

RAFAEL DA FONSECA ALVES

**Abordagens bionalíticas baseadas em peptídeo recombinante
selecionado por *Phage Display* visando a detecção e caracterização
de câncer de mama**

Tese de Doutorado apresentada ao Conselho do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” campus Araraquara, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Del Pilar Taboada Sotomayor

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Thaise Gonçalves de Araújo

Araraquara

2023

A474a	Alves, Rafael da Fonseca Abordagens bionalíticas baseadas em peptídeo recombinante selecionado por Phage Display visando a detecção e caracterização de câncer de mama / Rafael da Fonseca Alves. -- Araraquara, 2023 163 f. : il. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara Orientadora: Maria Del Pilar Taboada Sotomayor Coorientadora: Thaíse Gonçalves de Araújo 1. Câncer - Diagnóstico. 2. Peptídeos. 3. Biossensores. 4. Ensaio de imunoadsorção enzimática. 5. Exossomos. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Esta tese é inovadora ao apresentar novas ferramentas para a detecção e caracterização molecular do câncer de mama, abrindo novos caminhos para a prática clínica. A pesquisa realizada nesta tese tem um potencial significativo para beneficiar a sociedade de várias maneiras. Em primeiro lugar, o desenvolvimento de métodos de detecção mais precisos e sensíveis para o câncer de mama pode contribuir para um diagnóstico mais precoce, levando a melhores resultados de tratamento e aumento das taxas de sobrevivência. O ensaio ELISA e o biossensor desenvolvidos nesta pesquisa demonstraram um bom desempenho, indicando seu potencial como uma ferramenta de diagnóstico mais eficiente e confiável.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This thesis is innovative in presenting new tools for the detection and molecular characterization of breast cancer, opening new avenues for clinical practice. The research conducted in this thesis holds significant potential to benefit society in several ways. Firstly, the development of more precise and sensitive detection methods for breast cancer can contribute to earlier diagnosis, leading to improved treatment outcomes and increased survival rates. The ELISA assay and biosensor developed in this research has demonstrated a good performance, indicating its potential as a more efficient and reliable diagnostic tool.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE:

"Abordagens bionálticas baseadas em peptídeo recombinante selecionado por Phage Display visando a detecção e caracterização de câncer de mama"

AUTOR: RAFAEL DA FONSECA ALVES

ORIENTADORA: MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR

COORIENTADORA: THAISE GONÇALVES DE ARAÚJO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:

 Documento assinado digitalmente
MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR
Data: 05/06/2023 09:09:49-0300
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

Prof.^a Dr.^a MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR (Participação Presencial)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof.^a Dr.^a HIDEKO YAMANAKA (Participação Presencial)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química UNESP Araraquara

Prof. Dr. LUCAS FRANCO FERREIRA (Participação Virtual)
Instituto de Ciência e Tecnologia / Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM - Diamantina

Prof.^a Dr.^a YARA CRISTINA DE PAIVA MAIA (Participação Virtual) Faculdade
de Medicina / Universidade Federal de Uberlândia - Uberlândia MG

Prof. Dr. ADRIANO DOS SANTOS (Participação Presencial)
Departamento de Engenharia, Física e Matemática / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 02 de junho de 2023

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Rafael da Fonseca Alves

Nome em citações bibliográficas: ALVES, R. F.; DA FONSECA ALVES, RAFAEL

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Doutorado em Biotecnologia

UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara/SP.

Período: 02/2019 – 06/2023

Título da Tese: “Abordagens bionalíticas baseadas em peptídeo recombinante selecionado por *Phage Display* visando a detecção e caracterização de câncer de mama.”

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria del Pilar Taboada Sotomayor.

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Thaise Gonçalves de Araújo.

Bolsa: FAPESP Proc. nº 2019/10452-2

Doutorado Estágio Pesquisa no Exterior

Universitat Autònoma de Barcelona - UAB. Barcelona, Espanha.

Período: 04/2022 – 03/2023

Título: “Application of recombinant peptides selected by *Phage Display* as biorecognition platforms in lateral flow assays for the diagnosis of Breast Cancer.”

Supervisora no exterior: Prof.^a Dr.^a María Isabel Pividori

Bolsa: BEPE - FAPESP - Proc. nº 2021/12307-0

Mestrado em Biotecnologia

UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara/SP.

Período: 03/2016 – 02/2019

Título da dissertação: “Modificação e caracterização de eletrodos de baixo custo com material derivado de ácido 3-amino-4-hidroxibenzóico visando o desenvolvimento de genossensor aplicado ao diagnóstico do Zika vírus.”

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria del Pilar Taboada Sotomayor

Bolsa: FAPESP Proc. nº 2017/ 07436-0

Mestrado Estágio Pesquisa no Exterior

Universitat Autònoma de Barcelona - UAB. Barcelona, Espanha.

Período: 09/2018 – 01/2019

Título: “Molecularly imprinted biotin polymer for isolation and detection of zika-specific oligonucleotides biotinylated viruses with lateral flow and electrochemical system.”

Supervisora no exterior: Prof.^a Dr.^a María Isabel Pividori

Bolsa: BEPE (FAPESP - Proc. nº 2018/ 09596-7)

Graduação em Biotecnologia

UFU - Universidade Federal de Uberlândia, Campus - Patos de Minas, Patos de Minas/MG

Período: 2013-1 / 2016-2

Título do trabalho de conclusão de curso: “Estudo das propriedades elétricas e morfológicas de camadas automontadas e materiais derivados de ácido 4-mercaptobenzóico para o desenvolvimento de genossensores.”

Orientador: Prof. Dr. Diego Leoni Franco.

3. PUBLICAÇÕES

3.1 Artigos completos publicados em periódicos:

DA FONSECA ALVES, RAFAEL; MARTINS, ISABELLA CASTRO; FRANCO, DIEGO LEONI; SILVA, ADRIANE DAS GRAÇAS; DE SOUZA SANTOS, PAULA; GOULART, LUIZ RICARDO; CRISTINA DE PAIVA MAIA, YARA; FARIA SILVA, ALINNE TATIANE; GONÇALVES DE ARAÚJO, THAISE; DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR, MARIA. A novel peptide-based electrochemical biosensor for breast cancer characterization over a poly 3-(3-aminophenyl) propionic acid matrix. **BIOSENSORS & BIOELECTRONICS**, v. 205, p. 114081, 2022. (JCR 12,545)

WONG, ADEMAR; SANTOS, ANDERSON MARTIN; DA FONSECA ALVES, RAFAEL; VICENTINI, FERNANDO CAMPANHÃ; FATIBELLO-FILHO, ORLANDO; DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR, MARIA. Simultaneous determination of direct yellow 50, tryptophan, carbendazim, and caffeine in environmental and biological fluid samples using graphite pencil electrode modified with palladium nanoparticles. **TALANTA**, v. 222, p. 121539, 2020. (JCR 6,556)

DA FONSECA ALVES, RAFAEL; FRANCO, DIEGO LEONI; CORDEIRO, MARLI TENÓRIO; DE OLIVEIRA, ERNESTO MARQUES; FIREMAN DUTRA, ROSA AMALIA; DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR, MARIA. Novel electrochemical genosensor for Zika virus based on a poly-(3-amino-4-hydroxybenzoic acid)-modified pencil carbon graphite electrode. **SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL**, v. 296, p. 126681, 2019. (JCR 9,221)

SOARES, I.P.; DA SILVA, A.G.; DA FONSECA ALVES, RAFAEL; CORRÊA, R.A.M.S.; FERREIRA, L.F.; FRANCO, D.L. Electrochemical enzymatic biosensor for tyramine based on polymeric matrix derived from 4-mercaptophenylacetic acid. **JOURNAL OF SOLID-STATE ELECTROCHEMISTRY**, v. 23, p. 985-995, 2019. (JCR 2,747)

DA FONSECA ALVES, RAFAEL, SILVA, A.G., FERREIRA, L.F., FRANCO, D.L. Synthesis and characterization of a material derived from 4-mercaptobenzoic acid: A novel platform for oligonucleotide immobilization. **TALANTA**, v 165, 69–75, 2017. (JCR 6,556)

3.2 Capítulos de livros publicados:

DA FONSECA ALVES, RAFAEL; MARTINS, ISABELLA CASTRO; RIBEIRO, M. A.; TABOADA-SOTOMAYOR, M. P.; ARAUJO, T. G. *Phage Display* no desenvolvimento de biossensores aplicados à oncologia. In: Marcia Arantes Marques. (Org.). **Avanços Científicos em Medicina** 3. 1ed.São Paulo: Bookerfield, 2022, v. 1, p. 117-130.

DA FONSECA ALVES, RAFAEL; da Silva, Lucas Neres Chagas; Matos Neto, Gilberto; Ierick, Isabela Fernandes; Ferreira, Thiago Lima; Sotomayor, Maria Del Pilar Taboada. Magnetic MIPs: Synthesis and Applications. **Methods in Molecular Biology**. 1ed.New York: Springer US, 2021, v. 2359, p. 85-96.

3.3 Resumos publicados em anais de congressos:

ALVES, R. F.; PALLARES-RUSINOL, A.; TUXANS-SERRANO, M.; ARAUJO, T. G.; MARTI, M.; TABOADA-SOTOMAYOR, M. P.; PIVIDORI, M. I. Biosensing approaches based on recombinant peptide selected by *Phage Display* for breast cancer exosomes. In: XXVI Transfrontier Meeting on Sensors and Biosensors, 2022, BARCELONA. Anais do XXVI Transfrontier Meeting on Sensors and Biosensors, 2022.

ALVES, R. F.; DUTRA, R. A. F.; PIVIDORI, M. I.; TABOADA-SOTOMAYOR, M. P. Desenvolvimento de um sensor amperométrico, visando a detecção de oligonucleotídeos específicos do Zika Vírus. In: XXII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ELETROQUÍMICA E ELETROANALÍTICA - XXII SIBEE, 2019, RIBEIRÃO PRETO - SP. Anais do XXII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ELETROQUÍMICA E ELETROANALÍTICA, 2019.

ALVES, R. F.; FRANCO, D. L.; TABOADA-SOTOMAYOR, M. P.; DUTRA, R. A. F. Nova plataforma para o desenvolvimento de genossensor para Zika vírus baseado em eletrodos de baixo custo modificados com poli(3-amino-4-hidroxibenzóico). In: I Simpósio de Biotecnologia Avanços e Perspectivas, 2018, Patos de Minas - MG. Anais do I Simpósio de Biotecnologia Avanços e Perspectivas, 2018.

ALVES, R. F.; FRANCO, D. L.; DUTRA, R. A. F.; Sotomayor, M.D.P.T. Detección electroquímica del virus del Zika basada en un electrodomodificado de grafito carbono con un nuevo poli-(ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico). In: Congreso Iberoamericano de Química y XXIX Congreso Peruano de Química: La química Peruana rumbo al Bicentenario, 2018, Lima. CD de resúmenes, 2018. p. QPV-038.

ALVES, R. F.; FRANCO, D. L.; TABOADA-SOTOMAYOR, M.D.P.; DUTRA, R. A. F. Nova plataforma para o desenvolvimento de genossensor para zika vírus baseado em eletrodos de baixo custo modificados com poli(3-amino-4-hidroxibenzóico). In: I Simpósio de Biotecnologia Avanços e Perspectivas, 2018, Patos de Minas - MG.

SILVA, A. G.; ALVES, R. F.; SOARES I.P.; FRANCO, D. L. Otimização de técnicas eletroquímicas utilizando eletrodos de baixo custo para detecção de tiramina. In: XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica - XXI SIBEE, 2017, Natal - RN.

ALVES, R. F.; SILVA, A. G.; SOARES I.P.; FRANCO, D. L. Uma nova plataforma para imobilização de oligonucleotídeos baseado em eletrodos modificados com ácido 4-

mercaptobenzóico. In: XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica - XXI SIBEE, 2017, Natal - RN.

ALVES, R. F.; SOARES I.P.; FRANCO, D. L.; DUTRA, R. A. F.; TABOADA-SOTOMAYOR, M. P. Caracterização espectroscópica de um novo material polimérico derivado de ácido 3-amino- 4-hidroxibenzóico. In: VII Congresso Científico da UNESP e III Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2017, Araraquara – SP.

SOARES I.P.; ALVES, R. F. ; SILVA, A. G. ; FRANCO, D. L. . Modificação de eletrodos de carbono grafite de baixo custo com ácido 4-hidróxibenzóico para desenvolvimento de biossensor. In: VI Congresso Científico da UNESP e II Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2017, Araraquara - SP.

SILVA, A. G.; ALVES, R. F.; FRANCO, D. L. Estudo das propriedades elétricas de eletrodos de carbono grafite com derivados do monômero Ácido 4-mercaptofenilacético. In: XXI Jornada em Engenharia Química, 2016, Uberlândia - MG.

ALVES, R. F.; SILVA, A. G.; FRANCO, D. L. Caracterização espectroscópica de um novo material polimérico derivado de ácido 4-mercaptobenzóico. In: 2º Simpósio de Tecnologia e Ciência - SimTeCi, 2016, Patos de Minas - MG.

SILVA, A. G.; ALVES, R. F.; FRANCO, D. L. Utilização de eletrodo de trabalho de carbono grafite de baixo custo para modificação: Estudo comparativo. In: 2º Simpósio de Tecnologia e Ciência - SimTeCi, 2016, Patos de Minas - MG.

ALVES, R. F.; FRANCO, D. L. Modificação de eletrodos de ouro e de grafite com ácido 4-mercaptobenzóico para construção de genossensores. In: VI ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UFU, 2016, Uberlândia – MG

SILVA, A. G.; ALVES, R. F.; FRANCO, D. L. Estudo da caracterização de derivados do ácido 4-mercaptofenilacético em eletrodos de minas de grafite. In: XXX ERSBQ - Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2016, Uberlândia-MG.

ALVES, R. F.; SILVA, A. G.; FRANCO, D. L.. Estudo da detecção eletroquímica de oligonucleotídeos baseado em sistemas contendo ácido 4-mercaptobenzóico. In: XXX Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2016, Uberlândia - MG.

ALVES, R. F.; SILVA, A. G.; FRANCO, D. L. Effect of pH on carbon graphite electrodes with derivatives of acid 4-mercaptobenzoic. In: 23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015, Foz do Iguaçu - Paraná.

ALVES, R. F.; SILVA, A. G.; FRANCO, D. L. Imobilização e detecção de oligonucleotídeos sobre superfícies de eletrodos de ouro modificadas com Ácido 4-Mercaptobenzóico. In: XXIX Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química - MG, 2015, Belo Horizonte - MG.

ALVES, R. F.; FRANCO, D. L. Modificação eletroquímica e estudos morfológicos de derivado de Ácido 4-Mercaptobenzóico sobre eletrodos de carbono grafite. In: V

Encontro de Iniciação Científica e Tecnológica da UFU, 2015, Uberlândia - MG.

ALVES, R. F.; SOUZA, A.C.; FRANCO, D. L. Study of an eletrochemical modification of 4-Mercaptobenzoic Acid Self-Assembled monolayer on Au electrodes. In: XIII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, 2014, João Pessoa-PB.

SOUZA, A.C.; ALVES, R. F.; VIEIRA, S. N.; FRANCO, D. L. Eletropolimerização e caracterização de eletrodos de carbono grafite com derivado de ácido fólico. In: XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Poços de Caldas-MG.

ALVES, R. F.; SOUZA, A.C.; VIEIRA, S. N.; FRANCO, D. L. Caracterização eletroquímica da modificação de eletrodos de ouro com ácido 4-mercaptopbenzóico. In: 1º Simpósio de Tecnologia e Ciência, 2014, Patos de Minas - MG.

SOUZA, A.C.; ALVES, R. F.; VIEIRA, S. N.; FRANCO, D. L. Análise de reações redox da modificação de eletrodos de carbono grafite com derivado de ácido fólico. In: 1º Simpósio de Tecnologia e Ciência - UFU, 2014, Patos de Minas-MG.

ALVES, R. F.; SOUZA, A.C.; FRANCO, D. L. Modificação e caracterização eletroquímica e morfológica de derivado de Ácido 4-Mercaptopbenzóico sobre eletrodos de carbono grafite. In: XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Poços de Caldas - Minas Gerais.

SOUZA, A.C.; ALVES, R. F.; FRANCO, D. L. Effect of pH in the modification of carbon graphite electrodes with derivatives of folic acid. In: XIII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, 2014, João Pessoa-PB.

4. Outros:

Bolsista de Iniciação científica PIBIC - CNPq/UFU, Carga horária: 20 h
Períodos: 2014 – 2015; 2015 – 2016; 2016 – 2017.

Monitor no curso de graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia - Campus Patos de Minas, das disciplinas: Biologia Celular; Química Orgânica; Bioquímica I; Bioquímica II; Biotecnologia de Produtos Naturais; Biorreatores e Bioprocessos.

Participação como Membro de Banca Examinadora:

Defesa de Seminário da discente Elis Marina Fonseca Almeida, realizada em 11 de dezembro de 2019, cujo trabalho foi intulado “Metodologia Eletroanalítica para determinação de pesticidas carbamatos: mancozebe”.

4.1 Prêmios:

BEST POSTER COMMUNICATION, The Organizing Committee of XXVI Transfrontier Meeting on Sensors and Biosensors. 2022.

1º lugar na apresentação de trabalhos durante o I Simpósio de Biotecnologia, Comissão organizadora do - I SiBiotec. 2018.

2º melhor trabalho do eixo de Biotecnologia no 2º Simpósio de Tecnologia e Ciência, Universidade Federal de Uberlândia - UFU. 2016.

Prêmio de destaque da apresentação de trabalhos do Eixo de Engenharia de Alimentos no 2º Simpósio de Tecnologia e Ciência, Universidade Federal de Uberlândia - UFU. 2016.

Melhor trabalho da área de Eletroquímica e Eletroanalítica na sessão de pôsteres do XXX Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Universidade Federal de Uberlândia - UFU. 2016.

Menção honorífica pela apresentação de trabalho no eixo de Biotecnologia no 1º Simpósio de Tecnologia e Ciência, Universidade Federal de Uberlândia - UFU. 2014.

*Dedico esta tese à
minha mãe, por todos os sacrifícios
que fizemos juntos para chegarmos
até o fim desta árdua caminhada.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por todas as graças recebidas, dando-me força nos momentos difíceis, coragem e sabedoria.

À minha amada mãe, Gláucia, não há palavras que possam expressar a gratidão que sinto. O amor e o cuidado que sempre dedicou a mim são inestimáveis e eu sou verdadeiramente abençoado por tê-la na minha vida. A senhora é minha fonte constante de força e inspiração. Chegar até aqui não foi nada fácil, foi um longo caminho, mas a senhora sempre esteve ao meu lado. Obrigado por dividir esse sonho comigo, sempre me apoiando, aconselhando, orando e me ouvindo.

Ao meu irmão Douglas, obrigado por todo apoio! Obrigado também por cuidar e estar presente ao lado da mamãe, sempre que eu estive longe fisicamente.

À minha avó Maria (*in memoriam*) que sempre dizia “O Rafael vai ser nosso Doutor”, pois é vovó a senhora estava certa, quem imaginaria naquela época que hoje eu estaria aqui? Bem, a senhora não só imaginava, como dizia com total convicção. Sei que a senhora esteve todo esse tempo ao meu lado, obrigado!

Ao meu avô João, por todos os ensinamentos, sábios conselhos e carinho que sempre teve por mim.

À minha família, pelo apoio e por entender os momentos que eu não pude estar com vocês.

Às minhas amigas, Bruna e Raíssa, que apesar da distância física, sempre estão presentes, prontas para apoiar, ouvir, me fazer sorrir e ajudar nos dias difíceis.

À Prof.^a Dr.^a Maria del Pilar Taboada Sotomayor, pela orientação, pelos ensinamentos essenciais ao desenvolvimento deste trabalho e construção da minha carreira, também por todas as oportunidades concedidas, portas abertas e principalmente pela confiança. Muito Obrigado!

À Prof.^a Dr.^a Thaise Gonçalves de Araújo, pela coorientação, oportunidades, paciência em me ensinar tanto mesmo a distância sempre muito presente. Sua dedicação e entusiasmo sempre foram combustível para mim. Muito Obrigado!

Ao Prof Dr. Diego Leoni, obrigado por todas as oportunidades, dedicação e ensinamentos, profissionais e pessoais, desde a minha Iniciação Científica até aqui.

A Prof.^a Dr.^a Hideko Yamanaka e o Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira pela avaliação e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho no Exame Geral de Qualificação.

À Prof.^a Dr.^a María Isabel Pivadori pela supervisão durante o ano de intercâmbio na Universitat Autònoma de Barcelona, Espanha. E aos membros do grupo, Carol, Marina, Mireia, Arnau, Melania, Rosanna, Berta, Anaixis, Juan Carlos e Jenny, pelo acolhimento, paciência e momentos divertidos.

Aos amigos que Barcelona me trouxe, Patrícia, Carol, Giovanna, Iracema, Pedro, Luan, Matheus. Obrigado pela amizade construída nesse período, por todo apoio e suporte emocional de sempre, a vida na Aragò foi muito mais leve e divertida graças a nossa amizade. Amo muito vocês! P.S. Eu odeio o Matheus.

Aos amigos, Max, Bárbara, Willian, Alysson, Lílian, João Ângelo, Edervaldo, Fernanda, Maísa. Obrigado pela amizade, por todos os momentos de descontração, pelo suporte, e por toda a parceria. A todos os colegas do GEAR pelas discussões científicas e momentos de descontração.

Aos membros do Grupo de pesquisa da Prof.^a Dr.^a Thaise Gonçalves de Araújo, GBio, pelos ensinamentos, ajudas e paciência. Muito obrigado.

A todos os professores que tive desde o início da minha vida escolar até aqui. Muito obrigado por compartilharem seus conhecimentos e ensinamentos, hoje sou um pedacinho de cada um de vocês.

Ao Instituto de Química (IQ - UNESP- ARARAQUARA), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão das bolsas durante o período de realização deste Doutorado - Processo nº 2019/10452-2 e BEPE - Processo nº 2021/12307-0 e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

*“O conhecimento é o processo de acumular informação;
a sabedoria reside na sua simplificação.”
(Martin Fischer)*

RESUMO

O câncer de mama (CM) é o tumor maligno mais comum na população mundial. Assim, métodos mais precisos e que detectem a doença precocemente são necessários, de modo que técnicas inovadoras como o *Phage Display* (PD) vêm sendo amplamente exploradas. Nesse contexto, a construção de sensores biológicos e imunoensaio do tipo ELISA baseados em peptídeos ligantes selecionados por PD se mostra como uma promissora alternativa no desenvolvimento de novas abordagens bioanalíticas, sendo que estas se destacam pela sensibilidade e seletividade. Esta Tese, portanto, em consonância com as atuais demandas da área oncológica, objetivou desenvolver novas metodologias bioanalíticas voltadas para o CM. No Capítulo II, uma nova matriz para o acoplamento de biomoléculas na superfície de eletrodos de grafite de lapiseira (PGEs) foi gerada através da modificação eletroquímica com um novo material derivado do ácido 3-(3-aminofenil)propiónico (3-3-AAFP). Foram realizadas caracterizações eletroquímicas e morfológicas, sendo proposto o mecanismo de eletropolimerização do poli(3-3-AAFP), no qual os grupos carboxilato são mantidos na estrutura do polímero formado. Um novo teste ELISA e um biossensor eletroquímico, foram testados com o soro de pacientes diagnosticados com CM ou doença benigna da mama (DBM), visando detectar antígenos circulantes, ambos utilizando o peptídeo Biotina-H2 ou Biotina-C3. Foram plotadas curvas ROC, sendo para cada resultado significativo e realizados os cálculos da análise de desempenho, para os testes ELISA e o biossensor, respectivamente. O peptídeo Biotina-H2 apresentou um desempenho inferior (AUC de 0,677 e 0,806) comparado ao peptídeo Biotina-C3 que, além de manter o potencial diagnóstico (AUC de 0,771 e 0,951), caracterizou CM luminal de acordo com o status p53 (AUC de 0,886 e 0,748) e a expressão de HER2 (AUC de 0,748 e 0,833), sendo o biossensor uma melhor estratégia quando comparado ao teste ELISA. Além disso, no Capítulo III, por meio de um estudo proteômico, foram identificados 38 possíveis alvos para o peptídeo Biotina-C3, sendo estes presentes em membrana plasmática e membranas de organelas celulares, principalmente de mitocôndrias. Visando a detecção e caracterização de exossomos derivados de linhagens celulares de CM, ensaios de citometria de fluxo foram conduzidos. Para isso, exossomos imobilizados diretamente em partículas magnéticas e indiretamente em partículas magnéticas modificadas com anticorpos anti-CD9, anti-CD63 e anti-CD81 foram utilizados para validar a capacidade do peptídeo Biotina-C3 de se ligar aos exossomos. Estes também foram detectados por magneto-ELISA e por biossensor eletroquímico magnético, com LODs menores para a linhagem MCF-7, sendo (LOD magneto-ELISA de 330 exossomos μL^{-1}) e (LOD Biossensor de 175 exossomos μL^{-1}) em comparação com as outras linhagens celulares. A detecção de exossomos derivados da linhagem Luminal (MCF-7), em soro humano foi realizada com sucesso, e a combinação de partículas magnéticas modificadas com anti-CD63, seguida da detecção baseada no peptídeo Biotina-C3 proporcionou resultados promissores em termos de especificidade e recuperação, para o teste ELISA (108,8%) e para o Biossensor (111,9%). Estas novas abordagens bioanalíticas permitirão o desenvolvimento de novas plataformas rápidas e inovadoras para a caracterização do CM e seus subtipos moleculares.

Palavras-chave: Ácido 3-(3-aminofenil)propiónico; Biossensores; ELISA; magneto-ELISA; Exossomas; Biomarcadores; Câncer de Mama.

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the most common malignant tumor in the world population. Therefore, more precise methods that can detect the disease early are needed, and innovative techniques such as Phage Display (PD) have been extensively explored. In this context, the construction of biological sensors and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) based on PD-selected binding peptides emerges as a promising alternative in the development of new bioanalytical approaches, notable for their sensitivity and selectivity. This thesis, therefore, aimed to develop new bioanalytical methodologies focused on BC in line with the current demands of the oncology field. In Chapter II, a novel matrix for coupling biomolecules onto the surface of pencil graphite electrodes (PGEs) was generated through electrochemical modification using a new material derived from 3-(3-aminophenyl)propionic acid (3-3-AAFP). Electrochemical and morphological characterizations were performed, and the electro-polymerization mechanism of poly(3-3-AAFP) was proposed, in which carboxylate groups are retained in the structure of the formed polymer. A new ELISA test and an electrochemical biosensor were tested with serum samples from patients diagnosed with BC or benign breast disease (BBD) to detect circulating antigens, both using the peptide Biotin-H2 or Biotin-C3. ROC curves were plotted, and performance analysis calculations were carried out for the ELISA test and the biosensor, respectively. The peptide Biotin-H2 exhibited inferior performance (AUC of 0.677 and 0.806) compared to the peptide Biotin-C3, which maintained diagnostic potential (AUC of 0.771 and 0.951) and characterized luminal BC according to p53 status (AUC of 0.886 and 0.748) and HER2 expression (AUC of 0.748 and 0.833). The biosensor proved to be a better strategy when compared to the ELISA test. Additionally, in Chapter III, a proteomic study identified 38 potential targets for the Biotin-C3 peptide, predominantly present in the plasma membrane and cellular organelle membranes, especially mitochondria. Flow cytometry assays were conducted to detect and characterize exosomes derived from BC cell lines. For this purpose, exosomes immobilized directly on magnetic particles and indirectly on magnetic particles modified with anti-CD9, anti-CD63, and anti-CD81 antibodies were used to validate the binding capacity of the Biotin-C3 peptide to exosomes. They were also detected by magnetic ELISA and magnetic electrochemical biosensor, with lower limits of detection (LOD) for the MCF-7 cell line (LOD of 330 exosomes μL^{-1} for magnetic ELISA and LOD of 175 exosomes μL^{-1} for the biosensor) compared to other cell lines. Successful detection of exosomes derived from the Luminal cell line (MCF-7) in human serum was achieved, and the combination of anti-CD63-modified magnetic particles followed by detection based on the Biotin-C3 peptide provided promising results in terms of specificity and recovery for the ELISA test (108.8%) and the biosensor (111.9%). These new bioanalytical approaches will enable the development of rapid and innovative platforms for the characterization of BC and its molecular subtypes.

Keywords: 3-(3-aminophenyl)propionic acid; Biosensors; ELISA; magneto-ELISA; Exosomes; Biomarkers; Breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I: Fundamentação Teórica

FIGURA 1. COMPOSIÇÃO DOS EXOSSOMOS	34
FIGURA 2. BIOGÊNESE DE EXOSSOMOS	36
FIGURA 3. ESQUEMA REPRESENTATIVO DO BACTERÍOFAGO M13	39
FIGURA 4. FLUXO DE TRABALHO PARA A SELEÇÃO DE LIGANTES POR PHAGE DISPLAY.	41
FIGURA 5. PRINCÍPIO DO BIOSENSOR	45
FIGURA 6. ESQUEMA DA OXIDAÇÃO DE OPD CATALISADA PELA ENZIMA HRP	54
FIGURA 7. DESLOCAMENTO BATOCRÔMICO SOFRIDO PELO DAP APÓS ADIÇÃO DE H ₂ SO ₄	55
FIGURA 8. ESQUEMA DE DIFERENTES ABORDAGENS E FORMATOS DE TESTE ELISA	56
FIGURA 9. ESQUEMA INDICATIVO DA INFLUÊNCIA DO PONTO DE CORTE NA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DE UM TESTE DE DIAGNÓSTICO EM DESENVOLVIMENTO	59

Capítulo II: Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico baseado em peptídeos sobre uma matriz de ácido poli 3-(3-aminofenil) propiônico para caracterização do câncer de mama

FIGURA 1. VARIAÇÃO ENTRE POTENCIAL E TEMPO EM UMA VOLTAMETRIA CÍCLICA	78
FIGURA 2. ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO 3-(3-AMINOFENIL)PROPIÔNICO E ANILINA.....	78
FIGURA 3. VALIDAÇÃO DOS PEPTÍDEOS LIGANTES A PROTEÍNAS DO CÂNCER DE MAMA (CM)	87
FIGURA 4. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA	89
FIGURA 5. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	90
FIGURA 6. VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS EM PGEs MODIFICADOS EM SOLUÇÃO AQUOSA, CONTENDO 1,0 MM DE 3-3-AAFP EM $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, APÓS APLICAÇÃO DE DIFERENTES NÚMEROS DE CICLOS DE POTENCIAL	91
FIGURA 7. VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS EM PGEs, EM SOLUÇÃO AQUOSA, CONTENDO 1,0 MM DE 3-3-AAFP EM $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, 20 CICLOS.....	94
FIGURA 8. IMAGENS DE MEV	96
FIGURA 9. ESTUDO DO COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO 3-3-AAFP.....	100
FIGURA 10. PROPOSTA DE MECANISMO PARA ELETROPOLIMERIZAÇÃO DO 3-3-AAFP.....	102

FIGURA 11. ESPECTROS DE INFRAVERMELHO (FT-IR) OBTIDOS DO MONÔMERO (3-3-AAFP) E DO POLÍMERO (POLI(3-3-AFP))	103
FIGURA 12. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DAS ETAPAS DE CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR	105
FIGURA 13. INVESTIGAÇÃO DA SELETIVIDADE DO BIOSENSOR EM POOLS SOROLÓGICOS DE PACIENTES COM DBM E CM.....	106
FIGURA 14. ESTUDO DA REPETIBILIDADE DO BIOSENSOR COM PEPTÍDEO BIOTINA-C3 E PEPTÍDEO BIOTINA-H2 EM POOL SOROLÓGICO DE PACIENTES COM CM	107
FIGURA 15. ESTUDOS DE ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO DE BIOSENSOR.....	108
FIGURA 16. ANÁLISE DO DESEMPENHO DE LIGAÇÃO DOS PEPTÍDEOS BIOTINA-C3 E BIOTINA-H2 A AMOSTRAS SOROLÓGICAS DE PACIENTES.....	110
FIGURA 17. ANÁLISE DO DESEMPENHO DE LIGAÇÃO DO PEPTÍDEO BIOTINA-C3 A AMOSTRAS SOROLÓGICAS DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA (CM).....	112

Capítulo III: Detecção de exossomos de câncer de mama baseada em peptídeo recombinante selecionado por *Phage Display*

FIGURA 1. ESQUEMA DE ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES (Ves) DO SOBRENADANTE DE CULTURA DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA, UTILIZANDO ULTRACENTRIFUGAÇÃO DIFERENCIAL.	128
FIGURA 2. ANÁLISE DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR SEQUENCIAMENTO NAS AMOSTRAS DE IMUNOPRECIPITADAS COM O PEPTÍDEO BIOTINA-C3	134
FIGURA 3. ESTRUTURAS DE SUPERFÍCIE MAIS PROVÁVEIS OBTIDAS POR SIMULAÇÕES DE DOCKING MOLECULAR PARA OS COMPLEXOS DE PROTEÍNAS COM PEPTÍDEO BIOTINA-C3.....	140
FIGURA 4. CARACTERIZAÇÃO POR NTA DE AMOSTRAS PURIFICADAS DE EXOSSOMOS DE LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA, MCF-7, MDA-MB231, SKBR3 E LINHAGEM CELULAR DE FIBROBLASTOS MRC-5.	141
FIGURA 5. ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO BASEADO EM PARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA CARACTERIZAÇÃO DE EXOSSOMOS DERIVADOS DE LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA.....	143
FIGURA 6. ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO BASEADO EM PARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA CARACTERIZAÇÃO DE EXOSSOMOS DERIVADOS DE LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA.....	145
FIGURA 7. ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO BASEADO EM PARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA CARACTERIZAÇÃO DE EXOSSOMOS DERIVADOS DE LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA.....	146
FIGURA 8. ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO BASEADO EM PARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA CARACTERIZAÇÃO DE EXOSSOMOS DERIVADOS DE LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA.....	147

FIGURA 9. ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO BASEADO EM PARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA CARACTERIZAÇÃO DE EXOSSOMOS DERIVADOS DE LINHAS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA	148
FIGURA 10. ENSAIO MAGNETO-ELISA PARA DETECÇÃO DE EXOSSOMOS DERIVADOS DAS LINHAGENS DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA MCF-7, MDA-MB231, SKBr3 E DA LINHAGEM DE CÉLULAS DE FIBROBLASTOS MRC- 5 (CONTROLE)	150
FIGURA 11. BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE EXOSSOMOS DERIVADOS DAS LINHAGENS DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA MCF-7, MDA-MB231, SKBr3 E DA LINHAGEM DE CÉLULAS DE FIBROBLASTOS MRC-5	152

LISTAS DE TABELAS

Capítulo I: Fundamentação Teórica

TABELA 1. COMBINAÇÃO BINÁRIA DE RESULTADOS ENTRE O DIAGNÓSTICO FEITO POR TESTE PADRÃO OURO E OS POSSÍVEIS RESULTADOS DE UM TESTE DE DIAGNÓSTICO EM DESENVOLVIMENTO	58
---	----

TABELA 2. RELAÇÃO ENTRE A ÁREA SOB A CURVA ROC E A PRECISÃO DO DIAGNÓSTICO	60
---	----

Capítulo II: Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico baseado em peptídeos sobre uma matriz de ácido poli 3-(3-aminofenil) propiônico para caracterização do câncer de mama

TABELA 1. CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES (N = 118).	83
---	----

Capítulo III: Detecção de exossomos de câncer de mama baseada em peptídeo recombinante selecionado por Phage Display

TABELA 1. GRADIENTE UPLC	126
---------------------------------------	-----

TABELA 2. RESULTADOS DAS SIMULAÇÕES DE INTERAÇÃO MOLECULAR POR <i>DOCKING</i> , UTILIZANDO O SERVIDOR HDOCK	139
--	-----

TABELA 3. DETERMINAÇÃO DE EXOSSOMOS EM MATRIZ SOROLÓGICA	153
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	Inclinação da reta
α	Grau de reversibilidade do sistema
3-3-AAFP	Ácido 3-(3-aminofenil)propiónico
ALP	<i>Alkaline Phosphatase</i>
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i>
AUC	<i>Area under the ROC curve</i>
BR	<i>Britton-Robinson</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CM	Câncer de Mama
CM HER2E	Câncer de Mama HER2-enriquecido
DAP	2, 3-diaminofenazina
DAPH2+	2, 3-diaminofenazina protonado
DBM	Doença Benigna da mama
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
<i>E</i>	Especificidade clínica
E	Potencial
EDC	[1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Epa	Potencial de pico anódico
EUA	Estados Unidos da América
F	Constante de Faraday
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FN	Falso negativo
FP	Falso positivo
FT-IR	<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>
HER2	Receptor do crescimento epidérmico humano do tipo 2
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IHQ	Imunohistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Ipa	Corrente de pico anódico
IR	Índice de reatividade

Ki67	Marcador de índice de proliferação
LA	Câncer de Mama Luminal A
LB	Câncer de Mama Luminal B
LOD	<i>Limit of detection</i>
MES	2 (N-Morpholino) Ethanesulfonic Acid
MEV-FEG	Microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo
MIP	<i>Molecularly Imprinted Polymers</i>
MPs	<i>Magnetic Particles</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i>
<i>n</i>	Número de elétrons envolvidos na reação
NHS	N-hidroxisuccinimida
NTA	<i>Nanoparticle tracking analysis</i>
OPD	Ortofenilenodiamina
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PBS-T	<i>Phosphate-buffered saline with Tween</i>
PD	<i>Phage Display</i>
PGE	<i>Pencil Graphite electrode</i>
pH	Potencial de hidrogênio
pKa	Constante de dissociação ácida
poly-HRP	Estreptavidina-poliHRP
PrD	Precisão diagnóstica
PS	Prevalência sorológica
R	Constante dos gases
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>
RE	Receptor de estrogênio
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RP	Receptor de progesterona
RVN	Razão de verossimilhança negativa
RVP	Razão de verossimilhança positiva
S	Sensibilidade clínica
SPE	Eletrodos de carbono <i>screen-printed</i>
strep-HRP	Estreptavidina-HRP
t	Tempo
T	Temperatura

T-DM1	Ado-trastuzumabe entasina
TMB	3,3',5,5'- tetrametilbenzidina
TN	Câncer de Mama triplo negativo
Tris	Trisaminometano
UPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
V	Volt
VC	Voltametria cíclica
VE	Vesícula extracelular
VN	Verdadeiro negativo
VOQ	Voltametria de onda quadrada
VP	Verdadeiro positivo
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	28
1. CÂNCER	29
1.1 CÂNCER DE MAMA	29
1.2 SUBTIPOS MOLECULARES	30
1.2.1 Luminal A (LA)	30
1.2.2 Luminal B (LB)	31
1.2.3 HER2E	31
1.2.4 Triplo negativo	32
1.3 DIAGNÓSTICO	32
1.4 VESÍCULAS EXTRACELULARES	33
2. PHAGE DISPLAY	38
2.1 DEFINIÇÃO	38
2.2 BACTERÍOFAGOS E BIBLIOTECAS UTILIZADOS NO PD	38
2.3 BIOPANNING	40
2.4 DESAFIOS E LIMITAÇÕES DO PHAGE DISPLAY	42
2.5 APLICAÇÕES DE LIGANTES SELECIONADOS POR PHAGE DISPLAY	43
3. BIOSSENSORES	45
3.1 DEFINIÇÃO	45
3.2 HISTÓRIA DOS BIOSSENSORES	46
3.3 CLASSIFICAÇÃO DOS BIOSSENSORES	46
3.4 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DO ELEMENTO BIOLÓGICO	48
3.5 POLÍMEROS CONDUTORES APLICADOS EM BIOSSENSORES	50
3.6 ELEMENTO DE RECONHECIMENTO BIOLÓGICO	51
4. NOVOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	54
4.1 IMUNOENSAIOS DO TIPO ELISA: O PADRÃO-OURO	54
4.2 A BUSCA POR NOVOS MÉTODOS	56
4.3 CURVA ROC	60
REFERÊNCIAS	63
CAPÍTULO II	74

1. INTRODUÇÃO.....	75
2. OBJETIVOS.....	79
3. MATERIAL E MÉTODOS	80
3.1. REAGENTES E EQUIPAMENTOS	80
3.2. CULTIVO DE CÉLULAS E EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	81
3.3. ELISA EM EXTRATO DE PROTEÍNA	81
3.4. ELETROPOLIMERIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA.....	82
3.5. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ESTRUTURAL	82
3.6. AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES COM CM E DBM PARA ENSAIO ELISA E BIOSSENSOR	82
3.7. ELISA COM SORO DE PACIENTES	84
3.8. BIOSSENSOR APLICADO EM SORO DE PACIENTES.....	84
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	85
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
4.1. ELISA EM EXTRATO PROTEICO	86
4.2. ELETROPOLIMERIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PLATAFORMA	87
4.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE PGE MODIFICADO COM POLI(3-3-AAFP)90	
4.4. INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE CICLOS NA ELETROPOLIMERIZAÇÃO DO 3-3-AAFP 90	
4.5. EFEITO DO PH NA ELETROPOLIMERIZAÇÃO DO 3-3-AAFP	92
4.6. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE PGE MODIFICADO COM POLI(3-3-AAFP)95	
4.7. PROPOSTA DE MECANISMO DE ELETROPOLIMERIZAÇÃO PARA O 3-3-AAFP.....	97
4.8. CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA DE FT-IR	103
4.9. DESENVOLVIMENTO DO BIOSSENSOR	104
4.10. ANÁLISE DA CURVA ROC	108
4.11. CARACTERIZAÇÃO DOS SUBTIPOS MOLECULARES DE CM	111
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	113
REFERÊNCIAS.....	114
CAPÍTULO III.....	119
1. INTRODUÇÃO.....	120
2. OBJETIVOS.....	123
3. MATERIAL E MÉTODOS	124

3.1	REAGENTES E EQUIPAMENTO	124
3.2	CULTURA DE CÉLULAS	124
3.3	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	125
3.4	IMUNOPRECIPITAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE PROTEÍNAS.....	125
3.5	DIGESTÃO EM SOLUÇÃO E ANÁLISE LC-MS/MS	125
3.6	DOCKING MOLECULAR DA LIGAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA.....	127
3.7	ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE EXOSSOMOS	127
3.8	CARACTERIZAÇÃO DE EXOSSOMOS POR NTA.....	128
3.9	IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DE EXOSSOMOS E ANTICORPOS EM PARTÍCULAS MAGNÉTICAS	128
3.10	CARACTERIZAÇÃO DE EXOSSOMOS POR CITOMETRIA DE FLUXO UTILIZANDO PARTÍCULAS MAGNÉTICAS	129
3.11	MAGNETO-ELISA.....	130
3.12	BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO.....	130
3.13	ABORDAGENS DE BIOSSENSORIZAMENTO PARA A DETECÇÃO DE EXOSSOMOS EM SORO	131
3.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA	132
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	133
4.1	IMUNOPRECIPITAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE PROTEÍNAS.....	133
4.2	DOCKING MOLECULAR DA LIGAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA.....	137
4.3	CARACTERIZAÇÃO DE EXOSSOMOS POR NTA.....	141
4.4	CARACTERIZAÇÃO DE EXOSSOMOS POR CITOMETRIA DE FLUXO	142
4.5	MAGNETO-ELISA	149
4.6	MAGNETO-BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO.....	151
4.7	ABORDAGENS DE BIOANÁLISES PARA A DETECÇÃO DE EXOSSOMOS EM SORO...	153
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	154
	CONCLUSÃO	155
	REFERÊNCIAS.....	156

PREFÁCIO

A presente Tese encontra-se organizada em três capítulos, nos quais é demonstrada a aplicação de peptídeos selecionados por *Phage Display* na detecção de marcadores tumorais em células e exossomos de câncer de mama.

O Capítulo I apresenta a fundamentação teórica com a revisão bibliográfica dos principais temas abordados na Tese, como câncer de mama, seus subtipos moleculares, exossomos e utilização do *Phage Display* na seleção de novos peptídeos para bioanálises, destacando-se sua aplicação em biossensores e imunoensaios.

No Capítulo II um biossensor eletroquímico é desenvolvido a partir de peptídeos selecionados por *Phage Display* que se ligam especificamente às células de câncer de mama. Esse biossensor apresentou resultados superiores ao teste ELISA, além de possibilitar a caracterização molecular dos tumores luminais de acordo com o *status* de p53 e HER2.

O Capítulo III apresenta um estudo proteômico que identificou possíveis alvos do peptídeo selecionado na superfície das membranas de exossomos, o que viabilizou sua aplicação na detecção de exossomos em soro humano. Para isso foi desenvolvido um biossensor, com LODs menores em comparação com outros biossensores descritos na literatura.

Portanto, esta Tese é inovadora ao apresentar novas ferramentas para a detecção de câncer de mama e para sua caracterização molecular, bem como abre novos caminhos para a prática clínica. O conhecimento adquirido nesta Tese é importante para a compreensão da biologia do câncer de mama e pode ser aplicado em outras áreas da biotecnologia.

Capítulo I

Fundamentação teórica

1. Câncer

A manutenção das funções vitais dos tecidos é alcançada graças à capacidade das células de se renovarem constantemente. Tal processo é controlado por diversas vias de sinalização geneticamente programadas para regular quando e onde essas células devem se multiplicar. Entretanto, podem surgir mutações herdadas ou espontâneas em genes associados a esses mecanismos, comprometendo a fisiologia intracelular e desencadeando o crescimento celular desenfreado (GRIFFITHS, A. J. F. W., S.R.; LEWONTIN, R.C.; CARROL, [s.d.]). O surgimento de uma massa não agressiva e semelhante ao tecido original é denominado tumor benigno. Já a multiplicação celular desordenada e invasiva define sua malignidade. O câncer inclui um conjunto superior a mais de 100 doenças, sendo estas classificadas de acordo com o tecido de origem: carcinomas quando epitelial e sarcomas quando se iniciam em tecidos conjuntivos (ósseo, muscular e cartilagenoso), por exemplo. A velocidade de multiplicação das células e a capacidade de originar metástases também são fatores utilizados para diferenciar os diversos tipos de câncer (INCA, 2023).

1.1 Câncer de Mama

O Câncer de mama (CM), no mundo, é o mais comumente diagnosticado e, no Brasil, os números relacionados ao diagnóstico desse tumor só são superados pelos de câncer de pele não melanoma. A origem da doença ainda é pouco compreendida e envolve diversos fatores de risco, incluindo os ambientais, biológicos e hereditários (INCA, 2023). Além disso, trata-se de uma lesão complexa do ponto de vista histológico e molecular (ONCOMED, 2019).

O CM é estatisticamente definido como sendo responsável por 30% de novos casos de câncer a cada ano e, apesar de menos frequente (em torno de 1% dos casos), também acomete homens (INCA, 2023). De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o CM é a principal causa de morte por câncer em mulheres no Brasil. Estima-se que em cada ano do biênio 2022-2023 ocorram cerca de 17.760 óbitos por CM no país, com um risco de 16 óbitos a cada 100 mil mulheres. Espera-

Fundamentação Teórica

se que em cada ano do triênio 2023-2025 ocorram cerca de 73.610 novos casos de CM no Brasil, com um risco de 66,54 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2023). De fato, o CM se encontra em uma escala epidêmica e representa um problema para a saúde pública, afetando seriamente a qualidade de vida dos pacientes acometidos pela doença (GOLUBNITSCHAJA et al., 2016). Além disso, existem vários subtipos moleculares, que são classificados com base nos biomarcadores encontrados nas células tumorais mamárias.

1.2 Subtipos Moleculares

Após a instalação e desenvolvimento do tumor maligno, é necessária a intervenção clínica. O prognóstico e as decisões de gerenciamento do tratamento têm sido tradicionalmente baseados por marcadores avaliados por imunohistoquímica (IHQ) como o receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), receptor de crescimento epidérmico humano do tipo 2 (HER2) e marcador de índice de proliferação (Ki67), juntamente com tamanho, diferenciação celular (grau do tumor) e *status* linfonodal. Os avanços no desenvolvimento e validação dos testes genômicos, possibilitaram maior entendimento sobre a biologia tumoral e como fornecer melhor tratamento individualizado, além de uma compreensão mais profunda dos subtipos do CM. Estes são classificados, de forma geral, como o Luminal (A e B), HER-2-enriquecido (HER2E) e triplo negativo (TN) (GAO; SWAIN, 2018; PROVENZANO; ULANER; CHIN, 2018; RAKHA et al., 2010; SØRLIE et al., 2001).

1.2.1 Luminal A (LA)

No CM LA os receptores hormonais para estrógeno e progesterona estão altamente expressos e não são positivos para HER2. Esse subtipo é um dos mais prevalentes e menos agressivos, correspondendo a cerca de 40% dos casos. Comparativamente aos demais, os tumores LA não apresentam alto índice proliferativo ($ki67 < 14\%$) e exibem maior diferenciação celular. Além disso, possuem melhor prognóstico e respondem favoravelmente à terapia hormonal (EROLES et al., 2012; GAO; SWAIN, 2018; STENMARK TULLBERG et al., 2019). Nesta são utilizados moduladores seletivos do RE, como tamoxifeno, agonistas competitivos desse receptor, como o fulvestrant, ou inibidores de aromatase, como o anastrozol. Em

Fundamentação Teórica

algumas circunstâncias, a terapia hormonal pode ser combinada com radioterapia ou quimioterapia. É importante ressaltar que o LA pode evoluir para um subtipo de CM mais agressivo e invasivo quando não tratado oportunamente (AL-MAHAYRI; PATRINOS; ALI, 2020; GOLDBIRSCH et al., 2013; LI; MA, 2020; STENMARK TULLBERG et al., 2019).

1.2.2 Luminal B (LB)

O subtipo molecular LB possui duas subclassificações distintas. A primeira é caracterizada pela alta expressão de Ki67 e pela ausência de HER2. Já a segunda conhecida como híbrida, apresenta uma alta expressão de HER2. Cerca de 20% dos casos de CM se enquadram no subtipo LB, que é considerado intermediário em termos de agressividade. Comparativamente a outros subtipos de CM, os tumores LB tendem a crescer mais rapidamente e exibem um nível moderado de diferenciação celular. Além disso, têm um prognóstico moderado e podem reagir de maneira diferente à terapia hormonal. A decisão terapêutica depende da expressão de receptores hormonais e HER2. Em alguns casos, o tratamento hormonal e a quimioterapia podem ser combinados. Semelhante ao subtipo LA, o LB também pode evoluir para um subtipo de CM mais agressivo e invasivo, quando não devidamente tratado (GONCALVES et al., 2021; KENNECKE et al., 2010; PRAT et al., 2013).

1.2.3 HER2E

A superexpressão de HER2 estimula a proliferação celular descontrolada e, quando as lesões são RE e RP negativas, os tumores são classificados como HER2E. Este subtipo é agressivo e representa cerca de 15-20% dos casos. Tendem a crescer rapidamente e apresentam alto grau de indiferenciação celular, com pior prognóstico e maior risco de recorrência após a terapia. Anticorpos anti-HER2 como trastuzumabe, pertuzumabe e ado-trastuzumabe entansina (T-DM1) bloqueiam a cascata de sinalização desse receptor e, por conseguinte, são utilizados no tratamento dos pacientes com tumores HER2-positivos, com impacto significativo nas sobrevidas livre e global (CRONIN et al., 2010; GOBBINI et al., 2018; MARTÍNEZ-SÁEZ; PRAT, 2021; SLAMON et al., 2001).

Fundamentação Teórica

1.2.4 Triplo negativo

Os tumores TN são considerados um subtipo molecular mais agressivo de CM, representando entre 10 e 20% dos diagnósticos. Esses tumores não expressam RE, RP e HER2 e, portanto, não são elegíveis à hormonioterapia e a terapia alvo anti-HER2. Assim, a principal estratégia de tratamento é a quimioterapia seguida de radioterapia, geralmente administrada em regime neo ou adjuvante. Pacientes TN têm uma probabilidade maior de recidiva em relação aos outros subtipos de CM, e geralmente, apresentam uma menor sobrevida global e livre de doença. O prognóstico é ainda pior para pacientes com tumores TN de grau histológico mais elevado e com metástases linfonodais. Além disso, mulheres mais jovens, particularmente aquelas com mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* do inglês *breast cancer susceptibility gene*, têm um risco maior de desenvolver CM TN. (GEYER et al., 2017; SCHMID et al., 2020; TUTT et al., 2021; ZAGAMI; CAREY, 2022).

1.3 Diagnóstico

Atualmente, o diagnóstico do CM é baseado em testes por imagens como a mamografia diagnóstica, ultrassonografia e ressonância magnética, confirmado histopatologicamente após biópsia do tecido afetado. Testes genômicos, embora dispendiosos, podem ser adotados para prever o risco de recorrência, como o *Oncotype Dx* e *MammaPrint* (KÖPKE; AKTAS; DITSCH, 2023a). Contudo, devido à complexidade molecular da doença, novas ferramentas vêm sendo amplamente exploradas, destacando-se a biópsia líquida. Esta permite o rastreamento e monitoramento não invasivos da doença, utilizando, como amostra, fluidos corporais como sangue, saliva ou urina (ALIMIRZAI; BAGHERZADEH; AKBARI, 2019; KÖPKE; AKTAS; DITSCH, 2023b; MANOOCHERHI et al., 2023).

