; KOH. Development and applications of chip calorimeters as novel biosensors. Nanobiosensors In Disease Diagnosis, [s.l.], p.17-29, abr. 2012. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.2147/ndd.s26438.

LIN, Francini Matos Lima; BARACAT, Edmund Chada; CARVALHO, Filomena Marino. Amplification of the Oncogene HER2 in Breast Cancer: Molecular Basis and Therapeutic Significance. Journal Of The Senologic International Society, [s.l.], v. 1, n. 2, p.57-72, 30 mar. 2012. Senologic International Society. http://dx.doi.org/10.7170/jsis.v1i2.11.

LIU, Xingfen et al. An ultrasensitive label-free biosensor for assaying of sequence-specific DNA-binding protein based on amplifying fluorescent conjugated polymer. Biosensors And Bioelectronics, [s.l.], v. 41, p.218-224, mar. 2013. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2012.08.027.

LOO, Lina et al. Highly Sensitive Detection of HER2 Extracellular Domain in the Serum of Breast Cancer Patients by Piezoelectric Microcantilevers. Analytical Chemistry, [s.l.], v. 83, n. 9, p.3392-3397, maio 2011. American Chemical Society (ACS). http://dx.doi.org/10.1021/ac103301r.

MARQUES, Raquel C.b. et al. Electrochemical immunosensor for the analysis of the breast cancer biomarker HER2 ECD. Talanta, [s.l.], v. 129, p.594-599, nov. 2014. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.06.035.

MEDEIROS, E. S. et al. Uso de Polímeros Condutores em Sensores . Revista Eletrônica de Materiais e Processos, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 62–77, 2012

MEDEIROS, Giselle Coutinho et al. Análise dos determinantes que influenciam o tempo para o início do tratamento de mulheres com câncer de mama no Brasil. Cadernos de Saúde Pública, [s.l.], v. 31, n. 6, p.1269-1282, jun. 2015. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/0102-311x00048514

MEHRVAR, Mehrab; ABDI, Mustafe. Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors. Analytical Sciences, [s.l.], v. 20, n. 8, p.1113-1126, 2004. Japan Society for Analytical Chemistry. http://dx.doi.org/10.2116/analsci.20.1113

MIGOWSKI, Arn et al. Diretrizes para detecção precoce do câncer de mama no Brasil. II - Novas recomendações nacionais, principais evidências e controvérsias. Cadernos de Saúde Pública, [s.l.], v. 34, n. 6, p.1-16, 21 jun. 2018. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/0102-311x00074817.

MITTAL, Sunil et al. Biosensors for breast cancer diagnosis: A review of bioreceptors, biotransducers and signal amplification strategies. Biosensors And Bioelectronics, [s.l.], v. 88, p.217-231, fev. 2017. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.028.

NIXON, N.a.; HANNOUF, M.b.; VERMA, S.. A review of the value of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-targeted therapies in breast cancer. European Journal Of Cancer, [s.l.], v. 89, p.72-81, jan. 2018. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2017.10.037.

OLIVEIRA, N.c.l. et al. DNA biosensor as a confirmatory test: Studies of household cleaners effects of onto electrochemical DNA detection. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, [s.l.], v. 5, p.162-164, dez. 2015. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigss.2015.09.065.

ÖZDEMIR, Merve; ARSLAN, Fatma; ARSLAN, Halit. An amperometric biosensor for choline determination prepared from choline oxidase immobilized in polypyrrole-polyvinylsulfonate film. Artificial Cells, Blood Substitutes, And Biotechnology, [s.l.], v. 40, n. 4, p.280-284, 3 abr. 2012. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.3109/10731199.2011.646411.

PATRIS, Stéphanie et al. Nanoimmunoassay onto a screen printed electrode for HER2 breast cancer biomarker determination. Talanta, [s.l.], v. 130, p.164-170, dez. 2014. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.06.069.

PEROU, Charles M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature, [s.l.], v. 406, n. 6797, p.747-752, ago. 2000. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/35021093.

PFEIFFER, Franziska; MAYER, Günter. Selection and Biosensor Application of Aptamers for Small Molecules. Frontiers In Chemistry, [s.l.], v. 4, p.4-25, 15 jun. 2016. Frontiers Media SA. http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2016.00025.

RAMASAMY, Ramesh et al. Biosensors in clinical chemistry: An overview. Advanced Biomedical Research, [s.l.], v. 3, n. 1, p.3-67, 2014. Medknow. http://dx.doi.org/10.4103/2277-9175.125848.

RAMESH, Rajendran et al. Potentiometric biosensor for determination of urea in milk using immobilized Arthrobacter creatinolyticus urease. Materials Science And Engineering: C, [s.l.], v. 49, p.786-792, abr. 2015. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.01.048.

