

# DESENVOLVIMENTO DE APTASENSOR PARA DIAGNÓSTICO DE INFARTO AGUDO DO MIORCÁRDIO

Valter Romão de Souza Junior<sup>1</sup>; Luiz Bezerra de Carvalho Júnior<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Medicina - CCB – UFPE; E-mail: jr\_walter@hotmail.co.uk, <sup>2</sup>Docente/pesquisador do Depto de Bioquímica– CCB – UFPE. E-mail: lbcj.br@gmail.com.

**Sumário:** As doenças cardiovasculares, principalmente o infarto agudo do miocárdio (IAM), representam a principal causa de mortalidade e incapacidade no Brasil e no mundo, sendo fundamental a rapidez na confirmação do diagnóstico para instituição do tratamento. Esta alta incidência de mortes, geralmente nas primeiras horas de acometimento da doença, muitas vezes ocorre devido a falta de métodos diagnósticos rápidos e eficazes existentes atualmente. Pensando nesta problemática este trabalho visou desenvolver um biossensor para diagnóstico rápido usando aptâmero de RNA em uma superfície de grafeno para reconhecer a troponina cardíaca (biomarcador do IAM). No desenvolvimento de biossensores, o aptâmero - molécula RNA ou de DNA de curto tamanho com cadeia simples (ssDNA) que pode se ligar a uma vasta gama de alvos com elevada especificidade e afinidade- possui uma elevada estabilidade térmica e é de fácil modificação química. Dessa forma, quando a molécula de aptâmero, imobilizada em uma superfície de grafeno reduzido, reconheceu a troponina, visualizou-se um decrescimento do pico da corrente de 5,96  $\mu\text{A}$  para 5,07 $\mu\text{A}$ ; assim, pode-se identificar esse biomarcador na corrente sanguínea.

**Palavras-chave:** biossensores; infarto agudo miocárdio; nanocompósito.

## INTRODUÇÃO

O infarto do miocárdio, é uma patologia causada por redução do aporte sanguíneo no músculo cardíaco, decorrente do bloqueio do fluxo de sangue em uma artéria coronária (CASTRO, 2009). Atualmente o critério utilizado para determinação do IAM são a observância de ao menos dois destes fatores: sintomatologia isquêmica, alterações sugestivas no eletrocardiograma e elevação enzimática (CK-MB, troponina T e I) (WHITE; CHEW, 2008). Dentre os biomarcadores utilizados, as troponinas cardíacas (T e I) têm sido a escolha para o diagnóstico sorológico e prognóstico, em virtude de sua alta sensibilidade e especificidade (GODOY; BRAILE; PURINI NETO, 1998). Para atender esta necessidade, os biossensores surgem como métodos de diagnóstico mais rápidos, práticos e de custo relativamente reduzido. Como proposta, o projeto visa à implementação de um modelo de detecção rápida para troponina T cardíaca, utilizando para isso biossensores. Estes ainda contam com a possibilidade de miniaturização e utilização em municípios e cidades mais afastadas dos grandes centros médicos. Contribuindo para redução das taxas de mortalidade causadas pelo IAM através do diagnóstico prático e rápido. Com as medições acontecendo em tempo real será possível evitar grandes aglomerações nos hospitais das cidades repercutindo na economia para o paciente e para o setor público (PABIS et al., 2008).

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os biossensores de DNA foram construídos por meio da técnica printscreen. Após esta etapa, a superfície do eletrodo de trabalho foi modificada com grafeno oxidado para promover a imobilização do aptâmero. Nesta etapa 10  $\mu\text{l}$  do grafeno oxidado foi depositado na superfície do eletrodo de trabalho e seco em estufa à 50°C. Após a secagem