De fato, os avanços na tecnologia da biópsia líquida permitiram a identificação de células malignas circulantes e de fragmentos de DNA tumorais no sangue de pacientes com CM (POULET; MASSIAS; TALY, 2019; STERGIOPOULOU et al., 2023). Além disso, a biópsia líquida pode fornecer informações sobre as alterações moleculares que impulsionam o crescimento do tumor, permitindo que os médicos ajustem o tratamento de acordo com as necessidades de cada paciente (PIÑEIRO-

Fundamentação Teórica

PÉREZ; ABAL; MUINELO-ROMAY, 2022; STERGIOPOULOU et al., 2023).

A biópsia líquida é uma ferramenta ainda em desenvolvimento e não deve ser vista como uma substituta da biópsia convencional (HEIDRICH et al., 2021). Contudo, é particularmente promissora para a detecção de biomarcadores em diferentes tumores, uma vez que são enriquecidas com vesículas extracelulares (VEs), as quais são secretadas contendo ácidos nucleicos e proteínas passíveis de detecção (WANG et al., 2022b).

1.4 Vesículas extracelulares

As VEs são estruturas membranosas liberadas pelas células no ambiente extracelular que desempenham funções cruciais na comunicação intercelular. Encontram-se associadas a vários processos fisiológicos e patológicos, como resposta imunológica, regeneração tecidual, tumores e doenças neurológicas, sendo, portanto, exploradas clinicamente (VEZIROGLU; MIAS, 2020).

Microvesículas, vesículas apoptóticas e exossomos são alguns dos diferentes tipos de VEs (HAN et al., 2022). As microvesículas se originam da membrana plasmática e possuem em torno de 100 a 1000 nm de tamanho. Carregam proteínas, lipídios e, ocasionalmente, ácidos nucleicos (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015). As vesículas apoptóticas são formadas a partir da apoptose, sendo detectadas e fagocitadas por células do sistema imunológico, carregando proteínas e fragmentos de DNA (SANTAVANOND et al., 2021). Já os exossomos são pequenas vesículas (30 a 200 nm de tamanho) de formato esférico contendo lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (**Figura 1**). Como podem interagir com diferentes células e tecidos do corpo, os exossomos têm ganhando expressiva atenção como reguladores críticos da função celular e da comunicação intercelular (GURUNG et al., 2021).

Fundamentação Teórica

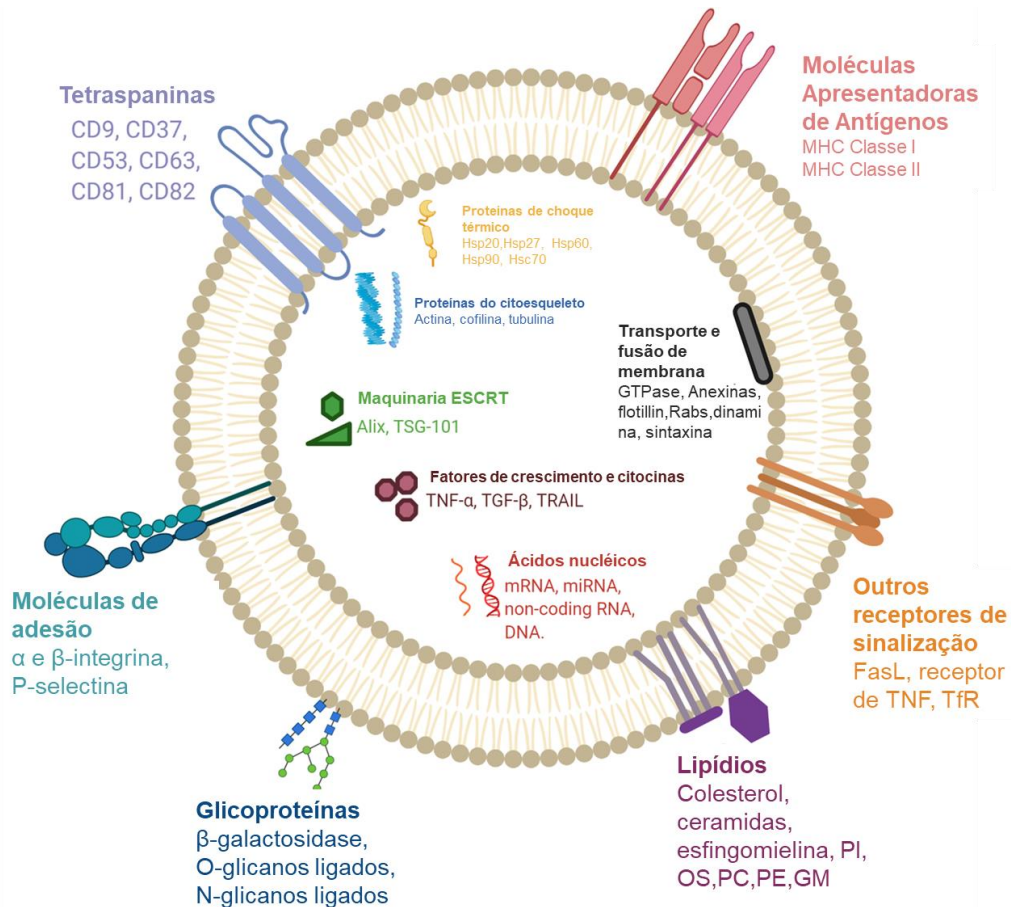


Figura 1. Composição dos exossomos. Os exossomos são compostos de várias proteínas: proteínas transmembrana como tetraspaninas, moléculas apresentadoras de antígenos, glicoproteínas e moléculas de adesão; proteínas no lúmen do exossomo, como proteínas de choque térmico, proteínas do citoesqueleto, componentes ESCRT, transporte de membrana, proteínas de fusão, fatores de crescimento e citocinas. Os exossomos também possuem lipídios, como colesterol, ceramidas, esfingomielina, fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e gangliosídeos (GM), juntamente com ácidos nucleicos como mRNA, miRNA, RNAs não codificantes e DNA em seu lúmen. Hsc = Choque térmico cognato; TSG = gene de suspeita de tumor; TNF = fator de necrose tumoral; TGF = Fator transformador de crescimento; TRAIL = ligando indutor de apoptose relacionado com TNF; FasL = ligando Fas; Tfr = Receptor de transferrina, Major Histocompatibility Complex (MHC). Adaptado de (GURUNG et al., 2021).

Exossomos são geralmente formados por via endossomal (GURUNG et al., 2021; JIN et al., 2023), conforme esquematizado na **Figura 2**. Quando uma seção da membrana plasmática da célula se dobra internamente a biogênese do exossomo se inicia. O endossoma é uma organela celular responsável pelo transporte, reciclagem e degradação de diversas substâncias. O processo de formação do endossoma começa quando uma vesícula se funde com a membrana plasmática. Essa estrutura inicial é conhecida como endossoma precoce e tem como função capturar moléculas

Fundamentação Teórica

provenientes do meio extracelular. Posteriormente, o endossoma precoce sofre modificações e se transforma em um endossoma tardio. Esse processo envolve a incorporação de vesículas intracelulares geradas a partir da membrana plasmática e de substâncias químicas que precisam ser recicladas ou destruídas. Assim, o endossoma tardio apresenta uma mistura de moléculas que foram capturadas e transportadas a partir do meio extracelular e de outras moléculas que foram geradas no interior da célula (GURUNG et al., 2021).

As moléculas contidas no endossoma tardio são finalmente quebradas quando essa estrutura se funde com um lisossomo. Os lisossomos são organelas que abrigam enzimas digestivas responsáveis pela quebra e reciclagem dos materiais celulares. A fusão do endossoma tardio com o lisossomo permite a liberação dessas enzimas no interior da organela, o que resulta na quebra e digestão das moléculas contidas no endossoma. Desse modo, o endossoma e o lisossomo trabalham em conjunto para garantir o transporte, reciclagem e degradação adequados das substâncias celulares. (HAN et al., 2022). As vesículas intracelulares criadas a partir da membrana plasmática, no entanto, podem ocasionalmente evitar o processo de degradação e serem expelidas pela célula como exossomos, detectáveis em fluidos corporais (THÉRY; ZITVOGEL; AMIGORENA, 2002).

Fundamentação Teórica

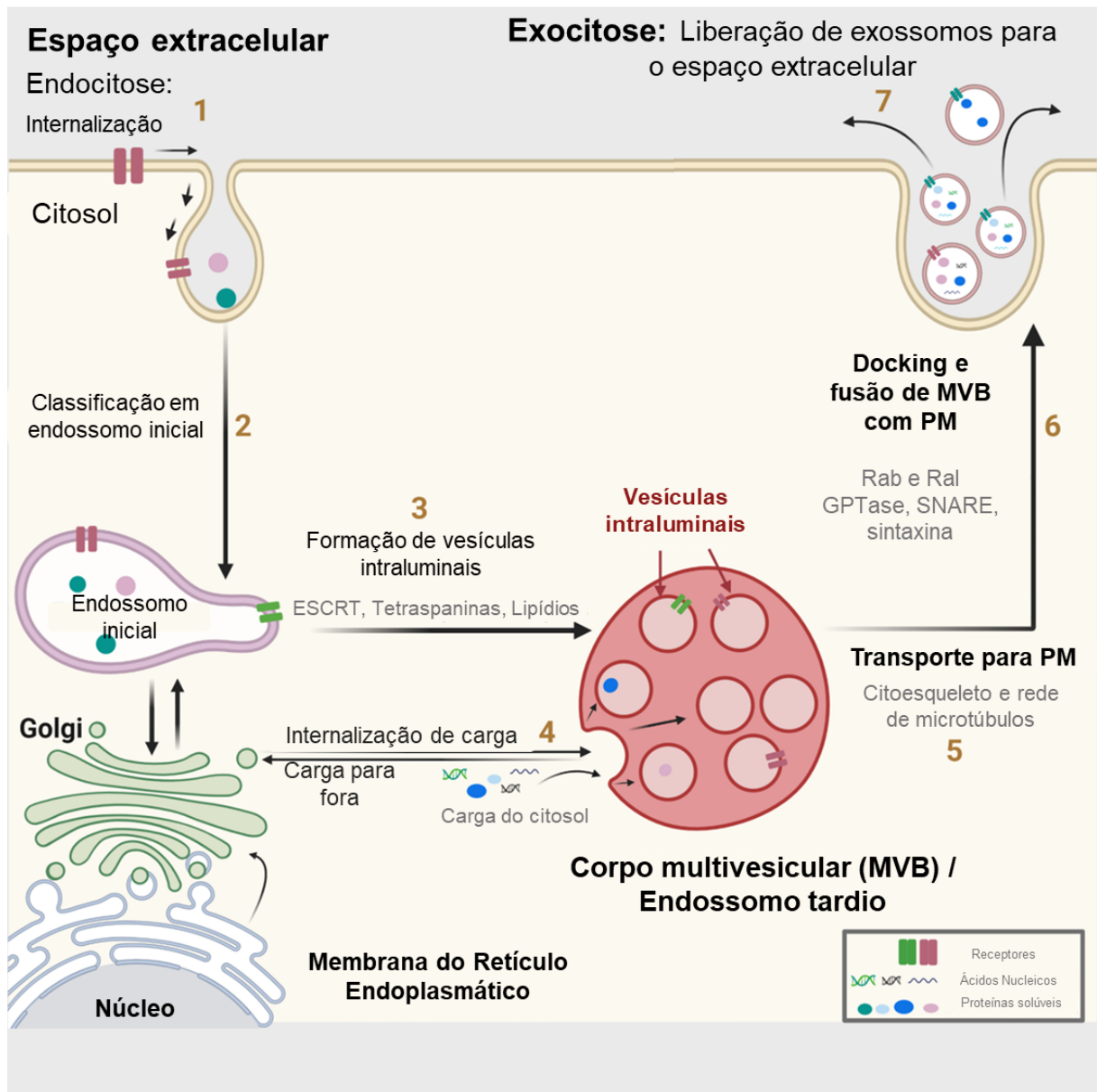


Figura 2. Biogênese de exossomos. Componentes internalizados são [1] classificados em endossomos iniciais [2] dentro do sistema endossomal, [3] que amadurecem em endossomos tardios ou corpos multivesiculares. As vesículas intraluminais, que sequestram proteínas, lipídios, compartimentos citosólicos e potenciais componentes de exossomos, são encontradas em abundância nos compartimentos endossomais especializados conhecidos como endossomos tardios/corpos multivesiculares. [4] A rede trans-Golgi e potencialmente o citosol também são usados para a entrega dos componentes. Corpos multivesiculares portadores de componentes de exossomos são transportados para a membrana plasmática, fundem-se com a superfície celular e, então, são secretados como exossomos. Adaptado de (GURUNG et al., 2021).

Fundamentação Teórica

Com a crescente demanda por biomarcadores mais precisos e eficientes, torna-se cada vez mais importante a identificação de novas moléculas com potencial aplicação para diagnóstico e prognóstico de diversas doenças. Além disso, detectar e caracterizar exossomos se mostra ainda mais promissor. Nesse contexto, a técnica de *Phage display* (PD) se destaca uma vez que permite a identificação de ligantes para alvos complexos e ainda não conhecidos, com nítida interface com a prática clínica. Assim, o PD pode contribuir significativamente para a identificação de novos biomarcadores, permitindo um diagnóstico mais preciso e um melhor acompanhamento de diversas doenças.

2. *Phage display*

2.1 Definição

A técnica de *Phage Display* (PD) foi criada na década de 1980 por George P. Smith e Sir Gregory P. Winter e garantiu aos seus criadores o Prêmio Nobel de Química em 2018. É baseada na biologia molecular para selecionar peptídeos, proteínas ou anticorpos de uma biblioteca de fagos (bacteriófagos) que exibem a proteína ou peptídeo de interesse na superfície de seu capsídeo. Basicamente, a técnica permite a seleção de fagos que apresentam a proteína ou peptídeo ligante a um alvo de interesse, enquanto a lavagem remove os demais fagos da biblioteca. O PD é uma das ferramentas mais poderosas e versáteis em biotecnologia, amplamente utilizada na descoberta de novos ligantes para diferentes fins (BARDERAS; BENITO-PEÑA, 2019; GOMES et al., 2023; LEDSGAARD et al., 2022; SMITH, 1985). Entre as aplicações mais importantes do PD está a descoberta de novos ligantes para a área médica, podendo ser utilizados no diagnóstico, prognóstico, monitoramento e tratamento de doenças, inclusive o câncer (PANDE; SZEWCZYK; GROVER, 2010).

2.2 Bacteriófagos e bibliotecas utilizados no PD

O PD possui as quatro principais características comuns a todas as plataformas de seleção: diversidade genotípica, genótipo/fenótipo de acoplamento, pressão de seleção e amplificação. É eficiente, robusto e específico (SILVA, 2017). Os peptídeos selecionados são pequenos, entre 5 e 20 aminoácidos, o que agrega uma estabilidade conformacional, além de menor custo de síntese e purificação. Pode ser utilizado para reconhecer diferentes agentes biológicos, como proteínas, vírus, bactérias, células cancerígenas e até substâncias inorgânicas (ANAND et al., 2021; BERNEDO-NAVARRO; YANO, 2016; VODNIK et al., 2011; WANG et al., 2019).

O PD utiliza a maquinaria biológica de bacteriófagos não envelopados e filamentosos para clonagem e expressão. Os fagos f pilus-específico (Ff), incluindo as cepas f1, M13 ou fd, e bacteriófagos líticos T7 são os mais amplamente utilizados

Fundamentação Teórica

sendo capazes de infectar procariotos, especificamente bactérias gram negativas. Essas partículas possuem DNA fita simples, o qual contém somente informações para a replicação e a formação do capsídeo viral (BARBAS; BURTON; SILVERMAN, 2004; RUSSEL; LOWMAN; CLACKSON, 2004).

A partícula de fago filamentososo M13 exibe uma forma cilíndrica com cerca de 930 nm de comprimento e 6 nm de diâmetro. O genoma do fago M13 é um DNA de 6407 bp composto por nove genes, codificadores de 11 proteínas diferentes (VAN WEZENBEEK; HULSEBOS; SCHOENMAKERS, 1980). A composição do capsídeo viral dos fagos se dá pela junção de cinco proteínas diferentes: pVII (33 aa, 5 cópias), pIX (32 aa, 5 cópias), pVIII (50 aa, 2700 cópias), pVI (112 aa, 5 cópias) e pIII (406 aa, 5 cópias) conforme a **Figura 3** (KEHOE; KAY, 2005).

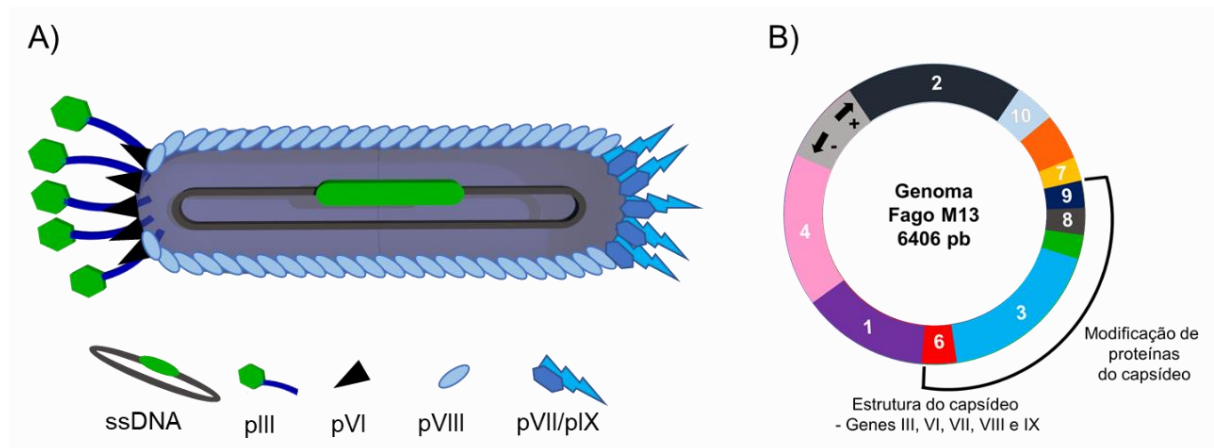


Figura 3. Esquema representativo do bacteriófago M13. **A)** biologia estrutural e **B)** genoma do fago mostrando as posições dos genes I ao X e locais de possíveis modificações de superfície por meio de engenharia genética. Fonte: Próprio autor.

As proteínas de revestimento dos fagos são sintetizadas e integradas à membrana bacteriana até serem reunidas em volta do DNA viral para liberação. Na técnica de PD, a sequência codificadora para o peptídeo a ser traduzido é inserida em uma região de restrição próxima ao gene III, codificador para a proteína integral de membrana pIII. Assim, a pIII não tem sua função comprometida e o peptídeo recombinante está acessível para seleção contra o alvo (BARBAS; BURTON; SILVERMAN, 2004; SMITH, 1985).

No PD, a estrutura e o ciclo de vida dos bacteriófagos são explorados para exibir proteínas ou peptídeos de interesse na superfície do fago. A infecção inicia com

Fundamentação Teórica

a ligação da pIII a receptores específicos na superfície da bactéria hospedeira. O fago, então, injeta seu material genético que é replicado pela maquinaria bacteriana, produzindo milhões de partículas virais. Assim, compreender a estrutura e o ciclo de vida dos bacteriófagos é fundamental para o sucesso da técnica de PD (RAKONJAC et al., 2017).

Uma biblioteca de PD é composta por fagos geneticamente modificados expressando uma ampla diversidade de peptídeos ou proteínas (incluindo anticorpos) (BÖTTGER; BÖTTGER, 2009). As bibliotecas de peptídeos são compostas de cadeias curtas de aminoácidos, geralmente de 7 a 20 resíduos, que são exibidos na superfície do fago. Podem ser sintéticas ou semi-sintéticas, o que significa que os peptídeos são criados quimicamente ou modificando sequências existentes (KONG et al., 2020). Já as bibliotecas de anticorpos são compostas de cadeias pesadas e leves de anticorpos encontrados na superfície do fago, incluindo fragmentos Fab, scFv e *nanobodies*. Cada um desses formatos tem suas próprias vantagens e desvantagens, e são escolhidos conforme a aplicação desejada. Por exemplo, os fragmentos scFv podem ser utilizados para a identificação de alvos terapêuticos, enquanto os *nanobodies* são altamente estáveis e podem ser utilizados no diagnóstico. São normalmente construídas a partir de células B de animais imunizados, como camundongos e coelhos (LEDSEGAARD et al., 2022).

2.3 Biopanning

A biosseleção, ou *biopanning*, é baseada na interação entre bibliotecas contendo bilhões de fagos recombinantes e o alvo de interesse. Nesse processo, fagos ligantes são capturados e os fagos não-ligantes, ou com interações fracas (não específicas), são descartados após sucessivas rodadas de lavagens (WU et al., 2016). Um esquema do processo é apresentado na **Figura 4**, o qual inclui, de maneira geral, a exposição dos fagos à molécula alvo, a lavagem para remoção dos não ligados e a eluição dos fagos de interesse. O processo de seleção é geralmente repetido várias vezes para aumentar a especificidade dos vírus recombinantes selecionados. Por fim, estes são sequenciados para identificar a sequência de aminoácidos dos peptídeos ou proteínas que se ligam ao alvo. Assim, a escolha da molécula alvo é crítica para o sucesso de seleção, podendo ser uma proteína purificada, uma célula ou um tecido. Dependendo da aplicação, pode ser escolhida por sua relevância clínica, capacidade

Fundamentação Teórica

de interagir com outras proteínas ou disponibilidade comercial. (FINLAY et al., 2017; RAHBARNIA et al., 2017; WU et al., 2016).

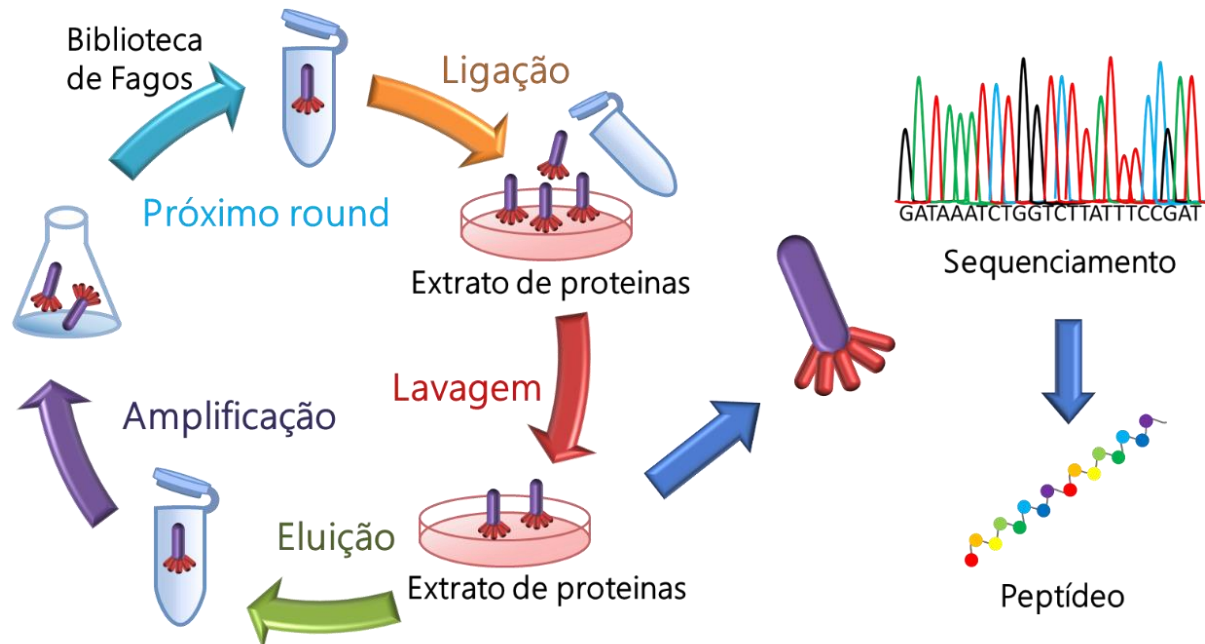


Figura 4. Fluxo de trabalho para a seleção de ligantes por Phage Display. Bibliotecas de fagos recombinantes podem ser construídas por engenharia genética, ao inserir sequências aleatórias de material genético codificante em regiões específicas do genoma viral. A triagem é realizada por 3 a 5 ciclos de seleção contra os alvos de interesse. Depois de capturados os fagos expressando os peptídeos ligantes são amplificados em *Escherichia coli*. Cada ciclo inclui os passos de interação/lavagem/amplificação, visando aumentar a pressão de seleção em favor de clones específicos. Após o *biopanning*, os clones individuais são caracterizados por sequenciamento de DNA e suas sequências sintetizadas para validação e análises subsequentes. Fonte: Próprio autor.

O desenho experimental também pode incluir diferentes estratégias, perfazendo seleções positivas e negativas. No *screening* positivo ocorre a seleção de fagos que se ligam especificamente ao alvo de interesse exposto à biblioteca (MIMMI et al., 2019). No *screening* negativo fagos que se ligam a componentes ou alvos que não interessam são eliminados. Uma matriz sem o alvo de interesse pode ser utilizada para esse fim e exposta à biblioteca de fagos. Nesse caso, os não ligantes, presentes no sobrenadante, são os que serão utilizados, posteriormente, na seleção positiva (XU et al., 2021a).

Após todo esse processo, os peptídeos/proteínas ligantes devem ter afinidade e especificidade suficientes para serem, de fato, aplicados. Para isso, diferentes

Fundamentação Teórica

estratégias podem ser utilizadas como introdução de mutações pontuais no gene que codifica o ligante, o uso de bibliotecas de mutantes aleatórios e a melhoria das configurações de triagem, entre outras. É fundamental observar que a otimização da afinidade e especificidade dos ligantes deve ser feita com cautela para evitar a perda de outros recursos importantes, como estabilidade e funcionalidade. Além disso, para evitar possíveis efeitos colaterais ou interações indesejáveis, a especificidade dos ligantes deve ser avaliada em relação a proteínas homólogas ou com estruturas semelhantes ao alvo (FINLAY et al., 2017; HAMMERS; STANLEY, 2014; SOKULLU; GAUTHIER; COULOMBE, 2021).

2.4 Desafios e limitações do *Phage Display*

Embora robusta, a tecnologia de PD apresenta algumas limitações. Primeiramente, a biblioteca precisar ser variável suficiente para o sucesso do processo de seleção, de modo que a eficácia e a especificidade podem ser influenciadas pela qualidade da biblioteca. Outra dificuldade é garantir que haja cópias suficientes do peptídeo ou proteína na superfície do fago para que a interação por afinidade seja identificada durante a seleção. Portanto, o tamanho da biblioteca deve ser grande o suficiente para representar a diversidade de variantes, mas não tão grande que dificulte a seleção (ALMAGRO et al., 2019).

Estratégias de *biopanning* inadequadas podem resultar em baixa eficiência e na seleção de ligantes não específicos. Adicionalmente, ao lidar com alvos que possuem sítios de ligação altamente conservados ou uma grande variedade de conformações estruturais, a seleção de ligantes individuais pode ser problemática (PRUDENCIO, 2004). Outras limitações também se destacam:

- **Tamanho dos peptídeos e proteínas exibidos:** Como o tamanho dos peptídeos e proteínas exibidos na superfície do fago é limitado, a seleção de ligantes com alta afinidade e especificidade pode ser restrita (ANAND et al., 2021).
- **Especificidade dos ligantes:** A escolha de ligantes de alta afinidade pode ser difícil, pois aumentar a pressão de seleção durante o processo de aumenta a probabilidade de escolher ligantes não específicos (KONG et al., 2020).

Fundamentação Teórica

- **Conformação e atividade:** Como os peptídeos exibidos não são capazes de exibir todas as conformações concebíveis, podem não ser úteis para a seleção de ligantes que reconhecem epítomos conformacionais ou dependentes de atividade (ALMEIDA et al., 2015; PRUDENCIO, 2004; WILLIAMS; SOOTER, 2015).

Contudo, os pesquisadores têm se dedicado ao aprimoramento da tecnologia de PD para superar suas limitações, incluindo o uso de bibliotecas mais diversas, desenhos experimentais mais sofisticados e processos de seleção mais rigorosos, aumentando a probabilidade de selecionar ligantes de alta afinidade e especificidade (BODER; RAEESZADEH-SARMAZDEH; PRICE, 2012; HEINIS, 2021; SCHIRRMANN et al., 2011). Outra possibilidade é a utilização de técnicas complementares ao PD, como cristalografia de raios X, espectrometria de massa e microscopia eletrônica, que possibilitam uma análise mais detalhada das interações entre o ligante e o alvo, auxiliando na validação dos ligantes (FINLAY et al., 2017).

Por fim, abordagens mais avançadas, como a biologia sintética (CRISPR-Cas9) e técnicas de engenharia genética para a produção de bibliotecas mais complexas e customizadas, com a introdução de mutações específicas em sequências de peptídeos ou anticorpos, têm sido utilizadas (KONG et al., 2020).

2.5 Aplicações de ligantes selecionados por *Phage Display*

O PD é um método eficaz para descobrir novos ligantes com potencial terapêutico. A abordagem inclui a seleção de peptídeos ou proteínas com alta afinidade e especificidade para uma determinada molécula-alvo, levando à descoberta de novos medicamentos (MIMMI et al., 2019; SOKULLU; GAUTHIER; COULOMBE, 2021). O anticorpo monoclonal Humira (Adalimumabe), por exemplo, foi selecionado por PD e é utilizado no tratamento da artrite reumatoide (RAHBARNIA et al., 2017).

Pode ser empregado para melhorar as propriedades funcionais de proteínas e enzimas, identificar novas moléculas para uso em terapia celular e selecionar ligantes para purificação de proteínas (GULIY; EVSTIGNEEVA; DYKMAN, 2022; MARTINS; REIS; AZEVEDO, 2016). Além disso, a técnica tem se mostrado eficaz para a engenharia de proteínas e enzimas, viabilizando uma maior estabilidade, afinidade ou atividade dessas moléculas (SCHIRRMANN et al., 2011). De fato, a síntese de

Fundamentação Teórica

enzimas com ação específica é uma das aplicações mais promissoras da engenharia de proteínas e enzimas (DALBY, 2007). Na medicina, o PD é também utilizado para encontrar variantes de proteínas terapêuticas com melhores características, incluindo estabilidade e seletividade (OMIDFAR; DANESHPOUR, 2015).

A capacidade de produzir e selecionar fragmentos de anticorpos humanos é um dos principais benefícios do PD. Esse fato é particularmente significativo no imunodiagnóstico, em que é necessário evitar a imunogenicidade, reduzir a possibilidade de reações cruzadas com outras espécies e aumentar a sensibilidade. Além disso, o PD permite a seleção de anticorpos específicos para epítopos dependentes de conformação, bem para proteínas de membrana (FRENZEL; SCHIRRMANN; HUST, 2016; MOREIRA et al., 2022).

Peptídeos bioativos, *antibody-like*, podem ser selecionados por PD, sendo também potencialmente promissores no diagnóstico por meio de biossensores (PARK, 2020), imunoenaios do tipo ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (SUO et al., 2015) e de fluxo lateral (*Lateral Flow*) (KULABHUSAN et al., 2017). Neste sentido, os peptídeos apresentam vantagens, pois são estáveis e resistentes a ambientes agressivos, podem ser mais receptivos que anticorpos, no nível molecular, com menor imunogenicidade. Podem ser sintetizados quimicamente em grandes quantidades e pureza, tornando-os uma escolha econômica e prática para uso em abordagens bioanalíticas. A combinação de peptídeos com várias técnicas de detecção pode produzir metodologias e dispositivos altamente sensíveis e seletivos, capazes de detectar uma ampla gama de analitos (KARIMZADEH et al., 2018; VANOVA et al., 2021; WU et al., 2016).

3. Biossensores

3.1 Definição

Os biossensores são instrumentos analíticos que combinam um elemento de reconhecimento biológico, como enzimas, anticorpos ou células vivas, com um transdutor que transforma o sinal biológico em um sinal quantificável (TURNER, 2013). Destinam-se a detectar e quantificar substâncias específicas em amostras complexas, como sangue, saliva, urina, alimentos e água. Os biossensores se comparam, podendo superar os métodos de análise tradicionais em termos de sensibilidade, seletividade, resultados rápidos, mobilidade, baixo custo e facilidade de uso. Possuem inúmeras aplicações, incluindo na medicina, biotecnologia, meio ambiente, segurança alimentar e agricultura (KIM et al., 2022; TURNER, 2013), a **Figura 5**, esquematiza os elementos principais de um biossensor.

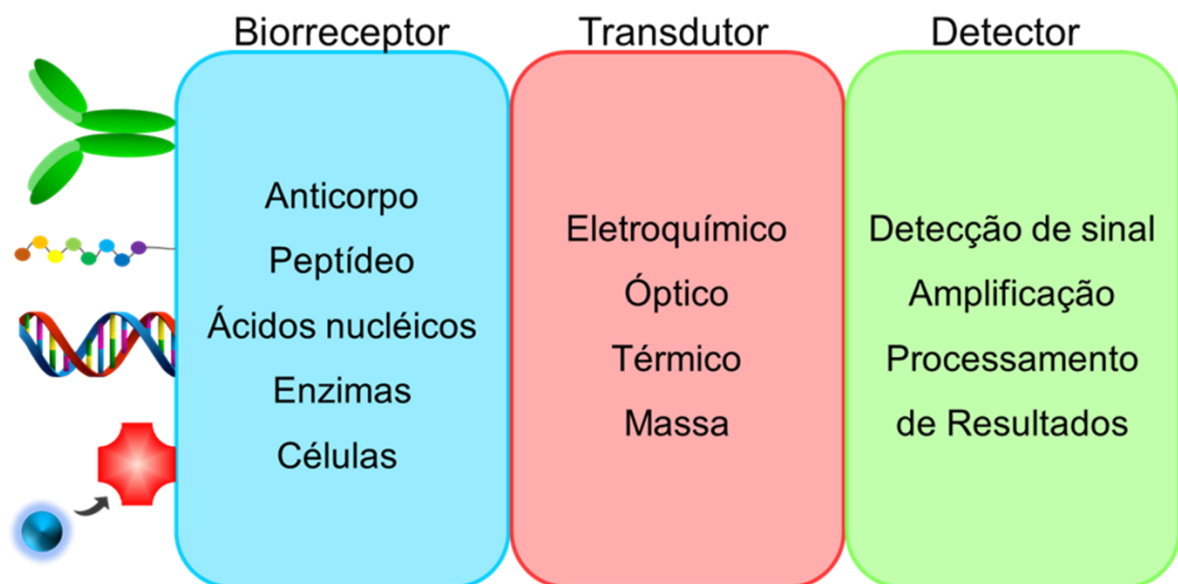


Figura 5. Princípio do biossensor. O biorreceptor identifica o analito na amostra, gerando um sinal primário que é transformado em um sinal mensurável pelo transdutor, que é, então, reconhecido e processado em um formato legível. Fonte: Próprio autor.

Fundamentação Teórica

3.2 História dos biossensores

Clark e Lyons, em 1962, demonstraram o primeiro experimento a utilizar um elemento biológico para detectar uma substância química, através da detecção de ácido glucônico após a glicose ser oxidada a ácido glucônico em uma solução contendo oxigênio e uma enzima chamada glicose oxidase. O que abriu caminho para o desenvolvimento de biossensores diversos (HARPER; ANDERSON, 2010).

Muitas melhorias foram alcançadas no campo desde então, incluindo a descoberta de novos elementos biológicos, o desenvolvimento de novos transdutores e o avanço das técnicas de integração e miniaturização. Os primeiros biossensores comerciais para detecção de glicose em amostras de sangue foram criados na década de 1960 e passaram a ser amplamente empregados no monitoramento de pacientes diabéticos. Na década de 1980 houve um aumento no interesse em biossensores, frente aos avanços da biologia molecular e engenharia de materiais. Como resultado, foram desenvolvidos novos tipos de biossensores, como os imunossensores e genossensores, capazes de detectar biomoléculas com seletividade e sensibilidade (LI et al., 2021).

Nos últimos anos, é nítida a busca pelo *downsizing* e pela portabilidade dos biossensores, com o desenvolvimento de dispositivos compactos e de baixo custo que podem ser utilizados como dispositivos *point-of-care*, como consultórios médicos e farmácias. Além disso, a combinação de vários biossensores em um único dispositivo oferece o potencial de aumentar os recursos do biossensor e permitir a análise simultânea de várias substâncias em uma única amostra (LI et al., 2021).

3.3 Classificação dos biossensores

Os biossensores são categorizados baseados no tipo de transdutor ou no tipo de biomolécula utilizada. O tipo de transdutor adotado para transformar o sinal biológico em um sinal elétrico, óptico ou mecânico é a classificação mais prevalente. Assim, os biossensores são classificados em quatro tipos (THÉVENOT et al., 2001):

- **Transdutores eletroquímicos:** Um transdutor eletroquímico é utilizado nesta forma de biossensor para converter o sinal biológico em um sinal elétrico. Transdutores eletroquímicos são comumente empregados em biossensores

Fundamentação Teórica

para detectar substâncias como glicose, colesterol, ácido úrico, lactato, neurotransmissores, hormônios e muitos mais. Apresentam inúmeras aplicações na medicina, meio ambiente e segurança alimentar. Além disso, o desenvolvimento contínuo de novos materiais e tecnologias de eletrodos permitiu a criação de biossensores mais sensíveis, seletivos e específicos para um amplo espectro de analitos (KUMAR; KACHHAWA, 2023).

- **Transdutores ópticos:** Um transdutor óptico é usado em biossensores para transformar um sinal biológico em um sinal de luz. A presença ou quantidade de um determinado analito pode ser detectada medindo uma propriedade óptica da amostra, como absorção, fluorescência ou refração. Os transdutores ópticos são altamente sensíveis e seletivos, com várias vantagens, incluindo a capacidade de detectar múltiplos analitos ao mesmo tempo e sem a necessidade de contato direto com a amostra. Fibras ópticas e *waveguide*, são transdutores ópticos usados na análise de proteínas e ácidos nucleicos (CHEN; WANG, 2020).
- **Transdutores piezoelétricos:** Um transdutor de massa transforma um sinal biológico em um sinal mecânico, como uma mudança de massa ou uma mudança na ressonância de um cristal piezoelétrico. Os transdutores de massa são extremamente sensíveis e podem detectar mudanças na massa de uma única molécula. Também podem detectar pequenas alterações ou mudanças conformacionais, que podem ser utilizadas para identificar alterações na atividade enzimática ou na estrutura da proteína. Pequenas substâncias como glicose, lactose e colesterol são frequentemente detectadas com esses sensores. Os transdutores de massa, por outro lado, são mais lentos do que os transdutores eletroquímicos e ópticos e são mais difíceis de miniaturizar e integrar em dispositivos portáteis (YADAV et al., 2023).
- **Outros Transdutores:** Outros transdutores que podem ser empregados em biossensores incluem transdutores térmicos, que medem a variação de temperatura causada pela interação do elemento de reconhecimento biológico e o analito. Esse tipo de biossensor pode detectar uma ampla gama de substâncias, como proteínas, enzimas, metabólitos e infecções. Existem outros biossensores baseados em transdutores de campo, como transdutores de campo elétrico e magnético, que podem detectar a interação entre o elemento

Fundamentação Teórica

de reconhecimento biológico e o analito alterando o campo elétrico ou magnético nas proximidades do sensor (POLAT et al., 2022; XIE; DANIELSSON, 2007).

Além da categorização do transdutor, os biossensores podem ser classificados dependendo do tipo de elemento de reconhecimento biológico utilizado, como enzimas, anticorpos, células vivas e ácidos nucleicos. Esta classificação auxilia na escolha do melhor tipo de biossensor para uma determinada aplicação (KUMAR; KACHHAWA, 2023).

3.4 Métodos de imobilização do elemento biológico

A seleção de elementos de reconhecimento biológico é crucial para a seletividade e sensibilidade do biossensor. A detecção precisa e confiável requer a capacidade de se conectar especificamente ao alvo pretendido. Além disso, sob condições ambientais especificadas, o elemento de reconhecimento biológico deve ser estável e funcional (TURNER, 2013).

A imobilização do elemento biológico é uma etapa crucial no projeto de um biossensor, pois é responsável por ancorar e manter o elemento biológico em contato com o transdutor do sensor de forma ativa, permitindo detecção seletiva do analito de interesse. O componente biológico pode ser imobilizado por diferentes métodos. A abordagem escolhida é determinada pelo tipo de elemento biológico, pelas características do transdutor e pelo tipo de amostra que está sendo estudada (BUERK, 2014; MALHOTRA, 2017). Assim, os elementos biológicos podem ser imobilizados através das seguintes estratégias:

- **Adsorção física:** é uma das abordagens mais simples e diretas para imobilizar o elemento de reconhecimento biológico em um transdutor. Este método envolve a fisissorção do elemento biológico na superfície da matriz de transdução, sem a necessidade de ligantes ou agentes químicos. Interações não covalentes, incluindo forças de *Van der Waals*, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas, são usadas na adsorção. Essa abordagem tem algumas vantagens, incluindo sua simplicidade e facilidade de implementação. A adsorção física, por outro lado, pode resultar em estabilidade de imobilização limitada devido à probabilidade de dessorção do elemento biológico durante a

Fundamentação Teórica

operação do biossensor (MAURYA; SINGH, 2019; NARESH; LEE, 2021).

- **Aprisionamento físico:** os elementos de bioreconhecimento são fisicamente confinados dentro das matrizes 3D por ligações covalentes ou não covalentes durante este procedimento. O processo de imobilização ou aprisionamento pode ocorrer por duas vias: a enzima é misturada a uma solução de monômero, seguida da polimerização da solução de monômero por uma reação química ou por alteração das condições experimentais, e a enzima é combinada à solução de monômero. Os elementos de biorreconhecimento estão interligados em uma rede tridimensional de materiais orgânicos ou inorgânicos. Polidimetilsiloxano, fotopolímero, gelatina, alginato, celulose, acetato ftálico, polipropileno modificado e poliacrilamida são os materiais orgânicos empregados, enquanto carvão ativado e materiais cerâmicos porosos são os elementos inorgânicos. Esta abordagem geralmente emprega (i) eletropolimerização, (ii) o processo sol-gel e (iii) técnicas de microencapsulação (KUDDUS, 2018).
- **Ligação covalente:** é uma forma de imobilizar um elemento de reconhecimento biológico que envolve a formação de uma ligação química entre o elemento e a matriz de transdução. Essa abordagem, que é mais estável do que a adsorção física, pode imobilizar proteínas, enzimas e anticorpos em superfícies de metal, vidro e polímero. As ligações covalentes podem ser criadas por grupos reativos, como grupos amino, carboxila, hidroxila e tiol encontrados no elemento de reconhecimento biológico ou na matriz de transdução. A forma e as condições de imobilização são determinadas pela natureza dos grupos reativos e sua compatibilidade com o material da matriz de transdução. A imobilização por ligação covalente aumenta a estabilidade e a reprodutibilidade do biossensor, o que é vital para seu uso em análises quantitativas e em situações hostis. No entanto, como essa abordagem pode afetar a atividade biológica do elemento de reconhecimento, é necessário um gerenciamento cuidadoso das condições de imobilização para evitar qualquer dano (NARESH; LEE, 2021; SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012).
- **Crosslinking:** a reticulação ocorre pela formação de ligações cruzadas covalentes intermoleculares entre elementos de biorreconhecimento (enzimas) ou elementos de bioreconhecimento e proteínas funcionalmente inativas. (por

Fundamentação Teórica

exemplo, albumina de soro bovino). Este procedimento é realizado com o auxílio de produtos químicos multifuncionais que servem como um *linker* para unir moléculas de enzimas em agregados reticulados 3D à superfície do transdutor. As condições ideais de reticulação são pH, temperatura e força iônica. Essa estratégia de imobilização permite um tempo de resposta mais rápido, adesão mais forte e melhor atividade catalítica da enzima. Os benefícios incluem menos vazamento da biomolécula, ligação química mais forte e a capacidade de modificar o ambiente para o elemento de biorreconhecimento usando agentes estabilizadores apropriados. As desvantagens são que as ligações cruzadas covalentes são formadas entre proteínas e não entre a matriz e a proteína, e que a desnaturação parcial da estrutura da proteína limita o uso de imobilização de ligação cruzada (NARESH; LEE, 2021; SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012).

3.5 Polímeros condutores aplicados em biossensores

O sucesso dos biossensores depende, em grande parte, da eficiência das técnicas de imobilização utilizadas nas interfaces biológicas. Uma excelente opção de aprimoramento é a modificação da superfície do transdutor com polímeros condutores que possuam grupos funcionais em suas estruturas, de modo que estas possam interagir com determinados grupos de biomoléculas (RAZA et al., 2021).

A geração de polímeros pode ser iniciada eletroquimicamente. Os polímeros eram conhecidos por suas propriedades passivantes até a década de 1970. No entanto, pesquisadores que trabalharam com poliacetileno descobriram, em 1977, que, dopando o polímero com vapores de cloro, bromo ou iodo, a sua condutividade aumentava para um valor comparável ao dos metais, condutores conhecidos. Os pesquisadores receberam o Prêmio Nobel de Química em 2000 por seu trabalho e os polímeros condutores se tornaram um novo campo de estudo (PRIZE ANNOUNCEMENT - NOBELPRIZE.ORG, [s.d.]).

Os filmes eletropolimerizados são um tipo de material comumente utilizado em biossensores. São formados de polímeros condutores ou não, que são depositados eletroquimicamente em um eletrodo. A eletropolimerização permite o controle da espessura da camada e da densidade da ligação química, produzindo uma superfície estável. Polianilina, polipirrol e politiofeno são os polímeros condutores mais populares

Fundamentação Teórica

usados em filmes eletropolimerizados. As características elétricas e eletroquímicas distintas desses polímeros possibilitam a identificação de proteínas específicas em amostras complexas, como sangue e urina (COSNIER, 2003).

Além disso, filmes eletropolimerizados superam métodos alternativos para imobilizar biomoléculas em eletrodos, como a adsorção física. O filme eletropolimerizado forma uma matriz tridimensional que protege as biomoléculas de danos eletroquímicos e da perda de atividade biológica. Os biossensores baseados em filmes eletropolimerizados encontraram ampla aplicação, incluindo a detecção de glicose, ácido úrico, colesterol, proteínas e enzimas. Esses dispositivos também têm sido empregados no diagnóstico de doenças, monitoramento de processos biotecnológicos e controle ambiental (COSNIER; HOLZINGER, 2010).

3.6 Elemento de reconhecimento biológico

O elemento de reconhecimento biológico é responsável por reconhecer e se ligar a um alvo biológico como um anticorpo, enzima, peptídeo ou ácido nucleico (LIU; LIN, 2006). O tipo de interface selecionado é determinado pelo tipo de transdutor e pelo tipo de sinal biológico empregado. As interfaces de sinalização enzimática, imunológica e de ácido nucleico são exemplos de interfaces de sinalização (FU; LU; LAI, 2019; SONG et al., 2021).

Uma das interfaces mais comuns usadas em biossensores é a enzimática. Esta funciona utilizando enzimas para catalisar reações químicas específicas. Os biossensores enzimáticos são amplamente empregados no monitoramento da glicose de pacientes diabéticos (RIDHUAN; ABDUL RAZAK; LOCKMAN, 2018). Os biossensores enzimáticos fornecem diversas vantagens, incluindo alta sensibilidade e seletividade, baixo custo, facilidade de operação e tempo de resposta rápido. Apresentam, no entanto, algumas limitações, como a necessidade de uma fonte externa de substrato para a reação enzimática e a suscetibilidade a interferentes que podem alterar a atividade enzimática como fatores ambientais agressivos, incluindo temperatura e pH (SADANI et al., 2022).

A interface imunológica baseia-se na interação de antígenos e anticorpos, o que resulta na produção de complexos imunológicos detectáveis. Os biossensores imunológicos são frequentemente empregados na detecção de doenças infecciosas e monitoramento de alergias. Dependendo do mecanismo de transdução empregado, a

Fundamentação Teórica

detecção pode ser realizada por meio de transdutores eletroquímicos, ópticos ou de massa. Esses biossensores são frequentemente utilizados em diagnóstico clínico, análise ambiental, detecção de hormônios, gerenciamento de qualidade de alimentos, bebidas, proteínas, bactérias e vírus (ALHADRAMI, 2018). A principal vantagem dos biossensores imunológicos é a alta especificidade e seletividade na detecção do analito devido à interação extremamente específica entre o anticorpo e o antígeno. Contudo, fatores ambientais podem alterar a estabilidade dos anticorpos, comprometendo a sensibilidade e a precisão dos biossensores. Além disso, a imobilização de anticorpos pode ser uma tarefa desafiadora, pois é necessário que permaneça estável para o sucesso do método (MATA CALIDONIO; GOMEZ-MARQUEZ; HAMAD-SCHIFFERLI, 2022).

Os biossensores de ácido nucleico são dispositivos que detectam a presença de material genético em amostras biológicas, como DNA e RNA. O funcionamento destes biossensores baseia-se numa interação específica entre uma sonda de ácido nucleico complementar e o ácido nucleico presente na amostra. Este contato produz um sinal detectável e quantificável. Os biossensores de ácido nucleico podem ser baseados em eletroquímica, óptica e piezoresistência com potencial para melhorar a saúde pública e a segurança alimentar devido à sua excelente sensibilidade e especificidade (DU; DONG, 2017).

Os biossensores de células vivas são dispositivos que permitem o monitoramento em tempo real da atividade celular. São baseados em tecnologias que utilizam células vivas para reconhecimento biológico. Essas células são modificadas geneticamente ou fisiologicamente para responder a estímulos específicos e podem ser de origem animal, vegetal ou bacteriana. Os biossensores de células vivas são capazes de detectar produtos químicos, venenos e infecções, além de monitorar processos biológicos, como o crescimento celular, diferenciação e apoptose. Para garantir a estabilidade e a utilidade das células, esses biossensores geralmente envolvem sua imobilização em uma matriz tridimensional, como hidrogéis ou membranas. A interface de sinalização geralmente é baseada em abordagens eletroquímicas, ópticas ou mecânicas que permitem a detecção em tempo real de respostas biológicas (GUI et al., 2017; ZHAO et al., 2021). Esses biossensores são muito específicos e sensíveis e podem ser facilmente personalizados para detectar diferentes analitos. Além disso, esses biossensores podem fornecer informações valiosas sobre a toxicidade e a atividade biológica dos compostos avaliados. No

Fundamentação Teórica

entanto, é essencial preservar a viabilidade e a funcionalidade das células vivas ao longo do processo de análise (GUI et al., 2017).

Os biossensores baseados em polímero de impressão molecular (MIP) são dispositivos de detecção com alta especificidade e sensibilidade que usam MIPs como elementos de reconhecimento. Esses polímeros são criados pela adição de um molde (análogo ao analito alvo) durante a polimerização, resultando em locais de reconhecimento altamente específicos para o analito alvo. Os biossensores MIP têm várias vantagens sobre os biossensores padrão, incluindo grande seletividade, estabilidade excepcional e longa vida útil. Esses dispositivos são aplicáveis na análise ambiental, diagnóstico clínico, monitoramento da qualidade dos alimentos e detecção de drogas. Além disso, podem substituir sistemas de detecção mais complexos e caros (CRAPNELL et al., 2020; PILETSKY; TURNER; LAITENBERGER, 2006).

A interfase baseada em peptídeos também é uma opção interessante. Os peptídeos podem ser fabricados quimicamente em grandes quantidades com grande pureza, tornando-os uma escolha econômica e prática para uso em biossensores. Além disso, as sequências peptídicas podem ser facilmente alteradas para melhorar a afinidade e a especificidade para uma determinada molécula alvo. A imobilização de peptídeos em matrizes de transdução pode ser realizada por meio de ligações covalentes ou abordagens de adsorção física. A interface de sinalização de um biossensor baseado em peptídeo pode ser elétrica, óptica ou baseada em mudanças de massa. A detecção pode ser feita diretamente, pelo contato do peptídeo com o analito, ou, indiretamente, pela detecção de uma molécula sinalizadora criada pela interação do peptídeo com o analito. A combinação de peptídeos com várias técnicas de detecção e transdução pode produzir biossensores altamente sensíveis e seletivos, capazes de detectar uma ampla gama de analitos (BULUT et al., 2023; ESCOBAR et al., 2023; KONG et al., 2023; SUN et al., 2020; UCAR et al., 2020; WANG et al., 2022a).

