

USO DE TESTES RÁPIDOS PARA DETECÇÃO DE BIOMARCADORES CARDÍACOS: ESTADO DA ARTE E PERSPECTIVAS FUTURAS

Stella Schuster da Silva^{1*}, Mylena Lemes Cunha^{1}, Lucas Blanes¹**

¹ Laboratório de Ciências e Tecnologias Aplicadas à Saúde, ICC/Fiocruz

* stellaschuster@ufpr.br

** mylenacunha@ufpr.br

Resumo

Doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no Brasil e no mundo. São patologias de alta mortalidade e morbidade, e a condição dos pacientes se agrava rapidamente. Um diagnóstico rápido, confiável e barato é necessário para reduzir a mortalidade e a probabilidade de sequelas cardíacas a longo prazo. Ensaios de fluxo lateral, popularmente conhecidos como testes rápidos, são uma tecnologia barata e adaptável que permite o diagnóstico de doenças cardíacas através da detecção de biomarcadores. Esta revisão tem por objetivo trazer uma visão do estado da arte dessa tecnologia e discutir suas perspectivas futuras, demonstrando seu potencial para reduzir a mortalidade por doenças cardíacas através do diagnóstico precoce e de fácil acesso, especialmente em um país heterogêneo como o Brasil. Para a coleta de dados, foram utilizadas as bases de dados Scopus, PubMed e ScienceDirect e as palavras-chaves “*lateral flow*” AND “*cardiac*” e semelhantes. Dezesete artigos, publicados nos últimos cinco anos, foram incluídos neste estudo.

Palavras-chave: Teste Rápido; Biomarcadores Cardíacos; Point-of-care; Diagnóstico.

Área Temática: Temas livres

Modalidade: Resumo expandido

1 INTRODUÇÃO

Ensaios de fluxo lateral, popularmente conhecidos como testes rápidos, são biosensores baseados em papel amplamente utilizados, capazes de detectar analitos em amostras biológicas complexas (KOCZULA e GALOTTA, 2016).

Sua operação se baseia em um elemento de bioreconhecimento conjugado a uma partícula que possa ser observada ou quantificada e um elemento de captura que fica imobilizado na linha de teste. Tipicamente, o elemento de bioreconhecimento tende a ser um anticorpo conjugado a uma partícula de ouro coloidal e o elemento de captura também um anticorpo imobilizado em uma linha de teste em uma membrana de nitrocelulose. Ambos formam um imunensaio sanduíche na presença do alvo e a acumulação das partículas de

ouro na linha de teste permite a visualização do resultado positivo. Contudo, existem diversos formatos de testes rápidos, com diferentes elementos de detecção, de captura, sistemas de detecção, etc. Esses dispositivos funcionam devido ao fluxo capilar passivo, portanto não necessitam de subpartes eletromecânicas para funcionar. Essa operação fácil e praticamente automática torna esses dispositivos *user-friendly* capazes de serem utilizados por pessoas não-capacitadas (ZHAO *et al.*, 2018).

Por serem baseados em papel, são baratos e fáceis de produzir. Além disso, são fáceis de usar, pois não demandam equipamentos laboratoriais, são eficientes e tem longa data de validade, podendo ser armazenados sem refrigeração. Essas características cumprem o critério ASSURED (Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free, and Delivered to the end-users), estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para dispositivos de aplicação *point-of-care* (NGUYEN *et al.*, 2020).

Dadas essas características, e por ser adaptável para detecção de qualquer alvo de interesse, é ideal para o diagnóstico de patologias cardíacas, como infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca e outras cardiopatias. Doenças cardiovasculares (DCV) atualmente são a principal causa de morte no Brasil e no mundo. A OMS estima que até 2030 será a causa de morte de 22,2 milhões de pessoas anualmente. São condições de alta mortalidade, morbidade e índice de re-hospitalização e a condição dos pacientes tendem a deteriorar rapidamente (WANG *et al.*, 2020). Posto isso, é imprescindível um método de diagnóstico rápido, capaz de estratificar risco, para providenciar manejo eficaz do paciente e atenção médica rápida e precisa. O diagnóstico precoce é fundamental para minimizar a mortalidade e reduzir a probabilidade de sequelas cardíacas a longo prazo (SAVONNET *et al.*, 2021).

