



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

**INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS**

**VANESSA MORAIS BRAITE**

**UTILIZAÇÃO DE RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE  
SUPERFÍCIE COMO FERRAMENTA ANALÍTICA PARA  
DETECÇÃO DE BIOMARCADORES**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,  
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita  
Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do  
título de Mestre no Programa de Pós-graduação em  
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa

Botucatu

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



**VANESSA MORAIS BRAITE**

**UTILIZAÇÃO DE RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE COMO  
FERRAMENTA ANALÍTICA PARA DETECÇÃO DE BIOMARCADORES**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,  
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita  
Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do  
título de Mestre no Programa de Pós-graduação em  
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa

Botucatu

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Braite, Vanessa Moraes.

Utilização de ressonância plasmônica de superfície como ferramenta analítica para detecção de biomarcadores /  
Vanessa Moraes Braite. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Valber de Albuquerque Pedrosa  
Capes: 90400003

1. Ressonância de plasmônio de superfície. 2. Próstata - Câncer. 3. Biossensores. 4. Mucinas. 5. Marcadores bioquímicos.

Palavras-chave: Biossensor; Câncer de próstata; Mucina; Ressonância plasmônica de superfície.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.

(Charles Chaplin)

Dedico esse trabalho aos meus pais Licínia e José Francisco pela dedicação e apoio e por sempre torcerem por mim.

## AGRADECIMENTOS

*Meus mais sinceros agradecimentos...*

À Deus, por me dar força e coragem para superar as dificuldades.

Aos meus pais Licínia e José Francisco que são a base da minha vida; pelo incentivo e amor incondicional. Aos meus tios Fernanda e Luciano por sempre estarem ao meu lado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa por me receber em seu laboratório, pela paciência, suporte e por todos os ensinamentos nesses anos.

Aos colegas do Laboratório de Biomateriais e Técnicas Eletroquímicas do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências de Botucatu (Unesp), Jéssica e João Paulo e em especial a Caroline e ao Bruno; pela ajuda, conhecimentos compartilhados e pelos momentos de descontração.

À Profa. Dra. Flávia Karina Delella e sua equipe, por fornecer sobrenadante celular, imprescindível para o experimento.

Aos meus amigos pelos desabafos, momentos compartilhados e pela compreensão das ausências inevitáveis.

Aos servidores do Departamento de Química e Bioquímica.

Aos servidores da Seção Técnica de Pós-graduação do Instituto de Biociências pelo suporte fornecido.

Aos colegas da Seção Técnica de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, Cesar, Daniele, Diego, Vânia, Lilian, Márcia, Tatiane, Janisse, Bruna e Ana pela compreensão das minhas ausências e pelo apoio; e em especial à Janete, Luciene, Andrea e Solange pelo incentivo, suporte, conselhos, desabafos e momentos de descontração, tornando esta jornada mais leve.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização e conclusão de mais uma etapa da minha vida.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de funcionamento de biossensor para detecção do analito .....	17
Figura 2 - Esquema de um biossensor e suas subclasses .....	18
Figura 3 - Representação do funcionamento de um equipamento de Ressonância Plasmônica de Superfície .....	22
Figura 4 - Representação de um instrumento típico de SPR. Lâmina de vidro recoberta com prata/ouro sob um prisma, onde o feixe de luz convergente é focado sobre o lado de baixo do filme de prata/ouro, que é refletida para um detector de arranjo bidimensional de fotodiodos. A superfície do filme de prata/ouro pode ser modificada dando origem a uma variedade de superfícies sensoras .....	23
Figura 5 – Sensorgrama característico da SPR dividido em quatro etapas: Fase de associação; fase estável; fase de dissociação e fase de regeneração .....	25
Figura 6 - Representação do funcionamento da Ressonância de Plasma de Superfície segundo configuração de Kretschmann .....	26
Figura 7: Sensorgrama exemplificando o experimento: Ativação dos grupos carboxílicos utilizando solução de EDC/NHS e a imobilização do aptâmero. As setas azuis indicam o início do passo de lavagem com água deionizada Milli-Q .....	36
Figura 8 A – Gráfico de detecção da proteína MUC1 obtido pela técnica SPR. (A) Ativação com EDC/NHS; (B) injeção do aptâmero conjugado com AuNP; (C, D, E, F) adição da proteína MUC1 50 ng $\mu\text{L}^{-1}$ , 70 ng $\mu\text{L}^{-1}$ , 100 ng $\mu\text{L}^{-1}$ e 140 ng $\mu\text{L}^{-1}$ respectivamente; (G) sobrenadante celular LNCaP. As setas azuis indicam lavagem com água deionizada Milli-Q. <b>Figura 8B:</b> Primeiros passos iguais ao da figura 8A; (C, D, E) adição da proteína MUC1 5 ng $\mu\text{L}^{-1}$ , 15 ng $\mu\text{L}^{-1}$ , 30 ng $\mu\text{L}^{-1}$ respectivamente. As setas azuis indicam lavagem com água deionizada Milli-Q .....	37
Figura 9- Resposta SPR (RU) versus concentração de MUC1. O gráfico mostra as respostas SPR em cada injeção de proteína .....	38
Figura 10 - Gráfico de detecção do sobrenadante celular da linhagem (LNCaP; ATCC® CRL-1740™). (A) Ativação com EDC/NHS; (B) injeção do aptâmero conjugado com AuNP; (C, D, E, F) adição do sobrenadante da linhagem (LNCaP; ATCC® CRL-1740™) nas seguintes diluições: 1/50; 1/100; 1/200 e 1/500. As setas azuis indicam lavagem com água deionizada Milli-Q .....	39