4. Novos métodos de diagnóstico

4.1 Imunoensaios do tipo ELISA: o padrão-ouro

O ensaio imunoenzimático do tipo ELISA é considerado o padrão-ouro dos imunoensaios. Apresenta alta sensibilidade e é usado para detectar e quantificar anticorpos, antígenos, proteínas, glicoproteínas e hormônios. A detecção do analito é realizada pela marcação enzimática de uma das espécies do par imunológico (antígeno ou anticorpo) necessitando de pequenas quantidades de uma amostra-teste (ALHAJJ; FARHANA, 2021). São realizadas etapas de lavagens para que o excesso de reagentes seja removido e permaneça, na fase sólida (poço), apenas o imunocomplexo formado. O marcador enzimático pode ser quantificado através da adição dos substratos específicos. As enzimas mais utilizadas para marcação são a peroxidase de rábano (HRP), e a fosfatase alcalina (ALP) (SADASIVAM; MANICKAM, 1996). A enzima HRP catalisa a oxidação de seu substrato, orto-fenilenodiamina (OPD), produzindo uma solução amarela contendo como produto desta reação o corante 2, 3-diaminofenazina (DAP) (**Figura 6**) (BYSTRYAK; SANTOCKYTE, 2015), e pode ser utilizado como substrato para a reação o 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB).

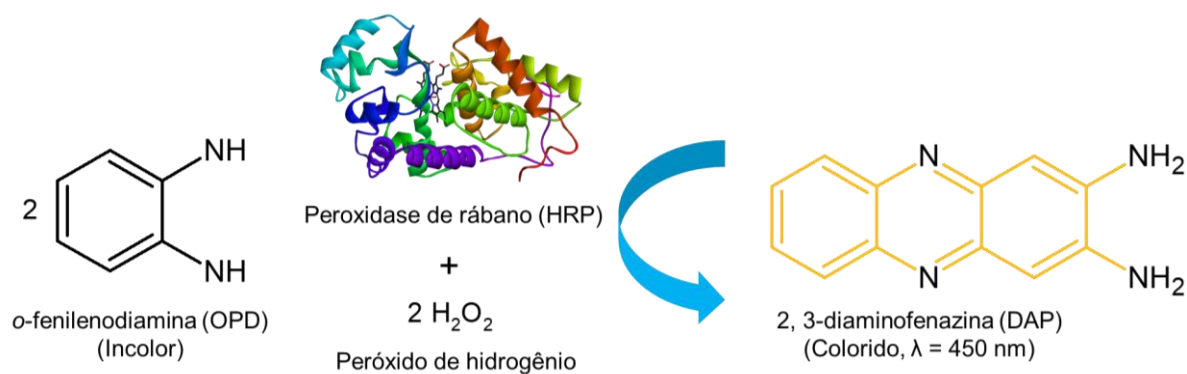


Figura 6. Esquema da oxidação de OPD catalisada pela enzima HRP. Fonte: Próprio autor.

Fundamentação Teórica

A adição de ácido sulfúrico concentrado interrompe a reação e muda a cor do DAP para laranja (**Figura 7**). Nesse contexto, a cor produzida é diretamente proporcional à concentração de HRP presente nas moléculas marcadas que estão envolvidas no ensaio, sendo mensurado com máximo de absorbância em 492 nm em um espectrofotômetro.

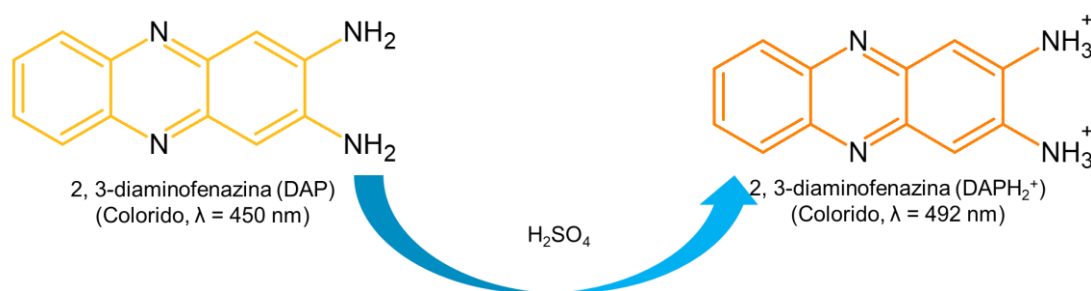


Figura 7. Deslocamento batocrômico sofrido pelo DAP após adição de H_2SO_4 . Fonte: Próprio autor.

Diferentes formatos do teste ELISA podem ser realizados, sendo os mais comuns: (i) direto, em que o antígeno é imobilizado na fase sólida e o anticorpo específico contra o antígeno já é marcado; (ii) indireto, em que o antígeno é imobilizado na fase sólida e o anticorpo primário específico contra o antígeno é reconhecido por um anticorpo secundário marcado, usualmente policlonal, o que garante um ganho expressivo na amplificação do sinal e na sensibilidade; (iii) sanduíche, quando o antígeno é incubado entre dois anticorpos diferentes, sendo um anticorpo imobilizado na fase sólida e o outro anticorpo marcado. Este formato é limitado a antígenos multivalentes e o sinal é proporcional à concentração deste na amostra e (iv) competitivo, o qual depende da competição do antígeno a um inibidor marcado. Este formato é útil para haptenos e sua coloração é inversamente proporcional à concentração do antígeno na amostra (ALEGRET et al., 2004). A **Figura 8**, ilustra os diferentes formatos do teste ELISA, anteriormente exemplificados:

Fundamentação Teórica

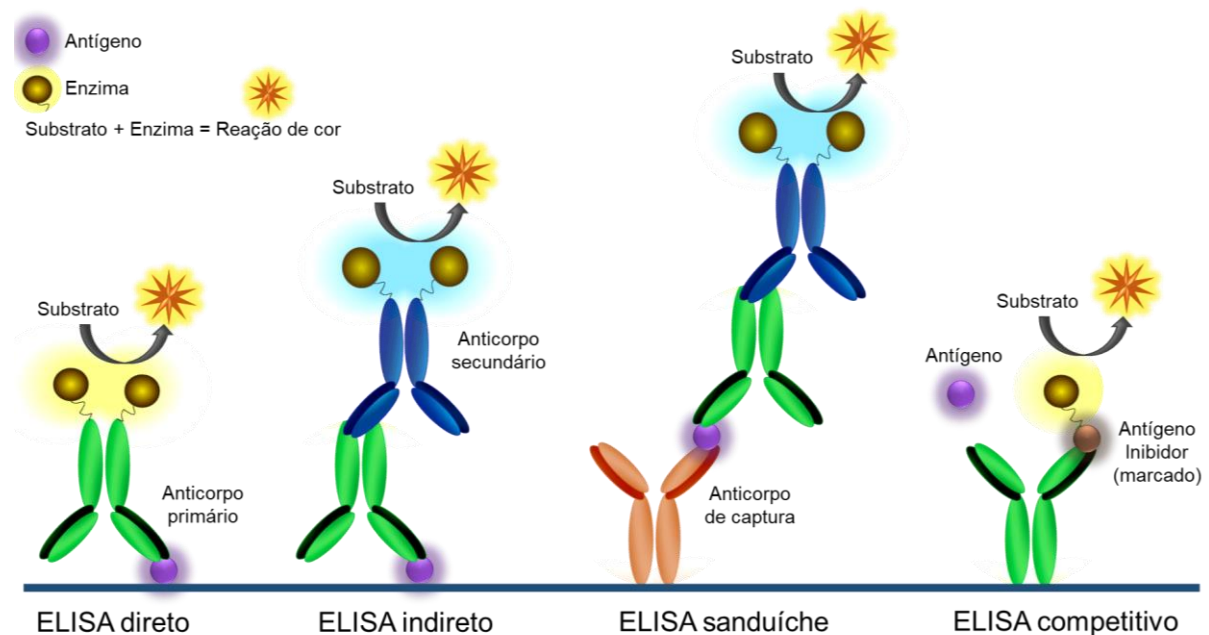


Figura 8. Esquema de diferentes abordagens e formatos de teste ELISA. Fonte: Próprio autor.

4.2 A busca por novos métodos

O gerenciamento oncológico moderno tem priorizado a medicina personalizada, alicerçada no conhecimento acerca da biologia do tumor, direcionando o tratamento e melhorando o prognóstico dos pacientes. Dessa forma, as classificações moleculares dos subtipos de CMs oferecem o potencial de revolucionar o tratamento individual. Porém, as técnicas atualmente disponíveis são dispendiosas em comparação com os métodos-padrão, como a imuno-histoquímica, além da enorme quantidade de dados gerados exigirem análises bioinformáticas complexas, limitando seu uso clínico (MAIA et al., 2017; PROVENZANO; ULANER; CHIN, 2018).

O diagnóstico precoce é fundamental para o sucesso do tratamento e cura do CM (BHUSHAN; GONSALVES; MENON, 2021), portanto, o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico pode ser um fator chave para salvar vidas e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

A avaliação de um novo método de diagnóstico é uma tarefa complexa que exige um processo rigoroso e bem definido para garantir sua eficácia e segurança. Os parâmetros-chave que devem ser avaliados incluem a especificidade, a sensibilidade, o valor preditivo positivo, o valor preditivo negativo, a acurácia, a precisão, a

Fundamentação Teórica

reprodutibilidade e a robustez. Esses parâmetros podem ser avaliados em diferentes etapas do processo de validação, desde os estudos pré-clínicos até os ensaios clínicos em humanos (LEEFLANG; ALLERBERGER, 2019).

Ao comparar um teste em desenvolvimento com um padrão ouro devem ser consideradas as seguintes variáveis:

- Falso positivo (FP) que é a possibilidade de um indivíduo saudável ser classificado como doente;
- Falso negativo (FN) que é a possibilidade de um indivíduo doente ser classificado como saudável;
- Verdadeiro positivo (VP) que é a possibilidade de um indivíduo doente ser classificado como doente; e
- Verdadeiro negativo (VN) que é a possibilidade de um indivíduo saudável ser classificado como saudável.

Para a avaliação do desempenho de um teste os valores de acerto, VP e VN, são significativamente relevantes e, entre as condições de erro, os valores de FN necessitam de maior atenção que os valores de FP. Um laudo FN pode trazer consequências irreparáveis para o indivíduo portador da doença, uma vez que passa a não ser elegível ao tratamento. As implicações de um resultado FP também são igualmente danosas, conduzindo a um tratamento desnecessário e, por vezes, com efeitos colaterais preocupantes. Contudo, uma decisão acerca do resultado de um teste deverá estar acompanhada do conhecimento e da experiência do profissional que investiga a doença, o que garante uma análise técnica do caso (VAZ, 2009).

A relação entre os pacientes classificados como doentes ou não doentes pelo teste diagnóstico padrão-ouro e os pacientes classificados como positivo ou negativos de um teste em desenvolvimento é mostrada na **Tabela 1**.

Fundamentação Teórica

Tabela 1. Combinação binária de resultados entre o diagnóstico feito por teste padrão ouro e os possíveis resultados de um teste de diagnóstico em desenvolvimento. Fonte: Adaptado de (VAZ, 2009).

PADRÃO-OURO				
TESTE		Doente	Não doente	Total
	Positivo	VP	FP	VP+FP
	Negativo	FN	VN	FN+VN
	Total	VP+FN	FP+VN	VP+FP+FN+VN

Abreviaturas: VP, verdadeiro positivo; FN, falso negativo; FP, falso positivo; VN, verdadeiro negativo.

Para que essa análise seja aplicável a respostas ordinais ou contínuas (MARTINEZ, 2001) é estabelecido um ponto de corte (*cut off*), o que permite que os dados sejam dicotomizados em positivos e negativos. Assim, podem ser estimadas a sensibilidade (*S*) e a especificidade (*E*) clínica, para diferentes pontos de corte, dentre os possíveis valores que o teste em desenvolvimento apresenta (VAZ, 2009).

A sensibilidade clínica pode ser calculada a partir da razão entre o número de resultados VP e o número de todos os pacientes VP e FN (Equação 1). Nesse sentido a sensibilidade de um teste está associada a taxa de verdadeiros positivos, ou seja, é a probabilidade de o teste fornecer um resultado positivo, quando a doença em questão está, de fato, presente.

$$S = \frac{VP}{(VP + FN)} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Já a especificidade clínica pode ser calculada como o número de resultados VN dividido pelo número de todos os indivíduos sem a doença VN e FP (Equação 2). Desta forma a especificidade clínica indica a taxa de verdadeiros negativos, ou seja, é a probabilidade de o teste fornecer um resultado negativo, quando a doença em questão está, de fato, ausente.

$$E = \frac{VN}{(VN + FP)} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Assim a **Figura 9** mostra uma representação genérica da distribuição de possíveis resultados de um teste de diagnóstico. Em α é definido o ponto de máxima sensibilidade, a partir do qual o número de resultados FN é menor. Este é o ponto de

Fundamentação Teórica

corte em que se encontra a maior probabilidade de um diagnóstico VN para indivíduos não doentes. Já em γ é definido o ponto de máxima especificidade, a partir do qual o número de resultados FP é menor. Neste se encontra a maior probabilidade de um diagnóstico VP para indivíduos doentes. Como a sensibilidade e a especificidade são inversamente proporcionais, o ponto de corte β é definido onde a máxima especificidade e a máxima sensibilidade coexistem. Porém, esse ponto descarta todos os resultados FN e inclui todos os FP, o que deve ser analisado cuidadosamente com base na doença em estudo.

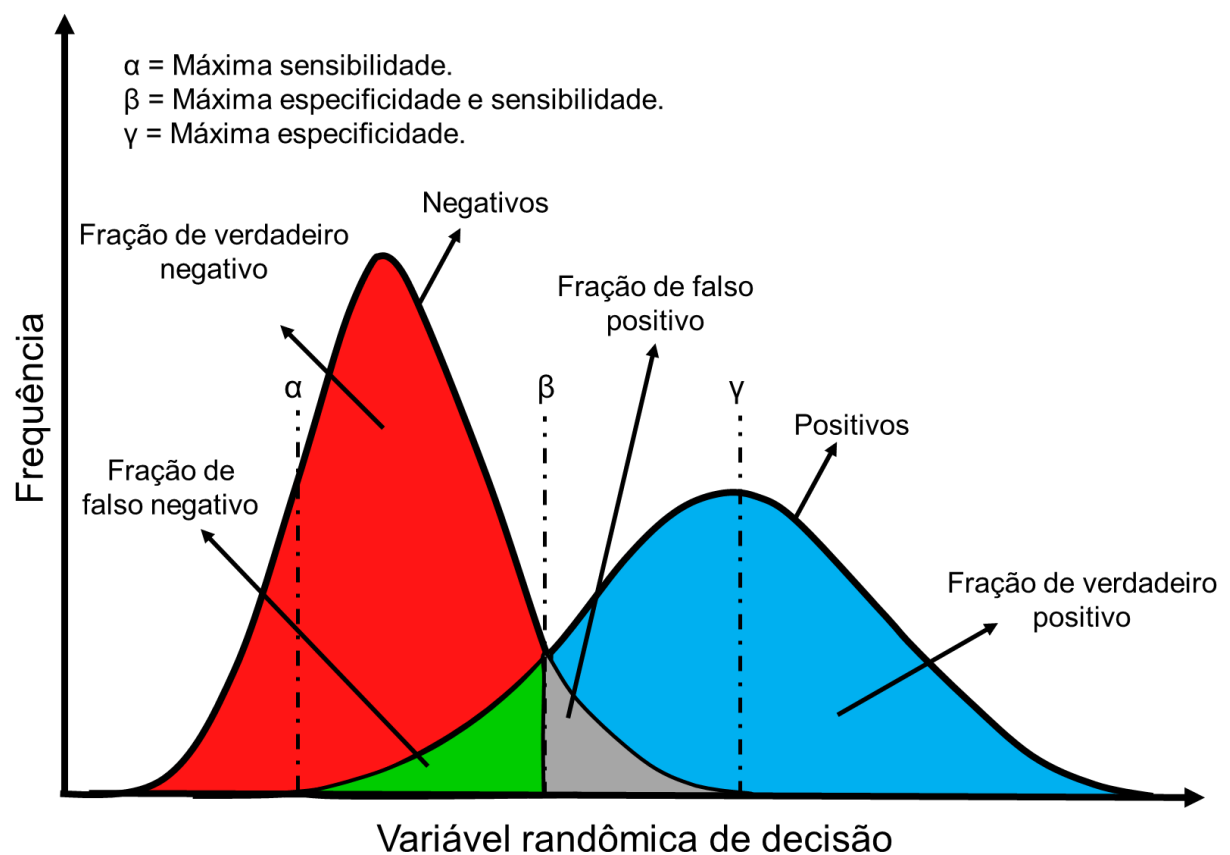


Figura 9. Esquema indicativo da influência do ponto de corte na sensibilidade e especificidade de um teste de diagnóstico em desenvolvimento. Fonte: Próprio autor.

A aplicação de uma metodologia que possa valorizar o ponto de corte se torna bastante interessante, uma vez que a definição de um ponto adequado é essencial para que sejam minimizados falsos resultados. Uma das metodologias disponíveis mais utilizadas é a curva ROC do inglês *Receiver Operating Characteristic*.

Fundamentação Teórica

4.3 Curva ROC

A curva ROC é definida como a descrição gráfica do desempenho de um teste representado pela relação entre a taxa de VP (sensibilidade) e a taxa de FN (especificidade). Com esse recurso é possível definir de forma mais segura a região na qual há sobreposição de dados de amostras de indivíduos doentes e sadios, de forma a representar a precisão intrínseca do teste. Para cada ponto de decisão são colocados os índices de sensibilidade que estarão representados no eixo das ordenadas e os índices de falsos positivos ($1 - \text{especificidade} = \text{inverso da especificidade}$) que estarão representados no eixo das abscissas, mostrando as variações ponto a ponto, para cada *cut-off* possível.

Deste modo, a curva ROC é uma função contínua de Sensibilidade *versus* 1–Especificidade, para diversos valores de corte. Então, cada ponto de corte é associado a um único par ($1 - \text{Especificidade}$, Sensibilidade). De uma maneira geral, quanto menor for o ponto de corte, maior será a habilidade do teste em classificar os doentes como positivos, isto é, maior será a sensibilidade. Inversamente, quanto maior for o ponto de corte, maior será a habilidade do teste em classificar os indivíduos sadios como negativos, isto é, maior será a especificidade.

A área sob a curva do inglês, *area under the ROC curve* (AUC) representa a acurácia do teste, considerando todos os valores de sensibilidade e especificidade para cada valor de corte. Um teste com pequeno poder diagnóstico tem curvas mais retilíneas. Já para um teste com maior poder diagnóstico, sua curva se aproxima do canto superior esquerdo (LOPES et al., 2014). A **Tabela 2** apresenta indicadores de desempenho para um teste em desenvolvimento, com base na área sob a curva ROC.

Tabela 2. Relação entre a área sob a curva ROC e a precisão do diagnóstico. Fonte: Adaptada de (BORGES, 2016).

AUC	Precisão diagnóstica
0,9 – 1,0	Excelente
0,8 – 0,9	Muito bom
0,7 – 0,8	Bom
0,6 – 0,7	Suficiente
0,5 – 0,6	Ruim
< 0,5	Não utilizar o teste

Abreviaturas: AUC, área sobre a curva.

Fundamentação Teórica

Outras duas variáveis envolvidas no processo de teste de desempenho são os valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN). Os valores preditivos definem a precisão de um teste em prever uma condição clínica, sendo referências que indicam qual a probabilidade de um indivíduo de um ensaio realmente portar ou não a doença, caso o resultado seja positivo ou negativo, respectivamente. Os valores preditivos são fortemente influenciados pela sensibilidade e especificidade do teste, bem como pela prevalência da doença, sendo calculados conforme as seguintes equações:

$$VPP = \frac{VP}{(VP + FP)} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

$$VPN = \frac{VN}{(VN + FN)} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Adicionalmente são considerados os parâmetros de verossimilhança positiva (RVP), a qual expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado positivo em pessoas doentes quando comparado a pessoas não doentes. Já a verossimilhança negativa (RVN) expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado negativo em pessoas doentes quando comparado com pessoas não doentes. As RV são calculadas pelas equações:

$$RVP = \frac{S}{(1 - E)} \quad \text{Equação 5}$$

$$RVN = \frac{(1 - S)}{E} \quad \text{Equação 6}$$

Por fim, a precisão ou acurácia diagnóstica (PrD) é a proporção de acertos de um teste. A prevalência sorológica (PS), por sua vez, é a porcentagem de indivíduos doentes em uma população, sendo ambas calculadas com as seguintes equações:

$$\text{Precisão diagnóstica} = \frac{(VP + VN)}{N} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

$$\text{Prevalência sorológica} = \frac{(VP + FN)}{N} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

Fundamentação Teórica

A técnica de PD permitiu, em estudo anterior do grupo de pesquisa da co-orientadora, a identificação de peptídeos específicos ligantes de linhagens celulares de CM (SILVA, 2017). O desenvolvimento de novos testes de diagnóstico, aplicáveis a biópsia líquida, utilizando estes marcadores selecionados, pode ser um caminho promissor na detecção precoce caracterização molecular e direcionamento no tratamento do CM.

Referências

- ALEGRET, S.; VALLE, M. DEL.; MERKOÇI, ARBEN.; UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA. SERVEI DE PUBLICACIONS. SENSORES ELECTROQUÍMICOS : INTRODUCCIÓN A LOS QUIMIOSENSORES Y BIODENSORES : CURSO TEÓRICO-PRÁCTICO. [S.L.] : UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA, 2004. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://BOOKS.GOOGLE.ES/BOOKS/ABOUT/SENSORES_ELECTROQUÍMICOS.HTML?ID=R39GOT4R0UGC&REDIR_ESC=Y](https://books.google.es/books/about/Sensores_electroquímicos.html?id=R39GOT4R0UGC&redir_esc=y)>. ACESSO EM: 12 DEZ. 2018.
- ALHADRAMI, H. A. BIODENSORS: CLASSIFICATIONS, MEDICAL APPLICATIONS, AND FUTURE PROSPECTIVE. BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMISTRY, UNITED STATES, V. 65, N. 3, P. 497–508, 2018.
- ALHAJJ, M.; FARHANA, A. ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY. [S.L.] : STATPEARLS PUBLISHING, 2021. DISPONÍVEL EM: <[HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/PUBMED/32310382](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32310382)>. ACESSO EM: 12 MAR. 2021.
- ALIMIRZAIE, S.; BAGHERZADEH, M.; AKBARI, M. R. LIQUID BIOPSY IN BREAST CANCER: A COMPREHENSIVE REVIEW. CLINICAL GENETICS, [S. L.], V. 95, N. 6, P. 643–660, 2019.
- ALMAGRO, J. C.; PEDRAZA-ESCALONA, M.; ARRIETA, H. I.; PÉREZ-TAPIA, S. M. PHAGE DISPLAY LIBRARIES FOR ANTIBODY THERAPEUTIC DISCOVERY AND DEVELOPMENT. ANTIBODIES, [S. L.], V. 8, N. 3, P. 44, 2019.
- AL-MAHAYRI, Z. N.; PATRINOS, G. P.; ALI, B. R. TOXICITY AND PHARMACOGENOMIC BIOMARKERS IN BREAST CANCER CHEMOTHERAPY. FRONTIERS IN PHARMACOLOGY, [S. L.], V. 11, P. 445, 2020.
- ALMEIDA, G.; JAPOLLA, G.; CAMPOS, I.; BATAUS, L. A.; SOUZA, G. PHAGE DISPLAY E SUA APLICAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA. ENCICLOPEDIA BIOSFERA, [S. L.], V. 11, N. 22, 2015.
- ANAND, T.; VIRMANI, N.; BERA, B. C.; VAID, R. K.; VASHISTH, M.; BARDAJATYA, P.; KUMAR, A.; TRIPATHI, B. N. PHAGE DISPLAY TECHNIQUE AS A TOOL FOR DIAGNOSIS AND ANTIBODY SELECTION FOR CORONAVIRUSES. CURRENT MICROBIOLOGY, [S. L.], 2021. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S00284-021-02398-9](https://doi.org/10.1007/s00284-021-02398-9)>
- BARBAS, C. F.; BURTON, D. R.; SILVERMAN, G. J. PHAGE DISPLAY: A LABORATORY MANUAL. [S.L.] : COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, 2004. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://BOOKS.GOOGLE.COM.BR/BOOKS?ID=UCNAAY6pVAgC](https://books.google.com.br/books?id=UCNAAY6pVAgC)>
- BARDERAS, R.; BENITO-PEÑA, E. THE 2018 NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY: PHAGE DISPLAY OF PEPTIDES AND ANTIBODIES. ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, [S. L.], V. 411, P. 2475–2479, 2019.
- BERNEDO-NAVARRO, R. A.; YANO, T. PHAGE DISPLAY AND SHIGA TOXIN NEUTRALIZERS. TOXICON, [S. L.], V. 113, P. 60–69, 2016.

Referências

- BHUSHAN, A.; GONSALVES, A.; MENON, J. U. CURRENT STATE OF BREAST CANCER DIAGNOSIS, TREATMENT, AND THERANOSTICS. *PHARMACEUTICS*, [S. L.], v. 13, n. 5, p. 723, 2021.
- BODER, E. T.; RAEESZADEH-SARMAZDEH, M.; PRICE, J. V. ENGINEERING ANTIBODIES BY YEAST DISPLAY. *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS*, [S. L.], v. 526, n. 2, p. 99–106, 2012.
- BORGES, L. S. MEDIDAS DE ACURÁCIA DIAGNÓSTICA NA PESQUISA CARDIOVASCULAR. *INT J CARDIOVASC SCI*, [S. L.], v. 29, n. 3, p. 218–222, 2016.
- BÖTTGER, V.; BÖTTGER, A. EPITOPE MAPPING USING PHAGE DISPLAY PEPTIDE LIBRARIES. *EPITOPE MAPPING PROTOCOLS: SECOND EDITION*, [S. L.], p. 181–201, 2009.
- BUERK, D. G. *BIOSENSORS: THEORY AND APPLICATIONS*. [S.L.] : CRC PRESS, 2014.
- BULUT, A.; TEMUR, B. Z.; KIRIMLI, C. E.; GOK, O.; BALCIOGLU, B. K.; OZTURK, H. U.; UYAR, N. Y.; KANLIDERE, Z.; KOCAGOZ, T.; CAN, O. A NOVEL PEPTIDE-BASED DETECTION OF SARS-CoV-2 ANTIBODIES. *BIOMIMETICS*, [S. L.], v. 8, n. 1, p. 89, 2023.
- BYSTRYAK, S.; SANTOCKYTE, R. INCREASED SENSITIVITY OF HIV-1 p24 ELISA USING A PHOTOCHEMICAL SIGNAL AMPLIFICATION SYSTEM. *JOURNAL OF ACQUIRED IMMUNE DEFICIENCY SYNDROMES (1999), ALLIED INNOVATIVE SYSTEMS, HILLSBOROUGH, NJ (SANTOCKYTE IS NOW WITH BRISTOL-MYERS SQUIBB, PRINCETON, NJ)*, v. 70, n. 2, p. 109–114, 2015.
- CHEN, C.; WANG, J. OPTICAL BIOSENSORS: AN EXHAUSTIVE AND COMPREHENSIVE REVIEW. *ANALYST*, [S. L.], v. 145, n. 5, p. 1605–1628, 2020.
- COSNIER, S. *BIOSENSORS BASED ON ELECTROPOLYMERIZED FILMS: NEW TRENDS. ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY*, [S. L.], v. 377, n. 3, p. 507–520, 2003.
- COSNIER, S.; HOLZINGER, M. *BIOSENSORS BASED ON ELECTROPOLYMERIZED FILMS. EM: ELECTROPOLYMERIZATION*. [S.L: S.N.]. P. 189–213.
- CRAPNELL, R. D.; DEMPSEY-HIBBERT, N. C.; PEETERS, M.; TRIDENTE, A.; BANKS, C. E. MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER BASED ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS: OVERCOMING THE CHALLENGES OF DETECTING VITAL BIOMARKERS AND SPEEDING UP DIAGNOSIS. *TALANTA OPEN*, [S. L.], v. 2, p. 100018, 2020.
- CRONIN, K. A.; HARLAN, L. C.; DODD, K. W.; ABRAMS, J. S.; BALLARD-BARBASH, R. POPULATION-BASED ESTIMATE OF THE PREVALENCE OF HER-2 POSITIVE BREAST CANCER TUMORS FOR EARLY STAGE PATIENTS IN THE US. *CANCER INVESTIGATION*, [S. L.], v. 28, n. 9, p. 963–968, 2010.
- DALBY, P. A. *ENGINEERING ENZYMES FOR BIOCATALYSIS. RECENT PATENTS ON BIOTECHNOLOGY*, [S. L.], v. 1, n. 1, p. 1–9, 2007.
- DU, Y.; DONG, S. *NUCLEIC ACID BIOSENSORS: RECENT ADVANCES AND PERSPECTIVES. ANALYTICAL CHEMISTRY, UNITED STATES*, v. 89, n. 1, p. 189–215, 2017.
- EROLE, P.; BOSCH, A.; PÉREZ-FIDALGO, J. A.; LLUCH, A. MOLECULAR BIOLOGY IN BREAST CANCER: INTRINSIC SUBTYPES AND SIGNALING PATHWAYS. *CANCER TREATMENT*

Referências

REVIEWS, NETHERLANDS, V. 38, N. 6, P. 698–707, 2012.

ESCOBAR, V.; SCARAMOZZINO, N.; VIDIC, J.; BUHOT, A.; MATHEY, R.; CHAIX, C.; HOU, Y. RECENT ADVANCES ON PEPTIDE-BASED BIOSENSORS AND ELECTRONIC NOSES FOR FOODBORNE PATHOGEN DETECTION. *BIOSENSORS*, [S. L.], V. 13, N. 2, P. 258, 2023.

FINLAY, W. J. J.; BLOOM, L.; GRANT, J.; FRANKLIN, E.; SHÚILLEABHÁIN, D. N.; CUNNINGHAM, O. PHAGE DISPLAY: A POWERFUL TECHNOLOGY FOR THE GENERATION OF HIGH-SPECIFICITY AFFINITY REAGENTS FROM ALTERNATIVE IMMUNE SOURCES. *PROTEIN CHROMATOGRAPHY: METHODS AND PROTOCOLS*, [S. L.], P. 85–99, 2017.

FRENZEL, A.; SCHIRRMANN, T.; HUST, M. PHAGE DISPLAY-DERIVED HUMAN ANTIBODIES IN CLINICAL DEVELOPMENT AND THERAPY. EM: MABS 2016, ANAIS... : TAYLOR & FRANCIS, 2016.

FU, Z.; LU, Y.-C.; LAI, J. J. RECENT ADVANCES IN BIOSENSORS FOR NUCLEIC ACID AND EXOSOME DETECTION. *CHONNAM MEDICAL JOURNAL*, [S. L.], V. 55, N. 2, P. 86–98, 2019.

GAO, J. J.; SWAIN, S. M. LUMINAL A BREAST CANCER AND MOLECULAR ASSAYS: A REVIEW. *THE ONCOLOGIST*, [S. L.], V. 23, N. 5, P. 556–565, 2018.

GEYER, F. C.; PAREJA, F.; WEIGELT, B.; RAKHA, E.; ELLIS, I. O.; SCHNITT, S. J.; REIS-FILHO, J. S. THE SPECTRUM OF TRIPLE-NEGATIVE BREAST DISEASE: HIGH-AND LOW-GRADE LESIONS. *THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY*, [S. L.], V. 187, N. 10, P. 2139–2151, 2017.

GOBBINI, E.; EZZALFANI, M.; DIERAS, V.; BACHELOT, T.; BRAIN, E.; DEBLED, M.; JACOT, W.; MOURET-REYNIER, M. A.; GONCALVES, A.; DALENC, F. TIME TRENDS OF OVERALL SURVIVAL AMONG METASTATIC BREAST CANCER PATIENTS IN THE REAL-LIFE ESME COHORT. *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER*, [S. L.], V. 96, P. 17–24, 2018.

GOLDHIRSCH, A.; WINER, E. P.; COATES, A.; GELBER, R.; PICCART-GEHBART, M.; THÜRLIMANN, B.; SENN, H.-J.; ALBAIN, K. S.; ANDRÉ, F.; BERGH, J. PERSONALIZING THE TREATMENT OF WOMEN WITH EARLY BREAST CANCER: HIGHLIGHTS OF THE ST GALLEN INTERNATIONAL EXPERT CONSENSUS ON THE PRIMARY THERAPY OF EARLY BREAST CANCER 2013. *ANNALS OF ONCOLOGY*, [S. L.], V. 24, N. 9, P. 2206–2223, 2013.

GOLUBNITSCHAJA, O.; DEBALD, M.; YEGHIAZARYAN, K.; KUHN, W.; PEŠTA, M.; COSTIGLIOLA, V.; GRECH, G. BREAST CANCER EPIDEMIC IN THE EARLY TWENTY-FIRST CENTURY: EVALUATION OF RISK FACTORS, CUMULATIVE QUESTIONNAIRES AND RECOMMENDATIONS FOR PREVENTIVE MEASURES. *TUMOR BIOLOGY*, [S. L.], V. 37, N. 10, P. 12941–12957, 2016.

GOMES, M.; FLECK, A.; DEGAUGUE, A.; GOURMELON, F.; LÉGER, C.; AUMONT-NICAISE, M.; MESNEAU, A.; JEAN-JACQUES, H.; HASSAINE, G.; URVOAS, A. DESIGN OF AN ARTIFICIAL PHAGE-DISPLAY LIBRARY BASED ON A NEW SCAFFOLD IMPROVED FOR AVERAGE STABILITY OF THE RANDOMIZED PROTEINS. *SCIENTIFIC REPORTS*, [S. L.], V. 13, N. 1, P. 1339, 2023.

GONCALVES, A.; FINETTI, P.; BIRNBAUM, D.; BERTUCCI, F. THE CINSARC SIGNATURE PREDICTS THE CLINICAL OUTCOME IN PATIENTS WITH LUMINAL B BREAST CANCER. *NPJ BREAST CANCER*, [S. L.], V. 7, N. 1, P. 48, 2021.

Referências

- GRIFFITHS, A. J. F. W., S.R.; LEWONTIN, R.C.; CARROL, S. B. INTRODUÇÃO À GENÉTICA. [S.L: S.N.].
- GUI, Q.; LAWSON, T.; SHAN, S.; YAN, L.; LIU, Y. THE APPLICATION OF WHOLE CELL-BASED BIOSENSORS FOR USE IN ENVIRONMENTAL ANALYSIS AND IN MEDICAL DIAGNOSTICS. SENSORS, [S. L.], v. 17, n. 7, p. 1623, 2017.
- GULIY, O. I.; EVSTIGNEEVA, S. S.; DYKMAN, L. A. RECOMBINANT ANTIBODIES BY PHAGE DISPLAY FOR BIOANALYTICAL APPLICATIONS. BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, [S. L.], p. 114909, 2022.
- GURUNG, S.; PEROCHÉAU, D.; TOURAMANIDOU, L.; BARUTEAU, J. THE EXOSOME JOURNEY: FROM BIOGENESIS TO UPTAKE AND INTRACELLULAR SIGNALLING. CELL COMMUNICATION AND SIGNALING, [S. L.], v. 19, n. 1, p. 47, 2021.
- HAMMERS, C. M.; STANLEY, J. R. ANTIBODY PHAGE DISPLAY: TECHNIQUE AND APPLICATIONS. THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, [S. L.], v. 134, n. 2, p. E17, 2014.
- HAN, Q.-F.; LI, W.-J.; HU, K.-S.; GAO, J.; ZHAI, W.-L.; YANG, J.-H.; ZHANG, S.-J. EXOSOME BIOGENESIS: MACHINERY, REGULATION, AND THERAPEUTIC IMPLICATIONS IN CANCER. MOLECULAR CANCER, [S. L.], v. 21, n. 1, p. 1–26, 2022.
- HARPER, A.; ANDERSON, M. R. ELECTROCHEMICAL GLUCOSE SENSORS—DEVELOPMENTS USING ELECTROSTATIC ASSEMBLY AND CARBON NANOTUBES FOR BIOSENSOR CONSTRUCTION. SENSORS, [S. L.], v. 10, n. 9, p. 8248–8274, 2010.
- HEIDRICH, I.; AČKAR, L.; MOSSAHEBI MOHAMMADI, P.; PANTEL, K. LIQUID BIOPSIES: POTENTIAL AND CHALLENGES. INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, [S. L.], v. 148, n. 3, p. 528–545, 2021.
- HEINIS, C. COMBINING BIOLOGICAL AND CHEMICAL DIVERSITY. NATURE CHEMISTRY, [S. L.], v. 13, n. 6, p. 512–513, 2021.
- INCA. CÂNCER DE MAMA — INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. 2023. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.GOV.BR/INCA/PT-BR/ASSUNTOS/CANCER/TIPOS/MAMA](https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/mama)>. ACESSO EM: 29 MAR. 2023.
- JIN, X.; XIA, T.; LUO, S.; ZHANG, Y.; XIA, Y.; YIN, H. EXOSOMAL LIPID PI4P REGULATES SMALL EXTRACELLULAR VESICLE SECRETION BY MODULATING INTRALUMINAL VESICLE FORMATION. JOURNAL OF EXTRACELLULAR VESICLES, [S. L.], v. 12, n. 4, p. 12319, 2023.
- KARIMZADEH, A.; HASANZADEH, M.; SHADJOU, N.; GUARDIA, M. DE LA. PEPTIDE BASED BIOSENSORS. TRAC TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY, [S. L.], v. 107, p. 1–20, 2018.
- KEHOE, J. W.; KAY, B. K. FILAMENTOUS PHAGE DISPLAY IN THE NEW MILLENNIUM. CHEMICAL REVIEWS, UNITED STATES, v. 105, n. 11, p. 4056–4072, 2005.
- KENNECKE, H.; YERUSHALMI, R.; WOODS, R.; CHEANG, M. C. U.; VODUC, D.; SPEERS, C. H.; NIELSEN, T. O.; GELMON, K. METASTATIC BEHAVIOR OF BREAST CANCER SUBTYPES. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY : OFFICIAL JOURNAL OF THE

Referências

- AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, UNITED STATES, v. 28, n. 20, p. 3271–3277, 2010.
- KIM, E. R.; JOE, C.; MITCHELL, R. J.; GU, M. B. BIOSENSORS FOR HEALTHCARE: CURRENT AND FUTURE PERSPECTIVES. *TRENDS IN BIOTECHNOLOGY*, [S. L.], 2022.
- KONG, H.; YANG, G.; HE, P.; ZHU, D.; LUAN, X.; XU, Y.; MU, R.; WEI, G. SELF-ASSEMBLY OF BIOINSPIRED PEPTIDES FOR BIOMIMETIC SYNTHESIS OF ADVANCED PEPTIDE-BASED NANOMATERIALS: A MINI-REVIEW. *NANO FUTURES*, [S. L.], 2023.
- KONG, X.-D.; CARLE, V.; DÍAZ-PERLAS, C.; BUTLER, K.; HEINIS, C. GENERATION OF A LARGE PEPTIDE PHAGE DISPLAY LIBRARY BY SELF-LIGATION OF WHOLE-PLASMID PCR PRODUCT. *ACS CHEMICAL BIOLOGY*, [S. L.], v. 15, n. 11, p. 2907–2915, 2020.
- KÖPKE, M. M.; AKTAS, B.; DITSCH, N. RECOMMENDATIONS FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF PATIENTS WITH EARLY BREAST CANCER: UPDATE 2023. *CURRENT OPINION IN OBSTETRICS AND GYNECOLOGY*, [S. L.], v. 35, n. 1, p. 67–72, 2023. A.
- KÖPKE, M. M.; AKTAS, B.; DITSCH, N. RECOMMENDATIONS FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF PATIENTS WITH EARLY BREAST CANCER: UPDATE 2023. *CURRENT OPINION IN OBSTETRICS AND GYNECOLOGY*, [S. L.], v. 35, n. 1, p. 67–72, 2023. B.
- KUDDUS, M. ENZYMES IN FOOD BIOTECHNOLOGY: PRODUCTION, APPLICATIONS, AND FUTURE PROSPECTS. [S. L.], 2018.
- KULABHUSAN, P. K.; RAJWADE, J. M.; SAHUL HAMEED, A. S.; PAKNIKAR, K. M. LATERAL FLOW ASSAY FOR RAPID DETECTION OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV) USING A PHAGE-DISPLAYED PEPTIDE AS BIO-RECOGNITION PROBE. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, [S. L.], v. 101, n. 11, p. 4459–4469, 2017.
- KUMAR, A. M.; KACHHAWA, K. BIOMEDICAL APPLICATIONS OF BIOELECTROCHEMICAL SENSORS. EM: MULTIFACETED BIO-SENSING TECHNOLOGY. [S.L.] : ELSEVIER, 2023. P. 239–260.
- LEDGAARD, L.; LJUNGARS, A.; RIMBAULT, C.; SØRENSEN, C. V.; TULIKA, T.; WADE, J.; WOUTERS, Y.; MCCAFFERTY, J.; LAUSTSEN, A. H. ADVANCES IN ANTIBODY PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY. *DRUG DISCOVERY TODAY*, [S. L.], 2022.
- LEEFLANG, M.; ALLERBERGER, F. HOW TO: EVALUATE A DIAGNOSTIC TEST. *CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTION*, [S. L.], v. 25, n. 1, p. 54–59, 2019.
- LI, C.; TEIXEIRA, A. F.; ZHU, H.-J.; TEN DIJKE, P. CANCER ASSOCIATED-FIBROBLAST-DERIVED EXOSOMES IN CANCER PROGRESSION. *MOLECULAR CANCER*, [S. L.], v. 20, n. 1, p. 154, 2021.
- LI, Y.; MA, L. EFFICACY OF CHEMOTHERAPY FOR LYMPH NODE-POSITIVE LUMINAL A SUBTYPE BREAST CANCER PATIENTS: AN UPDATED META-ANALYSIS. *WORLD JOURNAL OF SURGICAL ONCOLOGY*, [S. L.], v. 18, n. 1, p. 316, 2020.
- LIU, G.; LIN, Y. BIOSENSOR BASED ON SELF-ASSEMBLING ACETYLCHOLINESTERASE ON CARBON NANOTUBES FOR FLOW INJECTION/AMPEROMETRIC DETECTION OF ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES AND NERVE AGENTS. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, [S. L.], v.

Referências

78, N. 3, P. 835–843, 2006.

LOPES, B.; RAMOS, I. C. DE O.; RIBEIRO, G.; CORREA, R.; VALBON, B. DE F.; LUZ, A. C. DA; SALOMÃ\POUNDSO, M.; LYRA, J. M.; AMBRÃ\TEXTTHREESUPERIORSIO JUNIOR, R. BIOESTATÍSTICAS: CONCEITOS FUNDAMENTAIS E APLICAÇÕES PRÁTICAS. REVISTA BRASILEIRA DE OFTALMOLOGIA, [S. L.], V. 73, P. 16–22, 2014.

MAIA, A.-T.; SAMMUT, S.-J.; JACINTA-FERNANDES, A.; CHIN, S.-F. BIG DATA IN CANCER GENOMICS. CURRENT OPINION IN SYSTEMS BIOLOGY, [S. L.], V. 4, P. 78–84, 2017.

MALHOTRA, B. D. BIOSENSORS: FUNDAMENTALS AND APPLICATIONS. [S.L.] : SMITHERS RAPRA, 2017.

MANOOCHHEHRI, M.; BORHANI, N.; GERHÄUSER, C.; ASSENOV, Y.; SCHÖNUNG, M.; HIELSCHER, T.; CHRISTENSEN, B. C.; LEE, M. K.; GRÖNE, H.; LIPKA, D. B. DNA METHYLATION BIOMARKERS FOR NONINVASIVE DETECTION OF TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER USING LIQUID BIOPSY. INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, [S. L.], V. 152, N. 5, P. 1025–1035, 2023.

MARTINEZ, E. Z. MÉTODOS ESTATÍSTICOS PARA ESTUDOS DE DESEMPENHO DE TESTES DIAGNÓSTICOS. 2001. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ESTATÍSTICA - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, [S. L.], 2001.

MARTÍNEZ-SÁEZ, O.; PRAT, A. CURRENT AND FUTURE MANAGEMENT OF HER2-POSITIVE METASTATIC BREAST CANCER. JCO ONCOLOGY PRACTICE, [S. L.], V. 17, N. 10, P. 594–604, 2021.

MARTINS, I. M.; REIS, R. L.; AZEVEDO, H. S. PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY IN BIOMATERIALS ENGINEERING: PROGRESS AND OPPORTUNITIES FOR APPLICATIONS IN REGENERATIVE MEDICINE. ACS CHEMICAL BIOLOGY, [S. L.], V. 11, N. 11, P. 2962–2980, 2016.

MATA CALIDONIO, J.; GOMEZ-MARQUEZ, J.; HAMAD-SCHIFFERLI, K. NANOMATERIAL AND INTERFACE ADVANCES IN IMMUNOASSAY BIOSENSORS. THE JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY C, [S. L.], V. 126, N. 42, P. 17804–17815, 2022.

MAURYA, P. K.; SINGH, S. NANOTECHNOLOGY IN MODERN ANIMAL BIOTECHNOLOGY ELSEVIER, , 2019.

MIMMI, S.; MAISANO, D.; QUINTO, I.; IACCINO, E. PHAGE DISPLAY: AN OVERVIEW IN CONTEXT TO DRUG DISCOVERY. TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES, [S. L.], V. 40, N. 2, P. 87–91, 2019.

MOREIRA, G. M. S. G.; GRONOW, S.; DÜBEL, S.; MENDONÇA, M.; MOREIRA, Â. N.; CONCEIÇÃO, F. R.; HUST, M. PHAGE DISPLAY-DERIVED MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST INTERNALINS A AND B ALLOW SPECIFIC DETECTION OF LISTERIA MONOCYTOGENES. FRONTIERS IN PUBLIC HEALTH, [S. L.], V. 10, P. 449, 2022.

NARESH, V.; LEE, N. A REVIEW ON BIOSENSORS AND RECENT DEVELOPMENT OF NANOSTRUCTURED MATERIALS-ENABLED BIOSENSORS. SENSORS, [S. L.], V. 21, N. 4, P. 1109, 2021.

Referências

- NASCIMENTO, F.; PITTA, M.; RÊGO, M. ANÁLISE DOS PRINCIPAIS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE CÂNCER DE MAMA COMO PROPULSORES NO PROCESSO INOVATIVO. ARQUIVOS DE MEDICINA, [S. L.], v. 29, p. 153–159, 2015.
- OMIDFAR, K.; DANESHPOUR, M. ADVANCES IN PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY FOR DRUG DISCOVERY. EXPERT OPINION ON DRUG DISCOVERY, [S. L.], v. 10, n. 6, p. 651–669, 2015.
- ONCOMED, 2019. CÂNCER DE MAMA - ONCOMED. 2019. DISPONÍVEL EM: <[HTTP://ONCOMEDBH.COM.BR/TIPO-DE-CANCER/MAMA/](http://oncomedbh.com.br/tipo-de-cancer/mama/)>. ACESSO EM: 3 ABR. 2019.
- PANDE, J.; SZEWCZYK, M. M.; GROVER, A. K. PHAGE DISPLAY: CONCEPT, INNOVATIONS, APPLICATIONS AND FUTURE. BIOTECHNOLOGY ADVANCES, [S. L.], v. 28, n. 6, p. 849–858, 2010.
- PARK, M. SURFACE DISPLAY TECHNOLOGY FOR BIOSENSOR APPLICATIONS: A REVIEW. SENSORS, [S. L.], v. 20, n. 10, 2020. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.MDPI.COM/1424-8220/20/10/2775](https://www.mdpi.com/1424-8220/20/10/2775)>
- PILETSKY, S. A.; TURNER, N. W.; LAITENBERGER, P. MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS IN CLINICAL DIAGNOSTICS—FUTURE POTENTIAL AND EXISTING PROBLEMS. MEDICAL ENGINEERING & PHYSICS, [S. L.], v. 28, n. 10, p. 971–977, 2006.
- PIÑEIRO-PÉREZ, R.; ABAL, M.; MUINELO-ROMAY, L. LIQUID BIOPSY FOR MONITORING EC PATIENTS: TOWARDS PERSONALIZED TREATMENT. CANCERS, [S. L.], v. 14, n. 6, p. 1405, 2022.
- POLAT, E. O.; CETIN, M. M.; TABAK, A. F.; BILGET GÜVEN, E.; UYSAL, B. Ö.; ARSAN, T.; KABBANI, A.; HAMED, H.; GÜL, S. B. TRANSDUCER TECHNOLOGIES FOR BIOSENSORS AND THEIR WEARABLE APPLICATIONS. BIOSENSORS, [S. L.], v. 12, n. 6, p. 385, 2022.
- POULET, G.; MASSIAS, J.; TALY, V. LIQUID BIOPSY: GENERAL CONCEPTS. ACTA CYTOLOGICA, [S. L.], v. 63, n. 6, p. 449–455, 2019.
- PRAT, A.; CHEANG, M. C. U.; MARTÍN, M.; PARKER, J. S.; CARRASCO, E.; CABALLERO, R.; TYLDESLEY, S.; GELMON, K.; BERNARD, P. S.; NIELSEN, T. O. PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF PROGESTERONE RECEPTOR-POSITIVE TUMOR CELLS WITHIN IMMUNOHISTOCHEMICALLY DEFINED LUMINAL A BREAST CANCER. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, [S. L.], v. 31, n. 2, p. 203, 2013.
- PRIZE ANNOUNCEMENT - NOBELPRIZE.ORG. [S. L.], [S.D.]. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.NOBELPRIZE.ORG/PRIZES/CHEMISTRY/2000/PRIZE-ANNOUNCEMENT/](https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2000/prize-announcement/)>
- PROVENZANO, E.; ULANER, G. A.; CHIN, S.-F. MOLECULAR CLASSIFICATION OF BREAST CANCER. PET CLINICS, [S. L.], v. 13, n. 3, p. 325–338, 2018.
- PRUDENCIO, C. R. UTILIZAÇÃO DO “PHAGE DISPLAY” PARA A IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECONHECIDOS POR IMUNOGLOBULINAS Y POLICLONAIS ANTI-PROTEÍNAS TOTAIS DE LARVAS DO BOOPHILUS MICROPLUS. [S. L.], 2004.
- RAHBARNIA, L.; FARAJNIA, S.; BABAEI, H.; MAJIDI, J.; VEISI, K.; AHMADZADEH, V.; AKBARI, B. EVOLUTION OF PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY: FROM DISCOVERY TO

Referências

- APPLICATION. JOURNAL OF DRUG TARGETING, [S. L.], v. 25, n. 3, p. 216–224, 2017.
- RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S.; BAEHNER, F.; DABBS, D. J.; DECKER, T.; EUSEBI, V.; FOX, S. B.; ICHIHARA, S.; JACQUEMIER, J.; LAKHANI, S. R. BREAST CANCER PROGNOSTIC CLASSIFICATION IN THE MOLECULAR ERA: THE ROLE OF HISTOLOGICAL GRADE. BREAST CANCER RESEARCH, [S. L.], v. 12, n. 4, p. 1–12, 2010.
- RAKONJAC, J.; RUSSEL, M.; KHANUM, S.; BROOKE, S. J.; RAJIČ, M. FILAMENTOUS PHAGE: STRUCTURE AND BIOLOGY. RECOMBINANT ANTIBODIES FOR INFECTIOUS DISEASES, [S. L.], p. 1–20, 2017.
- RAZA, T.; QU, L.; KHOKHAR, W. A.; ANDREWS, B.; ALI, A.; TIAN, M. PROGRESS OF WEARABLE AND FLEXIBLE ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS WITH THE AID OF CONDUCTIVE NANOMATERIALS. FRONTIERS IN BIOENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY, [S. L.], v. 9, 2021. DISPONÍVEL EM:
<[HTTPS://WWW.FRONTIERSIN.ORG/ARTICLES/10.3389/FBIOE.2021.761020](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.761020)>
- RIDHUAN, N. S.; ABDUL RAZAK, K.; LOCKMAN, Z. FABRICATION AND CHARACTERIZATION OF GLUCOSE BIOSENSORS BY USING HYDROTHERMALLY GROWN ZNO NANORODS. SCIENTIFIC REPORTS, [S. L.], v. 8, n. 1, p. 13722, 2018.
- RUSSEL, M.; LOWMAN, H. B.; CLACKSON, T. INTRODUCTION TO PHAGE BIOLOGY AND PHAGE DISPLAY. PHAGE DISPLAY: A PRACTICAL APPROACH, [S. L.], p. 1–26, 2004.
- SADANI, K.; NAG, P.; THIAN, X. Y.; MUKHERJI, S. ENZYMATIC OPTICAL BIOSENSORS FOR HEALTHCARE APPLICATIONS. BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS: X, [S. L.], v. 12, p. 100278, 2022.
- SADASIVAM, S.; MANICKAM, A. BIOCHEMICAL METHODS. [S.L.] : NEW AGE INTERNATIONAL, 1996. DISPONÍVEL EM:
<[HTTPS://BOOKS.GOOGLE.ES/BOOKS/ABOUT/BIOCHEMICAL_METHODS.HTML?ID=JUUWBG_D1MIC&REDIR_ESC=Y](https://books.google.es/books/about/Biochemical_Methods.html?id=JUUWBG_D1MIC&redir_esc=y)>. ACESSO EM: 12 DEZ. 2018.
- SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. IMMOBILIZATION STRATEGIES TO DEVELOP ENZYMATIC BIOSENSORS. BIOTECHNOLOGY ADVANCES, [S. L.], v. 30, n. 3, p. 489–511, 2012.
- SCHIRRMANN, T.; MEYER, T.; SCHÜTTE, M.; FRENZEL, A.; HUST, M. PHAGE DISPLAY FOR THE GENERATION OF ANTIBODIES FOR PROTEOME RESEARCH, DIAGNOSTICS AND THERAPY. MOLECULES, [S. L.], v. 16, n. 1, p. 412–426, 2011.
- SCHMID, P.; CORTES, J.; PUSZTAI, L.; MCARTHUR, H.; KÜMMEL, S.; BERGH, J.; DENKERT, C.; PARK, Y. H.; HUI, R.; HARBECK, N. PEMBROLIZUMAB FOR EARLY TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER. NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, [S. L.], v. 382, n. 9, p. 810–821, 2020.
- SILVA, A. D. G. IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS LIGANTES A PROTEÍNAS DE CÉLULAS TUMORAIS MAMÁRIAS. 2017. UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, [S. L.], 2017.
- SLAMON, D. J.; LEYLAND-JONES, B.; SHAK, S.; FUCHS, H.; PATON, V.; BAJAMONDE, A.; FLEMING, T.; EIERMANN, W.; WOLTER, J.; PEGRAM, M. USE OF

Referências

CHEMOTHERAPY PLUS A MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST HER2 FOR METASTATIC BREAST CANCER THAT OVEREXPRESSES HER2. *NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*, [S. L.], v. 344, n. 11, p. 783–792, 2001.