Estudos feitos no Brasil e no Reino Unido mostram que, por conta da pandemia de COVID-19, a mortalidade por doenças cardiovasculares aumentou. Os motivos vão desde pessoas evitando procurar atendimento médico por conta do distanciamento social, o que levou a um aumento de mortes em casa por DCV, até o colapso do sistema de saúde pela sobrecarga de casos de COVID-19 (WATKINS *et al.*, 2020). Nesse cenário, um método diagnóstico barato, rápido e portátil, que descentralize o acesso ao sistema de saúde, poderia ter um papel fundamental na redução da mortalidade por doenças cardiovasculares.

A avaliação de biomarcadores cardíacos é fundamental para estabelecer o diagnóstico preciso de doenças cardiovasculares. Os mais utilizados são a troponina cardíaca I, considerada padrão-ouro para infarto agudo do miocárdio, peptídeos natriuréticos, para o diagnóstico de insuficiência cardíaca, creatina-kinase MB, proteína C reativa, entre outros.

Além desses, outros biomarcadores promissores estão emergindo, como os miRNAs (WANG et al, 2020).

Posto o potencial dessa tecnologia em reduzir a mortalidade e morbidade em doenças cardiovasculares através do diagnóstico rápido e acessível, esta revisão tem por objetivo integrar os testes rápidos para detecção de biomarcadores cardíacos descritos em artigos de pesquisa na literatura científica nos últimos cinco anos e, além disso, fornecer sugestões de abordagens para investigações na área com base nas perspectivas futuras de evolução dessa tecnologia.

2 MÉTODO

Foram realizadas buscas nas bases de dados PubMed, Scopus e ScienceDirect para coleta de dados. Foram aplicados os termos ““lateral flow” AND cardiac”, ““lateral flow” AND NT-proBNp”, ““lateral flow” AND “CK-MB”” e ““lateral flow” AND myoglobin”. Os critérios de inclusão utilizados foram artigos de pesquisa relevantes ao tema publicados nos últimos cinco anos (2017-2021) e em inglês, sendo excluído qualquer outro tipo de documento e qualquer artigo que não se tratasse do tema abordado. Foram selecionados para este estudo dezessete artigos que atenderam aos critérios.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios de fluxo lateral tipicamente contêm quatro estruturas básicas: um pad de amostra; um pad de conjugação, onde estão depositados os elementos de detecção e de bioreconhecimento; uma membrana de nitrocelulose, onde estão imobilizados os elementos de captura; e um pad absorvente, cuja função é estimular o fluxo capilar dentro do dispositivo. Esse formato pode ser adaptado para cada aplicação. Esses testes podem ser usados para o diagnóstico de doenças cardíacas através da detecção de biomarcadores.

Biomarcadores são indicadores de processos biológicos, patológicos ou fisiológicos, que podem ser quantificados e avaliados dentro de um organismo para prover diagnóstico e estratificação de risco em pacientes (SARHENE *et al.*, 2019). Portanto, quando há alguma desregulação no sistema cardiovascular que resulta em dano ao miocárdio e potencialmente morte celular, há a liberação de diversos fatores, proteínas e hormônios que podem ser usados como biomarcadores (WANG *et al.* 2020).

Entre os biomarcadores cardíacos, a troponina cardíaca I (cTnI) é considerada padrão-ouro no diagnóstico do infarto agudo do miocárdio (IAM), por ser altamente específica ao miocárdio. Peptídeos natriuréticos tipo-B (BNP) são o biomarcador cardíaco considerado

padrão para o diagnóstico de insuficiência cardíaca. A enzima Creatina kinase-MB (CK-MB), a proteína C-reativa, a mioglobina e a hFABP (do inglês, *Heart Fatty Acid Binding Protein*) também são biomarcadores utilizados para o diagnóstico de IAM, porém menos específicos que a cTnI.