do GO (grafeno oxidado) o eletrodo foi lavado com água ultrapura e seco a temperatura ambiente. Realizou-se o mesmo processo utilizando o rGO (grafeno reduzido) em vez do GO. Logo em seguida, para imobilização do aptâmero, 5µl dessa molécula foi imobilizado estavelmente na superfície nanoestruturada com GO durante 15 minutos, permitindo a ligação do aptâmero à superfície do eletrodo. Depois, realizou-se o mesmo procedimento com rGO. Para detecção dos níveis de troponina cardíaca, a molécula alvo foi adicionada sobre o transdutor imobilizado com o aptâmero e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente. Foi utilizado o azul de metileno como mediador químico, cuja finalidade foi proporcionar eletroquimicamente um meio para visualização das reações redox ocorridas na superfície transdutora. Realizou-se esse procedimento no eletrodo modificado com rGO. Para otimização da imobilização do biorreceptor sob os eletrodos impressos, foram testadas as concentrações de aptâmero em 0,1 µM; 0,5 µM; 1,0 µM; 1,5 µM e 3,0 µM. Logo em seguida testou a concentração de 1,5 µM relacionando com os tempos de 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos e 60 minutos. As análises dos sinais eletroquímicos, as leituras do eletrodo foram realizadas em célula eletrolítica contendo tampão Fosfato pH 7 e acoplados ao equipamento potenciostato AUTOLAB usando como interface o software GPES 4.9. A técnica de Voltametria de Pulso Diferencial (DPV) foi utilizada para detecção dos sinais eletroquímicos onde foi aplicada uma varredura de potenciais entre -4,0 e 0,0, com amplitude de 10 mV e velocidade de varredura 20 mV/s.

## RESULTADOS

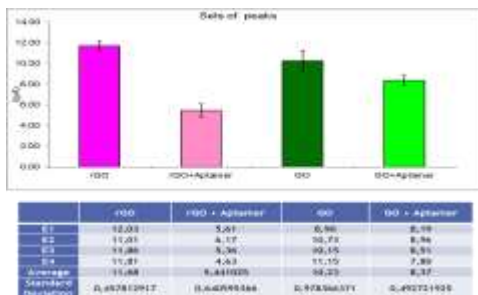


FIGURA 1: COMPARAÇÃO DA REPRODUTIVIDADE E IMOBILIZAÇÃO DO ELETRODO MODIFICADO COM rGO OU GO.

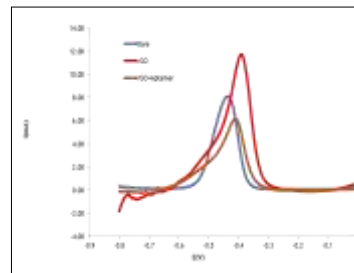


FIGURA 2: DPV DO ELETRODO MODIFICADO COM rGO E IMOBILIZADO COM APTÂMERO.

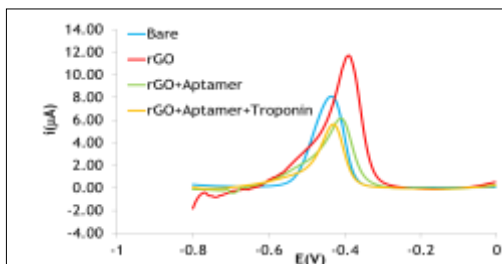


FIGURA 3: DPV DO ELETRODO MODIFICADO COM GO E IMOBILIZADO COM APTÂMERO.

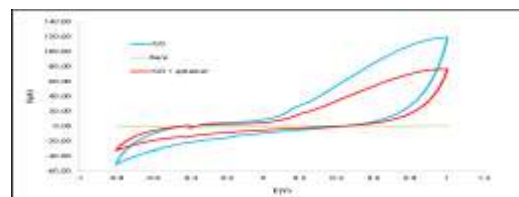


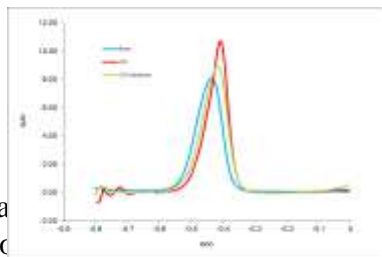
FIGURA 4: COMPARAÇÃO DAS VOLTAMETRIA CICLICA DO ELETRODO MODIFICADO COM rGO E IMOBILIZADO COM APTÂMERO.