SMITH, G. P. FILAMENTOUS FUSION PHAGE: NOVEL EXPRESSION VECTORS THAT DISPLAY CLONED ANTIGENS ON THE VIRION SURFACE. *SCIENCE*, [S. L.], v. 228, n. 4705, p. 1315–1317, 1985.

SOKULLU, E.; GAUTHIER, M.-S.; COULOMBE, B. DISCOVERY OF ANTIVIRALS USING PHAGE DISPLAY. *VIRUSES*, [S. L.], v. 13, n. 6, p. 1120, 2021.

SONG, M.; LIN, X.; PENG, Z.; XU, S.; JIN, L.; ZHENG, X.; LUO, H. MATERIALS AND METHODS OF BIOSENSOR INTERFACES WITH STABILITY. *FRONTIERS IN MATERIALS*, [S. L.], v. 7, p. 583739, 2021.

SØRLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J. C.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D.; LØNNING, P. E.; BØRRESEN-DALE, A. L. GENE EXPRESSION PATTERNS OF BREAST CARCINOMAS DISTINGUISH TUMOR SUBCLASSES WITH CLINICAL IMPLICATIONS. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, [S. L.], v. 98, n. 19, p. 10869–10874, 2001.

STENMARK TULLBERG, A.; LUNDSTEDT, D.; OLOFSSON BAGGE, R.; KARLSSON, P. POSITIVE SENTINEL NODE IN LUMINAL A-LIKE BREAST CANCER PATIENTS-IMPLICATIONS FOR ADJUVANT CHEMOTHERAPY? *ACTA ONCOLOGICA*, [S. L.], v. 58, n. 2, p. 162–167, 2019.

STERGIOPOULOU, D.; MARKOU, A.; STRATI, A.; ZAVRIDOU, M.; TZANIKOU, E.; MASTORAKI, S.; KALLERGI, G.; GEORGOULIAS, V.; LIANIDOU, E. COMPREHENSIVE LIQUID BIOPSY ANALYSIS AS A TOOL FOR THE EARLY DETECTION OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN BREAST CANCER. *SCIENTIFIC REPORTS*, [S. L.], v. 13, n. 1, p. 1258, 2023.

SUN, L.; CHEN, Y.; CHEN, F.; MA, F. PEPTIDE-BASED ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR FOR MATRIX METALLOPROTEINASE-14 AND PROTEIN-OVEREXPRESSING CANCER CELLS BASED ON ANALYTE-INDUCED CLEAVAGE OF PEPTIDE. *MICROCHEMICAL JOURNAL*, [S. L.], v. 157, p. 105103, 2020.

THÉRY, C.; ZITVOGEL, L.; AMIGORENA, S. EXOSOMES: COMPOSITION, BIOGENESIS AND FUNCTION. *NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY*, [S. L.], v. 2, n. 8, p. 569–579, 2002.

THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS: RECOMMENDED DEFINITIONS AND CLASSIFICATION. *ANALYTICAL LETTERS*, [S. L.], v. 34, n. 5, p. 635–659, 2001.

TURNER, A. P. F. BIOSENSORS: SENSE AND SENSIBILITY. *CHEMICAL SOCIETY REVIEWS*, [S. L.], v. 42, n. 8, p. 3184–3196, 2013.

TUTT, A. N.; GARBER, J. E.; KAUFMAN, B.; VIALE, G.; FUMAGALLI, D.; RASTOGI, P.; GELBER, R. D.; DE AZAMBUJA, E.; FIELDING, A.; BALMAÑA, J. ADJUVANT OLAPARIB FOR PATIENTS WITH BRCA1-OR BRCA2-MUTATED BREAST CANCER. *NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*, [S. L.], v. 384, n. 25, p. 2394–2405, 2021.

Referências

- UCAR, A.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, E.; STADERINI, M.; AVLONITIS, N.; MURRAY, A. F.; BRADLEY, M.; MOUNT, A. R. MINIATURISATION OF A PEPTIDE-BASED ELECTROCHEMICAL PROTEASE ACTIVITY SENSOR USING PLATINUM MICROELECTRODES. *ANALYST*, [S. L.], v. 145, n. 3, p. 975–982, 2020.
- VAN WEZENBEEK, P. M. G. F.; HULSEBOS, T. J. M.; SCHOENMAKERS, J. G. G. NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE FILAMENTOUS BACTERIOPHAGE M13 DNA GENOME: COMPARISON WITH PHAGE FD. *GENE*, [S. L.], v. 11, n. 1, p. 129–148, 1980.
- VANOVA, V.; MITREVSKA, K.; MILOSAVLJEVIC, V.; HYNEK, D.; RICHTERA, L.; ADAM, V. PEPTIDE-BASED ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS UTILIZED FOR PROTEIN DETECTION. *BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS*, [S. L.], v. 180, p. 113087, 2021.
- VAZ, J. C. L. REGIÕES DE INCERTEZA PARA A CURVA ROC EM TESTES DIAGNÓSTICOS. [S. L.], 2009.
- VEZIROGLU, E. M.; MIAS, G. I. CHARACTERIZING EXTRACELLULAR VESICLES AND THEIR DIVERSE RNA CONTENTS. *FRONTIERS IN GENETICS*, [S. L.], v. 11, p. 700, 2020.
- VODNIK, M.; ZAGER, U.; STRUKELJ, B.; LUNDER, M. PHAGE DISPLAY: SELECTING STRAWS INSTEAD OF A NEEDLE FROM A HAYSTACK. *MOLECULES*, [S. L.], v. 16, n. 1, 2011.
- WANG, M.; LI, L.; ZHANG, L.; ZHAO, J.; JIANG, Z.; WANG, W. PEPTIDE-DERIVED BIOSENSORS AND THEIR APPLICATIONS IN TUMOR IMMUNOLOGY-RELATED DETECTION. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, [S. L.], v. 94, n. 1, p. 431–441, 2022. A.
- WANG, X.; TIAN, L.; LU, J.; NG, I. O.-L. EXOSOMES AND CANCER - DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC BIOMARKERS AND THERAPEUTIC VEHICLE. *ONCOGENESIS*, [S. L.], v. 11, n. 1, p. 54, 2022. B.
- WANG, Y.; GAO, S.; LV, J.; LIN*, Y.; HAN, L. Z. AND L. PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY AND ITS APPLICATIONS IN CANCER IMMUNOTHERAPY. *ANTI-CANCER AGENTS IN MEDICINAL CHEMISTRY*, [S. L.], v. 19, n. 2, p. 229–235, 2019.
- WILLIAMS, R. M.; SOOTER, L. J. IN VITRO SELECTION OF CANCER CELL-SPECIFIC MOLECULAR RECOGNITION ELEMENTS FROM AMINO ACID LIBRARIES. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY RESEARCH*, [S. L.], v. 2015, 2015.
- WU, C.-H.; LIU, I.-J.; LU, R.-M.; WU, H.-C. ADVANCEMENT AND APPLICATIONS OF PEPTIDE PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY IN BIOMEDICAL SCIENCE. *JOURNAL OF BIOMEDICAL SCIENCE*, [S. L.], v. 23, p. 8, 2016.
- XIE, B.; DANIELSSON, B. THERMAL BIOSENSOR AND MICROBIOSENSOR TECHNIQUES. EM: *HANDBOOK OF BIOSENSORS AND BIOCHIPS*. [S.L.: S.N.].
- XU, P.; GHOSH, S.; GUL, A. R.; BHAMORE, J. R.; PARK, J. P.; PARK, T. J. SCREENING OF SPECIFIC BINDING PEPTIDES USING PHAGE-DISPLAY TECHNIQUES AND THEIR BIOSENSING APPLICATIONS. *TRAC TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY*, [S. L.], v. 137, p. 116229, 2021.
- YADAV, S.; SAINI, A.; DEVI, R.; LATA, S. TRANSDUCERS IN BIOSENSORS. EM: KUMAR, P.; DASH, S. K.; RAY, S.; PARWEEN, S. (Eds.). *BIOMATERIALS-BASED SENSORS*:

Referências

RECENT ADVANCES AND APPLICATIONS. SINGAPORE: SPRINGER NATURE SINGAPORE, 2023. P. 101–125.

YÁÑEZ-MÓ, M.; SILJANDER, P. R.-M.; ANDREU, Z.; BEDINA ZAVEC, A.; BORRÀS, F. E.; BUZAS, E. I.; BUZAS, K.; CASAL, E.; CAPPELLO, F.; CARVALHO, J. BIOLOGICAL PROPERTIES OF EXTRACELLULAR VESICLES AND THEIR PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS. JOURNAL OF EXTRACELLULAR VESICLES, [S. L.], V. 4, N. 1, P. 27066, 2015.

ZAGAMI, P.; CAREY, L. A. TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER: PITFALLS AND PROGRESS. NPJ BREAST CANCER, [S. L.], V. 8, N. 1, P. 95, 2022.

ZHAO, S.; WEN, H.; OU, Y.; LI, M.; WANG, L.; ZHOU, H.; DI, B.; YU, Z.; HU, C. A NEW DESIGN FOR LIVING CELL-BASED BIOSENSORS: MICROGELS WITH A SELECTIVELY PERMEABLE SHELL THAT CAN HARBOR BACTERIAL SPECIES. SENSORS AND ACTUATORS B: CHEMICAL, [S. L.], V. 334, P. 129648, 2021.

Capítulo II

Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico baseado em peptídeos sobre uma matriz de ácido poli 3-(3-aminofenil) propiônico para caracterização do câncer de mama

1. Introdução

O CM é o câncer mais frequentemente diagnosticado em todo o mundo, com cerca de 2,3 milhões de novos casos em 2020 e 684.996 mortes em 2021 (representando 15,5% das mortes por câncer em mulheres) (IARC, 2020). A origem da doença ainda é incerta, caracterizando-se como uma lesão complexa do ponto de vista histológico e molecular (WEIGELT; GEYER; REIS-FILHO, 2010). O CM representa um problema para o sistema público de saúde afetando a qualidade de vida dos pacientes, sendo responsável por um custo estimado de US\$ 208,9 bilhões de dólares nos EUA em 2020 (NATIONAL CANCER INSTITUTION, 2021). No Brasil, excluídos os tumores de pele não melanoma, o CM também é o mais incidente em mulheres de todas as regiões brasileiras, com taxas mais altas no Sul e Sudeste. Para o ano de 2021 eram esperados 66.280 casos novos, o que representa uma taxa de incidência de 61,61 casos por 100.000 mulheres (INCA, 2022).

Atualmente, o diagnóstico é baseado em exames de imagem como mamografia, ultrassonografia e ressonância magnética, sendo confirmado histopatologicamente após biópsia. Testes genômicos, embora caros, podem ser adotados para prever riscos de recorrência, como o *Oncotype Dx* e o *MammaPrint* (NASCIMENTO; PITTA; RÊGO, 2015).

Contudo, o prognóstico da doença e a decisão terapêutica têm sido tradicionalmente baseadas no tamanho do tumor, invasão de tecidos adjacentes, grau histológico, estado dos linfonodos, formação de metástases e na expressão do RE, RP, HER2 e índice Ki67, os quais são avaliados por IHQ (GAO; SWAIN, 2018; PROVENZANO; ULANER; CHIN, 2018; RAKHA et al., 2010; SØRLIE et al., 2001). Assim, quatro principais subtipos moleculares de CM são definidos. LA são tumores RE-positivo e/ou RP-positivo, HER2-negativo e $ki67 < 14\%$. Pacientes com este subtipo apresentam melhor taxa de sobrevida e a terapia hormonal tem sido empregada com sucesso. LB são RE-positivos e/ou RP-positivos com $ki67 > 14\%$. Além disso, também podem ser HER2-positivos ou HER2-negativos. Geralmente, esse subtipo está associado a um pior prognóstico e a uma alta taxa de recorrência (EROLES et al., 2012; GAO; SWAIN, 2018; KENNECKE et al., 2010). O subtipo

Introdução

HER2E é negativo para receptores hormonais, com superexpressão de HER2 na superfície das células transformadas, com pior prognóstico em comparação com LA e LB. Esses pacientes são elegíveis para tratamentos anti-HER2 (BRADLEY et al., 2021). Finalmente, o subtipo TN é caracterizado pela ausência de RE, RP e HER2 (HARBECK et al., 2019; PEROU et al., 2000). O CMTN é biologicamente mais agressivo, com maior tendência a desenvolver metástases e com menor sobrevida global (KUMAR; AGGARWAL, 2016; VULCZAK; ALBERICI; BISSON, 2018).

Embora sejam evidentes os avanços na caracterização dos tumores de mama, muitos pacientes ainda sucumbem em decorrência da resistência terapêutica. Essa realidade demanda mais pesquisas dedicadas à caracterização de novos alvos e marcadores para melhor prever a evolução da doença, o que impacta na decisão clínica quanto aos medicamentos a serem utilizados. Nesse sentido, a tecnologia de PD tem sido inovadora, consistindo na utilização de vetores virais para identificar, isolar e caracterizar proteínas e peptídeos com alta afinidade e especificidade para um alvo de interesse (SMITH, 1985). Com o desenvolvimento da técnica de PD, Smith e Winter dividiram o Prêmio Nobel de Química em 2018.

Vários peptídeos isolados de bibliotecas de fagos estão em estudos pré-clínicos ou clínicos, e mais de 60 peptídeos terapêuticos já foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA (RAHBARNIA et al., 2017). Por sua simplicidade, alta eficiência, menor custo de produção em larga escala e melhor penetração tecidual, a técnica representa um campo dinâmico de pesquisa, com repercussões em imunologia, biologia molecular e diversas áreas médicas (RAHBARNIA et al., 2017; TAN et al., 2016). Biomoléculas, como anticorpos monoclonais e peptídeos bioativos, podem ser utilizadas em diferentes aplicações, incluindo diagnóstico por biossensores (PARK, 2020), ELISA (SUO et al., 2015) e fluxo lateral (KULABHUSAN et al., 2017).

Um biossensor ou sensor biológico é um dispositivo analítico que contém um material de reconhecimento biológico, como ácidos nucleicos (ALVES et al., 2019), anticorpos (CORDEIRO et al., 2020), enzimas (SOARES et al., 2019) ou peptídeos (FUEYO-GONZÁLEZ et al., 2021), imobilizado sobre um transdutor sensível. Este último converte os sinais bioquímicos entre os analitos e o biorreceptor em um sinal elétrico mensurável proporcional à concentração do analito (HEALY et al., 2007; KAYA et al., 2021). O sistema apresenta alta sensibilidade, seletividade, baixo custo e respostas rápidas (KAYA et al., 2021). Considerando as etapas de seu desenvolvimento, a imobilização do material biológico sobre a superfície do transdutor

Introdução

é crucial. Não só a biomolécula precisa ser imobilizada de forma eficiente, mas sua atividade ou sítio ativo deve ser preservado, evitando processos de lixiviação, deterioração com o tempo ou desnaturação, mantendo a transferência eletrônica com o transdutor (ESCOBAR et al., 2023; WANG, 2002).

A modificação do transdutor com polímeros condutores contendo grupos funcionais é uma alternativa viável. Vários polímeros foram usados para desenvolver biossensores, como polipirrol (QI et al., 2021), polianilina (TOMŠÍK et al., 2021), derivados de politiofeno (AYDIN; AYDIN; SEZGINTÜRK, 2018), ácido 2-aminobenzóico (BOLLELLA et al., 2021), ácido 3-hidroxifenilacético (FLAUZINO et al., 2021), ácido 4-mercaptobenzóico (ALVES et al., 2017) e ácido 4-mercaptofenilacético (SOARES et al., 2019). Uma fina camada com grupos funcionais orientados para se ligar a moléculas biológicas pode ser formada sobre a superfície de um transdutor através da polimerização de uma estrutura aromática. Além disso, existe a possibilidade de que a mesma camada tenha a condutividade de um polímero intrinsecamente condutor (LUKKARI et al., 1998).

Para a formação de polímeros, já foram utilizadas várias técnicas eletroquímicas. Dentre estas, uma das mais simples metodologias encontradas é a voltametria cíclica (VC), na qual a varredura de potencial-tempo possui uma forma triangular (**Figura 1**), em que o potencial (E) é varrido de um valor inicial a um valor específico, sendo que em um tempo (t), o potencial é varrido no sentido inverso até o valor inicial. Assim, as contribuições catódicas e anódicas de processos eletroquímicos podem ser analisadas. Por apresentar estas características, podem ser obtidas informações muito úteis para descrever sistemas a partir de análises de corrente e potencial de oxidação e redução, concentração das espécies, coeficientes de difusão, área dos eletrodos, cinética das reações, dentre outros. Dessa forma, o uso da voltametria cíclica é ideal para o estudo de formação e caracterização de filmes poliméricos (BARD; FAULKNER, 2002).

Introdução

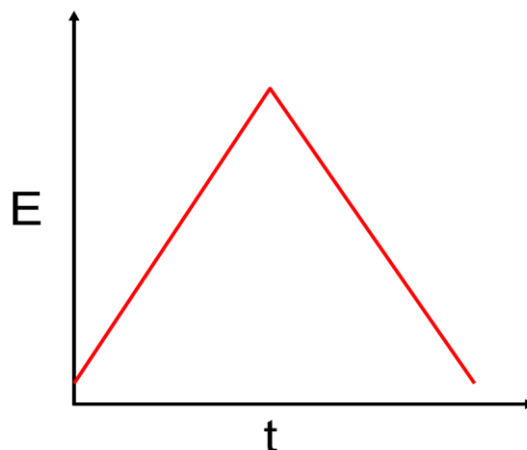


Figura 1. Variação entre potencial e tempo em uma voltametria cíclica. Fonte: Próprio autor.

O monômero, ácido 3-(3-aminofenil)propiônico (3-3-AAFP) contém as condições necessárias para o desenvolvimento desse dispositivo como mostra a **Figura 2**. Este apresenta um grupo ácido carboxílico ligado a um anel aromático. Além disso, a estrutura é derivada da já estudada anilina (**Figura 2**) que, dependendo das condições experimentais, gera um material com características condutoras (MATTOSO, 1996; WANG et al., 2023).

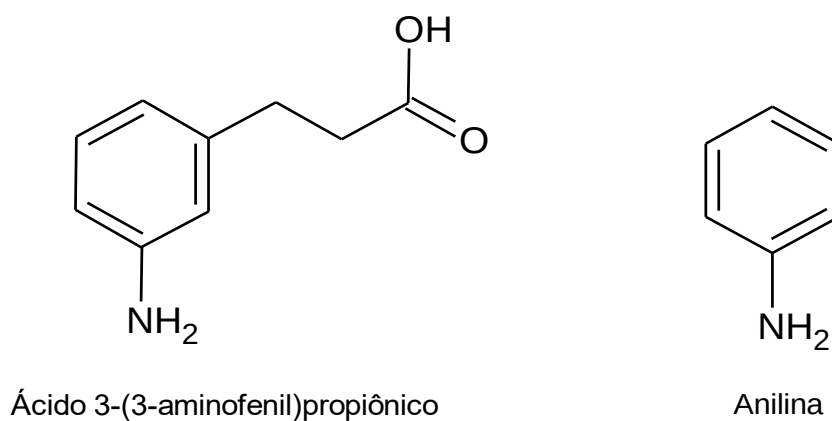


Figura 2. Estrutura molecular do ácido 3-(3-aminofenil)propiônico e anilina. Fonte: Próprio autor.

2. *Objetivos*

Construir, de forma inédita, um biossensor a partir do estudo das propriedades eletroquímicas e morfológicas de um novo material polimérico derivado da eletro-oxidação do monômero 3-3-AAFP na superfície de eletrodos de baixo custo. Peptídeos específicos que se ligam a proteínas de células de CM e selecionados por PD foram usados como interface de reconhecimento biológico. Além disso, comparamos o desempenho do biossensor com o teste ELISA

3. Material e Métodos

3.1. Reagentes e equipamentos

Foram utilizados os seguintes reagentes químicos: ácido 3-(3-aminofenil)propionico (3-3-AAFP), HClO_4 (70%), N-hidroxisuccinimida (NHS), cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico (MES), ferricianeto de potássio (III) ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), cloreto de hexaamminerutênio (III) ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$) foram adquiridos da Sigma Aldrich, cloreto de potássio KCl (99%, Vetec), caseína (Cromoline), glicina (Dinâmica), TWEEN® 20 (Dinâmica), azida sódica (NaN_3), peróxido de hidrogênio (30% H_2O_2), cloridrato de ortofenilenodiamina (OPD), estreptavidina-HRP (strep-HRP) (Invitrogen), solução tampão de bicarbonato (NaCO_3 0,1 M, pH 8,6), solução tampão fosfato (PBS 1x) (NaCl 13,7 mM, KCl 0,27 mM, Na_2HPO_4 1,2 mM, KH_2PO_4 0,12 mM, pH 7,4), solução tampão de citrato ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 0,04 M, $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7$ 0,06 M, pH 5,0).

As medidas eletroquímicas para as condições iniciais de otimização foram realizadas usando um potenciostato $\mu\text{Autolab PGSTAT 101}$ equipado com uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos (volume de 10,0 mL), controlada com o software NOVA 2.1 (Metrohm, Holanda). Os eletrodos utilizados foram: Eletrodo de referência Ag/AgCl/sat. KCl, um contra eletrodo de platina, e como eletrodo de trabalho, um eletrodo de carbono de grafite de lapiseira (PGE) da Pentel, Super Hi-Polymer C505 tipo HB com 0,90mm de diâmetro. Apenas 10mm ficaram imersos nas soluções, correspondendo a uma área ativa de 28,9 mm².

Diferentes soluções foram preparadas em três valores de pH para investigar a influência do pH na eletropolimerização do 3-3-AAFP, sendo: 0,50; 4,5 e 9,0. A eletropolimerização foi realizada em meio HClO_4 0,5 M com pH ajustado com NaOH 3,0 M. Foram aplicados 20 ciclos em diferentes intervalos de potencial, conforme **Figura 7A** (pH 0,5 entre +0,00 a 1,20V); **Figura 7B** (pH 4,5 entre +0,00 a +1,10V); **Figura 7C** (pH 9,0 entre -0,40 a +1,10 V), todos com uma taxa de varredura de 50 mV s⁻¹. Após a otimização, eletrodos de carbono *screen-printed* DRP-110 da Metrohm (SPE) foram usados para o desenvolvimento do biossensor. O eletrodo é

Material e Métodos

composto por tinta de carbono como eletrodo de trabalho ($0,11 \text{ cm}^2$), um eletrodo auxiliar de carbono e um eletrodo de pseudo-referência de prata. Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico ou HPLC. A água deionizada (resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ a 25°C) foi obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q Direct-0.3 (Millipore).

3.2. Cultivo de células e extração de proteínas

A linhagem de células de mama humana não tumorigênica, MCF-10A, e as linhagens de células de CM humano, MCF-7 (RE-positivo) e MDA-MB231 (TN) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC) e cultivadas de acordo com as instruções do fornecedor (www.atcc.org). Os meios foram trocados em dias alternados até que as células atingissem 80% de confluência. As proteínas do citoplasma e da membrana foram extraídas das linhagens celulares com o Kit NE-PER™ (Thermo Fisher™) seguindo-se as recomendações do fabricante e posterior armazenamento a -80°C .

3.3. ELISA em extrato de proteína

Placas de alta adsorção Maxisorp NUNC foram sensibilizadas por 16 horas a 4°C com extratos proteicos de citoplasma/membrana ($0,5 \mu\text{g poço}^{-1}$) diluídos em uma solução de NaHCO_3 ($0,1 \text{ M}$, $\text{pH } 8,0$) ($50 \mu\text{L poço}^{-1}$). Após a incubação, a solução foi descartada e a placa foi lavada uma vez com solução de PBS 1x. Em seguida, adicionou-se tampão de bloqueio (caseína a $0,5\%$), com incubação por 1 hora a 37°C . Os poços foram lavados duas vezes com PBS-T (20% Tween) e os peptídeos Biotina- C3 ($2,0 \mu\text{g poço}^{-1}$) ou Biotina-H2 ($1,0 \mu\text{g poço}^{-1}$) diluídos em tampão de bloqueio ($0,5\%$ caseína) foram incubados por 1 hora a 37°C . Os poços foram então lavados duas vezes com PBS-T. Finalmente, 50 mU poço^{-1} de strep-HRP diluída em tampão de bloqueio ($0,5\%$ caseína) foram incubadas por 1 hora a 37°C . Os poços foram lavados cinco vezes com PBS-T e foi adicionado dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD) $3,0 \text{ mM}$, com H_2O_2 $0,2 \mu\text{M}$. A reação foi interrompida com H_2SO_4 $1,2 \text{ M}$ e a absorbância foi lida em um leitor de microplacas (Robonik) no comprimento de onda de 492 nm . Três testes independentes foram realizados em triplicata e para as análises estatísticas foi utilizado o teste *One-Way ANOVA* com o

Material e Métodos

pós-teste de Tukey de comparações múltiplas.

3.4. Eletropolimerização e caracterização eletroquímica

A eletropolimerização do 3-3-AAFP (1,0 mM) foi realizada utilizando HClO_4 (0,5 M) como eletrólito suporte através de VC. Os voltamogramas foram registrados de 0,0 a +1,2 V a uma taxa de varredura de 50 mV s^{-1} . A otimização dos parâmetros de polimerização, como eletrólito suporte, número de ciclos e valores de pH foram realizados.

A caracterização eletroquímica foi avaliada através de VC usando soluções padrão de KCl 0,5 M contendo $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5,0 mM (registrado de 0,0 a +0,5 V, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$) ou $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ 5,0 mM (registrado de +0,2 a -0,5 V, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$), e solução de ácido perclórico 0,5 M (registrado de 0,0 a +1,2 V, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$). Os dados de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram obtidos em uma faixa de frequência de 0,1 Hz a 100 kHz em uma amplitude de 10 mV e potencial +0,24 V, em solução de 0,5 M de KCl contendo 5,0 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$.

3.5. Caracterização morfológica e estrutural

A caracterização morfológica do PGE foi avaliada por meio de imagens adquiridas em microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando-se um microscópio eletrônico de alta resolução JEOL, Modelo JSM-7500F. O espectro FT-IR do 3-3-AAFPA e seu polímero em eletrodos SPE DRP-110 foi obtido usando um espectrofotômetro Bruker Vertex 70 equipado com um módulo ATR.

3.6. Amostras de soro de pacientes com CM e DBM para ensaio ELISA e biossensor

Ensaio de ELISA com amostras de soro de pacientes foram realizados para validar os peptídeos Biotina-C3 e Biotina-H2 como interface de reconhecimento biológico no biossensor eletroquímico (item 3.7). As amostras sorológicas ($n=118$) foram previamente coletadas de mulheres que compareceram ao Hospital das Clínicas de Uberlândia, Uberlândia – MG - Brasil, e foram diagnosticadas com CM ($n=81$) ou Doença Benigna da Mama (DBM) ($n=37$) confirmada pela análise

Material e Métodos

anatomopatológica (**Tabela 1**). O estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque, e o Comitê de Ética do Conselho de Pesquisa Institucional aprovou todos os procedimentos (nº 176/2008). O consentimento informado por escrito foi obtido de todos os participantes.

Tabela 1. Características dos pacientes (N = 118).

Variável	Pacientes	
	N	%
<i>Idade (anos)</i>		
Mediana (intervalo)	54	(22 – 88)
DBM	37	31,35
CM	81	68,65
<i>Estágio tumoral</i>		
pT1	21	25,92
pT2	24	29,62
pT3	5	6,17
pT4	2	2,47
pTis	7	8,64
ND	22	27,16
<i>Status de RE</i>		
Positivo	62	76,54
Negativo	8	9,88
ND	11	13,58
<i>Status de RP</i>		
Positivo	49	60,50
Negativo	11	13,58
ND	21	25,92
<i>Status p53</i>		
Positivo	33	40,74
Negativo	21	25,92
ND	27	33,33
<i>Subtipos de CM</i>		
Luminal A	29	35,80
Luminal B	29	35,80
HER-2-enriquecido	2	2,46
Triplo-negativo	6	7,41
ND	15	18,52

Abreviaturas: ND = não disponível; DBM, doença benigna da mama; CM, câncer de mama; RE, receptor de estrogênio; HER2, receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2; RP, receptor de progesterona. Fonte: Próprio autor.

Material e Métodos

3.7. ELISA com soro de pacientes

Após otimização, placas de alta adsorção Maxisorp NUNC foram sensibilizadas por 16 horas a 4°C com soro de pacientes com CM e DBM diluídos 1:100 em solução de NaHCO₃ (0,1 M, pH 8,0). Após esse período, a solução foi descartada e a placa lavada uma vez com solução de PBS 1x. Em seguida, adicionou-se tampão de bloqueio (caseína a 0,5%) com incubação por 1 hora a 37°C. Os poços foram lavados duas vezes com PBS-T e foi adicionado o peptídeo Biotina-C3 (2,0 µg poço⁻¹) ou peptídeo Biotina-H2 (1,0 µg poço⁻¹) diluídos em solução de bloqueio e incubados por 1 hora a 37°C. Os poços foram lavados duas vezes com PBS-T e 50,0 mU poço⁻¹ de strep-HRP diluídos em solução de bloqueio foram adicionados e incubado durante 1 hora a 37°C. Os poços foram lavados cinco vezes com PBS-T e foi adicionado OPD 3,0 mM, com H₂O₂ 0,2 µM. A reação foi interrompida com H₂SO₄ 1,2 M e a absorbância foi lida em um leitor de microplacas (Robonik) no comprimento de onda de 492 nm. Três testes independentes foram realizados em triplicata e para as análises estatísticas foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

3.8. Biossensor aplicado em soro de pacientes

O eletrodo modificado com poli(3-3-AAFP) foi imerso em solução tampão MES (0,05 mM, pH 5,0) contendo 0,2 M de EDC e 0,2 M de NHS por 30 minutos para ativar os grupos -COOH do polímero. Em seguida, foram imersos em PBS 1x (pH 7,4) contendo 30,0 µg de avidina por 60 minutos à temperatura ambiente e depois lavados com PBS. O eletrodo foi bloqueado para evitar ligação inespecífica, utilizando 1,0 M de glicina por 30 minutos, e lavado com água destilada. Em seguida, 3,0 µg de peptídeos biotinilados em meio PBS foram adicionados por 30 minutos. Finalmente, 50,0 µL de amostras de soro de pacientes CM ou DBM foram adicionados (DING et al., 2005; LEE; ANANDAN; ZHANG, 2008).

A detecção foi realizada medindo a corrente (i), antes (ii) e após (ir) incubação com amostras de soro, usando o par redox aniônico K₃Fe(CN)₆ como sonda e usando a técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ). Os voltamogramas VOQ foram corrigidos na linha de base usando a ferramenta incluída no *software* NOVA 2.1.4. Todos os resultados do biossensor foram medidos pela mudança na corrente, que

Material e Métodos

caiu após a incubação com as amostras. O cálculo do Índice de Reatividade (IR) foi realizado com base na razão de i_f (corrente final) por i_i (corrente inicial) ($IR = i_f / i_i$).

As etapas de modificação para o desenvolvimento do biossensor foram caracterizadas usando VOQ (**Figura 12A**) e EIE (**Figura 12B**). Os dados de impedância experimental foram ajustados ao circuito de *Randles* descrito como $([R_s (Q_{dl} [R_{ct}W])]$. Foram obtidos diferentes valores de parâmetros para os circuitos equivalentes a partir da simulação (dados não apresentados), com uma resposta típica para o PGE limpo, com a maior corrente de pico e a menor resistência à transferência de carga (R_{ct}).

3.9. Análise estatística

Os dados dos ensaios ELISA e do biossensor eletroquímico com amostras de soro foram resumidos em curvas ROC (*receiver operating characteristic*), plotadas 100% - especificidade (%) no eixo-X e sensibilidade (%) no eixo-Y, considerando cada valor observado como um possível valor de corte. A área sob a curva (AUC) foi calculada para avaliar o desempenho geral do diagnóstico e a precisão dos peptídeos Biotina-C3 e Biotina-H2. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. *Resultados e Discussão*

4.1. ELISA em extrato proteico

Após a síntese química, a especificidade celular dos peptídeos Biotina-C3 e Biotina-H2 para MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB231 foi confirmada por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência (DA FONSECA ALVES et al., 2022). Histogramas resultantes da análise de citometria de fluxo (DA FONSECA ALVES et al., 2022) e a porcentagem de células coradas de cada linhagem (DA FONSECA ALVES et al., 2022) demonstraram que o peptídeo Biotina-C3 se ligou mais intensamente às células tumorais em comparação com a linhagem não tumorigênica ($p < 0,0001$). Para este peptídeo, uma coloração mais expressiva também foi observada para células MCF-7. O peptídeo Biotina-H2 diferenciou as células TN (MDA-MB231) das outras linhagens.

Esses dados foram confirmados por imunofluorescência, uma vez que a ligação de ambos os peptídeos foi mais intensa na membrana da linhagem MCF-7 (DA FONSECA ALVES et al., 2022), o que os torna relevantes para aplicação na caracterização de pacientes com CM. Após a definição dos parâmetros ideais para cada peptídeo utilizando o extrato de proteínas da linhagem MCF-7 (DA FONSECA ALVES et al., 2022), foi realizada, então, a comparação entre os extratos de proteínas das diferentes linhagens: MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB231. O ensaio ELISA com o extrato de proteínas do citoplasma/membrana das células das linhagens MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB231 demonstrou que os peptídeos Biotina-C3 e Biotina-H2 diferenciaram as linhagens celulares (**Figura 3** – $p < 0,01$ para todas as comparações). Assim, ambos os peptídeos discriminaram os subtipos de CM.

Resultados e Discussão

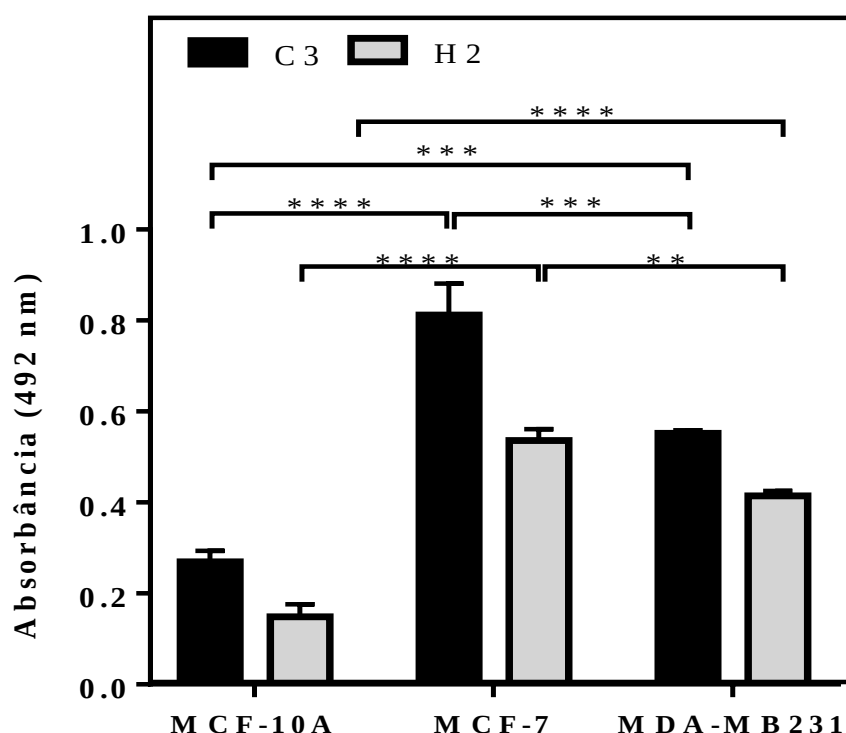


Figura 3. Validação dos peptídeos ligantes a proteínas do câncer de mama (CM). Ensaio ELISA comparativo entre a reatividade dos peptídeos Biotina-C3 e Biotina-H2. Foram utilizadas proteínas extraídas do citoplasma/membrana das células MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB231. As absorbâncias foram registradas em 492 nm. A significância foi avaliada usando o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Tukey. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****). Fonte: Próprio autor.

4.2. Eletropolimerização e caracterização da plataforma

A síntese eletroquímica de um polímero derivado de 3-3-AAFP na superfície de um PGE produziu uma nova matriz para o desenvolvimento de biossensores. A eletropolimerização de 3-3-AAFP, realizada por VC em meio ácido, é mostrada na **Figura 4A**. O perfil apresentado na **Figura 4A** foi semelhante aos perfis de eletropolimerização de ácidos aminobenzóicos (derivados de anilina) (SANTOS et al., 2019; WANG et al., 2020).

A oxidação eletroquímica do monômero aparece como um pico irreversível em torno de +1,00 V, correspondendo à formação de uma estrutura catiônica-radical seguida de um pico catódico em aproximadamente +0,43 V na varredura reversa. No início da varredura subsequente, aparece um segundo pico anódico em +0,49 V, complementar ao processo catódico sugerindo o surgimento de um par redox

Resultados e Discussão

reversível ($\Delta E_p = 60$ mV). Há uma diminuição gradual nos valores de corrente no potencial mais anódico e um aumento nos potenciais de pares redox reversíveis com os ciclos subsequentes.

A diminuição da corrente no potencial de oxidação do monômero sugere a modificação da superfície do eletrodo por um material que dificulta a chegada do monômero neutro. Este material poderia ser um polímero iniciado pelo processo de par redox em potenciais menos anódicos. Essas respostas são dependentes dessa primeira oxidação ocorrer, provavelmente devido ao acoplamento da estrutura catiônica-radical com outro monômero, gerando um dímero. Como o dímero apresenta mais possibilidades de ressonância do que o monômero, menos energia é necessária para a transferência de elétrons, daí a diminuição dos valores de potencial para o par redox. Além disso, a cada ciclo concluído, há um aumento nos valores de corrente, o que pode ser atribuído ao novo material eletroativo formado e adsorvido sobre a superfície do eletrodo (SANTOS et al., 2019). Este aumento a cada ciclo reflete a cobertura da superfície do eletrodo. O crescimento do filme foi mais rápido nos primeiros ciclos, diminuindo gradativamente a taxa de crescimento, sugerindo a saturação do processo de polimerização e deposição (ROSTAMI; OMRANI; HAMEDIAN, 2013).

Após 20 ciclos, o eletrodo foi lavado e transferido para uma célula contendo apenas o eletrólito suporte (0,5 M HClO_4). A **Figura 4B** mostra a ausência do pico de oxidação do monômero e a presença dos picos redox em +0,47 V e +0,43 V (mesmos potenciais observados na **Figura 4A**), indicando que o par reversível representa efetivamente o material adsorvido sobre a superfície do eletrodo. Assim, de acordo com um estudo sobre a eletropolimerização do ácido *p*-aminobenzóico, o par redox observado tem semelhanças com a polianilina e pode ser atribuído à formação de *polarons* na estrutura do polímero (BENYOUCEF et al., 2008), independentemente de não haver formação de dois pares redox. A ausência de um segundo par redox pode ser consequência da presença do grupo funcional carboxílico na posição meta do grupo amino, o que pode estar afetando as propriedades eletroquímicas do material obtido.

O uso de sondas redox, como $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ é útil para caracterizar as alterações causadas no processo de transferência eletrônica na superfície de eletrodos modificados (CHEN; KÄTELHÖN; COMPTON, 2020). Voltamogramas cíclicos foram registrados em duas soluções contendo cada sonda em um meio KCl

Resultados e Discussão

0,5 M para analisar a modificação da superfície do eletrodo com poli(3-3-AAFP) em comparação com PGE não modificados, conforme mostrado na **Figura 4C** e **Figura 4D**, respectivamente. A resposta reversível, padrão, em ambas as soluções para PGE pode ser vista em linhas sólidas pretas. Na **Figura 4C**, o PGE modificado com poli(3-3-AAFP) resultou em uma discreta diminuição da corrente (linhas sólidas vermelhas) e um $\Delta E_p = 170$ mV, indicando, embora pequena, uma repulsão eletrônica entre a superfície do eletrodo e a sonda aniônica. Na **Figura 4D**, no entanto, não houve variação significativa no ΔE_p , que permaneceu em 70 mV, e os valores de corrente aumentaram em relação ao PGE não modificado (aproximadamente 30% em ambas as direções). Este fato sugere que a transferência eletrônica é facilitada pelo polímero.

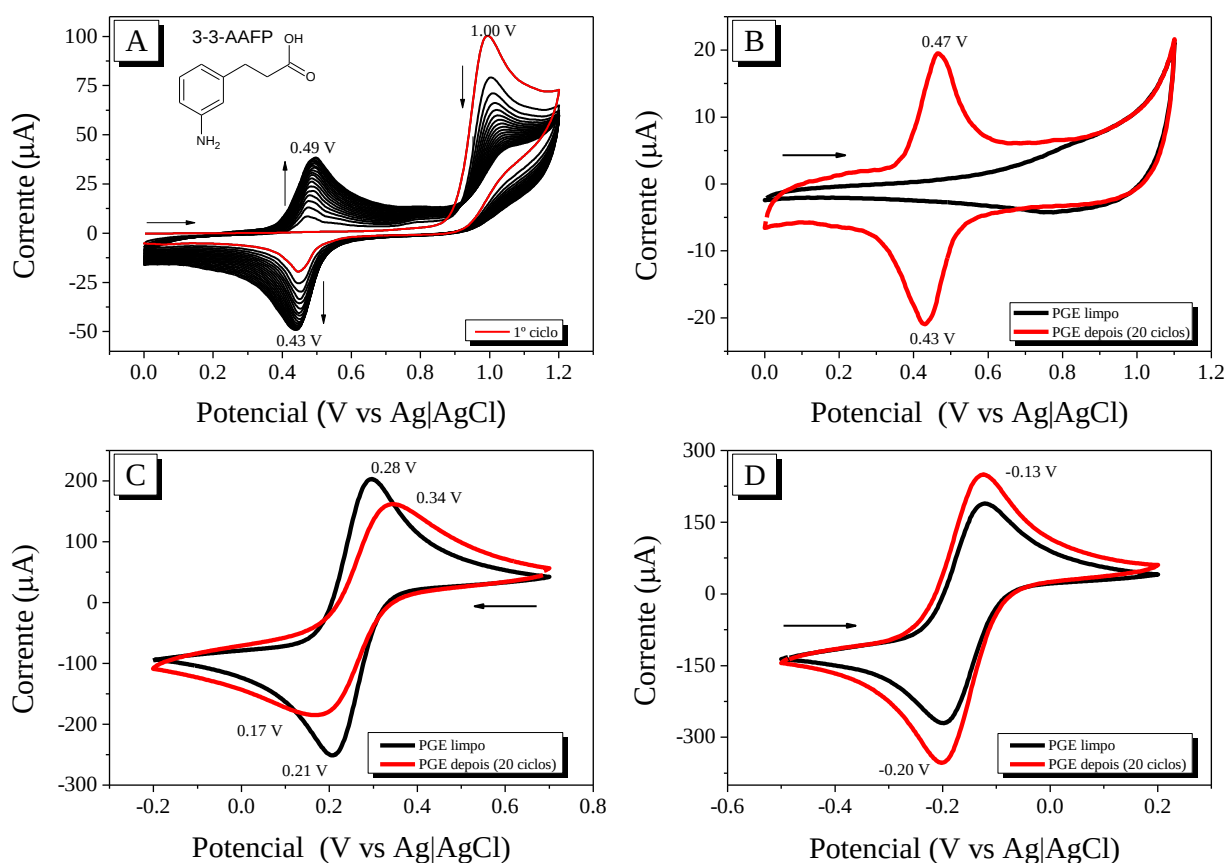


Figura 4. Caracterização eletroquímica. Voltamogramas cíclicos obtidos com o PGE: **A)** em solução aquosa de HClO₄ (0,5 M) contendo 3-3-AAFP (1,0 mM) registrados continuamente por 20 ciclos; **B)** em solução aquosa de HClO₄, ambos a 50 mV s⁻¹; **C)** em solução de KCl (0,5 M) com K₃Fe(CN)₆ (5,0 mM); **D)** em solução de KCl (0,5 M) com [Ru(NH₃)₆]Cl₃ (5,0 mM), ambos a 100 mV s⁻¹, (as setas indicam a direção da mudança de corrente). Fonte: Próprio autor.

Resultados e Discussão

4.3. Caracterização morfológica de PGE modificado com poli(3-3-AAFP)

A análise morfológica foi realizada utilizando MEV. As micrografias obtidas para a PGE não modificada e a PGE modificada com poli(3-3-AAFP) mostraram pouca diferença. A **Figura 5A** mostra a estrutura típica de minas de grafite com sobreposição de várias camadas além de sulcos evidentes devido ao tratamento mecânico com lixa d'água. Após a polimerização (**Figura 5B**), o PGE modificado exibe uma aparência menos rugosa, pois é observada uma camada homogênea cobrindo as lascas presentes no eletrodo limpo.

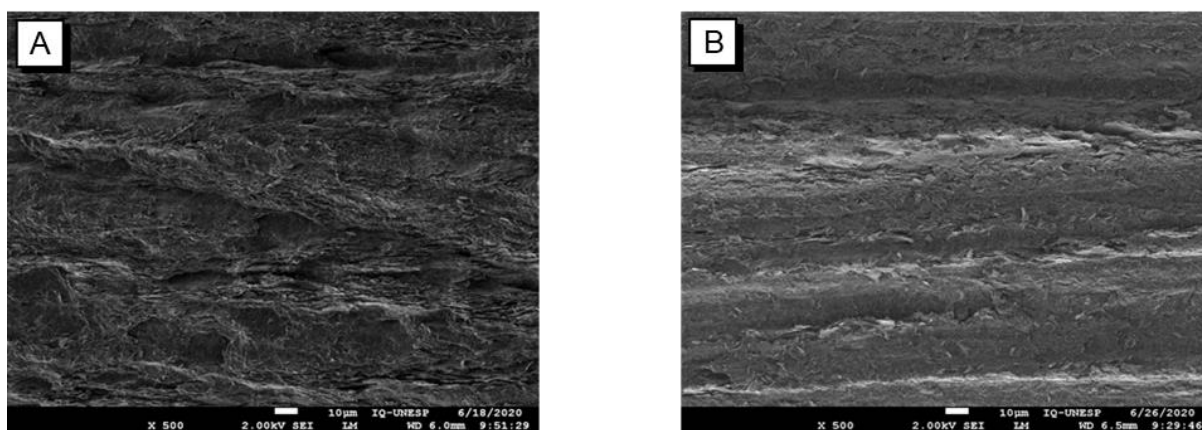


Figura 5. Caracterização morfológica. Micrografias eletrônicas de varredura obtidas para: **A)** PGE e **B)** PGE após modificação com 3-3-AAFP, usando 50 ciclos (Ampliação: 500x). Fonte: Próprio autor.

4.4. Influência do número de ciclos na eletropolimerização do 3-3-AAFP

A partir das interações eletrostáticas com as sondas, é possível obter um conhecimento prévio das propriedades estruturais e elétricas do polímero. Em uma solução aquosa de KCl contendo $K_3Fe(CN)_6$, o valor do pH é próximo a 7, os grupos carboxílicos presentes na estrutura polimérica estariam desprotonados, o que resulta em repulsão eletrostática entre as cargas negativas dos grupos carboxilato e a sonda redox aniônica, causando uma redução significativa na transferência de elétrons entre a sonda e o PGE modificado. Em uma solução aquosa de KCl contendo $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$, no entanto, o estado desprotonado dos grupos carboxílicos resulta em uma atração eletrostática entre as cargas negativas dos grupos carboxilato e as cargas positivas da sonda catiônica, causando assim um aumento da corrente redox da sonda

Resultados e Discussão

(PELLISSIER et al., 2008; SANTOS et al., 2019). Independentemente dessas diferenças, os resultados sugerem que o grupo carboxílico permanece inalterado após a eletropolimerização, condição necessária para posterior interação com biomoléculas por meio de ligação covalente.

A eletro-oxidação do 3-3-AAFP foi realizada, alterando os números de ciclos para encontrar melhores condições para a preparação do poli(3-3-AAFP), conforme mostrado na **Figura 6**. O número de ciclos foi otimizado para economizar tempo e adquirir conhecimento do comportamento e crescimento do filme depositado. Foram aplicados 10 a 100 ciclos potenciais. Em seguida, os voltamogramas foram registrados em uma solução contendo apenas o eletrólito suporte (**Figura 6A**) e em soluções de KCl contendo as sondas redox $K_3Fe(CN)_6$ (**Figura B**) e $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$ (**Figura 6C**).

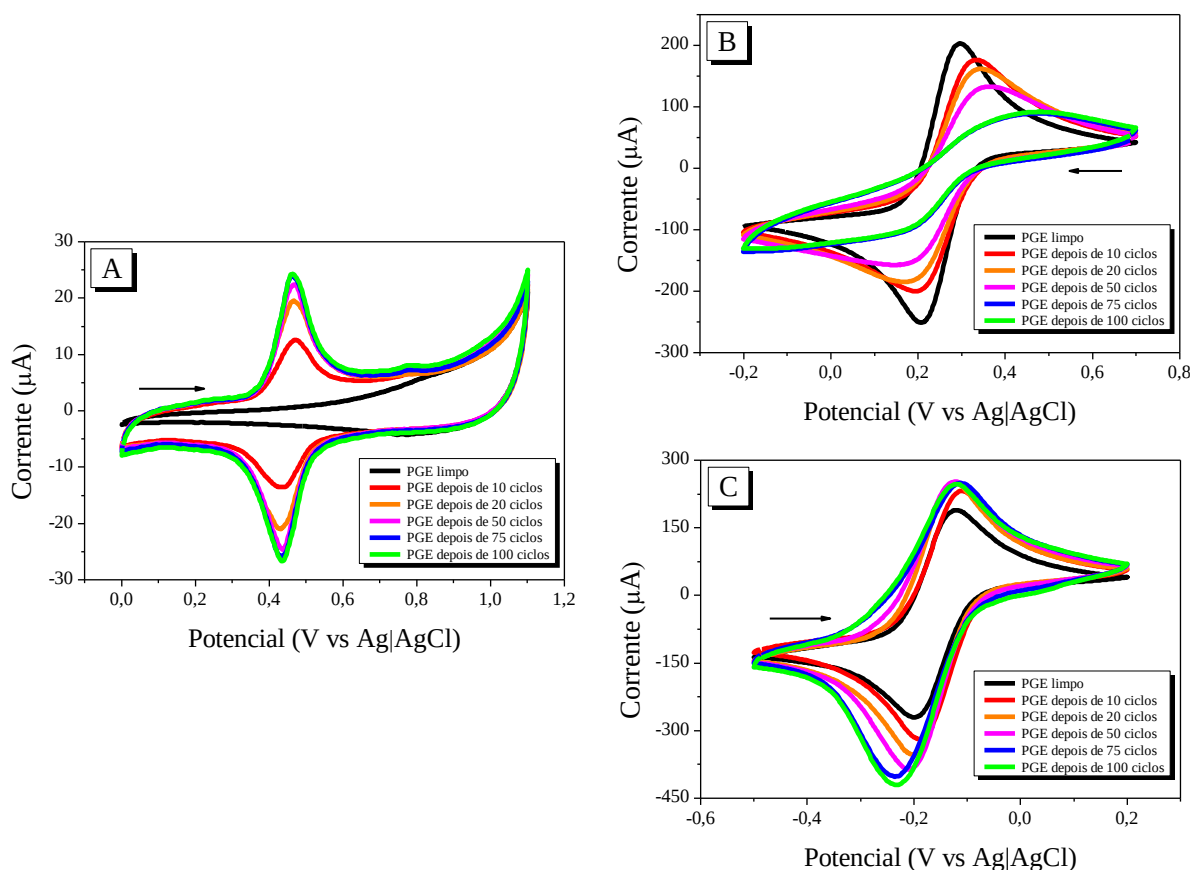


Figura 6. Voltamogramas cíclicos obtidos em PGEs modificados em solução aquosa, contendo 1,0 mM de 3-3-AAFP em $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, após aplicação de diferentes números de ciclos de potencial. **A)** Em solução de 0,5 M em $HClO_4$ a $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. **B)** Em uma solução contendo 5,0 mM de $K_3Fe(CN)_6$ a $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e **C)** $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$ a $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ em meio KCl 0,5 M. As setas indicam a direção das varreduras. Fonte: Próprio autor.