Figura 11 - Resposta SPR (RU) versus diluição de sobrenadante. O gráfico mostra as respostas SPR em cada injeção .....40

Figura 12 - Gráfico da refletividade pelo ângulo (SPR). A linha vermelha refere-se à modificação da superfície com a solução de MUA ativada com EDC/NHS. A linha azul representa a adsorção do aptâmero e a linha roxa é a adição do sobrenadante .....40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AuNPs- Nanopartículas de Ouro

$c$  - Velocidade da Luz

DNA- Ácido Desoxirribonucléico

EDC- N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

ELISA- Ensaio de Imunoadsorção Enzimática

$\epsilon_m$ - Constante Dielétrica do Metal

$\epsilon_p$ - Constante Dielétrica do Prisma

kDa - Kilodalton

$K_{OPS}$ - Constante de Propagação das Ondas de Plasmons de Superfície

$K_x$ - Ângulo

MUA- Ácido 11- mercaptoundecanóico

MUC1 – Mucina Epitelial Polimórfica tipo 1

NHS- N-hidroxissuccinimida

$\Theta$ - Ângulo de Incidência da Luz

OPS- Ondas de Plasmons de Superfície

PBS- Tampão Fosfato Salino

PCa – Câncer de Próstata

PCR- Reação de Cadeia Polimérica

PSA – Antígeno Prostático Específico

RNA- Ácido Ribonucléico

RU- Unidades Ressonantes

SAM- Monocamada Auto-organizada

SELEX - Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial

SPR- Ressonância Plasmônica de Superfície

$\omega$ - Frequência Angular da Luz Incidente

## SUMÁRIO

RESUMO .....	13
ABSTRACT .....	14
1 INTRODUÇÃO .....	15
1.1 Biossensor/aptasensor .....	17
1.2 Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) .....	21
1.3 Câncer de próstata e biomarcadores .....	28
2 OBJETIVO .....	31
2.1 Objetivos Gerais .....	31
2.2 Objetivos Específicos .....	31
3 PARTE EXPERIMENTAL .....	32
3.1 Reagentes Utilizados .....	32
3.2 Cultivo das células .....	32
3.3 Equipamento .....	33
3.3.1 Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) .....	33
3.4 Procedimentos .....	33
3.4.1 Limpeza do sensor e preparação das SAMs (Monocamadas auto organizadas) .....	33
3.4.2 Preparação das nanopartículas de ouro .....	34
4 RESULTADO E DISCUSSÃO .....	35
4.1 Detecção da MUC1 e sobrenadante das células da linhagem (LNCaP; ATCC® CRL-1740™) utilizando Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) .....	35
5 CONCLUSÃO .....	42
6 REFERÊNCIAS .....	43