## DISCUSSÃO

Primeiramente, na modificação da superfície do eletrodo, comparou-se qual entre o rGO e GO teria melhores resultados eletroquímicos: condutância, imobilização do aptâmero, menor variação de picos.

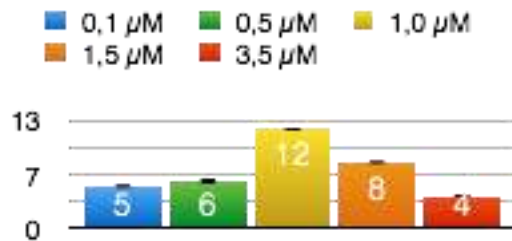
Pelas análises, o rGO apresentou-se como melhor opção para modificar a superfície

FIGURA 5: COMPARAÇÃO DE DPV DO ELETRODO MODIFICADO COM rGO E IMOBILIZADO COM APTÂMERO E COM A MOLÉCULA DE TROPONINA.



deca ser c

FIGURA 6: COMPARAÇÃO DA REPRODUTIVIDADE E IMOBILIZAÇÃO DO ELETRODO MODIFICADO VARIANDO A CONCENTRAÇÃO DE APTÂMERO NA SUPERFÍCIE DE rGO.



deca ser c nobilização. Estes dados de imobilização também podem ser c DPV (figura 2), na qual o rGO (linha vermelha) atingiu 11,7 μA de corrente decrescendo para 6,16 μA (Linha marrom) após a imobilização. Enquanto, na figura 3, a comparação de DPV mostra que o GO (linha vermelha) atingiu a corrente de 10,72 μA caindo para 8,89 μA com aptâmero imobilizado (Linha verde), ratificando sua menor eficiência no processo de imobilização. Quanto a imobilização do aptâmero na superfície do eletrodo modificado com o grafeno reduzido, observou-se uma diminuição do pico de corrente de 120 μA (Linha azul) para 80 μA (Linha vermelha) após a imobilização do aptâmero (Figura 4). Isso se deve ao fato do aptâmero se ligar com o grafeno reduzido, formando uma camada mais espessa, o que dificulta a passagem dos eletros. Assim, a condução de corrente no sistema é diminuída, repercutindo nos picos de oxidação e redução, cada vez menores (figura 4). Da mesma forma, quando a troponina é reconhecida pelo aptâmero (Figuras 5), visualizamos um decrescimento do pico da corrente de 5,96 μA para 5,07 μA, este comportamento justifica-se devido a troponina ser uma molécula de alto peso molecular e acabar dificultando mais ainda a passagem de eletrons no eletrodo. Dentre as diferentes concentrações de aptamero testadas, elas apresentaram médias de picos aproximadamente 5,1 μA; 5,73 μA; 11,9 μA; 7,95 μA e 3,91 μA, a de 1,5 μM apresentou o melhor sinal eletroquímico (7,95 μA), pois apresentou menor desvio do valor do pico (0,04), como pode ser observado na figura 6.

## CONCLUSÕES

Assi, a modificação na plataforma biossensora foi eficiente para a imobilização do aptamero e este reconhecer a troponina molécula alvo. Isto viabiliza seu uso para os futuros testes com as amostras dos pacientes, fazendo com que melhore o diagnóstico



precoce de pacientes acometidos pelo IAM através de uma tecnologia sensível e de baixo custo.

### **AGRADECIMENTOS**

CNPq, LIKA, UFPE, CAPES.

### **REFERÊNCIAS**

CASTRO, M. L. DE. 9. Infarto agudo do miocárdio. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 93, n. 6, p. 132–137, 2009.

GODOY, M. F. DE; BRAILE, D. M.; PURINI NETO, J. A troponina como marcador de injúria celular miocárdica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 71, n. 4, p. 629–633, 1998.

PABIS, F. C. et al. Avaliação ecocardiográfica evolutiva do infarto do miocárdio em ratos jovens e adultos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 91, n. 5, p. 321–326, 2008.

WHITE, H. D.; CHEW, D. P. Acute myocardial infarction. *The Lancet*, v. 372, n. 9638, p. 570–584, ago. 2008.