Atualmente, a maioria dos testes diagnósticos com biomarcadores cardíacos é feito em laboratórios centralizados, onde múltiplos passos são necessários e a carga de trabalho é alta, atrasando o diagnóstico do infarto, o que pode acarretar em sérias consequências (HAN *et al.*, 2020a). Outro problema frequente são os testes diagnósticos meramente qualitativos, o que tende a ser uma desvantagem já que a quantificação dos biomarcadores cardíacos é necessária para determinar prognóstico e estratificação de risco.

Muitos estudos descritos na literatura procuram desenvolver testes rápidos com abordagens quantitativas, usando diferentes elementos de bioreconhecimento e de detecção. Entre os métodos de detecção, destacam-se: quimioluminescência, fluorescência, espectroscopia Raman amplificada por superfície e outras técnicas com nanopartículas metálicas, imunocromatografia magnética e reações enzimáticas. Contudo, a maioria das abordagens relatadas necessita de um leitor dedicado de bancada, dificultando, portanto, a aplicação *point-of-care* em locais com poucos recursos. Uma das soluções para esse obstáculo é o uso de leitores baseados em *smartphones*. Como exemplo, Han *et al.* (2020b) desenvolveram um leitor baseado em *smartphone* fabricado por impressão 3D, aplicado em um teste rápido para quantificar cTnI em amostras clínicas de soro. Os autores reportaram um Limite de Detecção de 0,00092 ng/mL.

Quanto aos elementos de bioreconhecimento, os mais utilizados são anticorpos. Porém aptâmeros, pequenos oligonucleotídeos de RNA ou DNA fita simples selecionados através de Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX), também são utilizados, com diversas vantagens em relação aos anticorpos. Anticorpos, por serem gerados *in vivo*, podem ter diferença entre diferentes lotes, são mais instáveis à temperatura e dificultam modificações químicas, o que pode limitar as possibilidades de métodos analíticos (ZHAO *et al.*, 2018). Aptâmeros foram empregados por Zhang *et al.* (2018), conjugados a microesferas fluorescentes, para detecção de CK-MB em soro, com um leitor de fluorescência dedicado para fitas de teste, obtendo um limite de detecção de 0,63 ng/mL.

Além disso, é possível adaptar a base do teste substituindo a mais convencional membrana de nitrocelulose por uma membrana Fusion 5, como demonstrado por Lee *et al.* (2020) em um teste de fluxo lateral para detecção de cTnI em soro, com Limite de Detecção de 0,097 ng/mL. A principal vantagem reportada para o uso da Fusion 5 é a dispensabilidade

de matrizes adicionais, que normalmente serviriam como pad de conjugação e pad absorvente, de forma que todas as reações ocorrem na mesma membrana, tornando a produção do teste mais simples e custo-efetiva.

Ensaio *multiplex*, onde múltiplos biomarcadores podem ser avaliados em uma única fita, também são uma tendência no desenvolvimento de testes rápidos por sua capacidade de fornecer um resultado mais confiável e específico e com melhor predição do prognóstico. Um exemplo disso é o dispositivo desenvolvido por Hong *et al.* (2018), um teste baseado em nanopartículas magnéticas para detecção de cTnI, mioglobina e CK-MB. A mioglobina é liberada uma hora após o IAM, mas não é específica para o miocárdio, diferentemente da cTnI e da CK-MB. Contudo, estas são detectáveis no sangue apenas dentro de quatro horas. É possível, portanto, a partir da avaliação múltipla desses biomarcadores, determinar um diagnóstico precoce e específico dessa patologia, dentro de treze minutos.

4 CONCLUSÃO

Testes rápidos são os biosensores mais utilizados atualmente, dadas as suas inúmeras vantagens como portabilidade, custo-benefício e facilidade de uso. Essas características e outras tornam essa tecnologia ideal para a aplicação *point-of-care* no diagnóstico de doenças cardíacas, que demandam rapidez dada a progressão veloz da patologia.