## **RESUMO**

O desenvolvimento de novos dispositivos para monitorar o metabolismo celular e o diagnóstico de doenças expandiu as pesquisas com biossensores, que aliados à nanotecnologia possibilitaram a criação de novos elementos com alta sensibilidade de detecção, especificidade e capacidade de multiplexação, mostrando grande potencial para sua aplicabilidade no diagnóstico clínico. O trabalho foi desenvolvido em duas etapas. A primeira, referiu-se no desenvolvimento de uma metodologia para acoplar o aptâmero conjugado com as nanopartículas de ouro sobre o sensor da Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR). Foi utilizado MUA para formação das monocamadas auto-organizadas; ativação dos grupos carboxílicos utilizando solução de EDC/NHS e a imobilização do aptâmero conjugado. Após este processo, foram realizadas as injeções de Mucina Epitelial Polimórfica tipo 1 (MUC1). A segunda etapa, consistiu na mesma metodologia de acoplamento do aptâmero, porém substituindo a MUC1 por sobrenadante da linhagem celular LNCaP (células prostáticas tumorais). Desse modo, foi desenvolvida uma metodologia analítica utilizando aptâmeros e biomarcadores para diagnosticar o Câncer de Próstata (PCa) através da SPR.

**Palavras-chave:** Biossensor, Câncer de Próstata, Ressonância Plasmônica de Superfície e Mucina.

## **ABSTRACT**

The development of new devices to monitor cell metabolism and the diagnosis of diseases has expanded research with biosensors, which together with nanotechnology enable the creation of new elements with high detection sensitivity, specificity and multiplexing capacity. The work has developed in two stages. First, concerning the development of a methodology for the coupling or the conjugate with the gold nanoparticles on the Surface Plasmon Resonance (SPR) sensor. MUA has used for the formation of self-organized monolayers; activation of social media groups, EDC / NHS solution, and a conjugate fit immobilization. After this process, they have performed as injections of Polimorphic Epithelial Mucin type 1 (MUC1). The second step consisted of the same aptamer coupling methodology, but replacing a MUC1 with supernatant of the LNCaP cell line (prostatic tumor cells). Thus, an analytical methodology has developed, using aptamers and biomarkers for the diagnosis of Prostate Cancer (PCa) through the SPR.

**Keywords:** Biosensor, Prostate cancer, Surface Plasmon Resonance and Mucin.

## 1 INTRODUÇÃO

Câncer é o nome genérico designado a uma série de doenças, cuja característica principal é ser decorrente de um descontrole nos mecanismos da divisão celular. O início se dá quando as células de algum tecido ou órgão começam a crescer descontroladamente, produzindo células anômalas, podendo se multiplicar e invadir outros órgãos, processo conhecido por metástase [1] e seu aparecimento se dá com maior frequência em pessoas na faixa etária entre 40 e 60 anos. Os órgãos mais comumente acometidos são útero e mama nas mulheres, e próstata entre os homens [2]. O câncer é um problema de saúde pública, principalmente entre os países em desenvolvimento, onde espera-se que, nas próximas décadas, o impacto do câncer na população seja correspondente a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025 [3].

No Brasil a estimativa, do biênio 2016-2017, indica a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer. O perfil epidemiológico observado assemelha-se ao da América Latina e do Caribe, onde os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres serão os mais frequentes. Descontando os casos de câncer de pele não melanoma, os tipos mais frequentes em homens serão próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) figurarão entre os principais [3].

Nos Estados Unidos, Europa e no resto do mundo, o câncer de próstata (PCa) é o tipo mais comum e a segunda principal causa de óbitos por câncer em homens [4-5]. No mundo todo, no ano de 2030, calcula-se uma incidência de 1,7 milhões de casos de PCa e uma mortalidade anual de 0,5 milhões de homens [6].