Resultados e Discussão

Pode-se notar na **Figura 6A** um aumento nas correntes anódica e catódica, com o aumento do número de ciclos. A partir de 50 ciclos, não há ganho significativo de corrente, indicando que não são necessários mais ciclos para que ocorra a saturação da superfície. Entretanto, embora haja um aumento de corrente entre 20 e 50 ciclos, ele não ultrapassa 13,0%.

Ocorre uma diminuição significativa da corrente, até 75 ciclos, em relação aos valores de corrente após a aplicação de 10 ciclos (**Figura 6B**). Este fato corrobora com o efeito de repulsão eletrostática do polímero, que aumenta com as novas camadas poliméricas. Portanto, a aplicação de 10 ciclos permite uma melhor resposta nas soluções de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em comparação com a aplicação de 75 ciclos. Apenas para caracterização, a **Figura 6C** mostra o comportamento na solução contendo a sonda catiônica, com um leve aumento na corrente anódica, com o aumento do número de ciclos. Assim, os resultados mostrados na **Figura 6** sugerem que após 10 ciclos é possível observar a formação do material e uma notável modificação da superfície dos PGEs, sem grande comprometimento da intensidade de corrente da sonda aniônica.

4.5. Efeito do pH na eletropolimerização do 3-3-AAFP

Mudanças no pH do meio podem causar mudanças nas estruturas químicas das moléculas. O monômero 3-3-AAFP é um derivado da anilina com um ácido carboxílico modificado na posição meta. Ambos os grupos funcionais ($-\text{COOH}$ e $-\text{NH}_2$) estão sujeitos a processos de protonação/desprotonação de acordo com as mudanças no pH do meio. As moléculas de 3-3-AAFP possuem dois valores de pKa ($\text{pKa}_1=3,61$ e $\text{pKa}_2=5,46$) (CHEMAXON, 2020). Assim, a eletropolimerização do 3-3-AAFP em diferentes valores de pH foi verificada para avaliar a eficiência na obtenção de filmes poliméricos.

Uma mudança no potencial de pico para potenciais menos anódicos (positivos) é observada à medida que os valores de pH aumentam (+1,0 V em pH 0,5; 0,8 V em pH 4,5; e 0,7 V em pH 9,0), indicando que menos energia é necessária para a oxidação de 3-3-AAFP, e a dependência da oxidação do monômero com o grau de protonação. Essa mudança em função do pH pode gerar diferentes materiais e influenciar na deposição sobre a superfície do PGE. Processos redox reversíveis aparecem em +0,43 e +0,49 V (pH 0,5) e em +0,19 e +0,26 V (pH 4,5). Ambos os

Resultados e Discussão

processos mostram um aumento nos valores de corrente com sucessivos ciclos de potencial, indicando a formação de um material eletroativo. Em pH 4,5, após alguns ciclos, nota-se uma diminuição da corrente. Na solução em pH 9,0, os valores atuais dos picos redox (-0,1 e +0,1 V) permanecem inalterados, apresentando apenas a diminuição do pico de oxidação do monômero, permanecendo estáveis após alguns ciclos.

Os diferentes perfis mostrados na **Figura 7** sugerem que ocorre menor deposição de material com o aumento do valor do pH, o que pode estar relacionado aos diferentes processos de oxidação e deposição do material oxidado. O meio ácido (pH 0,5) gera mais material e com melhor eletroatividade. Observou-se uma diminuição da corrente de pico para a sonda $K_3Fe(CN)_6$ (**Figura 7E**), em relação às propriedades eletrônicas do material depositado na superfície dos PGEs, mais significativa na solução mais ácida. Uma solução contendo a sonda redox $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$ (**Figura 7F**) apresenta menor aumento nos valores de corrente em pH 4,5, corroborando as análises realizadas. As respostas eletroquímicas do eletrodo modificado em pH 9,0 assemelham-se ao comportamento do PGE limpo. Portanto, o material eletroativo depositado sobre a superfície do eletrodo na solução com um valor de pH de 0,5 é promissor para o desenvolvimento de biossensores.

Resultados e Discussão

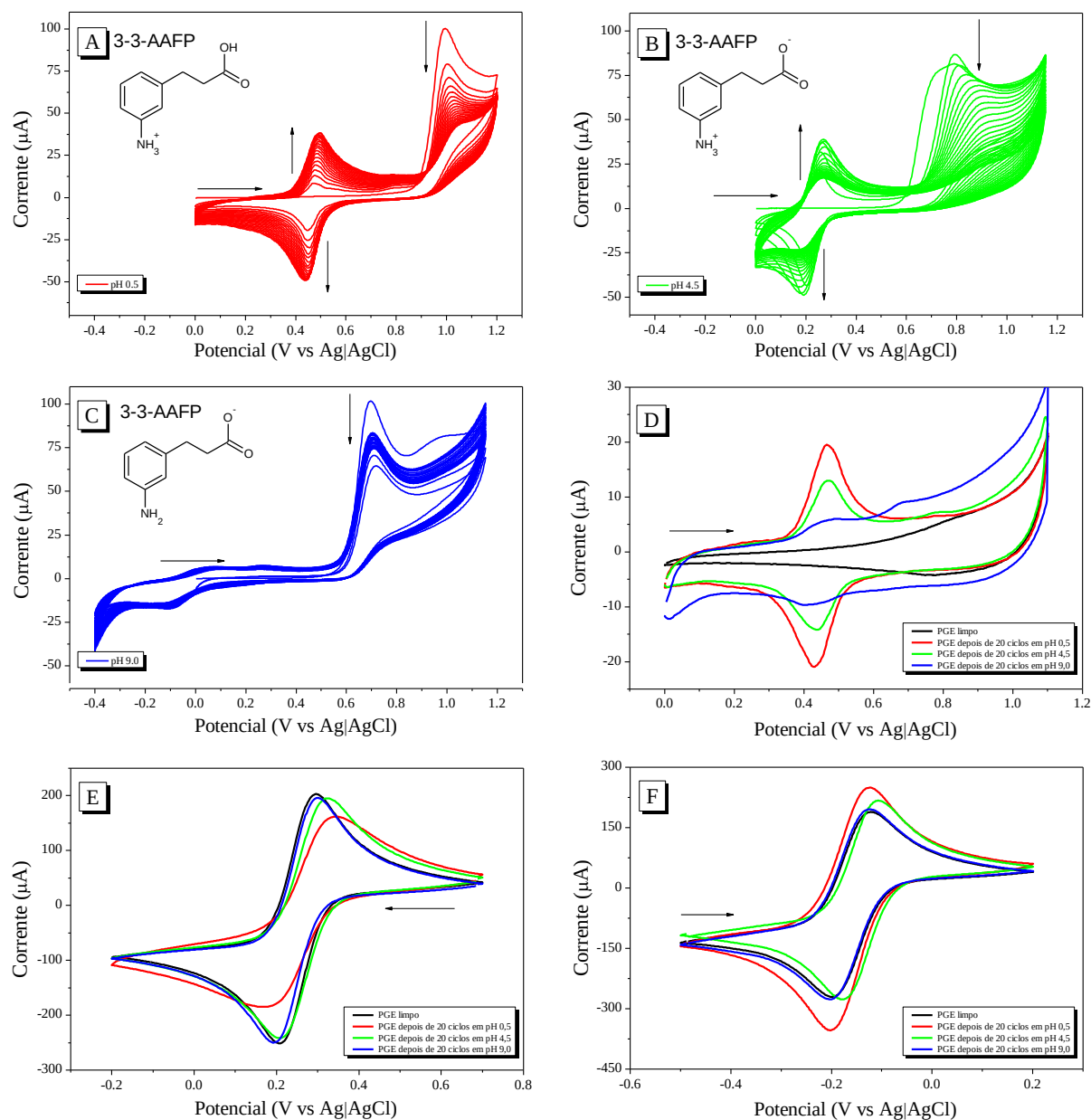


Figura 7. Voltamogramas cíclicos obtidos em PGEs, em solução aquosa, contendo 1,0 mM de 3-3-AAFP em $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, 20 ciclos, valor de pH: **A)** 0,5, **B)** 4,5 e **C)** 9,0. PGE limpo e PGEs modificadas após aplicação de 20 ciclos de potencial em solução com diferentes valores de pH, contendo 1,0 mM de 3-3-AAFP a $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. **D)** Em solução de 0,5 M a HClO_4 a $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. **E)** Em uma solução contendo 5,0 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ a $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e **F)** $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ a $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ em meio KCl 0,5 M. As setas indicam a direção e o aumento ou diminuição da corrente durante as varreduras. Fonte: Próprio autor.

Resultados e Discussão

4.6. Caracterização morfológica de PGE modificado com poli(3-3-AAFP)

A **Figura 8** mostra a análise morfológica para MEV após modificações em soluções com diferentes valores de pH. A **Figura 8A** e a **Figura 8B** mostram, em diferentes ampliações, o PGE limpo. A **Figura 8C** e a **Figura 8D** mostram a PGE após a polimerização em meio ácido (pH 0,5). Pode ser observado na **Figura 8E** e **Figura 8F**, o PGE ciclado em solução com um valor de pH de 4,5. Não há grande quantidade de material, como visto no PGE modificado em solução com valor de pH 0,5, com seções de lascas de PGE expostas e seções de revestimento, corroborando os dados eletroquímicos, que sugeriram que haveria menos material sobre a superfície. Por fim, na **Figura 8G** e na **Figura 8H**, que foram submetidas a tratamento em meio básico (pH 9,0), as micrografias apresentam grande semelhança com as de PGE limpa, como já indicado pelas respostas eletroquímicas. Assim, confirmando que para maior modificação das PGEs, o valor de pH ideal é 0,5.

Resultados e Discussão

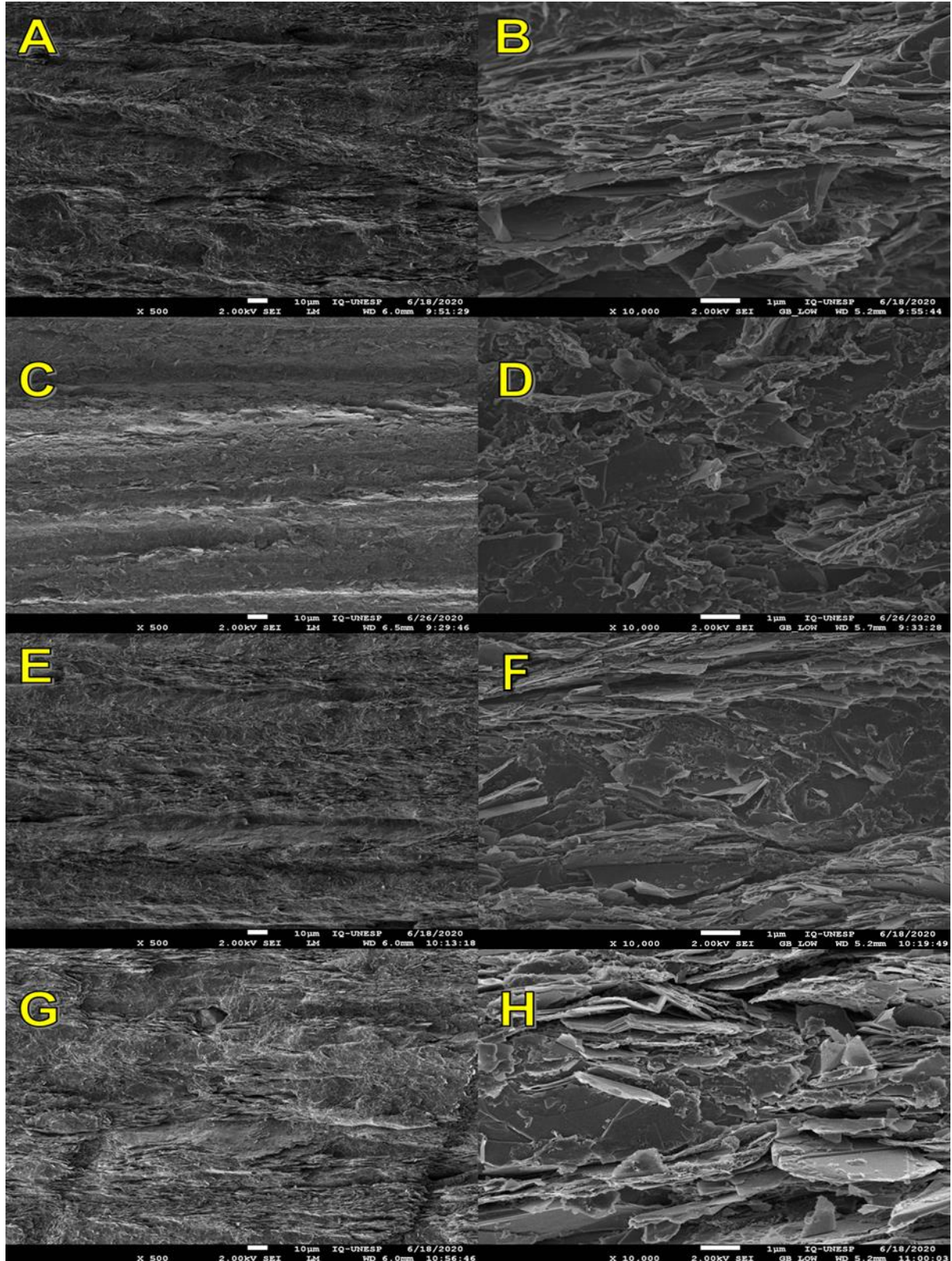


Figura 8. Imagens de MEV de (A e B) o PGE limpo e o PGE após modificação pela aplicação de 50 ciclos de potencial em solução contendo 3-3-AAFP, em (C e D) pH 0,5; (E e F) pH 4,5 e (G e H) pH 9,0. Ampliação: 500x para A, C, E e G. Ampliação: 10000x para B, D, F e H. Fonte: Próprio autor.

Resultados e Discussão

4.7. Proposta de mecanismo de eletropolimerização para o 3-3-AAFP

O efeito do pH no comportamento eletroquímico do monômero foi avaliado para iniciar o estudo de proposta do mecanismo de eletropolimerização. Assim, soluções de 3-3-AAFP foram preparadas em tampão Britton-Robinson (BR), com valores de pH variando de 2 a 10. O primeiro ciclo de potencial em cada solução foi registrado, e o valor de pH foi relacionado ao respectivo pico anódico potencial (E_{pa}) de 3-3-AAFP, conforme mostrado na **Figura 9A**. Há um deslocamento do E_{pa} para potenciais menos anódicos com o aumento do pH, apresentando linearidade entre os valores de pH 2 e 5. Após o cálculo da regressão linear nesta região de pH mais ácido, obteve-se a seguinte equação $y = 1,064 - 0,0613x$, que pode ser comparada ao modelo teórico da equação de Nernst (Equação 1).

$$E_p = E^0 - 0,0592 \left(\frac{H^+}{n} \right) pH \quad \text{Equação 1.}$$

O valor da inclinação obtido da reta experimental foi -0,0613, e o valor teórico que indica a proporção prótons/elétrons envolvidos na reação é -0,0592 (GALUS, 1976). Assim, supõe-se que haja o mesmo número de prótons e elétrons envolvidos na oxidação do 3-3-AAFP.

Para estimar o número de elétrons envolvidos na reação e entender o comportamento eletroquímico do monômero em meio ácido, foram realizados estudos sobre o efeito da velocidade de varredura. Aplicou-se uma variação entre 10 e 1000 mV s^{-1} , registrando um ciclo de potencial em solução de HClO_4 de forma crescente, contendo 3-3-AAFP para cada velocidade, no mesmo eletrodo. Os valores de E_{pa} e corrente de pico anódico (I_{pa}) foram coletados para análise para fins de caracterização. Juntamente com os respectivos valores de velocidade de varredura, foram aplicados alguns modelos matemáticos que permitem chegar a um número estimado de elétrons.

O gráfico de E_{pa} *versus* o $\log I_{pa}$ da oxidação 3-3-AAFP (**Figura 9B**) oferece informações sobre a reversibilidade do sistema. Segundo (BARD; FAULKNER, 2002), o grau de reversibilidade do sistema pode ser calculado pela equação anódica de Tafel (Equação 2):

$$a = (1-\alpha) \frac{F}{2,3RT} \quad \text{Equação 2.}$$

Resultados e Discussão

Em que:

α = Inclinação da reta

α = Grau de reversibilidade do sistema.

F = Constante de Faraday (C mol^{-1}).

R = Constante dos gases ($\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$).

T = Temperatura (K).

Resultados e Discussão

Obteve-se uma regressão linear representada pela equação da reta $y = -15,394 + 11,014x$. Usando Tafel anódico, o valor calculado foi, $a = 0,349$. O número de elétrons envolvidos na reação pode ser calculado a partir da Equação 3 (LAVIRON, 1979).

$$a = \frac{2,3RT}{(1-\alpha)nF} \quad \text{Equação 3.}$$

Em que:

a = Inclinação da reta

α = Grau de reversibilidade do sistema.

F = Constante de Faraday ($C \text{ mol}^{-1}$).

R = Constante dos gases ($J \text{ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$).

T = Temperatura (K).

n = Número de elétrons envolvidos na reação.

Obtida a regressão linear representada pela equação da reta $y = 0,826 + 0,084x$, o n foi calculado como 1,081. O valor obtido indica que há um elétron envolvido na oxidação do monômero 3-3-AAFP.

Resultados e Discussão

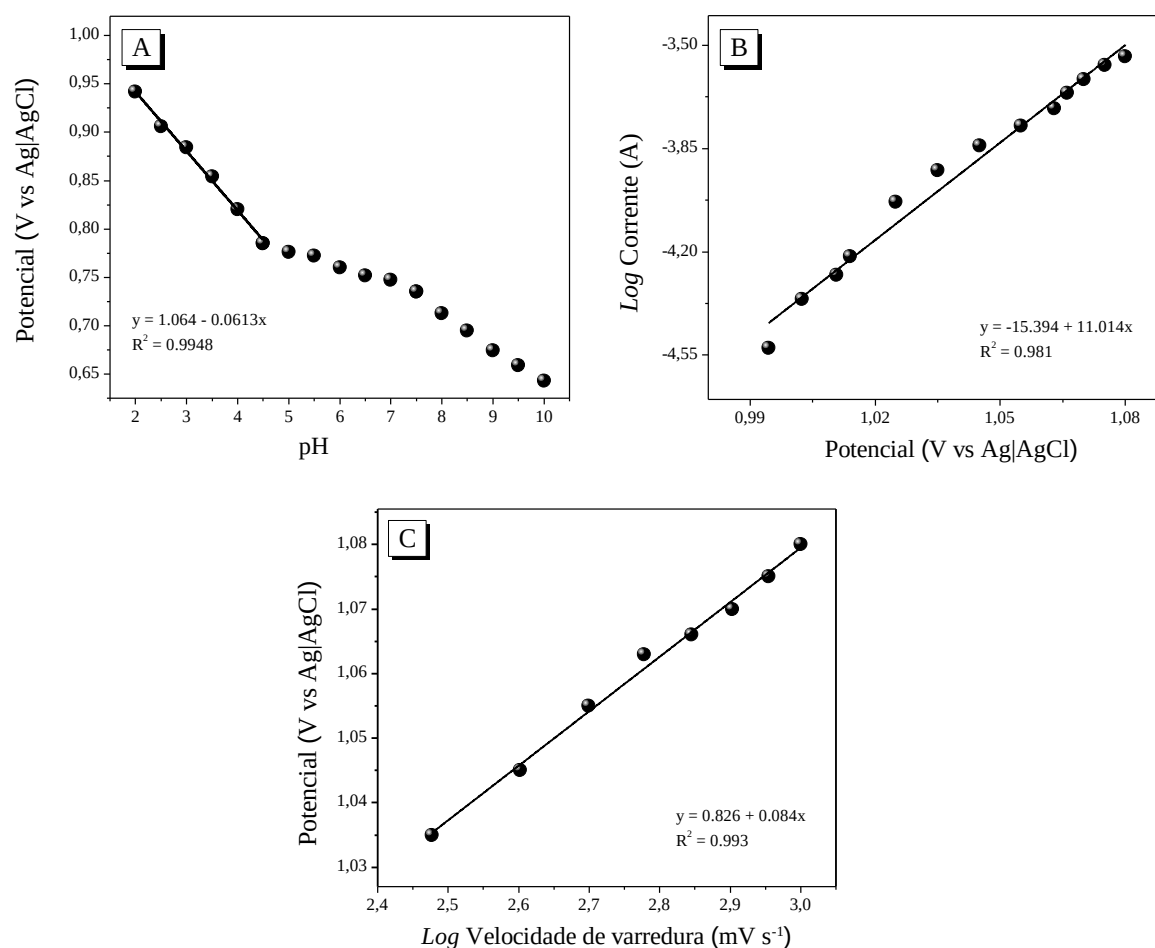


Figura 9. Estudo do comportamento eletroquímico do 3-3-AAFP. **A)** Relação entre pH *versus* potencial de pico obtido a partir de voltamogramas cíclicos registrados em 1,0 mM de 3-3-AAFP usando tampão BR (0,4 M) como eletrólito suporte sobre PGE, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. **B)** Relação entre o potencial de pico *versus* o logaritmo da corrente e **C)** Relação entre o logaritmo da velocidade de varredura *versus* o potencial de pico obtido a partir de voltamogramas cíclicos registrados em 1,0 mM de 3-3-AAFP, utilizando solução de ácido perclórico (0,5 M) como eletrólito suporte sobre PGE em diferentes taxas de varredura. Insets: equações obtidas por regressão linear. Fonte: Próprio autor.

O valor do potencial de pico obtido no primeiro ciclo de eletro-oxidação de 3-3-AAFP foi plotado em relação ao valor de pH (**Figura 9A**), resultando em um comportamento linear com uma inclinação de -0,061. Este valor sugere que a razão entre o número de prótons e elétrons envolvidos na eletro-oxidação do 3-3-AAFP é de 1:1, de acordo com a equação de Nernst (GALUS, 1976; STÉFANNE E SILVA et al., 2020). A partir dos cálculos realizados utilizando os modelos matemáticos de Tafel e Laviron (BARD; FAULKNER, 2002; LAVIRON, 1979), o número de elétrons assumidos foi igual a 1.

Resultados e Discussão

A condição ideal para a polimerização foi observada em meio ácido (pH 0,5), permanecendo protonados os grupos -COOH e -NH₂. Assim, a eletropolimerização começa com a aplicação de potencial suficiente para remover um elétron do 3-3-AAFP, e a oxidação eletroquímica ocorre com a perda de um próton, gerando o cátion radical (**Figura 10**). O cátion radical é estabilizado por suas respectivas estruturas de ressonância (Passo 1). As estruturas de ressonância mostram as possibilidades do elétron desemparelhado (SANTOS et al., 2019) nos carbonos aromáticos nas posições 2, 4 e 6. O impedimento estérico causado pelos grupos funcionais impossibilita o crescimento do polímero no C2 (Passo 1 d). As outras possibilidades de acoplamento são no C4 (Passo 1 b) e no C6 (Passo 1 c).

Stéfanne e Silva *et al.*, propuseram duas posições preferenciais para o ácido 3-hidroxibenzóico, *orto* e *para*, para o grupo hidroxila, a posição *orto* é improvável devido ao maior impedimento estérico causado, como mostra o Passo 2. No Passo 3, outra forma plausível é apresentada pelo acoplamento entre dois cátions radicais no C6. Propõe-se (em relação ao grupo amino) um mecanismo semelhante ao relatado para o ácido *m*-aminobenzóico (ROSTAMI; OMRANI; HAMEDIAN, 2013). Através do dímero, que pode ser girado, é gerado um trímero, seguindo o mesmo mecanismo (Passo 4), e sucessivamente a reação se repete, levando à formação de um tetrâmero até formar cadeias mais longas de oligômeros, caracterizando um polímero.

Resultados e Discussão

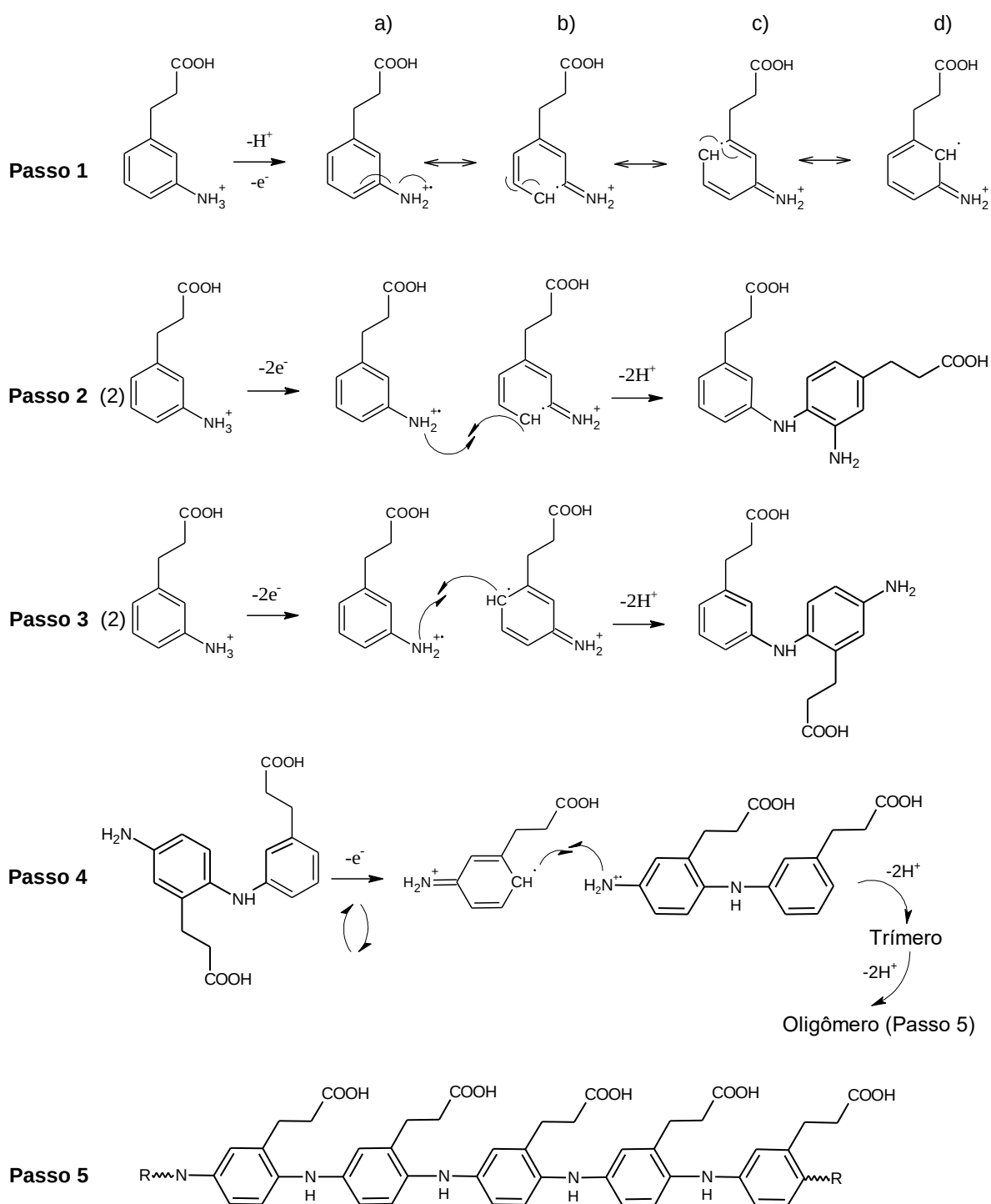


Figura 10. Proposta de mecanismo para eletropolimerização do 3-3-AAFP. Fonte: Próprio autor.

Resultados e Discussão

4.8. Caracterização por espectroscopia de FT-IR

O monômero e o material polimérico, foram avaliados pela técnica de FT-IR. O espectro do monômero (**Figura 11A**) foi comparado ao espectro do material eletropolimerizado (**Figura 11B**). A complexidade do espectro obtido para o monômero corresponde aos diferentes grupos funcionais (-NH_2 , -COOH) e o anel aromático na molécula. A absorção na região de 3400 cm^{-1} está associada às vibrações de deformação axial N-H da amina primária aromática. Portanto, as bandas de 3374 cm^{-1} e 3353 cm^{-1} são atribuídas a eles. Corroborando isso, a banda de 1590 cm^{-1} corresponde à deformação angular simétrica no plano N-H. Observa-se na região entre 3300 a 2500 cm^{-1} um complexo e amplo conjunto de deformações relacionadas à ligação O-H presentes em ácidos carboxílicos. Entre 3100 a 3000 cm^{-1} , há a contribuição das bandas de absorção referentes ao estiramento da ligação C-H dos compostos aromáticos. Na região entre 1300 e 1050 cm^{-1} , a presença de bandas estreitas e intensas pode estar relacionada à ligação C-N (MURRAY; EWING; DURST, 1987). Bandas intensas em 1690 cm^{-1} e 1230 cm^{-1} são observadas, atribuídas ao estiramento das ligações C=O e C-O do ácido carboxílico, respectivamente. As bandas em 1450 e 1420 cm^{-1} estão associadas ao estiramento das ligações C=C do anel aromático. A região entre 932 a 695 cm^{-1} apresenta uma diversidade de bandas, que podem ser atribuídas a deformações angulares das ligações C-H devido à estrutura aromática do monômero (DONALD L. PAVIA, GARY M. LAMPMAN, GEORGE S. KRIZ, 2015; SANTOS et al., 2019).

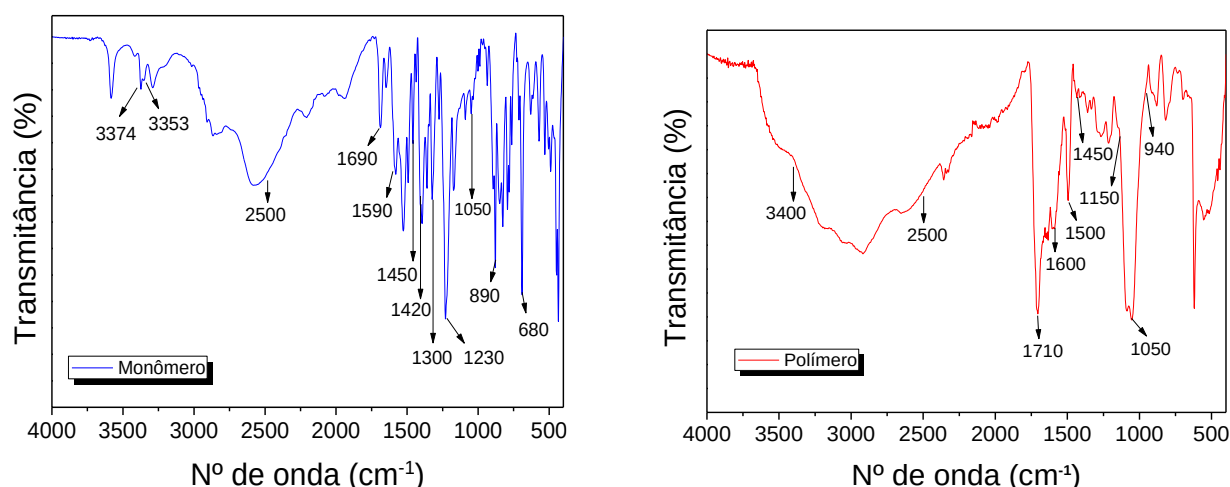


Figura 11. Espectros de infravermelho (FT-IR) obtidos do monômero (3-3-AAFP) e do polímero (poli(3-3-AFP)), resolução de 4 cm^{-1} , 64 varreduras. Fonte: Próprio autor.

Resultados e Discussão

Em relação ao material polimérico, o espectro apresenta variações notáveis quando comparado ao espectro do monômero. O desaparecimento das bandas referentes à deformação axial N-H das aminas aromáticas primárias em torno de 3400 cm^{-1} dá origem a uma banda larga, atribuída à deformação axial do O-H associado. Isso indica o envolvimento no processo de eletropolimerização, no qual a amina primária é convertida em uma amina secundária. A banda forte entre 1150 e 940 cm^{-1} com pico máximo em 1050 cm^{-1} presente apenas no espectro polimérico corrobora a análise, uma vez que a banda é atribuída à característica de deformação axial assimétrica C–N–C das aminas secundárias (MOVASAGHI; REHMAN; UR REHMAN, 2008; SANTOS et al., 2019). Pode-se observar a presença de bandas próximas a 1600 , 1500 e 1450 cm^{-1} referentes aos trechos C=C do anel aromático, preservados na estrutura. Comumente, a banda C=O em ácidos carboxílicos está presente em cerca de 1760 cm^{-1} . As ligações de hidrogênio e a ressonância enfraquecem a ligação C=O, resultando em uma mudança na absorção para frequências mais baixas. Isso explica as respostas entre 1710 e 1690 cm^{-1} para polímero e monômero (SOARES et al., 2019). A caracterização eletroquímica em sonda redox corrobora com os espectros de FT-IR com a persistência de grupos -COOH, indicando, conforme proposto no mecanismo, que este grupo não está envolvido no processo de polimerização. A presença da banda C – N – C no espectro FT-IR também é um forte indício de que o mecanismo de eletropolimerização ocorre, conforme proposto. Assim, o filme polimérico poli(3-3-AAFP) possui as características desejadas para ser utilizado como parte crucial do desenvolvimento do biossensor, possuindo grupos -COOH disponíveis para ligação covalente com avidina, posteriormente responsável pela interação com os peptídeos biotinilados.

4.9. Desenvolvimento do biossensor

A imobilização da avidina sobre o eletrodo modificado foi possível após os estudos de polimerização do monômero e caracterização do polímero. O PGE modificado (PGE/poli(3-3-AAFP)) mostrou uma diminuição na corrente de pico (**Figura 12A**) devido à repulsão eletrostática entre os ânions $[\text{Fe}(\text{CN}_6)]^{-3}$ e os ânions carboxilato do poli(3-3-AAFP)), como confirmado pelo aumento do semicírculo (R_{ct}) no diagrama de Nyquist (**Figura 12B**). O PGE/poli(3-3-AAFP) ativado com EDC/NHS antes da imobilização da sonda também foi testado (PGE/poli(3-3-AAFP)/EDC-NHS).

Resultados e Discussão

A corrente aumentou (**Figura 12A**) e a resistência diminuiu (**Figura 12B**) em relação ao eletrodo modificado, indicando a ativação bem-sucedida dos grupos carboxilato, com a formação de um intermediário neutro, causando menor repulsão elétrica da sonda. Com a ligação da avidina (PGE/poli(3-3-AAFP)/EDC-NHS/Avd), a resistência à transferência de elétrons foi novamente prejudicada. Este fato pode ser observado a cada etapa, após o bloqueio com glicina (PGE/poli(3-3-AAFP)/EDC-NHS/Avd/Gly) e principalmente após a interação com os peptídeos Biotina-C3 (PGE/poli(3-3-AAFP)/EDC-NHS/Avd/Gly/PEPC3) e Biotina-H2 (PGE/poli(3-3-AAFP)/EDC-NHS/Avd/Gly/PEPH2).

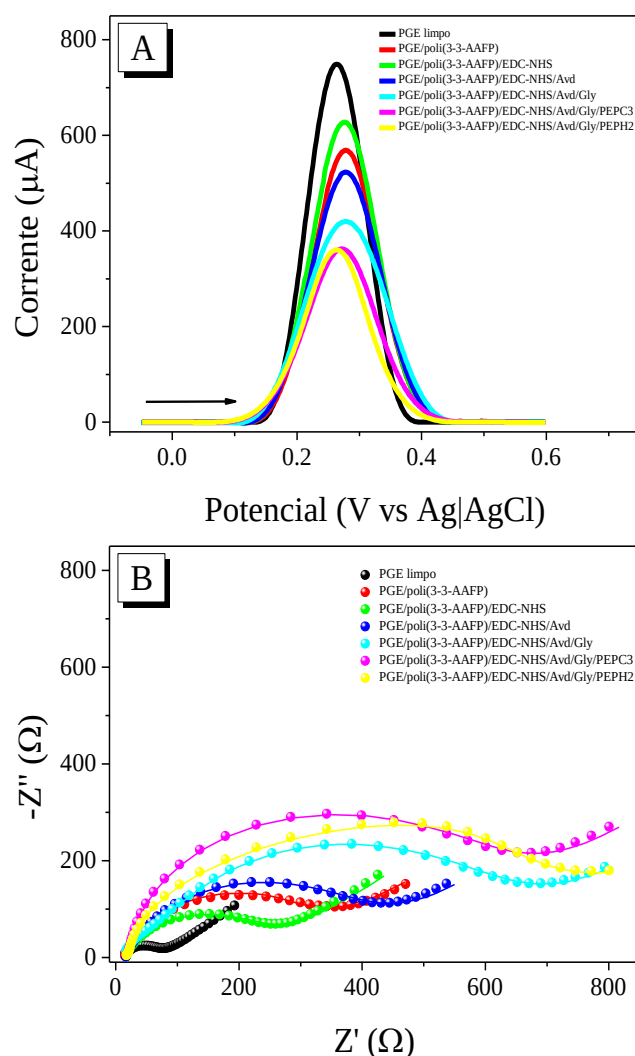


Figura 12. Caracterização eletroquímica das etapas de construção do biossensor. **A)** Voltamogramas de onda quadrada registrados em solução aquosa de KCl (0,5 M) contendo $K_3Fe(CN)_6$ (5,0 mM) em $f=80\text{ s}^{-1}$, $a = 50\text{ mV}$ e $\Delta E = 2\text{ mV}$. **B)** Diagramas de Nyquist de dados obtidos por EIE registrados em solução aquosa de KCl (0,5 M) contendo $K_3Fe(CN)_6$ (5,0 mM), linhas sólidas representam o ajuste do circuito aos dados experimentais. Fonte: Próprio autor.

Resultados e Discussão

Os dados experimentais de EIE para etapas de modificação de PGE para desenvolvimento de biossensores foram simulados e ajustados pelo circuito de Randle descrito como $([R_s (Q_{dl} [R_{ct}W]))$.

A diminuição da corrente pode ser explicada pelo acúmulo de cargas negativas presentes, causando uma barreira para os ânions $[Fe(CN)_6]^{-3}$. Ficou claro que o processo de imobilização ocorreu e que as técnicas de VOQ (baseado na diminuição da corrente aniônica da sonda) ou EIE (baseado no aumento da resistência de transferência de carga) podem ser usadas para análise de biossensores. A técnica VOQ foi escolhida para novos experimentos por proporcionar análises rápidas com cálculos matemáticos mais simples e apresentar resultados com alta sensibilidade e reprodutibilidade.

A seletividade, repetibilidade e estabilidade do biossensor foram investigadas. O biossensor foi incubado com amostras de soro de pacientes com DBM para confirmar a seletividade da plataforma. Foi possível diferenciar a resposta observada em amostras de DBM de amostras de CM, sugerindo que o processo de interação entre os peptídeos e o alvo é bastante específico, o que indica que o biossensor possui boa seletividade, para os peptídeos a Biotina-C3 e Biotina-H2, conforme mostra a **Figura 13**.

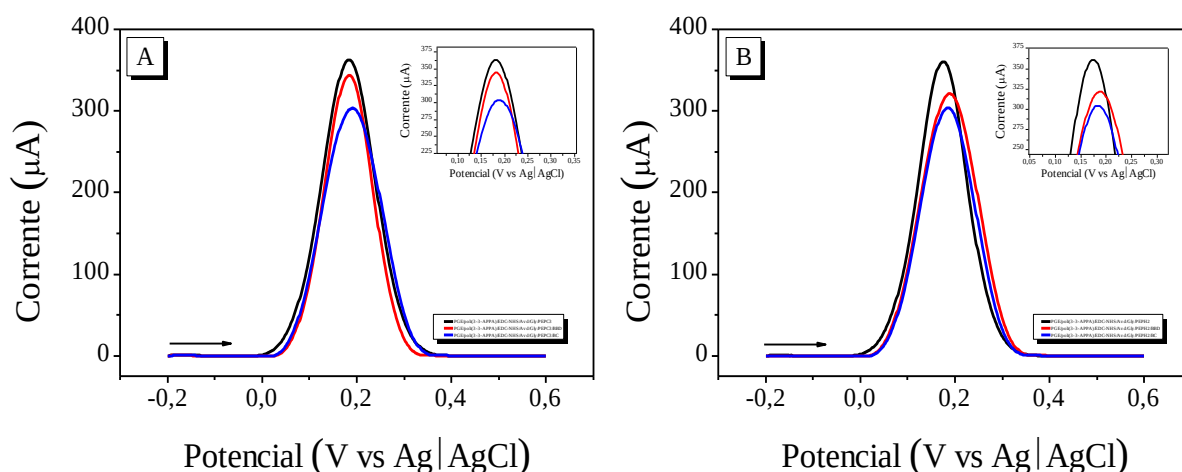


Figura 13. Investigação da seletividade do biossensor em *pools* sorológicos de pacientes com DBM e CM, **A)** Peptídeo Biotina-C3 e **B)** Peptídeo Biotina-H2. Voltamogramas de onda quadrada registrados em solução aquosa de KCl (0,5M) contendo $K_3Fe(CN)_6$ (5,0 mM) em $f=80\text{ s}^{-1}$, $a=50\text{mV}$ e $\Delta E=2\text{mV}$. Fonte: Próprio autor.

Amostras de *pool* sorológico positivo para CM foram detectadas com sucesso

Resultados e Discussão

em três eletrodos diferentes por 3 dias ($n = 9$) sob as condições otimizadas, com valores de desvio padrão relativo (RSD) de 3,23% para o peptídeo Biotina-C3 e 3,92% para o peptídeo Biotina-H2 (**Figura 14**). O sistema também apresentou reprodutibilidade para detecção em amostras de soro de pacientes com CM.

A repetibilidade de SPE/poli(3-3-AAFP)/EDC-NHS/Avd/Gly contendo os peptídeos Biotina-C3 e Biotina-H2 separadamente foi investigada em amostras de *pool* sorológico de CM, que foram detectadas com sucesso em três eletrodos diferentes por 3 dias ($n=9$), em condições otimizadas.

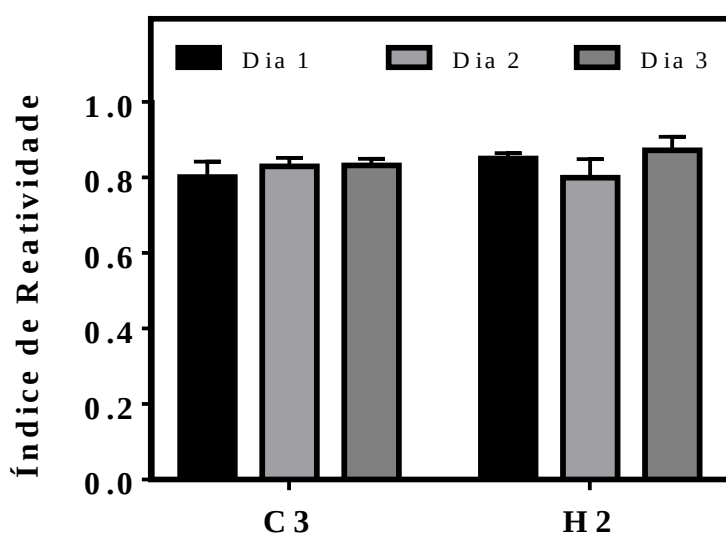


Figura 14. Estudo da repetibilidade do biossensor com peptídeo Biotina-C3 e peptídeo Biotina-H2 em *pool* sorológico de pacientes com CM. Fonte: Próprio autor.

Os SPE/poly(3-3-AAFP)/EDC-NHS/Avd/Gly contendo os peptídeos Biotina-C3 e Biotina-H2 separadamente foram armazenados a $-8,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, e a estabilidade foi analisada uma vez por semana durante 60 dias, em triplicata, como mostrado na **Figura 15**.

Resultados e Discussão

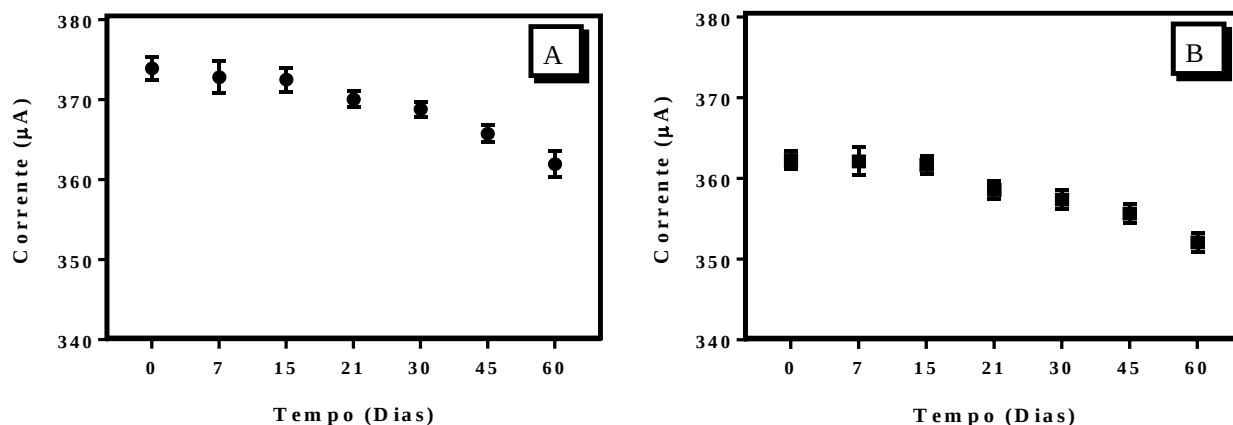


Figura 15. Estudos de estabilidade de armazenamento de biossensor com **A)** Peptídeo Biotina-C3 e **B)** Peptídeo Biotina-H2 por 60 dias a -8°C . Fonte: Próprio autor.

Apenas uma pequena perda de atividade foi detectada. O dispositivo manteve 96,80% da resposta inicial para Biotina-C3 e 97,18% para Biotina-H2. A estabilidade a longo prazo pode ser esperada devido à imobilização covalente da avidina no eletrodo modificado e à alta afinidade do complexo avidina/biotina, que pode evitar a perda de peptídeos após o armazenamento. A pequena perda pode estar relacionada à possibilidade de degradação dos componentes do biossensor, uma vez que as moléculas foram imobilizadas sobre a plataforma na ausência de qualquer agente estabilizador ou antioxidante.

4.10. Análise da curva ROC

O teste em *pool* foi preparado para fins de padronização. Inicialmente, para confirmar a seletividade, as análises de ELISA (**Figura 16A**) foram comparadas com os resultados do biossensor (**Figura 16F**). Ambos os peptídeos Biotina-C3 e Biotina-H2 discriminaram significativamente os dois grupos com $p = 0,021$ e $p = 0,037$, respectivamente, por ELISA. Utilizando o biossensor, além de discriminar os dois grupos, os peptídeos Biotina-C3 e Biotina-H2 apresentaram significância estatística superior ao teste ELISA, com $p < 0,0001$ e $p = 0,007$.

Análises de amostras de soro individuais foram realizadas para avaliar o desempenho de ligação dos peptídeos Biotina-C3 (**Figura 16B**) e Biotina-H2 (**Figura 16C**), usando soro de 118 pacientes divididos em DBM ($n=37$) e CM ($n=81$), os peptídeos apresentaram reatividade diferencial entre pacientes com CM e aqueles

Resultados e Discussão

com DBM, com significância de $p < 0,0001$ e $p = 0,0019$, respectivamente, pelo ensaio ELISA. A curva ROC para CM *versus* DBM foi significativa para ambos os peptídeos e, de acordo com os valores de AUC, os peptídeos Biotina-C3 e Biotina-H2 alcançaram valores moderados de precisão global, indicando que podem distinguir amostras positivas de negativas (Swets, 1988). O peptídeo Biotina-C3 (**Figura 16D**) apresentou AUC = 0,771, sensibilidade = 97,53%, especificidade = 59,46% e precisão = 84,74% e o peptídeo Biotina-H2 (**Figura 16E**) AUC = 0,677, sensibilidade = 98,77%, especificidade = 32,43% e acurácia = 77,96%.

Os peptídeos Biotina-C3 e Biotina-H2 também foram testados contra amostras de soro individuais usando o biossensor. A reatividade do biossensor com os peptídeos Biotina-C3 (**Figura 16G**) e Biotina-H2 (**Figura 16H**) também diferenciou pacientes com CM daqueles com DBM com significâncias de $p < 0,0001$ e $p = 0,011$, respectivamente. A curva ROC para CM *versus* DBM foi significativa para ambos os peptídeos. Além disso, os valores de AUC alcançaram valores de alta precisão global, indicando que podem distinguir eficientemente amostras positivas de negativas usando o biossensor eletroquímico. O peptídeo Biotina-C3 (**Figura 16I**) mostrou AUC = 0,951, sensibilidade = 100,00%, especificidade = 75,00% e precisão = 83,33% e o peptídeo Biotina-H2 (**Figura 16J**) AUC = 0,806, sensibilidade = 91,67%, especificidade = 41,67 % e precisão = 70,83 %. Os resultados confirmam, por comparação com o método ELISA, o potencial dos peptídeos para caracterizar amostras de pacientes com CM utilizando o biossensor.

Resultados e Discussão

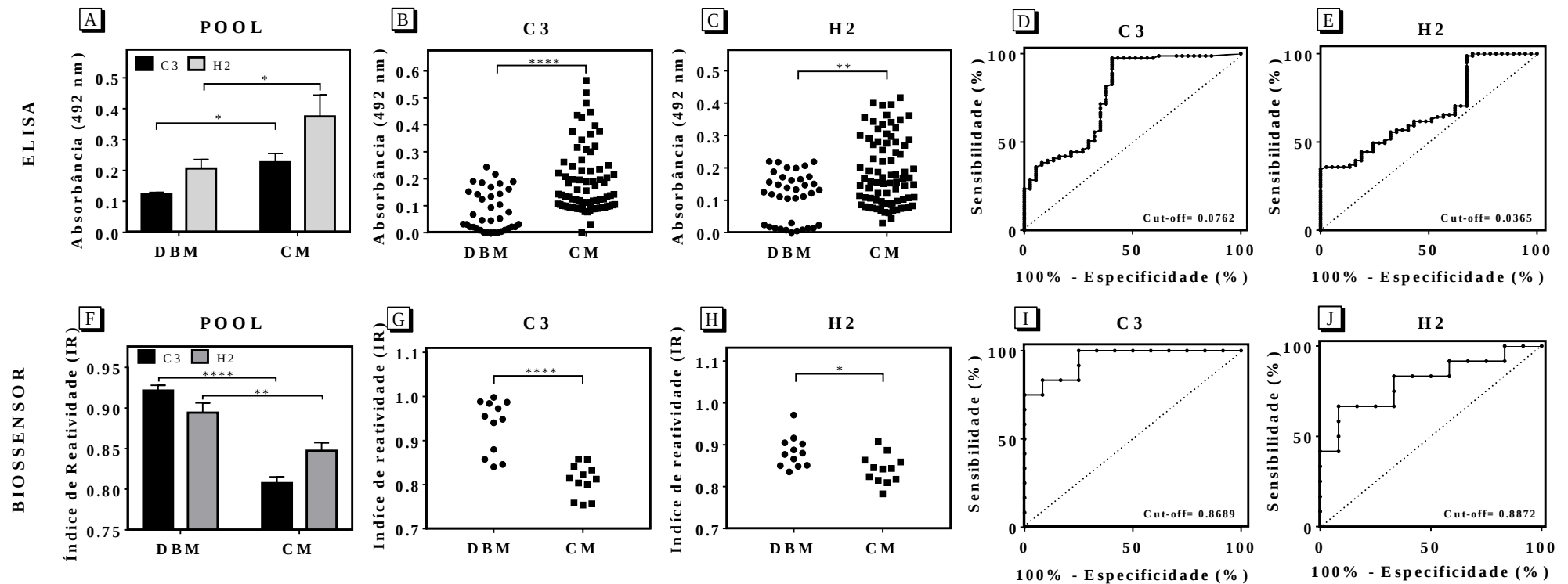


Figura 16. Análise do desempenho de ligação dos peptídeos Biotina-C3 e Biotina-H2 a amostras sorológicas de pacientes. **A)** Ensaio ELISA mostrando a reatividade dos peptídeos Biotina-C3 e Biotina-H2 contra soro de *pool* de pacientes com câncer de mama (CM) e doença benigna da mama (DBM). **B)** Ensaio ELISA mostrando a reatividade do peptídeo Biotina-C3 contra soro de pacientes com DBM (n=37) e CM (n=81), analisados individualmente. **C)** Ensaio ELISA mostrando a reatividade do peptídeo Biotina-H2 contra soro de pacientes com DBM (n=37) e CM (n=81), analisados individualmente. **D)** Curvas ROC (DBM x CM em ELISA), para o peptídeo Biotina-C3. **E)** curvas ROC (DBM x CM em ELISA), para o peptídeo Biotina-H2. Os valores de absorbância foram registrados em 492 nm. **F)** Índice de reatividade do biossensor obtido dos peptídeos Biotina-C3 e Biotina-H2 contra soro de *pool* de pacientes com DBM e CM. **G)** Reatividade do peptídeo Biotina-C3 contra soros de pacientes com DBM (n=12) e CM (n=12), analisados individualmente por biossensor. **H)** Reatividade do peptídeo Biotina-H2 contra soros de pacientes com DBM (n=12) e CM (n=12), analisados individualmente por biossensor. **I)** curvas ROC (DBM x CM em Biossensor) para peptídeo Biotina-C3 e **J)** curvas ROC (DBM x CM em Biossensor) para peptídeo Biotina-H2. A significância estatística foi calculada usando o teste de Mann Whitney. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****). Fonte: Próprio autor.