SAADATI, Arezoo et al. Immunosensing of breast cancer tumor protein CA 15-3 (carbohydrate antigen 15.3) using a novel nano-bioink: A new platform for screening of proteins in human biofluids by pen-on-paper technology. International Journal Of Biological Macromolecules, [s.l.], v. 132, p.748-758, jul. 2019. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.170.

SALIMIAN, Razieh; KÉKEDY-NAGY, László; FERAPONTOVA, Elena E.. Specific Picomolar Detection of a Breast Cancer Biomarker HER-2/neu Protein in Serum: Electrocatalytically Amplified Electroanalysis by the Aptamer/PEG-Modified Electrode. Chemelectrochem, [s.l.], v. 4, n. 4, p.872-879, 15 mar. 2017. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/celc.201700025.

SERRA, Katia Piton et al. Nova classificação dos carcinomas da mama: procurando o luminal A. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, [s.l.], v. 36, n. 12, p.575-580, dez. 2014. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/so100-720320140005158.

SHAMSIPUR, Mojtaba et al. A sandwich-type electrochemical immunosensor based on in situ silver deposition for determination of serum level of HER2 in breast cancer patients. Biosensors And Bioelectronics, [s.l.], v. 103, p.54-61, abr. 2018. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2017.12.022.

SHASHAANI, Hani et al. Silicon nanowire based biosensing platform for electrochemical sensing of Mebendazole drug activity on breast cancer cells. Biosensors And Bioelectronics, [s.l.], v. 85, p.363-370, nov. 2016. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.04.081.

SMITH, Robert A. et al. Cancer screening in the United States, 2017: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. Ca: A Cancer Journal for Clinicians, [s.l.], v. 67, n. 2, p.100-121, 7 fev. 2017. Wiley. http://dx.doi.org/10.3322/caac.21392.

SOUZA, Elaine et al. Label-Free Electrochemical Detection of the Specific Oligonucleotide Sequence of Dengue Virus Type 1 on Pencil Graphite Electrodes. Sensors, [s.l.], v. 11, n. 6, p.5616-5629, 26 maio 2011. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/s110605616.

TAGLIAFICO, Alberto Stefano et al. An exploratory radiomics analysis on digital breast tomosynthesis in women with mammographically negative dense breasts. The Breast, [s.l.], v. 40, p.92-96, ago. 2018. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2018.04.016.

TAYLOR, Paul; POTTS, Henry W.w.. Computer aids and human second reading as interventions in screening mammography: Two systematic reviews to compare effects on cancer detection and recall rate. European Journal Of Cancer, [s.l.], v. 44, n. 6, p.798-807, abr. 2008. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2008.02.016.

TEMBO, John et al. Recent advances in the development and evaluation of molecular diagnostics for Ebola virus disease. Expert Review Of Molecular Diagnostics, [s.l.], v. 19, n. 4, p.325-340, 3 abr. 2019. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1080/14737159.2019.1595592.

UNGER-SALDAÑA, Karla. Challenges to the early diagnosis and treatment of breast cancer in developing countries. World Journal Of Clinical Oncology, [s.l.], v. 5, n. 3, p.465-477, 2014. Baishideng Publishing Group Inc.. http://dx.doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.465.

VONDELING, G. T. et al. Burden of early, advanced and metastatic breast cancer in The Netherlands. Bmc Cancer, [s.l.], v. 18, n. 1, p.1-11, 7 mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1186/s12885-018-4158-3.

WANG, Gang et al. A living cell quartz crystal microbalance biosensor for continuous monitoring of cytotoxic responses of macrophages to single-walled carbon nanotubes. Particle And Fibre Toxicology, [s.l.], v. 8, n. 1, p.4-8, 2011. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1186/1743-8977-8-4

WANG, You et al. Electrochemical Sensors for Clinic Analysis. Sensors, [s.l.], v. 8, n. 4, p.2043-2081, 27 mar. 2008. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/s8042043

WANG, Zonghua et al. Carbon nanomaterials-based electrochemical aptasensors. Biosensors And Bioelectronics, [s.l.], v. 79, p.136-149, maio 2016. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2015.11.093.

YADAV, Sandeep et al. Immobilization of creatininase, creatinase and sarcosine oxidase on iron oxide nanoparticles/chitosan-g-polyaniline modified Pt electrode for detection of creatinine. Enzyme And Microbial Technology, [s.l.], v. 50, n. 4-5, p.247-254, abr. 2012. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.01.008.

ZHANG, Xiao-hong; XIAO, Can. Diagnostic Value of Nineteen Different Imaging Methods for Patients with Breast Cancer: a Network Meta-Analysis. Cellular Physiology And Biochemistry, [s.l.], v. 46, n. 5, p.2041-2055, 2018. S. Karger AG. http://dx.doi.org/10.1159/000489443.