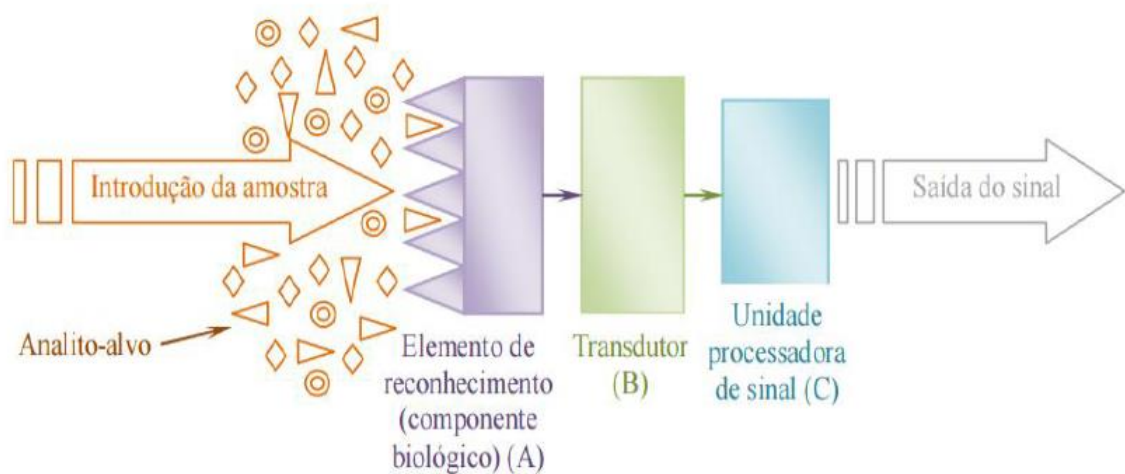
Atualmente, os métodos existentes de detecção de câncer dependem fortemente de métodos tradicionais (histopatológicos, imunohistoquímicos, ELISA, entre outros), que se baseiam na morfologia das células utilizando coloração e microscopia. Estas são técnicas invasivas baseadas na biopsia e análise do tecido utilizando a fixação e morfologia celular. Estes testes, no entanto, não são individualmente conclusivos; quanto à remoção de tecido pode perder células cancerígenas no início mais precoce da doença, sendo assim necessária mais investigação para desenvolvimento de testes para identificar o tumor sem a necessidade de exames invasivos. Outras metodologias bastante utilizadas para a detecção de câncer em estágios iniciais são os imunoenaios e polimerase transcriptase inversa [7-8]. Os imunoenaios são muito sensíveis e seletivos, porém são análises caras e demoradas quando comparadas as tradicionais técnicas. A utilização de ensaios por reação em cadeia de polimerase transcriptase inversa (RT-PCR) para análise de expressão de genes do câncer também tem sido utilizada para a detecção precoce do PCa. No entanto, os procedimentos acima são complexos, lentos, caros e requerem pessoal com alta experiência para conduzir a análise. Por conseguinte, o desenvolvimento de novas metodologias à base de proteínas para o diagnóstico da doença em vez de marcadores genéticos tem aumentado significativamente em anos recentes [9-10]. Por isso novos métodos emergentes moleculares estão sendo estudados para a melhor compreensão da doença e rápido diagnóstico.

Recentemente, biossensores têm sido utilizados para a detecção de alguns biomarcadores (proteínas, ácidos nucleicos, anticorpos, peptídeos, entre outros) [11]. Os biossensores podem ser altamente específicos, independentes de parâmetros físicos e químicos, como o pH e a temperatura [12]. Dentre as plataformas utilizadas, a Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) tem se destacado na detecção de tais moléculas biológicas [13].



## 1.1 Biossensor/aptasensor

Biossensor é um dispositivo analítico que contém elemento biológico, transdutor e unidade processadora. Combina a seletividade da biologia com o poder de processamento da microeletrônica e optoeletrônica moderna para oferecer poderosas ferramentas analíticas com aplicações importantes no campo da medicina, estudos ambientais, alimentos, entre outros. Os dispositivos analíticos (figura 1) se baseiam na junção entre componentes biológicos (macro moléculas como anticorpos, enzimas, que são utilizadas para reconhecer e interagir com um analito específico) e físico-químicos (normalmente transdutores que realizam a conversão das interações em sinais) [14].