4.11. Caracterização dos subtipos moleculares de CM

Os tumores de mama são classificados molecularmente, o que define o prognóstico e orienta as decisões quanto às estratégias terapêuticas. Portanto, analisar o comportamento desses peptídeos em subtipos moleculares é interessante pela possibilidade de otimizar o manejo dos pacientes. Os peptídeos Biotina-C3 e Biotina-H2 ligaram-se significativamente mais às células de CM luminais. O principal tratamento para este subtipo de CM é a terapia hormonal. No entanto, muitos pacientes são refratários ao tratamento devido à ativação de rotas de fuga que promovem a resistência e a sobrevivência das células tumorais, tornando a doença mais agressiva. A terapia hormonal é uma estratégia difundida e padronizada para pacientes RE-positivos, que são negligenciados na busca de novas abordagens terapêuticas. Portanto, uma caracterização refinada é essencial para entender o comportamento desses tumores, possibilitando o diagnóstico de resistência em estágio inicial ou substituindo/complementando os tratamentos atuais.

O peptídeo Biotina-C3 não diferenciou os quatro principais subtipos moleculares de CM (LA, LB, HER2+ e TN) usando o ensaio ELISA (**Figura 10A**). No entanto, entre os tumores luminais, este peptídeo diferenciou o LA p53-negativo de LA p53-positivo ($p = 0,0033$) e LB HER2-positivo de LB HER2-negativo ($p = 0,0223$), evidenciado na **Figura 17B** e **Figura 17C**. Esses resultados não foram observados para o peptídeo H2. Os pontos de corte foram definidos com base na maior especificidade, pois testes específicos são utilizados para confirmar o diagnóstico e, mais precisamente, a ausência da doença. As curvas ROC foram significativas para LA p53-negativo *versus* LA p53-positivo (**Figura 17D**) com AUC = 0,886, sensibilidade = 63,64%, especificidade = 87,50% e precisão = 75,00%. LB HER2-positivo *versus* LB HER2-negativo (**Figura 17E**) com AUC = 0,748, sensibilidade = 50,00%, especificidade = 86,67% e precisão = 68,96%.

O biossensor com o peptídeo Biotina-C3 também mostrou reatividade diferencial entre LA p53-negativo e LA p53-positivo ($p = 0,0415$) (**Figura 17F**), com AUC = 0,748, sensibilidade = 50,00%, especificidade = 100,00% e precisão = 75,00% (**Figura 17H**). Finalmente, entre LB HER2-positivo e LB HER2-negativo ($p = 0,0455$) (**Figura 17G**), os parâmetros foram AUC = 0,8333, sensibilidade = 66,67%, especificidade = 100,00% e precisão = 83,33% (**Figura 17I**). Esses dados confirmam que o biossensor tem potencial para caracterização molecular de subtipos de CM.

Resultados e Discussão

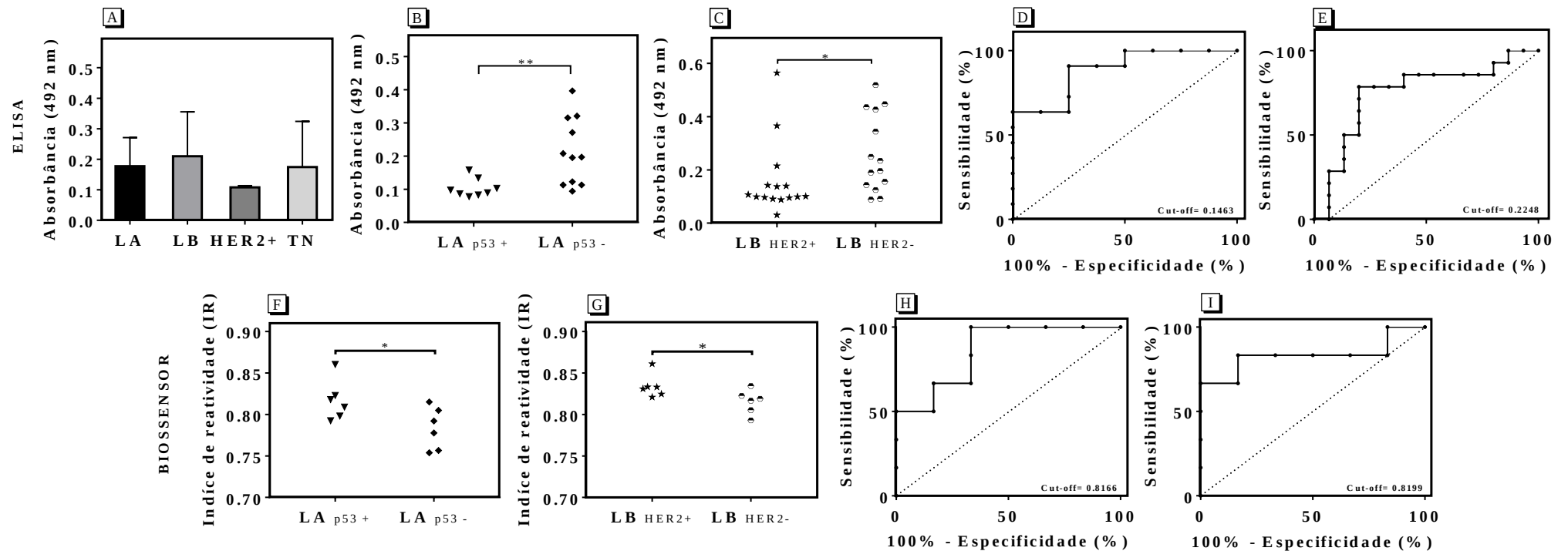


Figura 17. Análise do desempenho de ligação do peptídeo Biotina-C3 a amostras sorológicas de pacientes com câncer de mama (CM). **A)** Ensaio ELISA mostrando a reatividade do peptídeo Biotina-C3 contra soro de pacientes com CM categorizados de acordo com os subtipos moleculares: Luminal A (LA) (n=29), Luminal B (LB) (n=29), com HER2-enriquecido (HER2+) (n=2) e triplo-negativo (TN) (n=6). **B)** Reatividade do peptídeo Biotina-C3 contra soro de pacientes com CM LA categorizados de acordo com o *status* de p53: LA p53-positivo (+) (n=8) e LA p53-negativo (-) (n=11). **C)** Reatividade do peptídeo Biotina-C3 contra soro de pacientes com CM LB categorizados de acordo com o *status* de HER2: LB HER2-positivo (+) (n=15) e LB HER2-negativo (-) (n=14). **D)** Curva ROC (LA p53+ x LA p53- em ELISA). **E)** Curva ROC (LB HER2+ x LB HER2- em ELISA). Os valores de absorbância foram registrados em 492 nm. **F)** Índice de reatividade do biossensor obtido do peptídeo Biotina-C3 contra soro de pacientes com CM LA categorizados de acordo com o *status* de p53: LA p53+ (n=6) e LA p53- (n=6), e **G)** Índice de reatividade do biossensor obtido do peptídeo Biotina-C3 contra soro de pacientes com CM LB categorizados de acordo com o *status* de HER-2: LB HER2+ (n=6) e LB HER2- (n=6). **H)** Curva ROC (LA p53+ x LA p53- em Biossensor). **I)** Curva ROC (LB HER2+ x LB HER2- em Biossensor). A significância estatística foi calculada usando o teste de Mann Whitney. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****). Fonte: Próprio autor.

5. Considerações Finais

Os peptídeos Biotina-C3 e Biotina-H2, selecionados por PD, ligam-se especificamente às células luminais de CM, podendo ser utilizados como interface de reconhecimento biológico em biossensores. Para isso, foi possível a modificação de eletrodos de carbono grafite com um polímero derivado de 3-3-AAFP. Com base em estudos eletroquímicos, um mecanismo de polimerização foi proposto e confirmado por FT-IR. Um biossensor foi desenvolvido pela imobilização dos peptídeos biotinilados Biotina-C3 e Biotina-H2 no sistema SPE/poli(3-3-AAFP)/avidina para a detecção de marcadores tumorais de CM em amostras sorológicas.

O biossensor com peptídeos sintéticos foi utilizado com sucesso para diferenciar soro de pacientes com CM de DBM. Além disso, o peptídeo Biotina-C3 caracterizou os tumores LA de acordo com o *status* de p53 e LB de acordo com a expressão de HER2. Após testes de otimização, reprodutibilidade e estabilidade, o biossensor apresentou resultados superiores em relação ao teste ELISA. A plataforma desenvolvida neste trabalho é uma estratégia de operação simples com excelente desempenho de ligação, que fornece uma nova alternativa para detecção de CM e caracterização molecular. Os experimentos futuros se concentrarão no estudo de um número maior de amostras anônimas, pois os peptídeos são elegíveis para entrar nos estudos de Fase II para avaliar a eficácia e segurança de novos testes de diagnóstico, bem como para ajudar a identificar e corrigir eventuais limitações dos testes antes de sua implementação em larga escala, tanto para o biossensor desenvolvido aqui, quanto para o teste ELISA.

Referências

- ALVES, R. DA F.; DA SILVA, A. G.; FERREIRA, L. F.; FRANCO, D. L. SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF A MATERIAL DERIVED FROM 4-MERCAPTOBENZOIC ACID: A NOVEL PLATFORM FOR OLIGONUCLEOTIDE IMMOBILIZATION. *TALANTA*, [S. L.], v. 165, n. DECEMBER 2016, p. 69–75, 2017.
- ALVES, R. DA F.; FRANCO, D. L.; CORDEIRO, M. T.; DE OLIVEIRA, E. M.; FIREMAN DUTRA, R. A.; DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR, M. NOVEL ELECTROCHEMICAL GENOSENSOR FOR ZIKA VIRUS BASED ON A POLY-(3-AMINO-4-HYDROXYBENZOIC ACID)-MODIFIED PENCIL CARBON GRAPHITE ELECTRODE. *SENSORS AND ACTUATORS B: CHEMICAL*, [S. L.], v. 296, p. 126681, 2019.
- AYDIN, E. B.; AYDIN, M.; SEZGINTÜRK, M. K. HIGHLY SENSITIVE ELECTROCHEMICAL IMMUNOSENSOR BASED ON POLYTHIOPHENE POLYMER WITH DENSELY POPULATED CARBOXYL GROUPS AS IMMOBILIZATION MATRIX FOR DETECTION OF INTERLEUKIN 1B IN HUMAN SERUM AND SALIVA. *SENSORS AND ACTUATORS B: CHEMICAL*, [S. L.], v. 270, p. 18–27, 2018.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. *ELECTROCHEMICAL METHODS: FUNDAMENTALS AND APPLICATIONS*, NEW YORK: WILEY, 2001, 2ND ED. *RUSSIAN JOURNAL OF ELECTROCHEMISTRY*, [S. L.], v. 38, n. 12, p. 1364–1365, 2002.
- BENYOUCEF, A.; HUERTA, F.; FERRAHI, M. I.; MORALLON, E. VOLTAMMETRIC AND IN SITU FT-IRS STUDY OF THE ELECTROPOLYMERIZATION OF O-AMINO BENZOIC ACID AT GOLD AND GRAPHITE CARBON ELECTRODES: INFLUENCE OF PH ON THE ELECTROCHEMICAL BEHAVIOUR OF POLYMER FILMS. *JOURNAL OF ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY*, [S. L.], v. 624, n. 1, p. 245–250, 2008.
- BOLLELLA, P.; BOEVA, Z.; LATONEN, R.-M.; KANO, K.; GORTON, L.; BOBACKA, J. HIGHLY SENSITIVE AND STABLE FRUCTOSE SELF-POWERED BIOSENSOR BASED ON A SELF-CHARGING BIOSUPERCAPACITOR. *BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS*, [S. L.], v. 176, p. 112909, 2021.
- BRADLEY, R. ET AL. TRASTUZUMAB FOR EARLY-STAGE, HER2-POSITIVE BREAST CANCER: A META-ANALYSIS OF 13 864 WOMEN IN SEVEN RANDOMISED TRIALS. *THE LANCET ONCOLOGY*, [S. L.], v. 22, n. 8, p. 1139–1150, 2021.
- CHEMAXON. CHEMICALIZE - INSTANT CHEMINFORMATICS SOLUTIONS. 2020. DISPONÍVEL EM:
<[HTTPS://CHEMICALIZE.COM/APP/CALCULATION/NC1%3DCC\(CCC\(O\)%3DO\)%3DCC%3DC1%7CLP%3A0%3A1%2C7%3A2%2C8%3A2%7C](https://chemicalize.com/app/calculation/NC1%3DCC(CCC(O)%3DO)%3DCC%3DC1%7CLP%3A0%3A1%2C7%3A2%2C8%3A2%7C)>. ACESSO EM: 15 JUL. 2020.
- CHEN, L.; KÄTELHÖN, E.; COMPTON, R. G. PARTICLE-MODIFIED ELECTRODES: GENERAL MASS TRANSPORT THEORY, EXPERIMENTAL VALIDATION, AND THE ROLE OF ELECTROSTATICS. *APPLIED MATERIALS TODAY*, [S. L.], v. 18, p. 100480, 2020.
- CORDEIRO, T. A. R.; MARTINS, H. R.; FRANCO, D. L.; SANTOS, F. L. N.; CELEDON, P. A. F.; CANTUÁRIA, V. L.; DE LANA, M.; REIS, A. B.; FERREIRA, L. F. IMPEDIMETRIC IMMUNOSENSOR FOR RAPID AND SIMULTANEOUS DETECTION OF CHAGAS AND VISCERAL LEISHMANIASIS FOR POINT OF CARE DIAGNOSIS. *BIOSENSORS AND*

Referências

BIOELECTRONICS, [S. L.], v. 169, p. 112573, 2020.

DA FONSECA ALVES, R.; MARTINS, I. C.; FRANCO, D. L.; SILVA, A. DAS G.; DE SOUZA SANTOS, P.; GOULART, L. R.; CRISTINA DE PAIVA MAIA, Y.; FARIA SILVA, A. T.; GONÇALVES ARAÚJO, T.; DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR, M. A. NOVEL PEPTIDE-BASED ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR FOR BREAST CANCER CHARACTERIZATION OVER A POLY 3-(3-AMINOPHENYL) PROPIONIC ACID MATRIX. BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, [S. L.], v. 205, p. 114081, 2022.

DING, S.-J.; CHANG, B.-W.; WU, C.-C.; LAI, M.-F.; CHANG, H.-C. ELECTROCHEMICAL EVALUATION OF AVIDIN-BIOTIN INTERACTION ON SELF-ASSEMBLED GOLD ELECTRODES. ELECTROCHIMICA ACTA, [S. L.], v. 50, n. 18, p. 3660–3666, 2005.

DONALD L. PAVIA, GARY M. LAMPMAN, GEORGE S. KRIZ, J. A. V. INTRODUCTION TO SPECTROSCOPY. [S.L.: S.N.]. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://BOOKS.GOOGLE.COM.BR/BOOKS?ID=N-ZKAGAAQBAJ&PRINTSEC=FRONTCOVER&DQ=INTRODUCTION+TO+SPECTROSCOPY&HL=PT-BR&SA=X&VED=0AHUKEwi4NO7i3CROAHWxH7kGHSYABMMQ6AEINTAB#v=ONEPAGE&Q=INTRODUCTION+TO+SPECTROSCOPY&F=FALSE](https://books.google.com.br/books?id=N-ZKAGAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=introduction+to+spectroscopy&hl=pt-br&sa=X&ved=0AHUKEwi4NO7i3CROAHWxH7kGHSYABMMQ6AEINTAB#v=onepage&q=introduction+to+spectroscopy&f=false)>. ACESSO EM: 2 ABR. 2020.

EROLE, P.; BOSCH, A.; PÉREZ-FIDALGO, J. A.; LLUCH, A. MOLECULAR BIOLOGY IN BREAST CANCER: INTRINSIC SUBTYPES AND SIGNALING PATHWAYS. CANCER TREATMENT REVIEWS, NETHERLANDS, v. 38, n. 6, p. 698–707, 2012.

ESCOBAR, V.; SCARAMOZZINO, N.; VIDIC, J.; BUHOT, A.; MATHEY, R.; CHAIX, C.; HOU, Y. RECENT ADVANCES ON PEPTIDE-BASED BIOSENSORS AND ELECTRONIC NOSES FOR FOODBORNE PATHOGEN DETECTION. BIOSENSORS, [S. L.], v. 13, n. 2, p. 258, 2023.

FLAUZINO, J. M. R.; PERES, R. C. S.; ALVES, L. M.; VIEIRA, J. G.; DOS SANTOS, J. G.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. DNA ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR FOR DETECTION OF ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS UTILIZING HOECHST 33258 AS INDICATOR. BIOELECTROCHEMISTRY, [S. L.], v. 140, p. 107801, 2021.

FUEYO-GONZÁLEZ, F.; HERRANZ, R.; PLESSELOVA, S.; GIRON, M. D.; SALTO, R.; PAREDES, J. M.; ORTE, A.; MORRIS, M. C.; GONZÁLEZ-VERA, J. A. QUINOLIMIDE-BASED PEPTIDE BIOSENSOR FOR PROBING P25 IN VITRO AND IN LIVING CELLS. SENSORS AND ACTUATORS B: CHEMICAL, [S. L.], v. 339, p. 129929, 2021.

GALUS, Z. FUNDAMENTALS OF ELECTROCHEMICAL ANALYSIS. [S.L.] : HALSTED PRESS, 1976.

GAO, J. J.; SWAIN, S. M. LUMINAL A BREAST CANCER AND MOLECULAR ASSAYS: A REVIEW. THE ONCOLOGIST, [S. L.], v. 23, n. 5, p. 556–565, 2018.

HARBECK, N.; PENAULT-LLORCA, F.; CORTES, J.; GNANT, M.; HOUSSAMI, N.; POORTMANS, P.; RUDDY, K.; TSANG, J.; CARDOSO, F. BREAST CANCER. NATURE REVIEWS DISEASE PRIMERS, [S. L.], v. 5, n. 1, p. 66, 2019.

HEALY, D. A.; HAYES, C. J.; LEONARD, P.; MCKENNA, L.; O'KENNEDY, R. BIOSENSOR DEVELOPMENTS: APPLICATION TO PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN DETECTION. TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, [S. L.], v. 25, n. 3, p. 125–131, 2007.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. CANCER TODAY.

Referências

2020. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.IARC.WHO.INT/CANCER-TYPE/BREAST-CANCER/](https://www.iarc.who.int/cancer-type/breast-cancer/)>. ACESSO EM: 26 MAR. 2023.

INCA, 2021. TIPOS DE CÂNCER | INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. 2022. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.GOV.BR/INCA/PT-BR/ASSUNTOS/CANCER/O-QUE-E-CANCER](https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer)>. ACESSO EM: 26 MAR. 2023.

KAYA, H. O.; CETIN, A. E.; AZIMZADEH, M.; TOPKAYA, S. N. PATHOGEN DETECTION WITH ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS: ADVANTAGES, CHALLENGES AND FUTURE PERSPECTIVES. JOURNAL OF ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY, [S. L.], v. 882, p. 114989, 2021.

KENNECKE, H.; YERUSHALMI, R.; WOODS, R.; CHEANG, M. C. U.; VODUC, D.; SPEERS, C. H.; NIELSEN, T. O.; GELMON, K. METASTATIC BEHAVIOR OF BREAST CANCER SUBTYPES. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY : OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, UNITED STATES, v. 28, n. 20, p. 3271–3277, 2010.

KULABHUSAN, P. K.; RAJWADE, J. M.; SAHUL HAMEED, A. S.; PAKNIKAR, K. M. LATERAL FLOW ASSAY FOR RAPID DETECTION OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV) USING A PHAGE-DISPLAYED PEPTIDE AS BIO-RECOGNITION PROBE. APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, [S. L.], v. 101, n. 11, p. 4459–4469, 2017.

KUMAR, P.; AGGARWAL, R. AN OVERVIEW OF TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER. ARCHIVES OF GYNECOLOGY AND OBSTETRICS, GERMANY, v. 293, n. 2, p. 247–269, 2016.

LAVIRON, E. GENERAL EXPRESSION OF THE LINEAR POTENTIAL SWEEP VOLTAMMOGRAM IN THE CASE OF DIFFUSIONLESS ELECTROCHEMICAL SYSTEMS. JOURNAL OF ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY AND INTERFACIAL ELECTROCHEMISTRY, [S. L.], v. 101, n. 1, p. 19–28, 1979.

LEE, S.-J.; ANANDAN, V.; ZHANG, G. ELECTROCHEMICAL FABRICATION AND EVALUATION OF HIGHLY SENSITIVE NANOROD-MODIFIED ELECTRODES FOR A BIOTIN/AVIDIN SYSTEM. BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, [S. L.], v. 23, n. 7, p. 1117–1124, 2008.

LUKKARI, J.; KLEEMOLA, K.; MERETOJA, M.; OLLONQVIST, T.; KANKARE, J. ELECTROCHEMICAL POST-SELF-ASSEMBLY TRANSFORMATION OF 4-AMINOTHIOPHENOL MONOLAYERS ON GOLD ELECTRODES. LANGMUIR, [S. L.], v. 14, n. 7, p. 1705–1715, 1998.

MATTOSO, L. H. C. POLIANILINAS: SÍNTESE, ESTRUTURA E PROPRIEDADES. QUÍMICA NOVA, [S. L.], v. 19(4), p. 1–12, 1996.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; UR REHMAN, DR. I. FOURIER TRANSFORM INFRARED (FTIR) SPECTROSCOPY OF BIOLOGICAL TISSUES. APPLIED SPECTROSCOPY REVIEWS, [S. L.], v. 43, n. 2, p. 134–179, 2008.

MURRAY, R. W.; EWING, A. G.; DURST, R. A. CHEMICALLY MODIFIED ELECTRODES. MOLECULAR DESIGN FOR ELECTROANALYSIS. ANALYTICAL CHEMISTRY, [S. L.], v. 59, n. 5, p. 379A-390A, 1987.

NASCIMENTO, F.; PITTA, M.; RÊGO, M. ANÁLISE DOS PRINCIPAIS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE CÂNCER DE MAMA COMO PROPULSORES NO PROCESSO INOVATIVO. ARQUIVOS DE MEDICINA, [S. L.], v. 29, p. 153–159, 2015.

Referências

NATIONAL CANCER INSTITUTION. FINANCIAL BURDEN OF CANCER CARE | CANCER TRENDS PROGRESS REPORT, 2021. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://PROGRESSREPORT.CANCER.GOV/AFTER/ECONOMIC_BURDEN](https://progressreport.cancer.gov/after/economic_burden)>. ACESSO EM: 24 DEZ. 2021.

PARK, M. SURFACE DISPLAY TECHNOLOGY FOR BIOSENSOR APPLICATIONS: A REVIEW. SENSORS, [S. L.], v. 20, n. 10, 2020. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.MDPI.COM/1424-8220/20/10/2775](https://www.mdpi.com/1424-8220/20/10/2775)>

PELLISSIER, M.; BARRIÈRE, F.; DOWNARD, A. J.; LEECH, D. IMPROVED STABILITY OF REDOX ENZYME LAYERS ON GLASSY CARBON ELECTRODES VIA COVALENT GRAFTING. ELECTROCHEMISTRY COMMUNICATIONS, [S. L.], v. 10, n. 6, p. 835–838, 2008.

PEROU, C. M.; SØRLIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; REES, C. A.; POLLACK, J. R.; ROSS, D. T.; JOHNSEN, H.; AKSLEN, L. A.; FLUGE, Ø.; PERGAMENSCHIKOV, A.; WILLIAMS, C.; ZHU, S. X.; LØNNING, P. E.; BØRRESEN-DALE, A.-L.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. MOLECULAR PORTRAITS OF HUMAN BREAST TUMOURS. NATURE, [S. L.], v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000.

PROVENZANO, E.; ULANER, G. A.; CHIN, S.-F. MOLECULAR CLASSIFICATION OF BREAST CANCER. PET CLINICS, [S. L.], v. 13, n. 3, p. 325–338, 2018.

QI, X.; WANG, S.; JIANG, Y.; LIU, P.; HAO, W.; HAN, J.; ZHOU, Y.; HUANG, X.; LIANG, P. ADDITIONAL POLYPYRROLE AS CONDUCTIVE MEDIUM IN ARTIFICIAL ELECTROCHEMICALLY ACTIVE BIOFILM (EAB) TO INCREASE THE SENSITIVITY OF EAB BASED BIOSENSOR IN WATER QUALITY EARLY-WARNING. BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, [S. L.], v. 190, p. 113453, 2021.

RAHBARNIA, L.; FARAJNIA, S.; BABAEI, H.; MAJIDI, J.; VEISI, K.; AHMADZADEH, V.; AKBARI, B. EVOLUTION OF PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY: FROM DISCOVERY TO APPLICATION. JOURNAL OF DRUG TARGETING, [S. L.], v. 25, n. 3, p. 216–224, 2017.

RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S.; BAEHNER, F.; DABBS, D. J.; DECKER, T.; EUSEBI, V.; FOX, S. B.; ICHIHARA, S.; JACQUEMIER, J.; LAKHANI, S. R. BREAST CANCER PROGNOSTIC CLASSIFICATION IN THE MOLECULAR ERA: THE ROLE OF HISTOLOGICAL GRADE. BREAST CANCER RESEARCH, [S. L.], v. 12, n. 4, p. 1–12, 2010.

ROSTAMI, A.; OMRANI, A.; HAMEDIAN, N. FLOWER-LIKE MORPHOLOGY OF POLY(M-AMINOBENZOIC ACID) DEPOSITED AT GC SURFACE IN THE PRESENCE OF SILICA NANOPARTICLES: ELECTROPOLYMERIZATION AND CHARACTERIZATION. MONATSSHEFTE FÜR CHEMIE - CHEMICAL MONTHLY, [S. L.], v. 144, n. 12, p. 1775–1782, 2013.

SANTOS, C. DA C.; PIMENTA, T. C.; THOMASINI, R. L.; VERLY, R. M.; FRANCO, D. L.; FERREIRA, L. F. ELECTROPOLYMERIZATION OF PHENOL AND ANILINE DERIVATIVES: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND APPLICATION AS ELECTROCHEMICAL TRANSDUCERS. JOURNAL OF ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY, [S. L.], v. 846, p. 113163, 2019.

SMITH, G. P. FILAMENTOUS FUSION PHAGE: NOVEL EXPRESSION VECTORS THAT DISPLAY CLONED ANTIGENS ON THE VIRION SURFACE. SCIENCE, [S. L.], v. 228, n. 4705, p. 1315–1317, 1985.

SOARES, I. P.; DA SILVA, A. G.; DA FONSECA ALVES, R.; DE SOUZA CORRÊA, R. A. M.; FERREIRA, L. F.; FRANCO, D. L. ELECTROCHEMICAL ENZYMATIC BIOSENSOR FOR

Referências

TYRAMINE BASED ON POLYMERIC MATRIX DERIVED FROM 4-MERCAPTOPHENYLACETIC ACID. JOURNAL OF SOLID STATE ELECTROCHEMISTRY, [S. L.], v. 23, n. 3, p. 985–995, 2019.

SØRLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J. C.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D.; LØNNING, P. E.; BØRRESEN-DALE, A. L. GENE EXPRESSION PATTERNS OF BREAST CARCINOMAS DISTINGUISH TUMOR SUBCLASSES WITH CLINICAL IMPLICATIONS. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, [S. L.], v. 98, n. 19, p. 10869–10874, 2001.

STÉFANNE E SILVA, T.; SOARES, I. P.; GONÇALVES LACERDA, L. R.; REIS CORDEIRO, T. A.; FERREIRA, L. F.; FRANCO, D. L. ELECTROCHEMICAL MODIFICATION OF ELECTRODES WITH POLYMERS DERIVED FROM OF HYDROXYBENZOIC ACID ISOMERS: OPTIMIZED PLATFORMS FOR AN ALKALINE PHOSPHATASE BIOSENSOR FOR PESTICIDE DETECTION. MATERIALS CHEMISTRY AND PHYSICS, [S. L.], v. 252, p. 123221, 2020.

SUO, S.; WANG, X.; ZARLENGA, D.; BU, R.; REN, Y.; REN, X. PHAGE DISPLAY FOR IDENTIFYING PEPTIDES THAT BIND THE SPIKE PROTEIN OF TRANSMISSIBLE GASTROENTERITIS VIRUS AND POSSESS DIAGNOSTIC POTENTIAL. VIRUS GENES, [S. L.], v. 51, n. 1, p. 51–56, 2015.

TAN, Y.; TIAN, T.; LIU, W.; ZHU, Z.; J. YANG, C. ADVANCE IN PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY FOR BIOANALYSIS. BIOTECHNOLOGY JOURNAL, [S. L.], v. 11, n. 6, p. 732–745, 2016.

TOMŠÍK, E.; DALLAS, P.; ŠEDĚNKOVÁ, I.; SVOBODA, J.; HRUBÝ, M. ELECTROCHEMICAL DEPOSITION OF HIGHLY HYDROPHOBIC PERFLUORINATED POLYANILINE FILM FOR BIOSENSOR APPLICATIONS. RSC ADV., [S. L.], v. 11, n. 31, p. 18852–18859, 2021.

VULCZAK, A.; ALBERICI, L. C.; BISSON, G. S. EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBICO DE INTENSIDADE MODERADA REDUZ A VELOCIDADE DE CRESCIMENTO E MODULA O METABOLISMO ENERGÉTICO TUMORAL EM MODELO EXPERIMENTAL DE CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO, 2018. DISPONÍVEL EM: <HTTP://WWW.TESES.USP.BR/TESES/DISPONIVEIS/22/22133/TDE-27032019-155119/ PP - RIBEIRÃO PRETO>

WANG, J. ELECTROCHEMICAL NUCLEIC ACID BIOSENSORS. ANALYTICA CHIMICA ACTA, [S. L.], v. 469, n. 1, p. 63–71, 2002.

WANG, S.; MA, Y.; WANG, Y.; JIAO, M.; LUO, X.; CUI, M. ONE-STEP ELECTRODEPOSITION OF POLY(M-AMINOBENZOIC ACID) MEMBRANE DECORATED WITH PEPTIDE FOR ANTIFOULING BIOSENSING OF IMMUNOGLOBULIN E. COLLOIDS AND SURFACES B: BIOINTERFACES, [S. L.], v. 186, p. 110706, 2020.

WANG, Y.; GUO, H.; YUAN, M.; YU, J.; WANG, Z.; CHEN, X. ONE-STEP LASER SYNTHESIS PLATINUM NANOSTRUCTURED 3D POROUS GRAPHENE: A FLEXIBLE DUAL-FUNCTIONAL ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR FOR GLUCOSE AND PH DETECTION IN HUMAN PERSPIRATION. TALANTA, [S. L.], v. 257, p. 124362, 2023.

WEIGELT, B.; GEYER, F. C.; REIS-FILHO, J. S. HISTOLOGICAL TYPES OF BREAST CANCER: HOW SPECIAL ARE THEY? MOLECULAR ONCOLOGY, [S. L.], v. 4, n. 3, p. 192–208, 2010.

Capítulo III

**Detecção de exossomos de câncer de
mama baseada em peptídeo recombinante
selecionado por *Phage Display***

1. *Introdução*

O CM é o tumor mais incidente na população mundial, sendo a principal causa de morte pela doença em mulheres (SUNG et al., 2021). Foram contabilizados mais de 2,2 milhões de casos e cerca de 685 000 mortes em 2020 (WHO, 2023) e, para 2040, são esperados, a cada ano, um aumento de 3 milhões de novos diagnósticos e mais de 1 milhão de mortes (ARNOLD et al., 2022). O diagnóstico é rotineiramente baseado em técnicas de imagem, como mamografia, ultrassonografia e/ou tomografia computadorizada, os quais exigem o uso de instrumentação onerosa e pessoal treinado, estando disponíveis apenas em instalações hospitalares. Assim, os dados epidemiológicos evidenciam as diferenças socioeconômicas e o acesso populacional ao sistema de saúde, com situação alarmante em países de média e baixa rendas, onde o diagnóstico tardio é mais prevalente, com altas taxas de mortalidade (WHO, 2023). De fato, é premente a necessidade de se desenvolver estratégias rápidas de diagnóstico e monitoramento, visando sua aplicação não somente em centros de atenção primária à saúde, como também no leito de pacientes acometidos pela doença, otimizando seu acompanhamento (BERNABÉ-ORTIZ et al., 2021). Nesse sentido, exossomos têm se apresentado como biomarcadores interessantes, uma vez que são encontrados em amostras de fácil acesso, viabilizando sua aplicação clínica em doenças neurodegenerativas (GAO et al., 2021; SAEEDI et al., 2019) e no câncer (KELLER et al., 2011; WENG et al., 2021; YU et al., 2022, 2021)

Exossomos são um subconjunto de pequenas vesículas extracelulares (30-200 nm) de origem endossomal, naturalmente liberadas pelas células (GURUNG et al., 2021; THÉRY et al., 2018). Sua principal função biológica está relacionada aos mecanismos de comunicação intercelular, permitindo o transporte de proteínas biologicamente ativas, biomoléculas e ácidos nucleicos para as células receptoras (MATHIEU et al., 2019; VALADI et al., 2007). Os exossomos podem ser encontrados em diferentes fluidos biológicos, como sangue (JOHNSEN et al., 2019), soro e plasma, urina, suor ou leite materno (CAPPELLO et al., 2017). Sua composição bioquímica é altamente complexa e inclui proteínas, lipídeos, mRNA e ncRNAs. Sua biogênese endossomal (GURUNG et al., 2021; MATHIEU et al., 2019) lhes confere uma

Introdução

composição distinta de suas células progenitoras, o que torna necessário o estudo de sua caracterização molecular. Em relação aos biomarcadores de membrana, algumas proteínas como as tetraspaninas (CD9, CD63 e CD81) são amplamente utilizadas (ANDREU; YÁÑEZ-MÓ, 2014; THÉRY et al., 2018), embora também encontradas em membranas celulares (HEMLER, 2003).

O tamanho nanométrico dos exossomos demanda alternativas para sua aplicação bioanalítica orientada para células e micropartículas como suporte sólido têm sido exploradas. Como exemplo, a citometria de fluxo baseada em esferas (PALLARES-RUSIÑOL et al., 2023; VOLGERS et al., 2017), utilizando exossomos imobilizados em partículas magnéticas (MOURA et al., 2020) ou poliméricas (LOZANO-RAMOS et al., 2015) é atualmente utilizada como o método padrão para a análise de receptores de proteínas de exossomos. Kits comerciais também estão disponíveis com base nesse conceito, como MACSPlex (Milteny Biotec, NW, DE) ou Painel Human ProcartaPlex™ 6-Plex para Caracterização de Exossomos por Luminex (Thermo Fisher Scientific, MA, US). Esses métodos bioanalíticos multiplexados e de alto rendimento exigem o uso de instrumentação especializada, onerosa e de bancada (ou seja, citômetro, leitor Luminex), impedindo, assim, a sua implementação em ambientes com recursos limitados.

O ensaio ELISA também é rotineiramente usado como uma ferramenta padrão e versátil para a quantificação de exossomos em biofluidos. (HARTJES et al., 2019; PALLARES-RUSIÑOL et al., 2023). Além disso, a separação imunomagnética na etapa de pré-concentração e purificação confere mais potencialidade e versatilidade à técnica, denominada, assim, magneto-ELISA. O uso de partículas magnéticas (MPs) modificadas com anticorpos em imunoensaios aumenta a eficiência de captura graças à sua maior mobilidade, simplificando também o protocolo experimental (LOGOZZI et al., 2020). Estudos anteriores demonstraram a aplicação do magneto-ELISA na quantificação de exossomos com MPs modificadas com anticorpos (MOURA et al., 2020), aptâmeros (CHENG et al., 2022; DONG et al., 2018), sondas lipídicas (WAN et al., 2017; YANG et al., 2019) ou polímeros molecularmente impressos (YANG et al., 2021). Nesse contexto, os peptídeos surgem como uma alternativa aos anticorpos, uma vez que apresentam menor custo e maior estabilidade. Desde a descoberta do PD por Smith e Winter (SMITH, 1985), esta técnica tem sido empregada na triagem de novos ligantes com alta afinidade e especificidade para um alvo de interesse (PANDE; SZEWCZYK; GROVER, 2010; ZAMBRANO-MILA; BLACIO; VISPO, 2020).

Introdução

O PD tem se mostrado valioso na identificação de bioreceptores para aplicações em biossensores (ESCOBAR et al., 2023; PELTOMAA et al., 2019; XU et al., 2021b) e para a caracterização de exossomos (MAISANO et al., 2022)

No presente estudo, investigamos a aplicação de um peptídeo selecionado por PD na identificação seletiva de exossomos de CM derivados das linhagens celulares MCF-7, MDA-MB231 e SKBr3. Este peptídeo foi anteriormente selecionado e caracterizado, se mostrando promissor ao diferenciar amostras de soro humano de pacientes com Doença Benigna da Mama (DBM) e com CM, utilizando biossensor eletroquímico (DA FONSECA ALVES et al., 2022).

Foi inicialmente conduzido um estudo proteômico para identificar possíveis alvos do peptídeo Biotina-C3 na superfície das membranas de exossomos da linhagem MCF7. A ligação do peptídeo aos exossomos foi validada por citometria de fluxo utilizando MPs. Em seguida, um ensaio de magneto-ELISA foi realizado com o peptídeo Biotina-C3 como sonda de detecção, capturando exossomos com MPs modificadas com anticorpos anti-CD63. Finalmente, um biossensor eletroquímico também foi testado a partir do mesmo desenho experimental, a fim de detectar e quantificar exossomos derivados de CM.

2. Objetivos

O objetivo principal consistiu em investigar a aplicação de um peptídeo selecionado por PD na caracterização e detecção seletiva de exossomos de CM derivados das linhagens celulares MCF-7, MDA-MB231 e SKBr3.

3. Material e Métodos

3.1 Reagentes e equipamento

Partículas magnéticas (MPs) Tosilativadas (Dynabeads M450 Tosilativadas) adquiridas da Thermo Fisher Scientific. A estreptavidina marcada com Cy5 (strep-Cy5) foi adquirida da Thermo Fisher Scientific. Para a quantificação ELISA, Poly-HRP Streptavidin (polyHRP-strep) e kit de substrato Pierce TMB foram adquiridos da Thermo Fisher Scientific. Para a quantificação da proteína, o kit Pierce BCA Protein Assay foi adquirido da Thermo Fisher Scientific. Para lise celular e extração de proteínas, o reagente NE-PER também foi adquirido da Thermo Fisher Scientific. Para a cultura celular, o meio Dulbecco's Modified Eagle's Glutamax (DMEM) e soro bovino fetal (FBS) foram adquiridos da Gibco (Thermo Fisher Scientific). A composição de todos os tampões e soluções: fosfato de sódio dibásico fosfato de potássio dibásico, cloreto de sódio, cloreto de potássio, ácido bórico, glicina e albumina de soro bovino (BSA), foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Merck KGaA, DE). Carbonato de sódio foi adquirido da Panreac (ES), hidroquinona, peróxido de hidrogênio, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) Tween 20 foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Merck KGaA, DE). Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura MilliQ (Millipore® System, resistividade 18,2 MΩ·cm a 25 °C).

3.2 Cultura de células

As linhagens celulares de CM MCF-7 (RE e RP positivas), MDA-MB231 (TN) e SKBr3 (HER2 positiva) foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC) e a linhagem de fibroblastos MRC-5 foi utilizada como controle negativo. A expansão da população celular foi realizada a partir de 5×10^6 células em uma flaconete T-175 contendo 35 mL de meio de cultura DMEM (Modificado de Eagle com Glutamax), exceto para a cepa MRC-5, que utilizou o meio DMEM- α . Os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino deplecionado de exossomos e 100 U mL⁻¹ de penicilina-estreptomicina. A temperatura foi mantida a 37°C em uma

Material e Métodos

atmosfera de CO₂ concentrado e umidade controlada (5%). Uma vez que as células atingiram aproximadamente 95% de confluência no frasco T-175, o sobrenadante do cultivo foi removido e armazenado a -20°C até o isolamento dos exossomos.

3.3 Extração de proteínas

As proteínas da linhagem celular MCF-7 foram extraídas usando o Kit de Reagentes NE-PER™ Nuclear e Citoplasmático (Thermo Fisher Scientific™), de acordo com as recomendações do fabricante. O sobrenadante do extrato de membrana e citoplasma foi quantificado pelo método BCA (Ensaio de Proteína Pierce™ BCA, Thermo Fisher Scientific) e armazenado a -80°C até o uso

3.4 Imunoprecipitação e Sequenciamento de Proteínas

O peptídeo Biotina-C3 foi imobilizado em MPs (strep-MPs, Dynabeads MyOne Streptavidin T1, Thermo Fisher Scientific™) para captura de proteínas. Foram lavados três vezes 150 µL de strep-MPs (0,1 mg µL⁻¹) com 150 µL de tampão fosfato salino (PBS) 1x pH 7,4 (10 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,8 mM K₂HPO₄), usando um suporte de separação magnética. Em seguida, 2,0 µg de Biotina-C3 foram adicionados e mantidos sob agitação suave por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com 150 µL de PBS 1x pH 7,4. Então, 400 µg do extrato proteico da linhagem celular MCF-7 foram adicionados até um volume final de 500 µL e mantidos sob agitação suave por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, foram levados para o separador magnético e lavados três vezes com 500 µL de PBS 1x pH 7,4.

As proteínas isoladas foram eluídas em 500 µL de glicina 0,2 M pH 2,2, sob agitação suave à temperatura ambiente por 1 hora e, em seguida, conduzidas ao separador magnético. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e neutralizado com 0,05% de ácido trifluoroacético (TFA). O mesmo procedimento foi realizado, exceto pela adição do peptídeo Biotina-C3, para obter uma amostra controle para comparação. As amostras foram congeladas a -80 °C e posteriormente sequenciadas por espectroscopia de massas.

3.5 Digestão em solução e análise LC-MS/MS

Material e Métodos

As amostras (100 μL) foram evaporadas até secar em um *speed-vac*. Após resuspensão em 100 μL de bicarbonato de amônio 20 mM, foram digeridas em solução com tripsina. Os peptídeos digeridos foram analisados em um espectrômetro de massas. Cada amostra foi carregada em quantidades equivalentes a 125 ng (amostra em branco) e 500 ng (MCF-7) no sistema cromatográfico ACQUITY UPLC M-Class, composto por uma coluna de armadilha C18 nanoEase M/Z Symmetry de 180 μm x 20 mm (Waters) conectada a uma coluna nanoEase M/Z HSS C18 T3 de 75 μm x 100 mm (Waters). A temperatura da coluna LC foi definida em 40 °C, a separação foi realizada a 0,5 $\mu\text{L min}^{-1}$ em um gradiente de acetonitrila de 120 minutos, variando de 3% a 40% (solvente A: ácido fórmico 0,1%, solvente B: acetonitrila 0,1% ácido fórmico, consulte a **Tabela 1**).

Tabela 1. Gradiente UPLC

Tempo (min)	% B
0	2
5	7
90	40
93	85
98	85
100	2
120	2

O sistema de MS usado foi um LTQ *Orbitrap Velos* (Thermo Fisher Scientific™) equipado com uma fonte de íons nanoESI. O MS foi operado no modo de íons positivos com uma voltagem de spray de 1,8 kV. A análise espectrométrica foi realizada em modo dependente de dados, adquirindo uma varredura completa seguida de 10 varreduras MS/MS dos 10 sinais mais intensos detectados na varredura MS da lista global. A varredura completa do MS (faixa de 400-1600 m/z) foi adquirida no Orbitrap com uma resolução de 60.000. Os espectros MS/MS foram obtidos no íons-trap linear.

Os espectros LC-MS/MS foram pesquisados usando o SEQUEST (Proteome Discoverer v1.4, Thermo Fisher Scientific™) com os seguintes parâmetros: tolerância

Material e Métodos

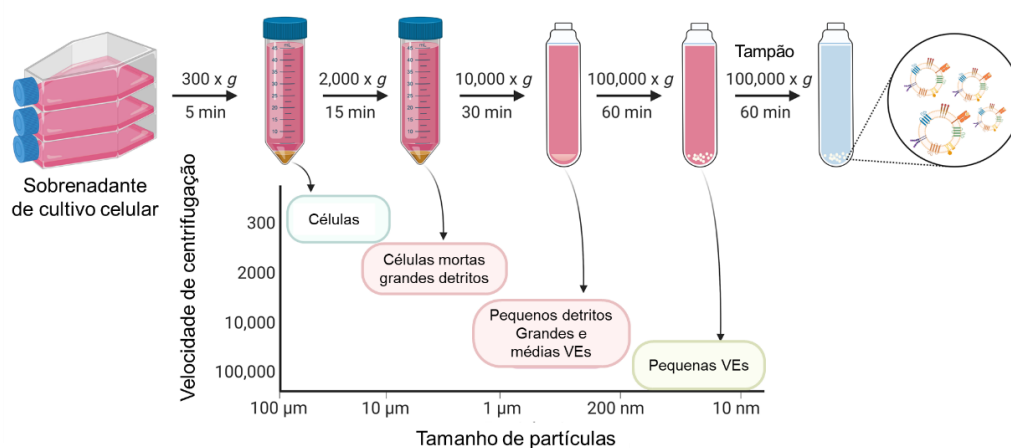
de massa de peptídeo de 20 ppm, tolerância de fragmento de 0,6 Da, a enzima definida como tripsina e permissão para até 2 clivagens perdidas, modificações dinâmicas de oxidação de metionina (+16 Da) e acetilação N-terminal (+42 Da) e modificação estática de carbamidometilação de cisteína (+57 Da). O banco de dados utilizado para a pesquisa foi criado pela combinação do banco de dados revisado humano (Uniprot 08/2022) e do banco de dados de contaminantes proteômicos (MaxQuant). Os resultados foram filtrados pelo rank de peptídeo 1, confiança de peptídeo alta (1% FDR) e rank de motor de busca 1.

3.6 Docking molecular da ligação proteína-proteína

Para simular o acoplamento de estruturas moleculares de proteínas com o peptídeo Biotina-C3 e para prever a afinidade de ligação dos complexos foi utilizado o servidor online HDock blind coupling (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>). Foi realizado o acoplamento macromolecular de modelos PDB de proteínas como receptores e com a sequência do peptídeo Biotina-C3 como ligante.

3.7 Isolamento e purificação de exossomos

Exossomos foram purificados do sobrenadante das linhagens de células de CM MCF-7, MDA-MB231, SKBr3 e da linhagem de células de fibroblastos MRC-5 por ultracentrifugação diferencial em cinco etapas, como descrito por (THÉRY et al., 2018), com pequenas modificações, como mostrado esquematicamente na **Figura 1**.



Material e Métodos

Figura 1. Esquema de isolamento de vesículas extracelulares (VEs) do sobrenadante de cultura de células de câncer de mama, utilizando ultracentrifugação diferencial. No sobrenadante da cultura de células, são aplicadas etapas de centrifugação sequenciais (400, 2.000, 10.000 e 100.000 x g) para separar as pequenas VEs, excluindo assim células, células mortas, detritos e VEs grandes e médias. Criado com BioRender.com.

Os exossomos foram centrifugados inicialmente a 400 g por 5 min (remoção de células em suspensão), 2000 g por 15 min e 10.000 g por 30 min (remoção de microvesículas e detritos celulares). Em seguida, usando um ultracentrífugo, os sobrenadantes foram ultracentrifugados a 100.000 g por 60 min. Finalmente, o sobrenadante foi descartado gentilmente e os precipitados contendo exossomos foram ressuspensos em PBS 1x filtrado por esterilização (0,22 µm), combinados e a ultracentrifugação foi repetida a 100.000 g. O precipitado resultante de exossomos foi ressuspendido em PBS 1x filtrado por esterilização (0,22 µm) (500 µL por 100 mL de sobrenadante de meio de partida) e armazenado a -20 °C. Todas as etapas de centrifugação e ultracentrifugação foram realizadas a uma temperatura de 4 °C.

3.8 Caracterização de exossomos por NTA

Os exossomos purificados foram diluídos em solução tampão PBS filtrada, entre 100 e 500 vezes dependendo da concentração inicial da amostra, para estimar a distribuição de tamanho e concentração de partículas por NTA utilizando o sistema NanoSight LM10-HS com laser ajustado a 405 nm (NanoSight Ltd., Amesbury, UK). O software NanoSight NTA analisou vídeos dos dados brutos em triplicata por 60 s a 25 frames s⁻¹.

3.9 Imobilização covalente de exossomos e anticorpos em partículas magnéticas

Para a imobilização de exossomos, foram utilizados dois métodos distintos. O primeiro envolveu a imobilização covalente direta de exossomos em partículas magnéticas, enquanto o segundo envolveu a imobilização covalente de anticorpos para uma separação imunomagnética adicional dos exossomos, conforme descrito a seguir:

i) Imobilização de exossomos: Os exossomos foram imobilizados utilizando

Material e Métodos

partículas superparamagnéticas Dynabeads® M450 tosylactivated. O método consistiu em adicionar $3,5 \times 10^{10}$ exossomos a $40 \mu\text{L}$ ($1,6 \times 10^7$ MPs) de Dynabeads® M450 tosilitivadas. Para melhorar a cinética da reação, um tampão de borato $0,1 \text{ M}$ pH 8,5 foi adicionado para garantir a reação nucleofílica pelo grupo amina. A etapa de incubação foi realizada durante a noite a 4°C com agitação suave. Após isso, uma solução de glicina $0,5 \text{ M}$ foi adicionada e incubada por 2 horas a 25°C para bloquear quaisquer grupos tosilitivados remanescentes. Em seguida, as MPs modificadas com exossomos foram ressuspensas em $160 \mu\text{L}$ de solução tampão PBS 10 mM para obter 1×10^6 MPs por $10 \mu\text{L}$. Curvas de calibração foram criadas utilizando 1×10^6 MPs por poço da placa e concentrações de exossomos variando de $3,9 \times 10^4$ a 2×10^7 exossomos μL^{-1} .

ii) Imobilização de anticorpos: Foram adicionados $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ de um anticorpo específico (antiCDX = antiCD9, antiCD63 e antiCD81, previamente otimizados) a $55 \mu\text{L}$ ($2,2 \times 10^7$ MPs) de Dynabeads® M450 tosilitivados. Para aumento da cinética de reação adicionou-se $0,1 \text{ M}$ de tampão borato pH 8,5. A etapa de incubação foi realizada durante a noite, a 37°C , com agitação suave. As MPs modificadas com anticorpos (anti-CD9, anti-CD63 e anti-CD81) foram então ressuspensas em $220 \mu\text{L}$ de solução tampão PBS 10 mM ($10 \mu\text{L}$ poço $^{-1}$ para obter 1×10^6 partículas poço $^{-1}$).