Os testes rápidos meramente qualitativos, tradicionalmente fabricados com nanopartículas de ouro, possuem sensibilidade e aplicabilidade limitada, visto que a quantificação dos biomarcadores permite a estratificação de risco e avaliação do prognóstico dos pacientes. Por isso, novos métodos de detecção, como o uso de partículas fluorescentes, por exemplo, estão surgindo para permitir a quantificação dos analitos. Contudo, a maior desvantagem atrelada a esses novos métodos é a necessidade de leitores de bancada, o que limita a aplicação *point-of-care*. Para superar essa deficiência, leitores baseados em *smartphones* estão sendo desenvolvidos para viabilizar o diagnóstico sem a necessidade de equipamentos laboratoriais. Além disso, uma das perspectivas futuras para o diagnóstico com ensaios de fluxo lateral é a detecção simultânea de múltiplos biomarcadores, o que permite superar as limitações atreladas a cada um, como baixa especificidade ou liberação tardia na corrente sanguínea.

Posto isso, os próximos desafios a serem superados para facilitar o diagnóstico rápido, confiável e acessível de doenças cardíacas é a detecção em sangue total, para dispensar a necessidade de preparação prévia das amostras, e a detecção de biomarcadores de ácidos

nucleicos, como miRNA, que são altamente específicos, mas demandam de reações de amplificação para serem detectáveis.

REFERÊNCIAS

HAN, G-R. *et al.* Paper/Soluble Polymer Hybrid-Based Lateral Flow Biosensing Platform for High-Performance Point-of-Care Testing. **ACS Appl Mater Interfaces**, v. 12, n. 31, p. 34564–34575, jul./2020. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c07893>

HAN, G-R., KIM, M-G. Highly Sensitive Chemiluminescence-Based Lateral Flow Immunoassay for Cardiac Troponin I Detection in Human Serum. **Sensors**, v. 20, n. 9:2593, mai./2020a. <https://doi.org/10.3390/s20092593>

HONG L., *et al.* High performance immunochromatographic assay for simultaneous quantitative detection of multiplex cardiac markers based on magnetic nanobeads. **Theranostics**, v. 8, n. 22, p. 6121-6131, nov./2018. doi:10.7150/thno.29070

KOCZULA, K. M.; GALLOTTA, A. Lateral flow assays. **Essays Biochem**, v. 60, n. 1, p. 111–120, jun./2018. <https://doi.org/10.1042/ebc20150012>

LEE, K. *et al.* Time-resolved fluorescence resonance energy transfer-based lateral flow immunoassay using a raspberry-type europium particle and a single membrane for the detection of cardiac troponin I. **Biosens Bioelectron**, v. 163, n. 112284, set./2020. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112284>

NGUYEN, V.-T. *et al.* Recent advances in high-sensitivity detection methods for paper-based lateral-flow assay. **Biosens Bioelectron**, v. 152, n. 112015, mar./2020. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112015>

SARHENE, M. *et al.* Biomarkers in heart failure: the past, current and future. **Heart Fail Rev**, v. 24, p. 867–903, jun./2019. <https://doi.org/10.1007/s10741-019-09807-z>

SAVONNET, M. *et al.* (2021). Recent advances in cardiac biomarkers detection: From commercial devices to emerging technologies. **J Pharm Biomed Anal**, v. 194, n. 113777, fev./2021. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113777>

WANG, X.-Y. *et al.* The Biomarkers for Acute Myocardial Infarction and Heart Failure. **Biomed Res Int**, v. 2020, ID 2018035, jan./2020. <https://doi.org/10.1155/2020/2018035>

WATKINS, D. A. Cardiovascular health and COVID-19: time to reinvent our systems and rethink our research priorities. **Heart**, v. 106, n. 24, p. 1870–1872, nov./2020. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2020-318323>

ZHANG, J. *et al.* Aptamer-based fluorometric lateral flow assay for creatine kinase MB. **Microchim Acta**, v.185, n. 364, jul./2018. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2905-4>

ZHAO, S. *et al.* State of the art: Lateral flow assay (LFA) biosensor for on-site rapid detection. **Chin Chem Lett**, v. 29, n. 11, p. 1567–1577, dez./2018. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2017.12.008>