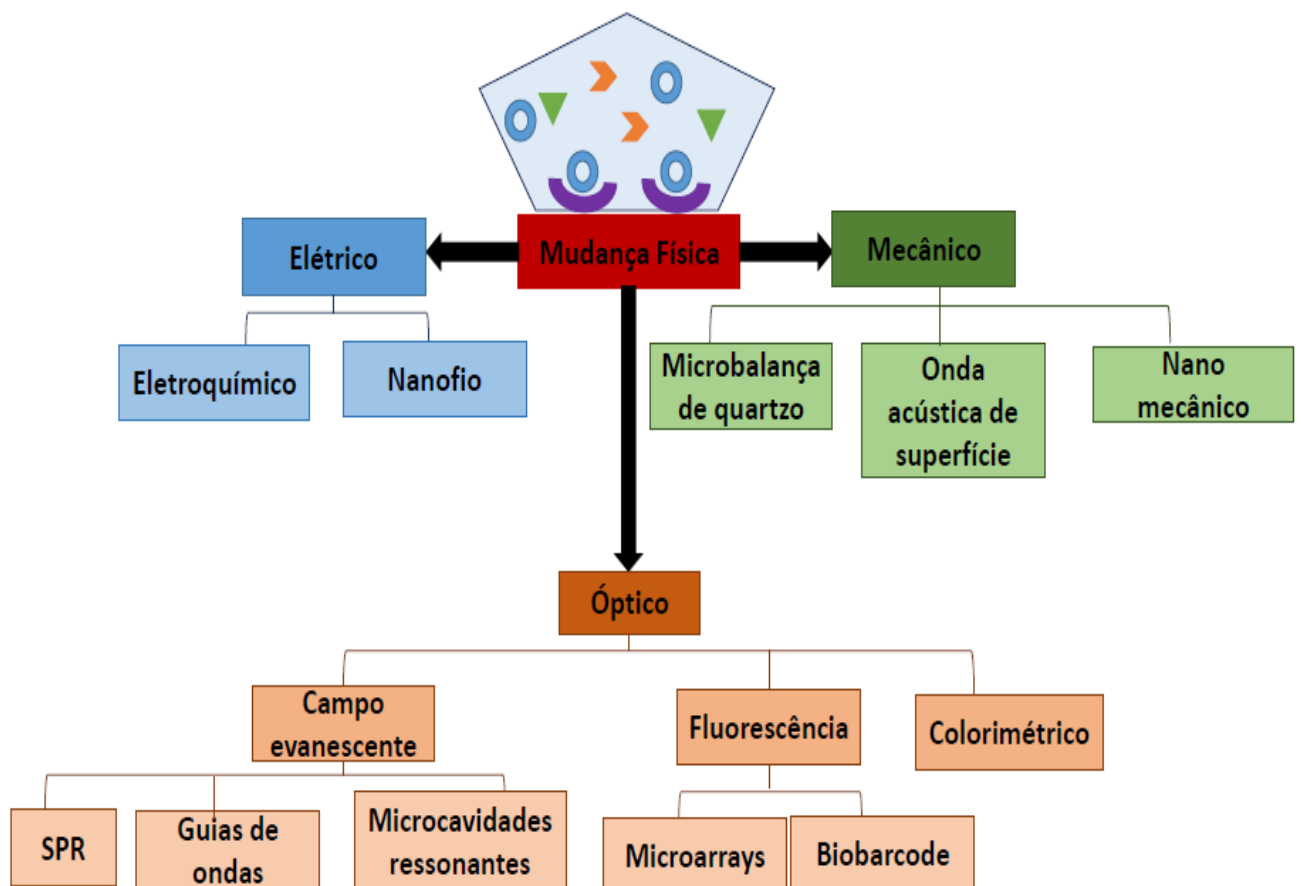


**Figura 1:** Esquema de funcionamento de biossensor para detecção do analito.

Fonte: Calil; Silva, 2011 [15].

Para a construção dos biossensores as técnicas mais comuns de imobilização do componente biológico são adsorção física (interações do tipo iônica e polar e ligação de hidrogênio), ligação cruzada (reticulação), oclusão ou aprisionamento, ligação covalente e covalente cruzada, encapsulamento e microencapsulamento [12]. A estabilidade das técnicas de imobilização pode determinar a sensibilidade e confiabilidade do sinal do biossensor, devido

à preservação dos sítios ativos da molécula. O transdutor age como uma interface, medindo as mudanças físicas ou químicas que ocorrem na reação com o biorreceptor, transformando essa energia em um produto mensurável, como massa, carga, calor ou luz (Figura 2) [15].



**Figura 2:** Esquema de um biossensor e suas subclasses (autoria própria).

Dentre as diversas técnicas citadas, os biossensores ópticos podem ser divididos em detecção baseada em fluorescência e detecção *label-free*. Na detecção baseada em fluorescência, moléculas alvo ou moléculas de biorecognição são marcadas com fluorescentes, tais como corantes; a intensidade do sinal de fluorescência indica a quantidade de moléculas alvo. Em contraste, na detecção *label-free*, as moléculas alvo não são marcadas ou alteradas e são detectadas nas suas formas naturais. Uma parte significativa dos sensores ópticos *label-free* mensura a alteração do índice de refração perto da superfície do sensor excitando um campo

evanescente que decai exponencialmente na solução de volume com um comprimento característico entre dezenas a centenas de nanômetros. O método SPR, é o mais popular entre biossensores ópticos *label-free* [11].