3.10 Caracterização de exossomos por citometria de fluxo utilizando partículas magnéticas

A citometria de fluxo foi utilizada para caracterizar a capacidade do peptídeo Biotina-C3 em reconhecer alvos presentes na membrana dos exossomos derivados das linhagens celulares de CM MCF-7, MDA-MB231 e SKBr3. Especificamente, o comportamento e a diferenciação de exossomos imobilizados diretamente em MPs ou capturados por receptores de tetraspanina CD9, CD63 e CD81 foram avaliados. Assim, os exossomos derivados de células foram primeiramente imobilizados em MPs (**Figura 5**) ou capturados por MPs modificadas com antiCD9 (**Figura 6**), antiCD63 (**Figura 7**) ou antiCD81(**Figura 8**), conforme detalhado no item 3.9. Em seguida, $100 \mu\text{L}$ de peptídeo Biotina-C3 ($2,0 \mu\text{g poço}^{-1}$) foi adicionado por 1 hora com agitação suave a 37°C e lavado três vezes com tampão Tris 1x ($0,1 \text{ mM}$ Tris-HCl, $0,15 \text{ mM}$ NaCl), pH 7,4, contendo $0,5\%$ BSA ($200 \mu\text{L poço}^{-1}$). Para detecção, $100 \mu\text{L}$ de strep-Cy5 ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram adicionados e incubados por 30 min no escuro com agitação

Material e Métodos

suave a 25 °C. Após a captura dos exossomos, as MPs modificadas foram ressuspensas em 200 µL de Tris 1x contendo 0,5% BSA. O processo de separação magnética foi realizado após cada etapa de incubação ou lavagem, posicionando um ímã, sob a placa de microtitulação até que os pellets de MPs se formassem no canto inferior, seguido da separação do sobrenadante.

3.11 magneto-ELISA

Foram utilizadas placas de microtitulação (96 poços) para o imunoensaio ativado por magnetismo. Os exossomos foram capturados usando MPs modificadas com anti-CD63 (antiCD63-MPs), contendo 1×10^6 antiCD63-MPs poço⁻¹ e 100 µL de exossomos variando as concentrações de 150 a $4,8 \times 10^6$ exossomos µL⁻¹, durante 30 min com agitação suave a 25 °C. Após a incubação, a solução foi descartada, e a placa foi lavada três vezes com 200 µL poço⁻¹ de solução de PBS 1x contendo 0,5% BSA (PBS-BSA). Em seguida, o peptídeo Biotina-C3 (2,0 µg poço⁻¹) diluído em solução PBS-BSA foi adicionado e incubado por 1 hora a 37 °C. Os poços foram então lavados três vezes com PBS-BSA. O complexo foi marcado por strep-polyHRP (100µL, 10 ng mL⁻¹) diluído em PBS-BSA e incubado por 1 hora a 37°C. Posteriormente, os poços foram lavados três vezes com PBS-BSA e o kit de substrato Pierce™ TMB foi adicionado (100 µL poço⁻¹) por 30 min a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 2,0 M H₂SO₄. Em seguida, o complexo de MPs foi separado usando um separador de placas magnéticas de 96 poços. Um precipitado no fundo do poço é formado, seguido pela separação do sobrenadante. A absorbância da solução foi lida em um leitor de microplacas a 450 nm. O processo de separação magnética foi realizado após cada etapa de incubação ou lavagem, posicionando um separador de placas magnéticas de 96 poços sob a placa de microtitulação até que os pellets se formassem no canto inferior, seguido pela separação do sobrenadante.

3.12 Biossensor eletroquímico

Para detecção eletroquímica, os exossomos (100 µL, variando a concentração de 150 a $4,8 \times 10^6$ exossomos µL⁻¹) foram incubados com antiCD63-MPs (contendo 1×10^6 antiCD63-MPs poço⁻¹) durante 30 min sob agitação suave a 25 °C, seguido de três lavagens com PBS-BSA e adição do peptídeo Biotina-C3 (2,0 µg poço⁻¹). O

Material e Métodos

complexo foi marcado por strep-polyHRP (100 μ L, 10 ng mL⁻¹) diluído em PBS-BSA e incubado por 1 hora a 37°C, seguido de três lavagens com PBS-BSA. Posteriormente, o precipitado de MPs foi transferido para a superfície de um eletrodo de trabalho magnético (eletrodos de carbono screen-printed DRP-110 da Dropsens), esse eletrodo é composto por tinta de carbono como eletrodo de trabalho (0,11 cm²), um eletrodo auxiliar de carbono e um eletrodo de pseudo-referência de Ag. Foi posicionado um ímã de neodímio de 3 mm de diâmetro abaixo do eletrodo de trabalho). A leitura amperométrica foi realizada utilizando um potencial de -0,12 V (vs pseudo-referência de Ag). Em tampão ePBS (0,1 M Na₂HPO₄, 0,1 M KCl, pH 7.0.) (150 μ L) na presença de peróxido de hidrogênio 2 mM, hidroquinona 2 mM, os eletrodos foram descartados a cada medida. Uma corrente estacionária reprodutível foi obtida após 40 s. A corrente catódica gerada pelo monitoramento das espécies de benzoquinona está diretamente relacionada com a quantidade de exossomos capturados. O processo de separação magnética foi realizado após cada etapa de incubação ou lavagem, posicionando um separador de placa magnética de 96 poços sob a placa de microtitulação até a formação de precipitados no canto inferior, seguido da separação do sobrenadante. Diferentes parâmetros do magneto-biossensor eletroquímico foram previamente otimizados por nosso grupo.

3.13 Abordagens de biossensoriamento para a detecção de exossomos em soro

Para a avaliação do efeito de matriz os exossomos purificados das linhagens celulares de CM MCF-7, MDA-MB231 e SKBr3 e de fibroblastos MRC-5, foram adicionados em soro humano (centrifugado a 20.000 g). Soro humano sem adição de exossomos foi usado como controle. Depois disso, um ensaio magneto-ELISA foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços e envolveu as seguintes etapas: Captura magnética dos exossomos com MPs modificadas com anti-CD63 (contendo 1 $\times$ 10⁶ MPs modificadas poço⁻¹) e os exossomos (100 μ L, nas concentrações 6,0 $\times$ 10⁵ e 4,8 $\times$ 10⁶ exossomos poço⁻¹), foram incubados simultaneamente por 30 min com agitação a 25 °C, seguido de três etapas de lavagem com PBS contendo 0,5% BSA (200 μ L). Em seguida foi adicionado o peptídeo Biotina-C3 (2,0 μ g poço⁻¹) diluído em solução PBS-BSA foi adicionado e incubado por 1 hora a 37 °C. Os poços foram então lavados três vezes com PBS-BSA. O complexo foi marcado por strep-polyHRP

Material e Métodos

(100 μ L, 10 ng mL⁻¹) diluído em PBS-BSA e incubado por 1 hora a 37°C. Os poços foram lavados três vezes com PBS-BSA. As etapas posteriores de análises do ensaio magneto-ELISA e biossensor eletroquímico foram realizadas como descrito nos itens 3.11 e 3.12

3.14 Análise estatística

Os dados das curvas analíticas foram ajustados usando uma regressão não linear (Equação logística de quatro parâmetros) no software GraphPad Prism 7 (San Diego, EUA).

4. Resultados e Discussão

4.1 Imunoprecipitação e Sequenciamento de Proteínas

Em estudo anterior, o peptídeo Biotina-C3 foi utilizado com sucesso para diferenciar soro de pacientes com CM de DBM. Porém seu alvo não foi descrito (DA FONSECA ALVES et al., 2022). Sangue/soro são fluidos ricos em VEs (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015) e, portanto, foi investigada a capacidade do peptídeo Biotina-C3 em reconhecer os exossomos de células tumorais mamárias.

No câncer, há uma desregulação na biogênese de VEs, com aumento de sua liberação e alteração de seus componentes (JABALEE; TOWLE; GARNIS, 2018; XAVIER et al., 2020). Nesse sentido, com o objetivo de caracterizar VEs presentes no secretoma de linhagens celulares de CM, foi realizada a identificação do possível alvo do peptídeo Biotina-C3. A imunoprecipitação resultante da captura magnética em extrato de proteínas de membrana e citoplasma da linhagem MCF7 foi analisada por espectrometria de massas, com a remoção dos contaminantes mais prevalentes. Para reduzir o número de alvos putativos, excluímos as proteínas presentes no controle negativo contendo nanopartículas magnéticas sem a presença do peptídeo Biotina- C3.

Do total de proteínas identificadas, 223 foram excluídas da análise por estarem presentes nas duas amostras e 365 proteínas apresentaram alguma afinidade com o peptídeo Biotina-C3. Posteriormente, foram filtradas apenas proteínas de membrana, com base nas informações de localização subcelular disponíveis no UniProt (COUDERT et al., 2023). O diagrama de Venn na **Figura 2A** evidencia 38 proteínas presentes em membranas plasmática e de organelas celulares das quais 27 apresentaram alguma interação pela análise de STRING (**Figura 2B**).

Resultados e Discussão

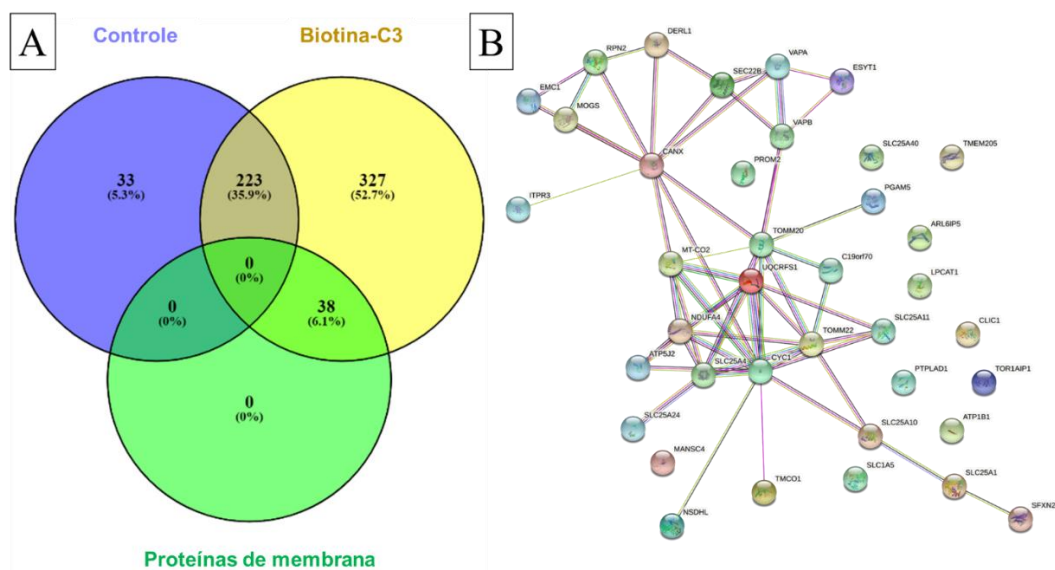


Figura 2. Análise das proteínas identificadas por sequenciamento nas amostras de imunoprecipitadas com o peptídeo Biotina-C3. **A)** Diagrama de Venn das proteínas identificadas nas amostras: Controle (azul), amostra contendo o peptídeo Biotina-C3 (amarelo) e proteínas de membrana (verde). **B)** Análise STRING de proteínas de membrana evidenciando as interações entre as proteínas de membrana. As proteínas são representadas como nós e as interações como linhas. As linhas são codificadas por cores, indicando o tipo de interação como física, regulação, coexpressão, entre outros. As proteínas estão agrupadas em *clusters*, com base na similaridade de suas interações. Fonte: Diagrama de Venn obtido em (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny>); Análise STING obtida em (<https://string-db.org/>).

As proteínas identificadas estão descritas na **Tabela 2**. Dentre as 38 identificadas, foram encontrados dados sugerindo e/ou relacionando 16 proteínas com o CM, conforme a seguir:

A subunidade do complexo citocromo b-c1 Rieske, mitocondrial (UQCRCFS1) é essencial para a montagem do complexo ubiquinol-citocromo c redutase. Este está envolvido na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e na fosforilação oxidativa, contribuindo para o surgimento e progressão do CM (COUDERT et al., 2023; KAMADA et al., 2022).

A Lisofosfatidilcolina aciltransferase 1 (LPCAT1) é uma enzima responsável pela síntese de fosfolipídios. Conforme indicado por (ABDELZAHER; MOSTAFA, 2015), a superexpressão da LPCAT1 está relacionada ao aumento da atividade proliferativa, ao RE e RP negativos, fatores associados à agressividade do CM.

Não há evidências diretas que associam os membros da família de transportadores de soluto 25 (SLC25), incluindo SLC25A4/5/6/31, com o CM. No entanto, são responsáveis pelo transporte de metabólitos na membrana mitocondrial interna e alterações no metabolismo dessa organela, sendo este um *hallmark*

Resultados e Discussão

estabelecido do CM (CHEN et al., 2022). A proteína mitocondrial de transporte de tricarboxilato (SLC25A1) desempenha um papel importante na defesa antioxidante de células malignas, representando um alvo promissor para terapias contra o CM (HLOUSCHEK et al., 2018). Além disso, como mencionado em (LYTOVCHENKO; KUNJI, 2017), as células tumorais da mama aumentam a expressão dos transportadores de citrato, incluindo a SLC25A1, para atender suas demandas energéticas (ZHANG et al., 2023). Finalmente, segundo (LIU et al., 2022), os transportadores mitocondriais de ATP-Mg/fosfato codificados por SLC25A23 e SLC25A24 também são conhecidos como transportadores mitocondriais de ligação ao cálcio, com papel na tumorigênese (GAO et al., 2022).

Outra proteína identificada foi a Prominina-2 (PROM2). Seu valor prognóstico no CM é controverso (SAHA et al., 2020). Contudo, foi sugerido que a PROM2 é uma proteína que responde ao estresse da ferroptose, podendo desempenhar um importante papel no desenvolvimento e progressão do câncer (BROWN et al., 2019).

A sideroflexina-2 (SFXN2) é uma das proteínas envolvidas na modulação da homeostase do ferro (GUO et al., 2021), o qual encontra-se associado à patogênese do CM (BROWN et al., 2020). Foi proposto que a SFXN2 seja um marcador biológico útil e possível alvo terapêutico para pacientes com CM, significativamente associada a um bom prognóstico em pacientes com CM (MON et al., 2019; YUAN et al., 2023).

O Fator de ribosilação Adp 6 como proteína de interação GTPase 5 (ARL6IP5), de acordo com informações presentes no *National Center for Biotechnology Information*, possui papel regulatório em células tumorais mamárias. É reportado que a proteína ativadora de GTPase ARF ASAP1 está presente em aderências focais e se liga de maneira estável à FAK, que, por sua vez, contribui para a metástase do CM (LIU et al., 2002).

A subunidade f mitocondrial da ATP sintase (ATP5J) pode estar associada ao CM, assim como mutações nos genes *ATP6* e *ATP8*, que codificam a subunidade α da F1Fo ATP sintase, da qual a ATP5J faz parte (PARK; BROWN; KIM, 2020). A elevada expressão de proteínas que compõem o fator de montagem do complexo mitocondrial I (MAS), incluindo as subunidades da ATP sintase, está correlacionada com um prognóstico desfavorável em vários tipos de câncer. Já a expressão reduzida da subunidade β catalítica (β -F1-ATP sintase) encontra-se associada à progressão da doença, incluindo do CM (KIM et al., 2020).

O receptor de inositol 1,4,5-trifosfato tipo 3 (IP3R3) tem sua expressão regulada

Resultados e Discussão

por 17 β -estradiol. O IP3R3 também regula a proliferação de células da linhagem de CM MCF-7 ao interagir com o canal de potássio BKCa dependente de Ca²⁺ (MOUND et al., 2013). IP3Rs, especialmente o subtipo 3, são mediadores/marcadores de carcinogênese mamária (FOULON et al., 2022).

Existem evidências que associam o transportador de aminoácidos neutro B(0) (SLC1A5 ou ASCT2) com o CM. De acordo com (BRÖER et al., 2019), o SLC1A5 é frequentemente superexpresso nesses tumores.

A relação entre o MICOS13 e o CM é pouco conhecida, mas mutações em seu gene codificante estão associadas a problemas na mitocôndria (NICOLAS et al., 2019). O complexo MICOS, do qual o MICOS13 faz parte, é importante na manutenção da forma e função das cristas mitocondriais (KLEIN et al., 2020).

A proteína heme mitocondrial citocromo c1 (CYC1) é uma subunidade crucial do complexo citocromo bc1, o qual desempenha um papel fundamental na cadeia respiratória mitocondrial. A desregulação dessa cadeia respiratória já foi relacionada ao CM (KARLSSON et al., 2021; RAK et al., 2016). Além disso, (GRASSO et al., 2020) destacam que a respiração mitocondrial tem sido identificada como um possível mecanismo a ser modulado no tratamento do câncer.

A proteína chaperona ligadora de cálcio, Calnexina (CANX) está envolvida no processo de enovelamento de proteínas e no controle de qualidade no retículo endoplasmático (REZAUL et al., 2010). A resposta ao estresse do retículo endoplasmático é ativada em células de CM, o que pode aumentar sua sobrevivência e proliferação (ALLISON et al., 2020; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2023; REZAUL et al., 2010). Além disso, CANX é superexpressa nos tecidos de CM, correlacionando-se com o grau e o estágio do tumor (WHO, 2023).

Outra proteína identificada, a Derlin-1, foi descrita como superexpressa em amostras de CM e como um potencial marcador para a doença. Derlin-1 é conhecida por sua atuação na degradação associada ao retículo endoplasmático (ERAD) e no controle de qualidade de proteínas (HO-YEN; JONES; KERMORGANT, 2015; LIU et al., 2020; SALHIA et al., 2014).

A proteína 1 do canal intracelular do cloreto (CLIC1) regula a formação de aderências da matriz celular e a dinâmica da membrana, processos importantes no desenvolvimento e progressão do câncer (PENG et al., 2021). Além disso, (PERETTI et al., 2015) relataram que o CLIC1 aumenta a corrente de cloreto nas células do CM, sendo um potencial alvo terapêutico (SUH et al., 2005).

Resultados e Discussão

Mutações no gene que codifica para a subunidade 2 da citocromo c oxidase (MT-CO2) estão associadas a menor sobrevida livre de doença em pacientes com leucemia mieloide aguda (WU, Sharon e colab., 2018). Além disso, mutações em outra subunidade da citocromo c oxidase, a subunidade I (MT-CO1 ou MT-COI), são comuns em diversos tipos de câncer. Como o MT-CO2 é uma subunidade importante na respiração celular, é possível que influencie no desenvolvimento do CM (PÉREZ-AMADO et al., 2020; SINGH et al., 2019).

Assim, das proteínas identificadas, 11 apresentaram origem mitocondrial. Considerando o papel das mitocôndrias na regulação metabólica celular (CASSIM et al., 2020; MARTÍNEZ-REYES; CHANDEL, 2021; MCANDREWS; KALLURI, 2019) sugerimos que o peptídeo Biotina-C3 identifica mitovesículas e, portanto, alvos relacionados à reprogramação energética e ao estado redox das células, sendo um possível marcador de formação, progressão e/ou metástase tumoral (CASSIM et al., 2020; VASAN; WERNER; CHANDEL, 2020).

As proteínas mitocondriais podem representar até 10% do teor total de proteínas de pequenas VEs que, quando derivadas de tumores como o CM, contêm componentes mitocondriais não identificados em amostras de controles saudáveis (JANG et al., 2019; SCHWARZENBACH; GAHAN, 2021). Além disso, o desenvolvimento de um método para o isolamento seletivo de mitovesículas foi descrito recentemente, o que possibilita a caracterização *in vivo* de processos biológicos que conectem a biologia de VEs, a dinâmica mitocondrial e estratégias terapêuticas e diagnósticas inovadoras (D'ACUNZO et al., 2021).

4.2 Docking molecular da ligação proteína-proteína

Para estudar a interação entre as proteínas sequenciadas e o peptídeo Biotina- C3, foi realizada uma simulação de *docking* molecular utilizando o servidor online HDOCK. Essa ferramenta computacional permite prever a afinidade de ligação entre proteínas e ligantes, utilizando modelos PDB de proteínas como receptores e a sequência do peptídeo Biotina-C3 como ligante.

O HDOCK prevê, por meio de um algoritmo híbrido, as interações intermoleculares na interface de duas proteínas (ou peptídeos) complexadas. O algoritmo HDOCK realiza um ajuste preciso considerando tanto o receptor quanto o ligante como moléculas rígidas (YAN et al., 2020). Após a simulação são

Resultados e Discussão

apresentados os valores de pontuação de *docking* e de confiança. A pontuação de *docking* é calculada pela função de pontuação interativa baseada em conhecimento *ITScorePP* ou *ITScorePR*. Uma pontuação de encaixe mais negativa significa um modelo de ligação *in silico* mais possível (YAN et al., 2020). Já a pontuação de confiança foi definida conforme a pontuação de encaixe dos complexos proteína-proteína no PDB, indicando a probabilidade de ligação de duas moléculas. Assim, quando a pontuação de confiança estava acima de 0,7 foi considerada muito provável; quando entre 0,5 e 0,7 foi definida como possível e abaixo 0,5 como improvável. No entanto, a pontuação de confiança deve ser usada com cuidado devido à sua natureza empírica (YAN et al., 2020).

Os resultados do *docking* de interação entre o peptídeo Biotina-C3 e as 38 proteínas identificadas por imunoprecipitação e sequenciamento estão resumidos na **Figura 3**. Suas energias de ligação calculadas para as interações e as pontuações de confiança encontram-se na **Tabela 2**. Essa análise reforça os dados da imunoprecipitação e sequenciamento, indicando a possível interação entre o peptídeo Biotina-C3 e as 38 proteínas identificadas. Podemos destacar com maiores pontuações a Subunidade c da citocromo oxidase (O00483), subunidade do complexo citocromo b-c1 Rieske, mitocondrial (P47985) ambas presentes na membrana interna de mitocôndrias e Sinaptotagmina-1 estendida (Q9BSJ8) presente na membrana de retículos endoplasmáticos.

Também vale ressaltar a posição de interação do peptídeo Biotina-C3 com a proteína considerando o impedimento estérico e a orientação da biotina presente na extremidade Carbox-terminal do peptídeo. Nesse sentido, é interessante e necessário que a biotina esteja em um sítio estericamente livre para interação com moléculas de estreptavidina para captura ou bioanálises. Destacam-se, portanto, as proteínas: Subunidade da citocromo c oxidase NDUFA4 (O00483), Lisofosfatidilcolina aciltransferase 1 (Q8NF37), Prominina-2 (Q8N271), Proteína transmembrana 205 (Q6UW68), Proteína B/C associada à proteína de membrana associada à vesícula (O95292), Sideroflexina-2 (Q96NB2), Proteína 1 da família PRA3 (O075915), Cadeia muito longa (3R)-3-hidroxiacil-CoA desidratase 3 (Q9P035), , Derlin-1 (Q9BUN8), Esterol-4-alfa-carboxilato 3-desidrogenase, descarboxilante (Q15738), Subunidade do receptor de importação mitocondrial TOM20 homóloga (Q15388), Proteína transportadora mitocondrial ligadora de cálcio SCA-MC-1 (Q6NUK1).

Resultados e Discussão

Tabela 2. Resultados das simulações de interação molecular por *docking*, utilizando o servidor HDock. Os resultados foram avaliados com base na pontuação de *docking* e na pontuação de confiança. Os valores apresentados correspondem às melhores pontuações obtidas nas simulações.

Item de consulta	Nome preferido	Pontuação de <i>docking</i>	Pontuação de confiança
O00483	NDUFA4	-321,67	0,9687
P47985	UQCRFS1	-288,73	0,9413
Q9BSJ8	ESYT1	-287,14	0,9395
Q02978	SLC25A11	-283,96	0,9358
Q8NF37	LPCAT1	-282,82	0,9344
P12235	SLC25A4	-280,71	0,9318
Q9NS69	TOMM22	-276,56	0,9263
Q8N271	PROM2	-269,84	0,9166
Q6UW68	TMEM205	-265,59	0,9098
A6NHS7	MANSC4	-261,18	0,9023
P53007	SLC25A1	-259,83	0,8999
O95292	VAPB	-259,31	0,8990
Q9UBX3	SLC25A10	-252,36	0,8857
Q13724	MOGS	-251,79	0,8845
O75915	ARL6IP5	-246,19	0,8726
P56134	ATP5J2	-245,91	0,8719
Q14573	ITPR3	-242,27	0,8636
Q8TBP6	SLC25A40	-240,03	0,8582
Q15758	SLC1A5	-238,77	0,8551

Item de consulta	Nome preferido	Pontuação de <i>docking</i>	Pontuação de confiança
Q9P035	PTPLAD1	-238,25	0,8538
P05026	ATP1B1	-232,79	0,8397
P04844	RPN2	-231,90	0,8373
Q8N766	EMC1	-231,40	0,8359
Q9UM00	TMCO1	-226,04	0,8207
Q5XKP0	C19orf70	-224,28	0,8154
Q96NB2	SFXN2	-222,94	0,8113
Q96HS1	PGAM5	-222,94	0,8113
O75396	SEC22B	-222,55	0,8102
P08574	CYC1	-221,11	0,8057
P27824	CANX	-220,04	0,8023
Q9P0L0	VAPA	-217,64	0,7946
Q5JTV8	TOR1AIP1	-216,07	0,7894
Q9BUN8	DERL1	-211,40	0,7735
Q15738	NSDHL	-207,20	0,7584
O00299	CLIC1	-205,71	0,7529
P00403	MT-CO2	-205,57	0,7524
Q15388	TOMM20	-197,56	0,7214
Q6NUK1	SLC25A24	-176,23	0,6282

Resultados e Discussão

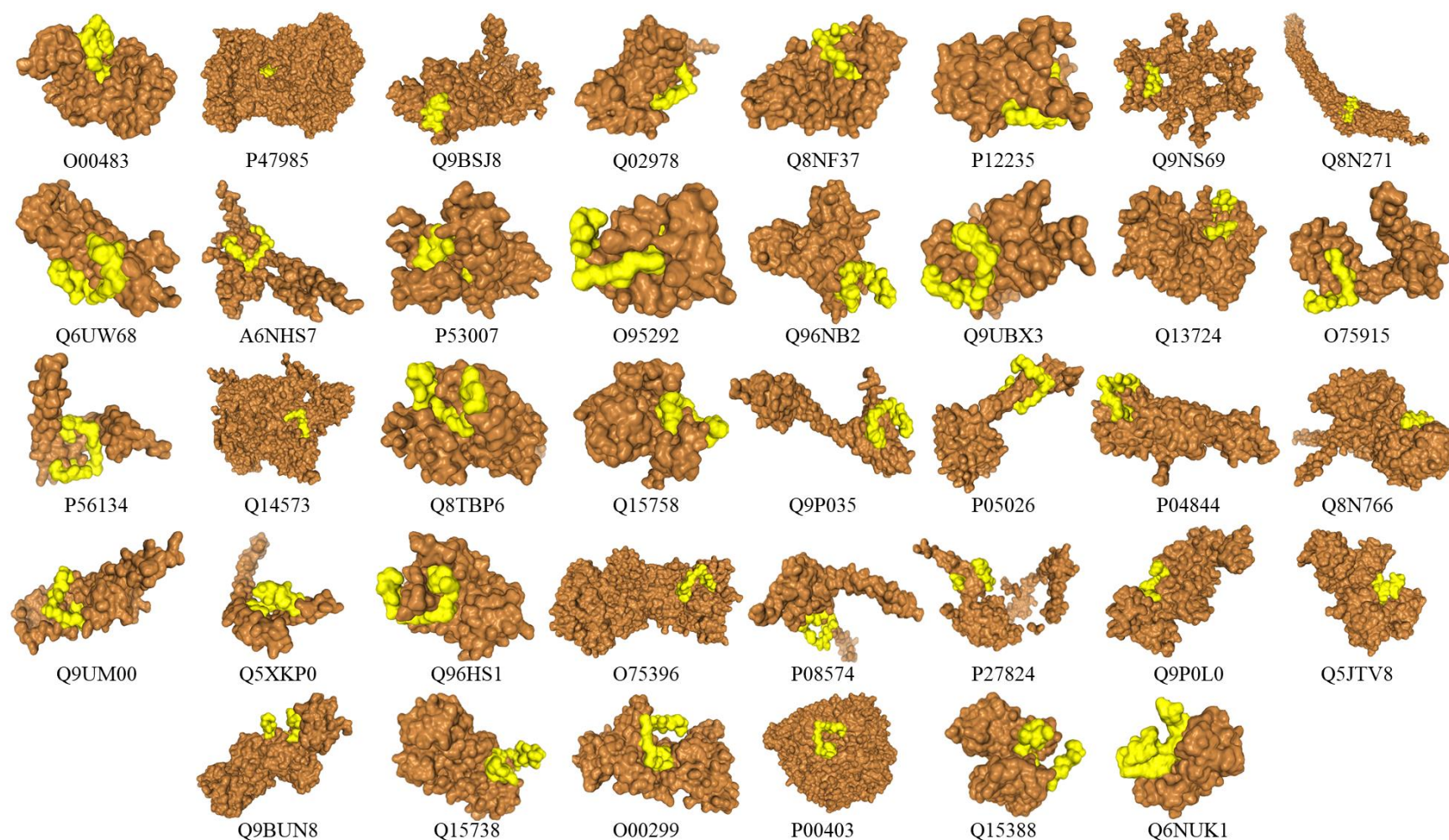


Figura 3. Estruturas de superfície mais prováveis obtidas por simulações de *docking* molecular para os complexos de proteínas com peptídeo Biotina-C3.

Fonte: Próprio autor.

Resultados e Discussão

4.3 Caracterização de exossomos por NTA

A análise NTA de exossomos derivados das linhagens celulares MCF-7, MDA-MB231, SKBr3 e MRC-5 revelou uma distribuição de tamanho similar. A **Figura 4** apresenta os resultados para os exossomos das quatro linhagens celulares. O histograma de distribuição de tamanho dos exossomos de MCF-7 mostra um pico evidente em 145 nm e um pico menos intenso a 215 nm. No caso dos exossomos de MDA-MB231, dois picos em 130 e 185 nm, e um pico menor em 295 nm correspondente a pequenos agregados. Para SKBr3 o NTA revela um pico claro em 145 nm e outro menor em 255 e, para MRC-5 apresentou um pico em 125 nm e outro menor em 285 nm. Além da distribuição de tamanho, a concentração de partículas também foi estimada por NTA.

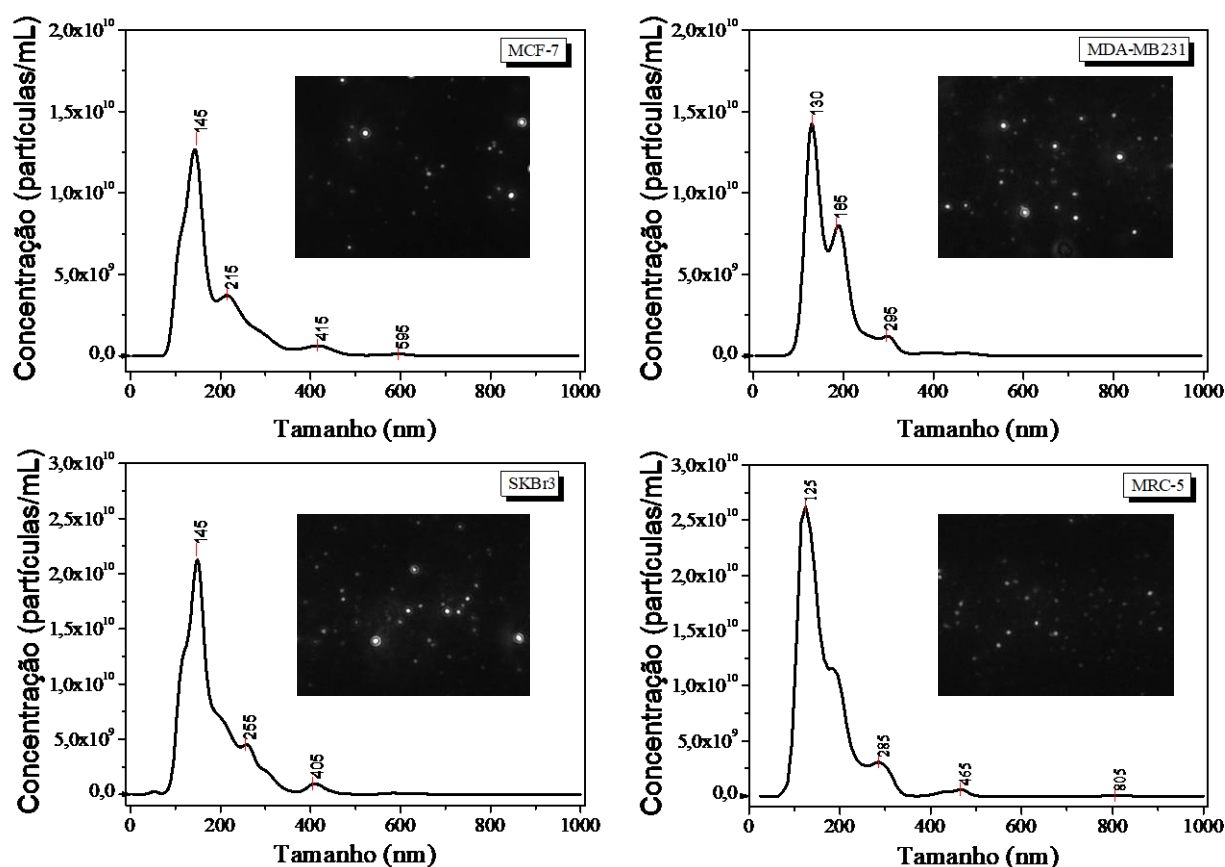


Figura 4. Caracterização por NTA de amostras purificadas de exossomos de linhagens celulares de CM, MCF-7, MDA-MB231, SKBr3 e linhagem celular de fibroblastos MRC-5. A caracterização NTA analisou vídeos de dados brutos em triplicata durante 60 segundos com 25 quadros por segundo e a temperatura da unidade de laser foi definida em 24,8°C. Fonte: Próprio autor.

Resultados e Discussão

4.4 Caracterização de exossomos por citometria de fluxo

A fim de avaliar a capacidade de reconhecimento do peptídeo Biotina-C3 e a presença de alvos ligantes em exossomos derivados de diversas linhagens celulares, incluindo MCF-7, MDA-MB231, SKBr3 e MRC-5, foram conduzidos ensaios em citometria de fluxo. Nestes foram marcados exossomos imobilizados diretamente em partículas magnéticas, conforme descrito anteriormente pelo grupo (MOURA et al., 2020).

Na **Figura 5** observa-se que o peptídeo Biotina-C3 reconheceu alvos presentes nos exossomos e apresentou um perfil diferencial entre as linhagens celulares, com marcação positiva de 99,0% nos exossomos derivados de MFC-7, 96,5% nos exossomos derivados de MDA-MB231, 51,4% nos exossomos derivados de SKBr3 e apenas 1,9% nos exossomos derivados de MRC-5. Os resultados também são apresentados em histogramas **Figura 5B** e *Dot Blots* na **Figura 5C**, juntamente com um mapa de calor que representa a porcentagem de positividade.

Portanto, o peptídeo Biotina-C3 reconhece alvos presentes em exossomos de células de CM e de forma mais relevante, com maior intensidade nas linhagens MCF7 e MDA-MB231. Apesar de molecularmente distintas, a MCF7 é luminal e positiva para RE e a MDA-MB231 é triplo-negativa, sendo que ambas são consideradas mais agressivas e com maior potencial metastático em comparação com a SKBr3 (SAEZ; MCGUIRE; CLARK, 1989; YORDANOVA; HASSAN, 2022). Sabe-se que células tumorais com maior potencial metastático tendem a produzir mais exossomos, o que pode estar relacionado à disseminação do tumor para outros órgãos (HUANG; DONG; CHEN, 2022). Assim, sugerimos que existem mecanismos congruentes ao processo metastático de células de subtipos moleculares distintos de CM. Além disso, a capacidade do peptídeo em marcar apenas os exossomos derivados das células mais agressivas e não dos fibroblastos é interessante, uma vez que os fibroblastos estão presentes no microambiente tumoral (LI et al., 2021).

Resultados e Discussão

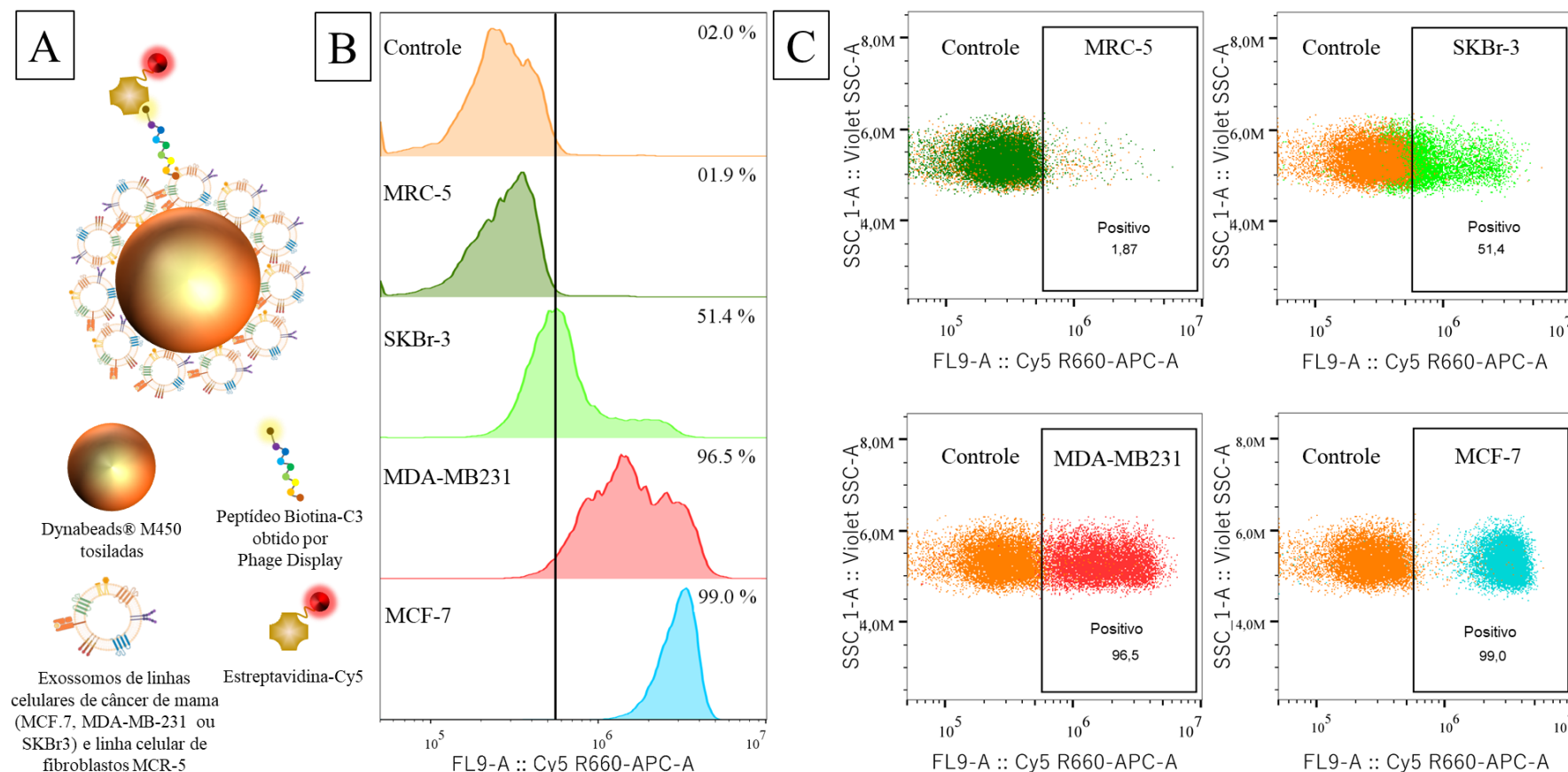


Figura 5. Ensaio de citometria de fluxo baseado em partículas magnéticas para caracterização de exossomos derivados de linhagens celulares de câncer de mama. **A)** mostra uma representação esquemática de partículas magnéticas covalentemente modificadas com exossomos derivados das linhagens celulares de câncer de mama MCF-7, MDA-MB231 e SKBr3 e de fibroblastos MRC-5. Foi utilizado o peptídeo Biotina-C3 e estreptavidina-Cy5. **B)** mostra os histogramas de partículas magnéticas modificadas com exossomos derivados das células das linhagens de câncer de mama MCF-7, MDA-MB231 e SKBr3 e da linhagem celular de fibroblastos MRC-5 com o peptídeo Biotina-C3, marcado com estreptavidina-Cy5. **C)** mostra o gráfico de pontos da análise de citometria de fluxo baseado em microesferas (**B**). Como controle negativo, foram utilizadas partículas magnéticas modificadas sem o peptídeo Biotina-C3 para verificar a especificidade da reação de imunoafinidade. Fonte: Próprio autor.

Resultados e Discussão

As tetraspaninas são proteínas integrais da membrana que desempenham funções cruciais no suporte estrutural de proteínas e ancoragem em membranas celulares. Os exossomos expressam significativamente as tetraspaninas CD9, CD63 e CD81, que são frequentemente utilizadas como biomarcadores de exossomos e podem influenciar sua formação e composição (HEMLER, 2003). Assim, em um segundo momento, foram utilizadas partículas magnéticas modificadas com anticorpos anti-CD9 (**Figura 6A**), anti-CD63 (**Figura 7A**) e anti-CD81 (**Figura 8A**), direcionando a captura para exossomos.

Observou-se que o peptídeo Biotina-C3 reconheceu diferencialmente alvos presentes nos exossomos conforme o anticorpo utilizado na captura e conforme a linhagem celular. Para exossomos capturados com anti-CD9 obteve-se marcação positiva de 75,5% nos exossomos derivados de MFC-7, 46,9% nos exossomos derivados de MDA-MB231, 10,2% nos exossomos derivados de SKBr3 e 3,5% nos exossomos derivados de MRC-5 (**Figura 6**). Para exossomos capturados com anti-CD63 obteve-se marcação positiva de 92,4% nos exossomos derivados de MFC-7, 95,0% nos exossomos derivados de MDA-MB231, 0,37% nos exossomos derivados de SKBr3 e 0,03% nos exossomos derivados de MRC-5 (**Figura 7**). Por fim, para exossomos capturados com anti-CD81 obteve-se marcação positiva de 74,1% nos exossomos derivados de MFC-7, 11,4% nos exossomos derivados de MDA-MB231, 41,5% nos exossomos derivados de SKBr3 e 30,4% nos exossomos derivados de MRC-5 (**Figura 8**).

Resultados e Discussão

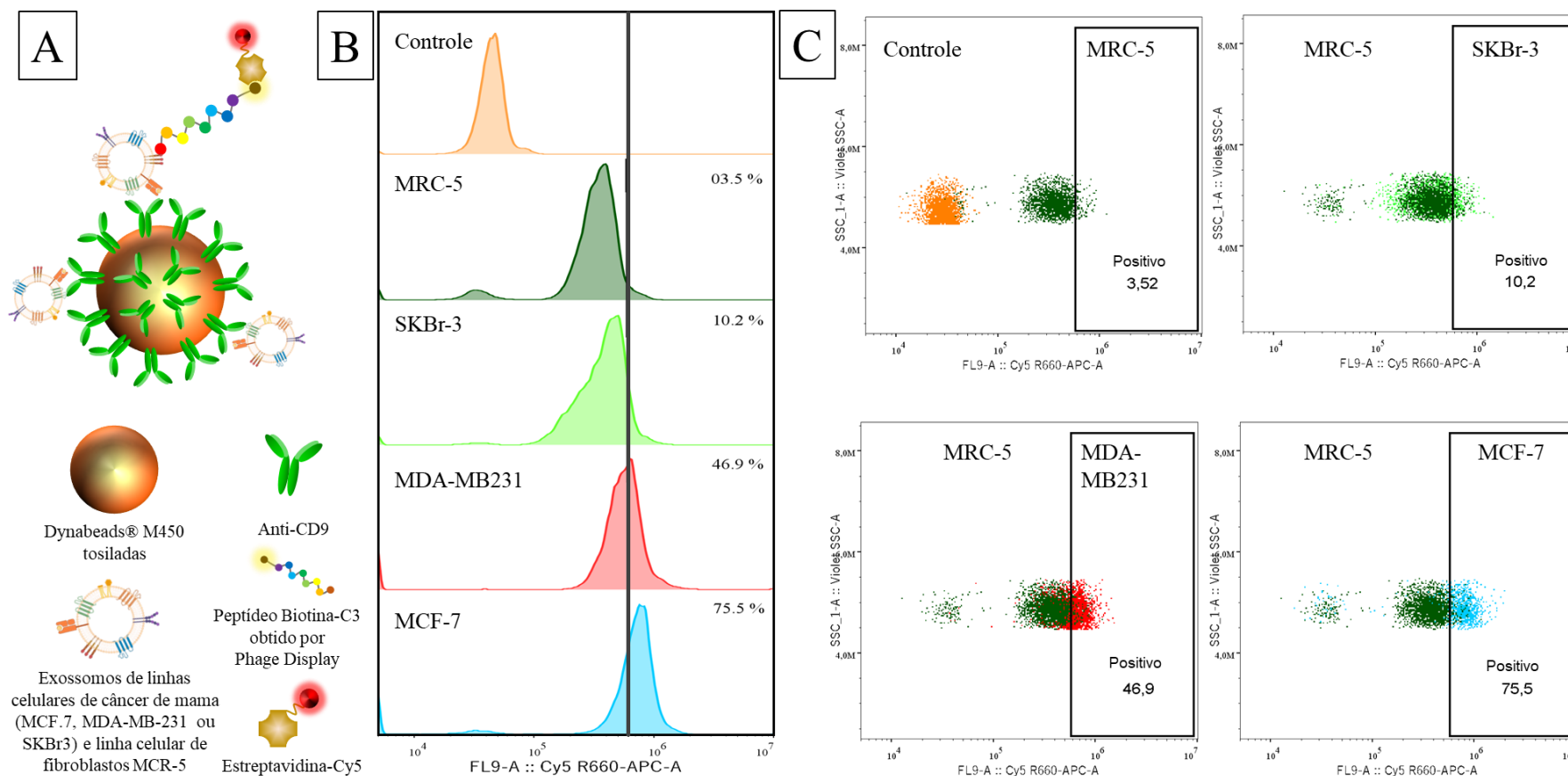


Figura 6. Ensaio de citometria de fluxo baseado em partículas magnéticas para caracterização de exossomos derivados de linhagens celulares de câncer de mama. **A)** mostra uma representação esquemática de partículas magnéticas covalentemente modificadas com anti-CD9 para captura de exossomos derivados das linhagens de câncer de mama MCF-7, MDA-MB231 e SKBr3 e de fibroblastos MRC-5. Foi utilizado o peptídeo Biotina-C3 e estreptavidina-Cy5. **B)** mostra os histogramas de partículas magnéticas modificadas com anti-CD9 para captura de exossomos derivados das linhagens de câncer de mama MCF-7, MDA-MB231 e SKBr3 e de fibroblastos MRC-5 com o peptídeo Biotina-C3, marcado com estreptavidina-Cy5. **C)** mostra o gráfico Dot Blots da análise de citometria de fluxo baseado em partículas magnéticas (**B**). Foram utilizadas como controle negativo partículas magnéticas modificadas sem o peptídeo Biotina-C3 e exossomos para verificar a especificidade da reação de imunoafinidade. Fonte: Próprio autor.

Resultados e Discussão

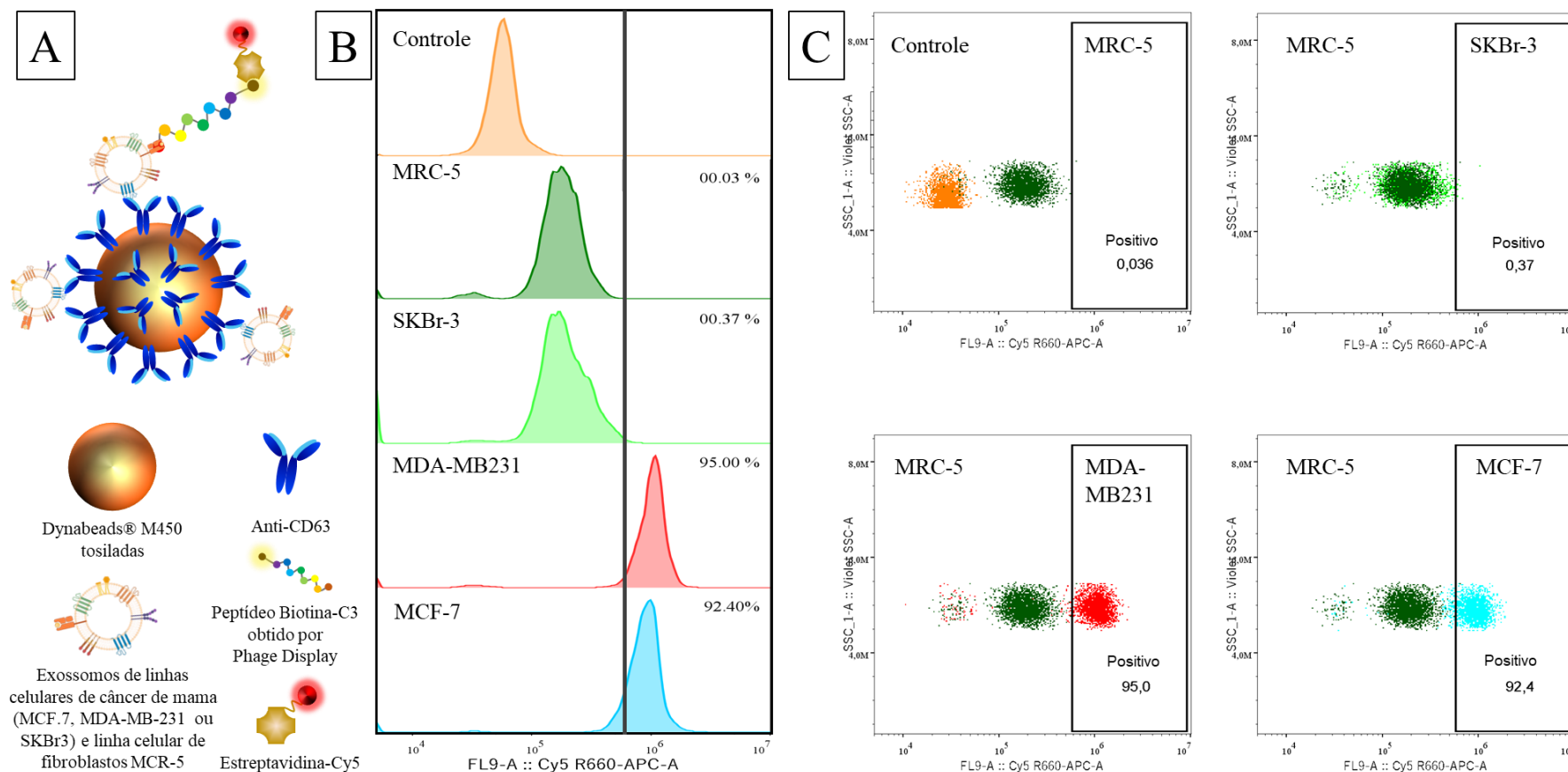


Figura 7. Ensaio de citometria de fluxo baseado em partículas magnéticas para caracterização de exossomos derivados de linhagens celulares de câncer de mama. **A)** mostra uma representação esquemática de partículas magnéticas covalentemente modificadas com anti-CD63 para captura de exossomos derivados das linhagens celulares de câncer de mama MCF-7, MDA-MB231 e SKBr3 e de fibroblastos MRC-5. Foi utilizado o peptídeo Biotina-C3 e estreptavidina-Cy5. **B)** B mostra os histogramas de partículas magnéticas modificadas com anti-CD63 para captura de exossomos derivados das linhagens de câncer de mama MCF-7, MDA-MB231 e SKBr3 e de fibroblastos MRC-5 com o peptídeo Biotina-C3, marcado com estreptavidina-Cy5. **C)** mostra o gráfico Dot Blots da análise de citometria de fluxo baseado em partículas magnéticas (**B**). Foram utilizadas como controle negativo partículas magnéticas modificadas sem o peptídeo Biotina-C3 e exossomos para verificar a especificidade da reação de imunoafinidade. Fonte: Próprio autor.