No desenvolvimento de biossensores para diagnóstico e monitoramento do câncer o componente biológico do sensor é fundamental para se obter êxito na pesquisa. O componente biológico pode variar desde moléculas (proteínas e ácidos nucleicos, por exemplo) até células inteiras, podendo ser dividido em dois grupos, elementos não-catalíticos e catalíticos. Os elementos não-catalíticos, são representados por receptores celulares ou anticorpos, e normalmente são utilizados para detecção direta (p.ex. biossensores *label-free*) [16]. Diversos biossensores são desenvolvidos para análise de proteínas, indicando assim o seu potencial na detecção de proteínas biomarcadoras para o câncer. No entanto, um dos gargalos é a disponibilidade de uma gama de elementos de reconhecimento que sejam específicos para os diversos biomarcadores cancerígenos. Os anticorpos são excelentes elementos, nos termos de ligação, especificidade e seletividade, porém eles são relativamente caros para produzir e algumas vezes são incompatíveis com metodologias de alto rendimento. Portanto em adição ao uso de anticorpos, novas alternativas estão sendo o foco de diversos grupos de pesquisa como os biossensores baseados em aptâmeros [17-19].

Os aptâmeros são sequências de DNA ou RNA que se ligam a proteínas com alta afinidade, uma alternativa aos anticorpos. O conceito de aptâmeros surgiu na década de 90 através do estudo com macromoléculas com diferentes estruturas primárias que adotam uma configuração tridimensional única com afinidade exclusiva de ligação com proteínas-alvo. Sendo de fato, o mesmo tipo de dependência estrutural na qual os anticorpos se ligam aos epítomos dos antígenos. Nos últimos 20 anos, o conceito de ligação baseada na estrutura foi otimizado para a produção de um pool de aptâmeros, resultando num amplo banco de dados de macromoléculas com conjuntos de sequências de DNA e RNA [20-21]. O método para sua

geração é denominado SELEX (sigla em inglês para Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial) [22].

O SELEX é uma técnica em que os oligonucleotídeos de cadeia simples são selecionados a partir de uma grande variedade de sequências, baseados numa atividade desejada contra uma proteína alvo ou outra molécula. O procedimento SELEX é normalmente iniciado com uma biblioteca de RNA ou DNA que consiste em algumas sequências oligonucleotídicas aleatórias ( $10^{14}$ - $10^{15}$ ). Cada molécula exibirá uma estrutura terciária única que será dependente da sequência nucleotídica dessa molécula. A afinidade de ligação do oligonucleotídeo para essa proteína será determinada pelo ajuste entre porções na superfície do oligonucleotídeo e epítomos na proteína alvo. Muitas vezes é possível identificar aptâmeros com afinidades nanomolares ou subnanomolares que se ligam seletivamente à proteína alvo em relação a outras proteínas com um elevado grau de homologia estrutural [23].

Os aptâmeros fornecem uma nova plataforma de pesquisa de reconhecimento rápida e eficiente para bioquímica e comunidade biomédica e mostram uma boa perspectiva de aplicação. Foram descobertos aptâmeros com afinidade de ligação específica para uma variedade de alvos que vão desde peptídeos, pequenas moléculas como corantes orgânicos e até mesmo algumas células. Essas descobertas permitiram progressos na aplicação dos aptâmeros, como por exemplo, o desenvolvimento de aptasensores [24].

A diversidade funcional dos aptâmeros permite o uso em uma vasta gama de aplicações, como detecção analítica, diagnósticos, terapêuticas, veículos de liberação de fármacos, engenharia celular, entre muitas outras [25]. Comparados com os anticorpos, oferecem diversas vantagens, incluindo estabilidade a longo prazo e produção de baixo custo [26]. Podem ser facilmente modificados com consequências mínimas para as suas propriedades de ligação, possibilitando a sua integração em diferentes plataformas (biossensores e terapêuticas). As

condições específicas de cada seleção podem ser ajustadas para a aplicação final do aptâmero, alterando as propriedades sob demanda [27].

Os biossensores que utilizam aptâmeros como elemento de reconhecimento são chamados de aptasensores. Os aptâmeros podem ser modificados quimicamente para sofrer alterações conformacionais dependentes do analito. Eles também podem ser projetados para suportar ciclos repetidos de desnaturação e renaturação, abrindo uma possibilidade de regenerar a função biocomponente imobilizada para reutilização e assim serem empregados em diagnósticos [25].