Resultados e Discussão

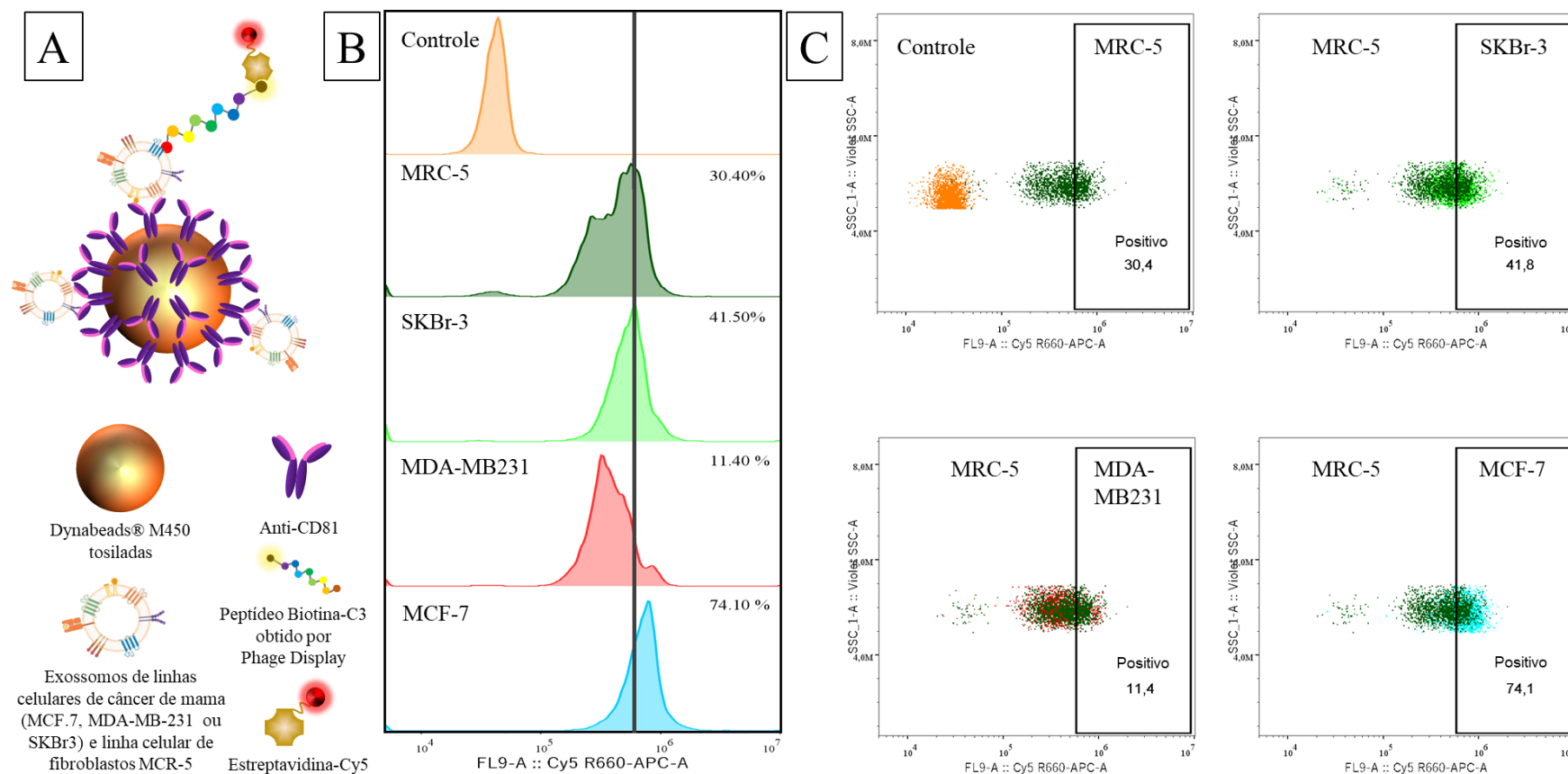


Figura 8. Ensaio de citometria de fluxo baseado em partículas magnéticas para caracterização de exossomos derivados de linhagens celulares de câncer de mama. **A)** mostra uma representação esquemática de partículas magnéticas covalentemente modificadas com anti-CD81 para captura de exossomos derivados das linhagens celulares de câncer de mama MCF-7, MDA-MB231 e SKBr3 e de fibroblastos MRC-5. Foi utilizado o peptídeo Biotina-C3 e estreptavidina-Cy5. **B)** mostra os histogramas de partículas magnéticas modificadas com anti-CD81 para captura de exossomos derivados das linhagens de câncer de mama MCF-7, MDA-MB231 e SKBr3 e de fibroblastos MRC-5 com o peptídeo Biotina-C3, marcado com estreptavidina-Cy5. **C)** mostra o gráfico Dot Blots da análise de citometria de fluxo baseado em partículas magnéticas (B). Foram utilizadas como controle negativo partículas magnéticas modificadas sem o peptídeo Biotina-C3 e exossomos para verificar a especificidade da reação de imunoafinidade. Fonte: Próprio autor.

Resultados e Discussão

Foram realizadas, com sucesso, duas abordagens de imunoseparação magnética: direta e indireta. Na abordagem direta, os exossomos foram capturados em partículas magnéticas e marcados com peptídeo Biotina-C3. Já na abordagem indireta, os exossomos foram capturados por partículas magnéticas modificadas com anticorpos e marcados com peptídeo Biotina-C3 **Figura 9**.

Comparativamente, a imobilização direta apresentou um perfil semelhante à marcação utilizando anti-CD63. Contudo, é aplicável apenas em experimentos de caracterização, uma vez que partículas magnéticas Dynabeads™ M-450 Tosilativadas são projetadas para se ligarem covalentemente aos grupos amino e sulfidril primários disponíveis em biomoléculas (JACKSON et al., 1990). Portanto, em uma amostra complexa, não é possível direcionar a imobilização apenas de exossomos. Nesse sentido, a imobilização de anticorpos que se ligam a essas VEs, como as tetraspaninas CD9, CD63 e CD81, tem se mostrado aplicável a fluidos biológicos (MOURA et al., 2020).

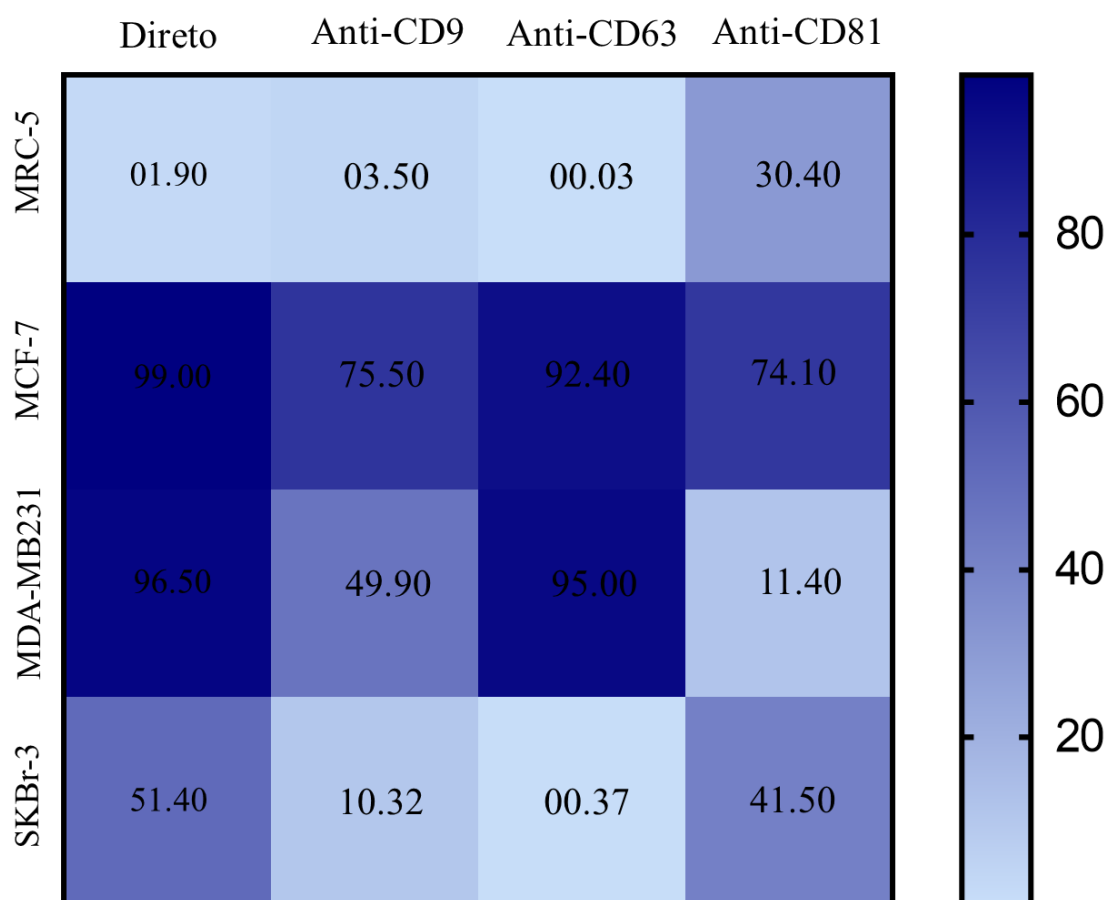


Figura 9. Ensaio de citometria de fluxo baseado em partículas magnéticas para caracterização de exossomos derivados de linhas celulares de câncer de mama. Mapa de Calor indicando porcentagem de marcação positiva. Fonte: Próprio autor.

Resultados e Discussão

Quando foi utilizada a abordagem indireta, o peptídeo Biotina-C3 marcou menos exossomos derivados da linhagem SKBr3, o que pode indicar a capacidade do peptídeo em identificar uma subpopulação de VEs específicas. Esses resultados fornecem um direcionamento valioso para a seleção da melhor abordagem de imunoseparação magnética para a análise de exossomos em diferentes linhagens celulares. A marcação específica do peptídeo Biotina-C3 pode ser útil para a identificação de exossomos derivados de diferentes subtipos celulares, o que pode ter implicações importantes na utilização dessas vesículas como biomarcadores em diagnósticos e tratamentos de CM (BHARDWAJ et al., 2017). De fato, Mathieu et al. (2021) apresentaram evidências de que as VEs portadoras de tetraspaninas, especialmente CD9 e CD81, com pouca expressão de CD63, têm origem principalmente na membrana plasmática, enquanto as que expressam CD63 com pouco CD9 se formam em compartimentos internos e são caracterizadas como exossomos (MATHIEU et al., 2021).

O estudo para avaliar a eficácia do peptídeo Biotina-C3 na marcação de exossomos, utilizando partículas magnéticas modificadas com anticorpos anti-CD9, anti-CD63 e anti-CD8, demonstrou que a abordagem utilizando o anticorpo anti-CD63 apresentou maior similaridade com o perfil de marcação obtido pela captura direta dos exossomos, derivados das linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB231. Estes resultados corroboram diretamente com nossos achados nas análises de imunoprecipitação e sequenciamento de proteínas, nos quais sugerimos que grande parte dos alvos ligantes ao peptídeo Biotina-C3 são proteínas de membranas de organelas celulares, como mitocôndrias e retículo endoplasmático. Adicionalmente, o experimento confirmou a eficácia do uso do anticorpo anti-CD63 na imunoseparação magnética dos exossomos, tornando-o a escolha adequada para o desenvolvimento de abordagens bioanalíticas apresentadas a seguir.

4.5 magneto-ELISA

Foi, então, desenvolvido um método de detecção de exossomos derivados das linhagens celulares por magneto-ELISA. A **Figura 10A** apresenta um esquema do processo de captura magnética e reação colorimétrica e na **Figura 10B** são demonstradas as curvas de calibração para exossomos derivados das linhagens de

Resultados e Discussão

células de CM MCF-7, MDA-MB231, SKBr3 e da linhagem de células de fibroblastos MRC- 5. As respostas de absorbância registradas foram satisfatórias em termos de intensidade.

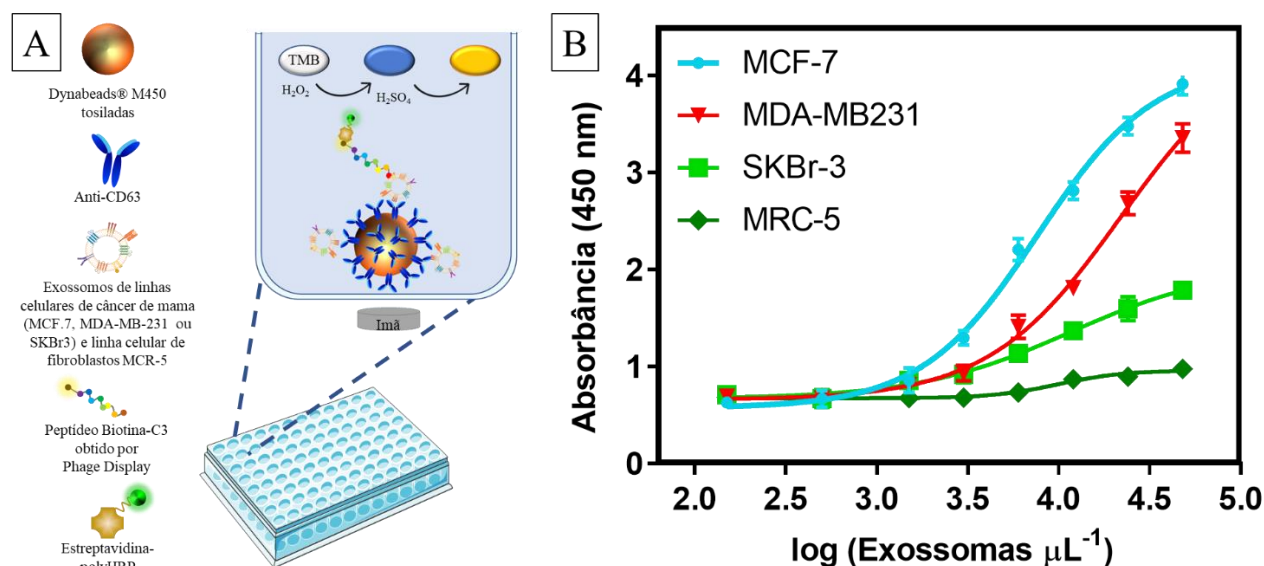


Figura 10. Ensaio magneto-ELISA para detecção de exossomos derivados das linhagens de células de câncer de mama MCF-7, MDA-MB231, SKBr3 e da linhagem de células de fibroblastos MRC- 5 (controle). **A)** Imobilização covalente de anti-CD63 em partículas magnéticas, seguida de marcação com o peptídeo Biotina-C3 e marcação com Estreptavidina-poliHRP e reação colorimétrica com TMB **B)** Valores de absorbância registrados a 450 nm, variando a concentração exossomos de 150 a $4,8 \times 10^6$ exossomos μL^{-1} , ajustados usando uma regressão não linear (Equação logística de quatro parâmetros) ($n=3$). Fonte: Próprio autor.

A curva analítica foi construída para diferentes concentrações de exossomos. As respostas de absorbância foram ajustadas usando uma regressão não linear (Equação logística de quatro parâmetros), na faixa de concentração de 150 a $4,8 \times 10^6$ exossomos μL^{-1} . Os limites de detecção (LOD) foram calculados através da interpolação na curva com o valor do Branco+ $(3 \times \text{SD})$, sendo o LOD de 330 exossomos μL^{-1} ($r^2=0,9928$), LOD de 388 exossomos μL^{-1} ($r^2=0,9904$) e LOD 473 exossomos μL^{-1} ($r^2=0,9708$) para exossomos derivados das linhagens MCF-7, MDA-MB231 e SKBr3, respectivamente.

Os resultados mostraram que a linhagem MCF-7 apresentou o menor LOD (330 exossomos μL^{-1}) em comparação com as outras duas linhagens celulares. Isso sugere que a linhagem MCF-7 libera mais exossomos do que as outras linhagens, o

Resultados e Discussão

que pode ter implicações quanto ao seu potencial metastático. Estudos anteriores já mostraram que os exossomos liberados por células tumorais podem conter informações prognósticas valiosas, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e outros biomarcadores que podem ser usados para avaliar a agressividade do tumor e prever a progressão da doença (WANG et al., 2022b). Sugerimos que nossa abordagem utilizando o peptídeo Biotina-C3 seja aplicável, e necessita ser testado em diferentes plataformas

4.6 Magneto-biossensor eletroquímico

O biossensor eletroquímico baseado em partículas magnéticas foi então construído e testado primeiro em exossomos derivados das linhagens celulares de CM MCF7, MDA-MB231, SKBr3 e de fibroblastos MRC-5. A **Figura 11** mostra os gráficos de calibração de exossomos previamente purificados por ultracentrifugação (variando de 150 a $4,8 \times 10^6$ exossomos μL^{-1} , determinados por NTA) em um tampão PBS. A **Figura 11A** apresenta um esquema do processo de captura magnética e detecção eletroquímica. A **Figura 11B** apresenta o comportamento dos cronoamperogramas registrados utilizando exossomos derivados da linhagem celular MCF-7. Por fim, a **Figura 11C** apresenta e compara as curvas de calibração para exossomos derivados de cada linhagem. As respostas eletroquímicas mostraram um bom desempenho analítico.

Resultados e Discussão

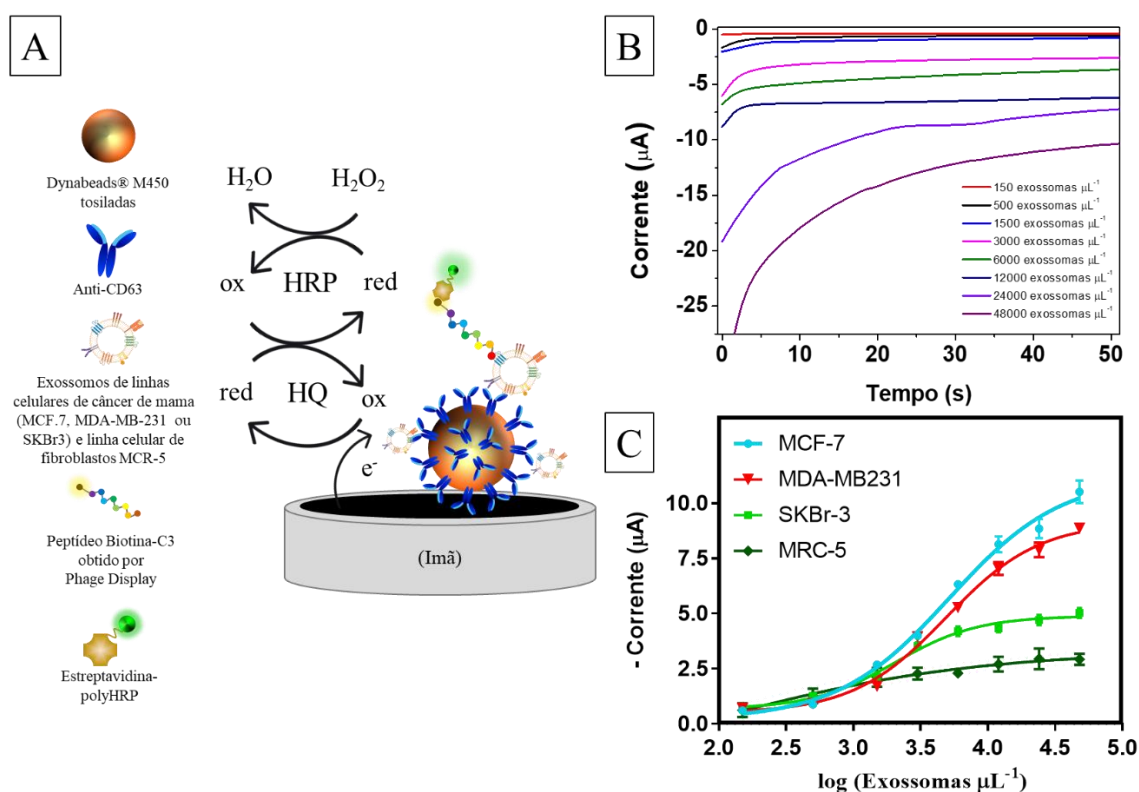


Figura 11. Biossensor eletroquímico para detecção de exossomos derivados das linhagens de células de câncer de mama MCF-7, MDA-MB231, SKBr3 e da linhagem de células de fibroblastos MRC-5. **A)** Imobilização covalente de anti-CD63 em partículas magnéticas, seguida de marcação com o peptídeo Biotina-C3 e marcação com Estreptavidina-poliHRP **B)** Comportamento dos cronoamperogramas em ePBS na presença de peróxido de hidrogênio 2 mmol L⁻¹, hidroquinona 2 mM e HRP como marcador enzimático para o biossensor, aplicando um potencial de -0,12 V vs. pseudo-referência de Ag. O eletrodo foi descartado a cada experimento. **C)** Valores de corrente registrados a 40 s, variando a concentração exossomos de 150 a 4,8 x 10⁶ exossomos μL^{-1} em tampão ePBS, ajustados usando uma regressão não linear (Equação logística de quatro parâmetros) (n=3). Fonte: Próprio autor.

A realização da separação magnética de exossomos com base no anti-CD63, seguida da detecção eletroquímica usando estreptavidina-poliHRP é mostrada na **Figura 11C**. Os limites de detecção (LOD) foram calculados através da interpolação na curva com o valor do Branco+(3*SD), sendo o LOD de 175 exossomos μL^{-1} ($r^2=0,9907$), LOD de 189 exossomos μL^{-1} ($r^2=0,9914$) e LOD 262 exossomos μL^{-1} ($r^2=0,9809$) para exossomos derivados das linhagens MCF-7, MDA-MB231 e SKBr3, respectivamente, sendo o menor LOD para a linhagem MCF-7 como esperado.

Esses valores representam uma melhoria em relação aos LODs obtidos por biossensor baseado na transferência de energia de ressonância Förster (FRET) (ZHAI

Resultados e Discussão

et al., 2018) e resultados equiparáveis aos biossensores eletroquímicos (ZHOU et al., 2016) e (MOURA et al., 2020). Apesar de ser descrito um biossensor de arranjo magnético-nanomecânico (MEI et al., 2023), com menor LOD, o mesmo utilizou como molécula de reconhecimento, um aptâmero para CD63, o que não garante uma especificidade direcionada apenas a exossomos derivados de células do CM. Além disso os LODs obtidos pelo biossensor, foram menores que os LODs obtidos pelo método ELISA apresentado anteriormente.

4.7 Abordagens de bioanálises para a detecção de exossomos em soro

A detecção de exossomos derivados de células de CM na matriz de soro humano foi investigada utilizando as bioabordagens desenvolvidas para ensaio magneto-ELISA e biossensor magnético com detecção eletroquímica. A **Tabela 3**, apresenta os valores de recuperação dos dois métodos de bioanálises desenvolvidos.

Tabela 3. Determinação de exossomos em matriz sorológica. Resultados obtidos pela utilização do biossensor eletroquímico e ensaio magneto-ELISA.

Amostras	Exossomos μL^{-1}			Recuperação** (biossensor,%)	Recuperação** (ELISA, %)
	Adicionado	Encontrado*			
		biossensor	ELISA		
MCF7	$6,0 \times 10^3$	$6,7 \times 10^3$	$6,5 \times 10^3$	111,9	108,8
	$4,8 \times 10^4$	$5,1 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$	107,3	103,6
MDA-MB231	$6,0 \times 10^3$	$5,8 \times 10^3$	$5,7 \times 10^3$	97,6	95,4
	$4,8 \times 10^4$	$5,3 \times 10^4$	$5,1 \times 10^3$	111,1	105,9
SKBr3	$6,0 \times 10^3$	$5,6 \times 10^3$	$5,5 \times 10^3$	93,9	91,2
	$4,8 \times 10^4$	$4,7 \times 10^4$	$4,6 \times 10^3$	98,3	96,6

*Média de 3 concentrações medidas.

**Porcentagem de recuperação = $[\text{Encontrado}] / [\text{Adicionado}] \times 100$.

A combinação de MPs modificadas com anti-CD63, seguida da detecção baseada em um peptídeo selecionado por PD e ligante a proteínas tumorais de CM, proporcionou resultados promissores em termos de recuperação, detectando a presença de exossomos em matriz sorológica enriquecida sem a necessidade de tratamento ou diluição da amostra. O complexo peptídeo-exossomos ganha destaque, se mostrando inovador e potencialmente aplicável em pacientes com CM.

5. Considerações Finais

Foi inicialmente conduzido um estudo proteômico para identificar possíveis alvos do peptídeo Biotina-C3 onde, foram identificadas 38 proteínas de membrana presentes em membranas plasmáticas e membranas de organelas celulares, principalmente de mitocôndrias, que têm um papel importante na regulação metabólica celular e na progressão do câncer, sendo possíveis alvos do peptídeo Biotina-C3 em exossomos de CM. Para isso, ensaios de citometria de fluxo com exossomos imobilizados diretamente em partículas magnéticas e indiretamente em partículas magnéticas modificadas com anticorpos anti-CD9, anti-CD63 e anti-CD81 validaram a capacidade do peptídeo de se ligar a essas VEs. Interessantemente, foi observada uma marcação mais intensa nos exossomos das linhagens mais agressivas, especialmente quando pré-capturados com anti-CD63

Os exossomos também foram detectados por magneto-ELISA e por biossensor eletroquímico magnético, com LODs menores para a linhagem MCF-7 em comparação com as outras linhagens celulares. A detecção de exossomos em soro humano foi realizada com sucesso, e a combinação de partículas magnéticas modificadas com anti-CD63, seguida da detecção baseada em um peptídeo específico para proteínas tumorais de CM selecionadas por PD, proporcionou resultados promissores em termos de recuperação e especificidade. Os resultados mostraram uma melhora significativa em relação aos LODs obtidos por outros biossensores descritos na literatura.

Conclusão

Em conclusão, a presente Tese teve como objetivo desenvolver novas plataformas bioanalíticas para a detecção, diagnóstico e prognóstico do CM por meio do uso de peptídeos selecionados por PD. As plataformas consistem em um na detecção de marcadores tumorais e a identificação de exossomos em amostras sorológicas. Os resultados obtidos mostram que os peptídeos biotinilados Biotina-C3 e Biotina-H2 possuem alta afinidade pelas células luminais de CM e foram capazes de distinguir subtipos moleculares de CM, além de apresentarem melhor desempenho nos biossensores desenvolvidos em relação ao teste ELISA. Além disso, foi possível identificar possíveis alvos do peptídeo Biotina-C3 em exossomos de CM e desenvolver um método eficaz para a detecção de exossomos em soro humano.

Essas plataformas representam uma importante contribuição para a detecção precoce do CM e para a caracterização molecular de tumores, abrindo novas perspectivas para o diagnóstico e tratamento personalizado dessa doença. Futuros estudos são necessários para avaliar a eficácia e segurança dessa plataforma em estudos clínicos e sua implementação em larga escala.

Referências

ABDELZAHER, E.; MOSTAFA, M. F. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) upregulation in breast carcinoma contributes to tumor progression and predicts early tumor recurrence. **Tumor Biology**, [s. l.], v. 36, n. 7, p. 5473–5483, 2015.

ALLISON, K. H.; HAMMOND, M. E. H.; DOWSETT, M.; MCKERNIN, S. E.; CAREY, L. A.; FITZGIBBONS, P. L.; HAYES, D. F.; LAKHANI, S. R.; CHAVEZ-MACGREGOR, M.; PERLMUTTER, J.; PEROU, C. M.; REGAN, M. M.; RIMM, D. L.; SYMMANS, W. F.; TORLAKOVIC, E. E.; VARELLA, L.; VIALE, G.; WEISBERG, T. F.; MCSHANE, L. M.; WOLFF, A. C. Estrogen and progesterone receptor testing in breast cancer: ASCO/CAP guideline update. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 38, n. 12, p. 1346–1366, 2020.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Breast Cancer Gene, Protein, and Blood Tests**. 2023. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/other-breast-cancer-gene-protein-blood-tests.html>>. Acesso em: 30 mar. 2023.

ANDREU, Z.; YÁÑEZ-MÓ, M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. **Frontiers in immunology**, [s. l.], v. 5, p. 442, 2014.

ARNOLD, M.; MORGAN, E.; RUMGAY, H.; MAFRA, A.; SINGH, D.; LAVERSANNE, M.; VIGNAT, J.; GRALOW, J. R.; CARDOSO, F.; SIESLING, S. Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. **The Breast**, [s. l.], v. 66, p. 15–23, 2022.

BERNABÉ-ORTIZ, A.; ZAFRA-TANAKA, J. H.; MOSCOSO-PORRAS, M.; SAMPATH, R.; VETTER, B.; MIRANDA, J. J.; BERAN, D. Diagnostics and monitoring tools for noncommunicable diseases: a missing component in the global response. **Globalization and health**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1–5, 2021.

BHARDWAJ, A.; PATEL, G. K.; LAURINI, J. A.; ROVEDA, K.; TAN, M. C.; PATTON, M. C.; SINGH, S.; TAYLOR, W.; SINGH, A. P. Exosomal Markers (CD63 and CD9) expression pattern using immunohistochemistry in resected malignant and non-malignant pancreatic specimens. **Pancreas**, [s. l.], v. 46, n. 6, p. 782, 2017.

BRÖER, A.; GAUTHIER-COLES, G.; RAHIMI, F.; VAN GELDERMALSEN, M.; DORSCH, D.; WEGENER, A.; HOLST, J.; BRÖER, S. Ablation of the ASCT2 (SLC1A5) gene encoding a neutral amino acid transporter reveals transporter plasticity and redundancy in cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 294, n. 11, p. 4012–4026, 2019.

BROWN, C. W.; AMANTE, J. J.; CHHOY, P.; ELAIMY, A. L.; LIU, H.; ZHU, L. J.; BAER, C. E.; DIXON, S. J.; MERCURIO, A. M. Prominin2 drives ferroptosis resistance by stimulating iron export. **Developmental cell**, [s. l.], v. 51, n. 5, p. 575–586, 2019.

Referências

- BROWN, R. A. M.; RICHARDSON, K. L.; KABIR, T. D.; TRINDER, D.; GANSS, R.; LEEDMAN, P. J. Altered Iron Metabolism and Impact in Cancer Biology, Metastasis, and Immunology. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 10, 2020.
- CAPPELLO, F.; LOGOZZI, M.; CAMPANELLA, C.; BAVISOTTO, C. C.; MARCILLA, A.; PROPERZI, F.; FAIS, S. Exosome levels in human body fluids: A tumor marker by themselves? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 96, p. 93–98, 2017.
- CASSIM, S.; VUČETIĆ, M.; ŽDRALEVIĆ, M.; POUYSSEGUR, J. Warburg and beyond: the power of mitochondrial metabolism to collaborate or replace fermentative glycolysis in cancer. **Cancers**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 1119, 2020.
- CHEN, Y. J.; HONG, W. F.; LIU, M. L.; GUO, X.; YU, Y. Y.; CUI, Y. H.; LIU, T. S.; LIANG, L. An integrated bioinformatic investigation of mitochondrial solute carrier family 25 (SLC25) in colon cancer followed by preliminary validation of member 5 (SLC25A5) in tumorigenesis. **Cell Death and Disease**, [s. l.], v. 13, n. 3, 2022.
- CHENG, S.; KONG, Q.; HU, X.; ZHANG, C.; XIAN, Y. An ultrasensitive strand displacement signal amplification-assisted synchronous fluorescence assay for surface proteins of small extracellular vesicle analysis and cancer identification. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 94, n. 2, p. 1085–1091, 2022.
- COUDERT, E.; GEHANT, S.; DE CASTRO, E.; POZZATO, M.; BARATIN, D.; NETO, T.; SIGRIST, C. J. A.; REDASCHI, N.; BRIDGE, A.; CONSORTIUM, T. U. Annotation of biologically relevant ligands in UniProtKB using ChEBI. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. btac793, 2023.
- DA FONSECA ALVES, R.; MARTINS, I. C.; FRANCO, D. L.; SILVA, A. das G.; DE SOUZA SANTOS, P.; GOULART, L. R.; CRISTINA DE PAIVA MAIA, Y.; FARIA SILVA, A. T.; GONÇALVES ARAÚJO, T.; DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR, M. A novel peptide-based electrochemical biosensor for breast cancer characterization over a poly 3-(3-aminophenyl) propionic acid matrix. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 205, p. 114081, 2022.
- D'ACUNZO, P.; PÉREZ-GONZÁLEZ, R.; KIM, Y.; HARGASH, T.; MILLER, C.; ALLDRED, M. J.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; PENIKALAPATI, S. C.; PAWLIK, M.; SAITO, M. Mitovesicles are a novel population of extracellular vesicles of mitochondrial origin altered in Down syndrome. **Science advances**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. eabe5085, 2021.
- DONG, H.; CHEN, H.; JIANG, J.; ZHANG, H.; CAI, C.; SHEN, Q. Highly sensitive electrochemical detection of tumor exosomes based on aptamer recognition-induced multi-DNA release and cyclic enzymatic amplification. **Analytical chemistry**, [s. l.], v. 90, n. 7, p. 4507–4513, 2018.
- ESCOBAR, V.; SCARAMOZZINO, N.; VIDIC, J.; BUHOT, A.; MATHEY, R.; CHAIX, C.; HOU, Y. Recent Advances on Peptide-Based Biosensors and Electronic Noses for Foodborne Pathogen Detection. **Biosensors**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 258, 2023.
- FOULON, A.; RYBARCZYK, P.; JONCKHEERE, N.; BRABENCOVA, E.; SEVESTRE, H.; OUADID-AHIDOUCH, H.; RODAT-DESPOIX, L. Inositol (1,4,5)-Trisphosphate Receptors in Invasive Breast Cancer: A New Prognostic Tool?

Referências

International Journal of Molecular Sciences, [s. l.], v. 23, n. 6, 2022.

GAO, L.-F.; ZHONG, Y.; LONG, T.; WANG, X.; ZHU, J.-X.; WANG, X.-Y.; HU, Z.-Y.; LI, Z.-G. Tumor bud-derived CCL5 recruits fibroblasts and promotes colorectal cancer progression via CCR5-SLC25A24 signaling. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 81, 2022.

GAO, P.; LI, X.; DU, X.; LIU, S.; XU, Y. Diagnostic and therapeutic potential of exosomes in neurodegenerative diseases. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [s. l.], v. 13, p. 916, 2021.

GRASSO, D.; ZAMPIERI, L. X.; CAPELÔA, T.; VAN DE VELDE, J. A.; SONVEAUX, P. Mitochondria in cancer. **Cell Stress**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. 114–146, 2020.

GUO, Q.; LI, L.; HOU, S.; YUAN, Z.; LI, C.; ZHANG, W.; ZHENG, L.; LI, X. The Role of Iron in Cancer Progression. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 11, 2021.

GURUNG, S.; PEROCHEAU, D.; TOURAMANIDOU, L.; BARUTEAU, J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. **Cell Communication and Signaling**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 47, 2021.

HARTJES, T. A.; MYTNYK, S.; JENSTER, G. W.; VAN STEIJN, V.; VAN ROYEN, M. E. Extracellular vesicle quantification and characterization: common methods and emerging approaches. **Bioengineering**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 7, 2019.

HEMLER, M. E. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. **Annual review of cell and developmental biology**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 397–422, 2003.

HLOUSCHEK, J.; HANSEL, C.; JENDROSSEK, V.; MATSCHKE, J. The mitochondrial citrate carrier (SLC25A1) sustains redox homeostasis and mitochondrial metabolism supporting radioresistance of cancer cells with tolerance to cycling severe hypoxia. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 8, n. MAY, 2018.

HO-YEN, C. M.; JONES, J. L.; KERMORGANT, S. The clinical and functional significance of c-Met in breast cancer: a review. **Breast Cancer Research**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1–11, 2015.

HUANG, S.; DONG, M.; CHEN, Q. Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Breast Cancer Metastasis. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 22, p. 13993, 2022.

JABALEE, J.; TOWLE, R.; GARNIS, C. The role of extracellular vesicles in cancer: Cargo, function, and therapeutic implications. **Cells**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. 93, 2018.

JACKSON, C.; GARBETT, P.; NISSEN, B.; SCHRIEBER, L. Binding of human endothelium to Ulex europaeus I-coated Dynabeads: application to the isolation of microvascular endothelium. **Journal of cell science**, [s. l.], v. 96, n. 2, p. 257–262, 1990.

JANG, S. C.; CRESCITELLI, R.; CVJETKOVIC, A.; BELGRANO, V.; OLOFSSON BAGGE, R.; SUNDFELDT, K.; OCHIYA, T.; KALLURI, R.; LÖTVALL, J. Mitochondrial protein enriched extracellular vesicles discovered in human melanoma tissues can be detected in patient plasma. **Journal of extracellular vesicles**, [s. l.], v. 8, n. 1, p.

Referências

1635420, 2019.

JOHNSEN, K. B.; GUDBERGSSON, J. M.; ANDRESEN, T. L.; SIMONSEN, J. B. What is the blood concentration of extracellular vesicles? Implications for the use of extracellular vesicles as blood-borne biomarkers of cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, [s. l.], v. 1871, n. 1, p. 109–116, 2019.

KAMADA, S.; TAKEIWA, T.; IKEDA, K.; HORIE, K.; INOUE, S. Emerging roles of COX7RP and mitochondrial oxidative phosphorylation in breast cancer. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], p. 151, 2022.

KARLSSON, M.; ZHANG, C.; MÉAR, L.; ZHONG, W.; DIGRE, A.; KATONA, B.; SJÖSTEDT, E.; BUTLER, L.; ODEBERG, J.; DUSART, P.; EDFORS, F.; OKSVOLD, P.; VON FEILITZEN, K.; ZWAHLEN, M.; ARIF, M.; ALTAY, O.; LI, X.; OZCAN, M.; MARDINOGLU, A.; FAGERBERG, L.; MULDER, J.; LUO, Y.; PONTEN, F.; UHLÉN, M.; LINDSKOG, C. **A single-cell type transcriptomics map of human tissues** *Sci. Adv.* [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.proteinatlas.org>.

KELLER, S.; RIDINGER, J.; RUPP, A.-K.; JANSSEN, J. W.; ALTEVOGT, P. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. **Journal of translational medicine**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–9, 2011.

KIM, M. S.; GERNAPUDI, R.; CEDEÑO, Y. C.; POLSTER, B. M.; MARTINEZ, R.; SHAPIRO, P.; KESARI, S.; NURMEMMEDOV, E.; PASSANITI, A. **Targeting breast cancer metabolism with a novel inhibitor of mitochondrial ATP synthesis** *Oncotarget*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.oncotarget.com>.

KLEIN, K.; HE, K.; YOUNES, A. I.; BARSOUMIAN, H. B.; CHEN, D.; OZGEN, T.; MOSAFFA, S.; PATEL, R. R.; GU, M.; NOVAES, J.; NARAYANAN, A.; CORTEZ, M. A.; WELSH, J. W. Role of Mitochondria in Cancer Immune Evasion and Potential Therapeutic Approaches. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 11, 2020.

LI, C.; TEIXEIRA, A. F.; ZHU, H.-J.; TEN DIJKE, P. Cancer associated-fibroblast-derived exosomes in cancer progression. **Molecular Cancer**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 154, 2021.

LIU, A. R.; LIU, Y. N.; SHEN, S. X.; YAN, L. R.; LV, Z.; DING, H. X.; WANG, A.; YUAN, Y.; XU, Q. Comprehensive Analysis and Validation of Solute Carrier Family 25 (SLC25) and Its Correlation with Immune Infiltration in Pan-Cancer. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2022, 2022.

LIU, Y.; LOIJENS, J. C.; MARTIN, K. H.; KARGINOV, A. V.; PARSONS, J. T. The association of ASAP1, an ADP ribosylation factor-GTPase activating protein, with focal adhesion kinase contributes to the process of focal adhesion assembly. **Molecular Biology of the Cell**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 2147–2156, 2002.

LIU, Y.; WANG, Z.; LIU, H.; WANG, X.; ZHANG, Z.; XIAO, B.; AN, B.; ZHANG, J. Derlin-1 functions as a growth promoter in breast cancer. **Biological Chemistry**, [s. l.], v. 401, n. 3, p. 377–387, 2020.

LOGOZZI, M.; DI RAIMO, R.; MIZZONI, D.; FAIS, S. Immunocapture-based ELISA to characterize and quantify exosomes in both cell culture supernatants and body fluids. **Methods in enzymology**, [s. l.], v. 645, p. 155–180, 2020.

Referências

- LOZANO-RAMOS, I.; BANCU, I.; OLIVEIRA-TERCERO, A.; ARMENGOL, M. P.; MENEZES-NETO, A.; PORTILLO, H. A. D.; LAUZURICA-VALDEMOROS, R.; BORRÁS, F. E. Size-exclusion chromatography-based enrichment of extracellular vesicles from urine samples. **Journal of extracellular vesicles**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 27369, 2015.
- LYTOVCHENKO, O.; KUNJI, E. R. S. Expression and putative role of mitochondrial transport proteins in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, [s. l.], v. 1858, n. 8, p. 641–654, 2017.
- MAISANO, D.; MIMMI, S.; DATTILO, V.; MARINO, F.; GENTILE, M.; VECCHIO, E.; FIUME, G.; NISTICÒ, N.; ALOISIO, A.; DE SANTO, M. P. A novel phage display based platform for exosome diversity characterization. **Nanoscale**, [s. l.], v. 14, n. 8, p. 2998–3003, 2022.
- MARTÍNEZ-REYES, I.; CHANDEL, N. S. Cancer metabolism: looking forward. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 669–680, 2021.
- MATHIEU, M.; MARTIN-JAULAR, L.; LAVIEU, G.; THÉRY, C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. **Nature cell biology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 9–17, 2019.
- MATHIEU, M.; NÉVO, N.; JOUVE, M.; VALENZUELA, J. I.; MAURIN, M.; VERWEIJ, F. J.; PALMULLI, R.; LANKAR, D.; DINGLI, F.; LOEW, D.; RUBINSTEIN, E.; BONCOMPAIN, G.; PEREZ, F.; THÉRY, C. Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9. **Nature Communications**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 4389, 2021.
- MCANDREWS, K. M.; KALLURI, R. Mechanisms associated with biogenesis of exosomes in cancer. **Molecular cancer**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1–11, 2019.
- MEI, K.; YAN, T.; WANG, Y.; RAO, D.; PENG, Y.; WU, W.; CHEN, Y.; REN, M.; YANG, J.; WU, S. Magneto-Nanomechanical Array Biosensor for Ultrasensitive Detection of Oncogenic Exosomes for Early Diagnosis of Cancers. **Small**, [s. l.], v. 19, n. 9, p. 2205445, 2023.
- MON, E. E.; WEI, F.-Y.; AHMAD, R. N. R.; YAMAMOTO, T.; MOROISHI, T.; TOMIZAWA, K. Regulation of mitochondrial iron homeostasis by sideroflexin 2. **The Journal of Physiological Sciences**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 359–373, 2019.
- MOUND, A.; RODAT-DESPOIX, L.; BOUGARN, S.; OUADID-AHIDOUCH, H.; MATIFAT, F. Molecular interaction and functional coupling between type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and BKCa channel stimulate breast cancer cell proliferation. **European Journal of Cancer**, [s. l.], v. 49, n. 17, p. 3738–3751, 2013.
- MOURA, S. L.; MARTÍN, C. G.; MARTÍ, M.; PIVIDORI, M. I. Electrochemical immunosensing of nanovesicles as biomarkers for breast cancer. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 150, p. 111882, 2020.
- NICOLAS, E.; TRICARICO, R.; SAVAGE, M.; GOLEMIS, E. A.; HALL, M. J. Disease-Associated Genetic Variation in Human Mitochondrial Protein Import. **American Journal of Human Genetics**, [s. l.], v. 104, n. 5, p. 784–801, 2019.
- PALLARES-RUSIÑOL, A.; BERNUZ, M.; MOURA, S. L.; FERNÁNDEZ-SENAC, C.;

Referências

- ROSSI, R.; MARTÍ, M.; PIVIDORI, M. I. Advances in exosome analysis. **Advances in clinical chemistry**, [s. l.], p. 69, 2023.
- PANDE, J.; SZEWCZYK, M. M.; GROVER, A. K. Phage display: concept, innovations, applications and future. **Biotechnology advances**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 849–858, 2010.
- PARK, H. A.; BROWN, S. R.; KIM, Y. Cellular mechanisms of circulating tumor cells during breast cancer metastasis. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 14, p. 1–19, 2020.
- PELTOMAA, R.; BENITO-PEÑA, E.; BARDERAS, R.; MORENO-BONDI, M. C. Phage display in the quest for new selective recognition elements for biosensors. **ACS omega**, [s. l.], v. 4, n. 7, p. 11569–11580, 2019.
- PENG, J.-M.; LIN, S.-H.; YU, M.-C.; HSIEH, S.-Y. CLIC1 recruits PIP5K1A/C to induce cell-matrix adhesions for tumor metastasis. **The Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 131, n. 1, 2021.
- PERETTI, M.; ANGELINI, M.; SAVALLI, N.; FLORIO, T.; YUSPA, S. H.; MAZZANTI, M. Chloride channels in cancer: Focus on chloride intracellular channel 1 and 4 (CLIC1 AND CLIC4) proteins in tumor development and as novel therapeutic targets. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [s. l.], v. 1848, n. 10, Part B, p. 2523–2531, 2015.
- PÉREZ-AMADO, C. J.; TOVAR, H.; GÓMEZ-ROMERO, L.; BELTRÁN-ANAYA, F. O.; BAUTISTA-PIÑA, V.; DOMINGUEZ-REYES, C.; VILLEGAS-CARLOS, F.; TENORIO-TORRES, A.; ALFARO-RUIZ, L. A.; HIDALGO-MIRANDA, A.; JIMÉNEZ-MORALES, S. Mitochondrial DNA Mutation Analysis in Breast Cancer: Shifting From Germline Heteroplasmy Toward Homoplasmy in Tumors. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 10, 2020.
- RAK, M.; BÉNIT, P. P.; CHRÉTIEN, D.; BOUCHEREAU, J.; SCHIFF, M.; EL-KHOURY, R.; TZAGOLOFF, A.; RUSTIN, P. Mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency. **Clinical Science**, [s. l.], v. 130, n. 6, p. 393–407, 2016.
- REZAUL, K.; KUMAR THUMAR, J.; LUNDGREN, D. H.; ENG, J. K.; CLAFFEY, K. P.; WILSON, L.; HAN, D. K. Differential protein expression profiles in estrogen receptor-positive and -negative breast cancer tissues using label-free quantitative proteomics. **Genes and Cancer**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 251–271, 2010.
- SAEEDI, S.; ISRAEL, S.; NAGY, C.; TURECKI, G. The emerging role of exosomes in mental disorders. **Translational psychiatry**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 122, 2019.
- SAEZ, R. A.; MCGUIRE, W. L.; CLARK, G. M. Prognostic factors in breast cancer. Em: 1989, **Anais...** . Em: SEMINARS IN SURGICAL ONCOLOGY. : Wiley Online Library, 1989.
- SAHA, S. K.; ISLAM, S. M. R.; KWAK, K.-S.; RAHMAN, M. S.; CHO, S.-G. PROM1 and PROM2 expression differentially modulates clinical prognosis of cancer: a multiomics analysis. **Cancer gene therapy**, [s. l.], v. 27, n. 3–4, p. 147–167, 2020.
- SALHIA, B.; KIEFER, J.; ROSS, J. T. D.; METAPALLY, R.; MARTINEZ, R. A.; JOHNSON, K. N.; DIPERNA, D. M.; PAQUETTE, K. M.; JUNG, S.; NASSER, S.

Referências

- Integrated genomic and epigenomic analysis of breast cancer brain metastasis. **PloS one**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. e85448, 2014.
- SCHWARZENBACH, H.; GAHAN, P. B. Exosomes in immune regulation. **Non-coding RNA**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 4, 2021.
- SINGH, R. K.; SAINI, S. K.; PRAKASAM, G.; KALAIRASAN, P.; BAMEZAI, R. N. K. Role of ectopically expressed mtDNA encoded cytochrome c oxidase subunit I (MT-COI) in tumorigenesis. **Mitochondrion**, [s. l.], v. 49, p. 56–65, 2019.
- SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, [s. l.], v. 228, n. 4705, p. 1315–1317, 1985.
- SUH, K. S.; MUTOH, M.; GERDES, M.; CRUTCHLEY, J. M.; MUTOH, T.; EDWARDS, L. E.; DUMONT, R. A.; SODHA, P.; CHENG, C.; GLICK, A. Antisense suppression of the chloride intracellular channel family induces apoptosis, enhances tumor necrosis factor α -induced apoptosis, and inhibits tumor growth. **Cancer research**, [s. l.], v. 65, n. 2, p. 562–571, 2005.
- SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.
- THÉRY, C.; WITWER, K. W.; AIKAWA, E.; ALCARAZ, M. J.; ANDERSON, J. D.; ANDRIANTSITOHAINA, R.; ANTONIOU, A.; ARAB, T.; ARCHER, F.; ATKIN-SMITH, G. K. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of extracellular vesicles**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1535750, 2018.
- VALADI, H.; EKSTRÖM, K.; BOSSIOS, A.; SJÖSTRAND, M.; LEE, J. J.; LÖTVALL, J. O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature cell biology**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 654–659, 2007.
- VASAN, K.; WERNER, M.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial metabolism as a target for cancer therapy. **Cell metabolism**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 341–352, 2020.
- VOLGERS, C.; BENEDIKTER, B. J.; GRAULS, G. E.; SVELKOU, P. H.; STASSEN, F. R. Bead-based flow-cytometry for semi-quantitative analysis of complex membrane vesicle populations released by bacteria and host cells. **Microbiological Research**, [s. l.], v. 200, p. 25–32, 2017.
- WAN, Y.; CHENG, G.; LIU, X.; HAO, S.-J.; NISIC, M.; ZHU, C.-D.; XIA, Y.-Q.; LI, W.-Q.; WANG, Z.-G.; ZHANG, W.-L. Rapid magnetic isolation of extracellular vesicles via lipid-based nanoprobe. **Nature biomedical engineering**, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 0058, 2017.
- WANG, X.; TIAN, L.; LU, J.; NG, I. O.-L. Exosomes and cancer - Diagnostic and prognostic biomarkers and therapeutic vehicle. **Oncogenesis**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 54, 2022.

Referências

- WENG, J.; XIANG, X.; DING, L.; WONG, A. L.-A.; ZENG, Q.; SETHI, G.; WANG, L.; LEE, S. C.; GOH, B. C. Extracellular vesicles, the cornerstone of next-generation cancer diagnosis? Em: 2021, **Anais...** . Em: SEMINARS IN CANCER BIOLOGY. : Elsevier, 2021.
- WHO. **Breast cancer**. 2023. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>>. Acesso em: 30 mar. 2023.
- XAVIER, C. P. R.; CAIRES, H. R.; BARBOSA, M. A. G.; BERGANTIM, R.; GUIMARÃES, J. E.; VASCONCELOS, M. H. The role of extracellular vesicles in the hallmarks of cancer and drug resistance. **Cells**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 1141, 2020.
- XU, P.; GHOSH, S.; GUL, A. R.; BHAMORE, J. R.; PARK, J. P.; PARK, T. J. Screening of specific binding peptides using phage-display techniques and their biosensing applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 137, p. 116229, 2021.
- YAN, Y.; TAO, H.; HE, J.; HUANG, S.-Y. The HDock server for integrated protein–protein docking. **Nature protocols**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 1829–1852, 2020.
- YÁÑEZ-MÓ, M.; SILJANDER, P. R.-M.; ANDREU, Z.; BEDINA ZAVEC, A.; BORRÀS, F. E.; BUZAS, E. I.; BUZAS, K.; CASAL, E.; CAPPELLO, F.; CARVALHO, J. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of extracellular vesicles**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 27066, 2015.
- YANG, J.; PAN, B.; ZENG, F.; HE, B.; GAO, Y.; LIU, X.; SONG, Y. Magnetic colloid antibodies accelerate small extracellular vesicles isolation for point-of-care diagnostics. **Nano Letters**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 2001–2009, 2021.
- YANG, Y.; LI, C.; SHI, H.; CHEN, T.; WANG, Z.; LI, G. A pH-responsive bioassay for paper-based diagnosis of exosomes via mussel-inspired surface chemistry. **Talanta**, [s. l.], v. 192, p. 325–330, 2019.
- YORDANOVA, M.; HASSAN, S. The Role of the 21-Gene Recurrence Score® Assay in Hormone Receptor-Positive, Node-Positive Breast Cancer: The Canadian Experience. **Current Oncology**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 2008–2020, 2022.
- YU, D.; LI, Y.; WANG, M.; GU, J.; XU, W.; CAI, H.; FANG, X.; ZHANG, X. Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy. **Molecular Cancer**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 56, 2022.
- YU, W.; HURLEY, J.; ROBERTS, D.; CHAKRABORTTY, S.; ENDERLE, D.; NOERHOLM, M.; BREAKFIELD, X.; SKOG, J. Exosome-based liquid biopsies in cancer: opportunities and challenges. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 466–477, 2021.
- YUAN, D.; LIU, J.; SANG, W.; LI, Q. Comprehensive analysis of the role of SFXN family in breast cancer. **Open Medicine**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 20230685, 2023.
- ZAMBRANO-MILA, M. S.; BLACIO, K. E. S.; VISPO, N. S. Peptide phage display: Molecular principles and biomedical applications. **Therapeutic innovation & regulatory science**, [s. l.], v. 54, n. 2, p. 308–317, 2020.
- ZHAI, L.-Y.; LI, M.-X.; PAN, W.-L.; CHEN, Y.; LI, M.-M.; PANG, J.-X.; ZHENG, L.;

Referências

CHEN, J.-X.; DUAN, W.-J. In situ detection of plasma exosomal microRNA-1246 for breast cancer diagnostics by a Au nanoflare probe. **ACS applied materials & interfaces**, [s. l.], v. 10, n. 46, p. 39478–39486, 2018.

ZHANG, L.; WEI, Y.; YUAN, S.; SUN, L. Targeting Mitochondrial Metabolic Reprogramming as a Potential Approach for Cancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 4954, 2023.

ZHOU, Q.; RAHIMIAN, A.; SON, K.; SHIN, D.-S.; PATEL, T.; REVZIN, A. Development of an aptasensor for electrochemical detection of exosomes. **Methods**, [s. l.], v. 97, p. 88–93, 2016.