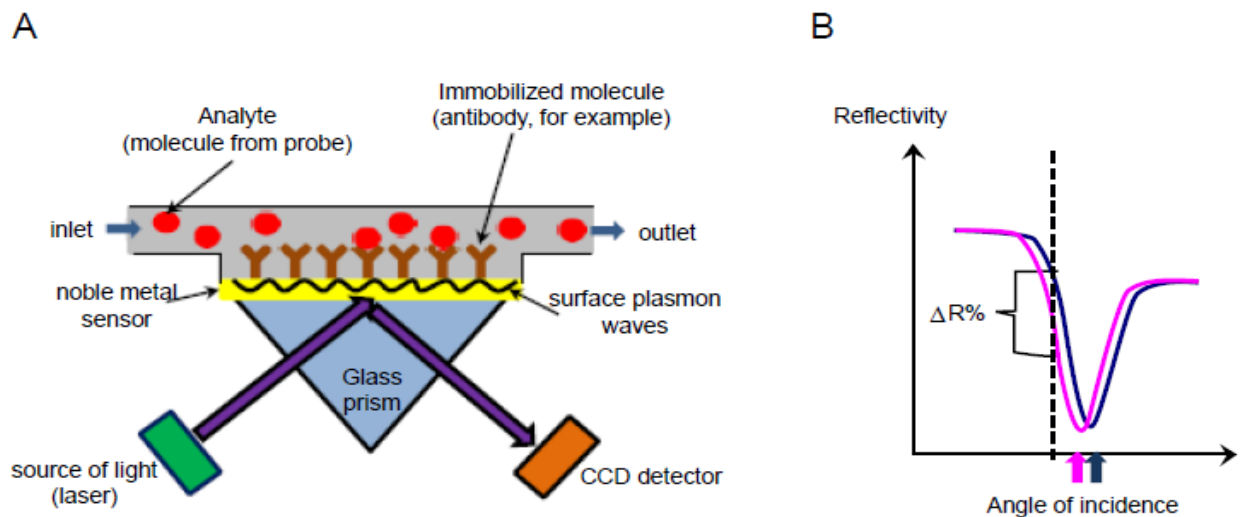
Os aptasensores competem com outros biossensores bem estabelecidos, essencialmente baseados em anticorpos, entretanto, seu foco principal são as aplicações onde os anticorpos não conseguem alcançar os objetivos ansiados. Apresentam diversas vantagens, tornando-os preferíveis: estrutura mais simples, síntese fácil, mais baratos, mais estáveis, possuem afinidade e especificidade por ligantes que não são reconhecidos por anticorpos (como íons ou pequenas moléculas) e utilizam pequenas quantidades de analito [15]. As aplicações mais comuns dos aptasensores residem nos campos de testes de segurança alimentar e controle de poluição ambiental. Deste modo, os aptasensores desenvolvidos para a detecção de contaminantes de pequenas moléculas, incluindo antibióticos, toxinas, pesticidas e metais pesados (que podem estar presentes em uma grande variedade de produtos alimentares e amostras ambientais) são de particular interesse [28].

## **1.2 Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)**

O primeiro equipamento (SPR), foi comercializado em 1990. Desde então, foi utilizado em diversas pesquisas para testar novas aplicações em diferentes áreas analíticas, como, segurança alimentar, contaminação microbiana, detecção de bactérias, análise de doping,

proteômica e monitoramento ambiental [13]. As vantagens da tecnologia SPR incluem o monitoramento em tempo real dos marcadores moleculares/analitos, pré-tratamento mínimo da amostra, resposta quantitativa, boa sensibilidade e reprodutibilidade [29].

Os analitos são injetados em um sistema de fluxo e encaminhados a pontos específicos na superfície do sensor, onde acontece a ligação em uma molécula alvo imobilizada (anticorpo, enzima, aptâmero, entre outros). O gráfico resultante fornece a informação das taxas de associação e dissociação à que o analito liga-se e é liberado da molécula alvo [30].

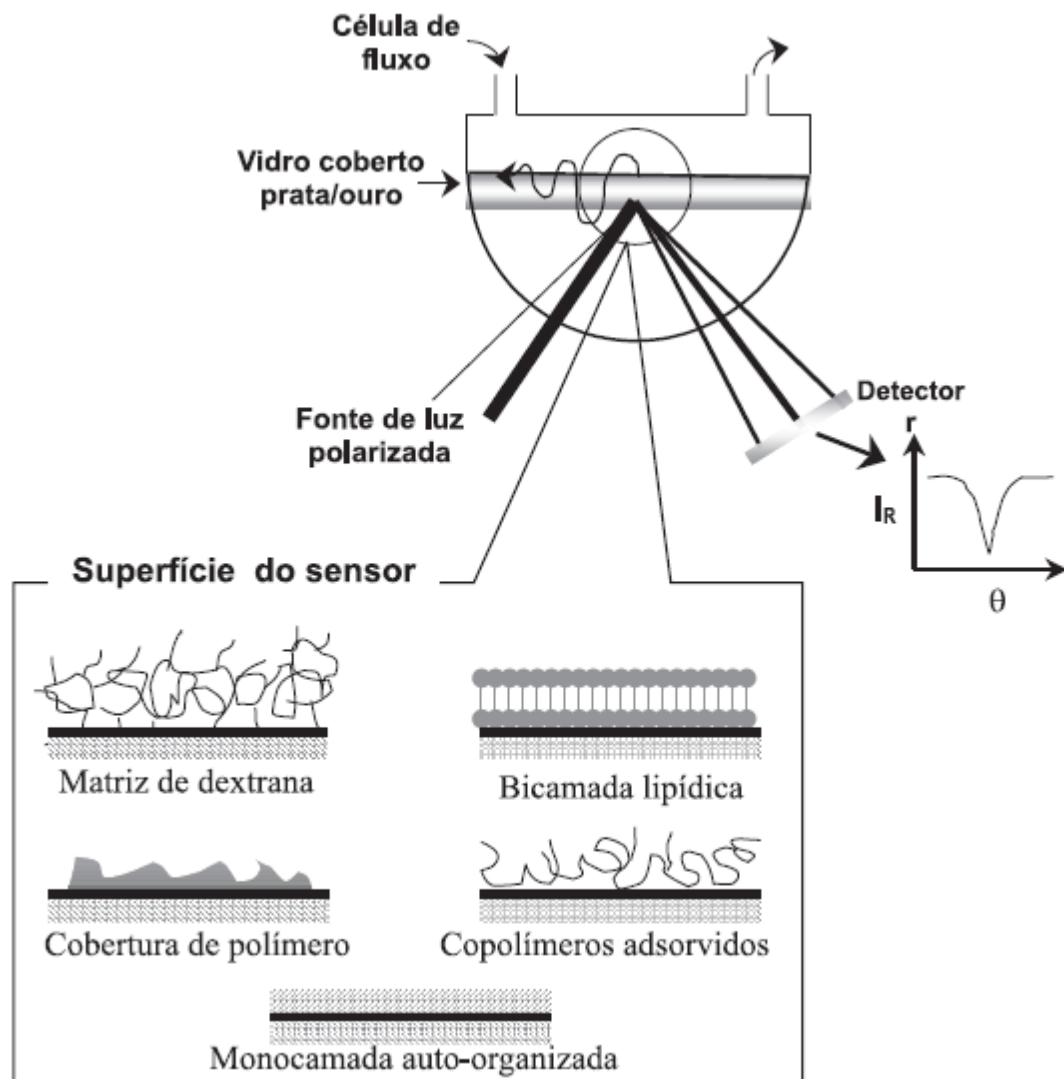


**Figura 3:** Representação do funcionamento de um equipamento de Ressonância Plasmônica de Superfície.

Fonte: Victoria, 2012 [31].

A SPR é um método óptico de alta sensibilidade. Uma biomolécula é imobilizada na superfície do sensor (um metal nobre) e uma biopartícula de interação (ligante) torna-se disponível. As interações entre as biopartículas acontecem na interface do sensor no sistema de células de fluxo sob fluxo contínuo. A ligação de biomoléculas flutuantes e imobilizadas leva ao acúmulo de biomoléculas na superfície do sensor, resultando no aumento do índice de refração próximo à superfície. Alterações do índice de refração levam a alterações nas ondas do plasma da superfície (polaridade do plasma de superfície). Estas alterações são medidas em

tempo real e assim fornecem informações sobre a eficiência de ligação das biomoléculas (Figura 3 e Figura 4) [31].



**Figura 4:** Representação de um instrumento típico de SPR. Lâmina de vidro recoberta com prata/ouro sob um prisma, onde o feixe de luz convergente é focado sobre o lado de baixo do filme de prata/ouro, que é refletida para um detector de arranjo bidimensional de fotodiodos. A superfície do filme de prata/ouro pode ser modificada dando origem a uma variedade de superfícies sensoras.

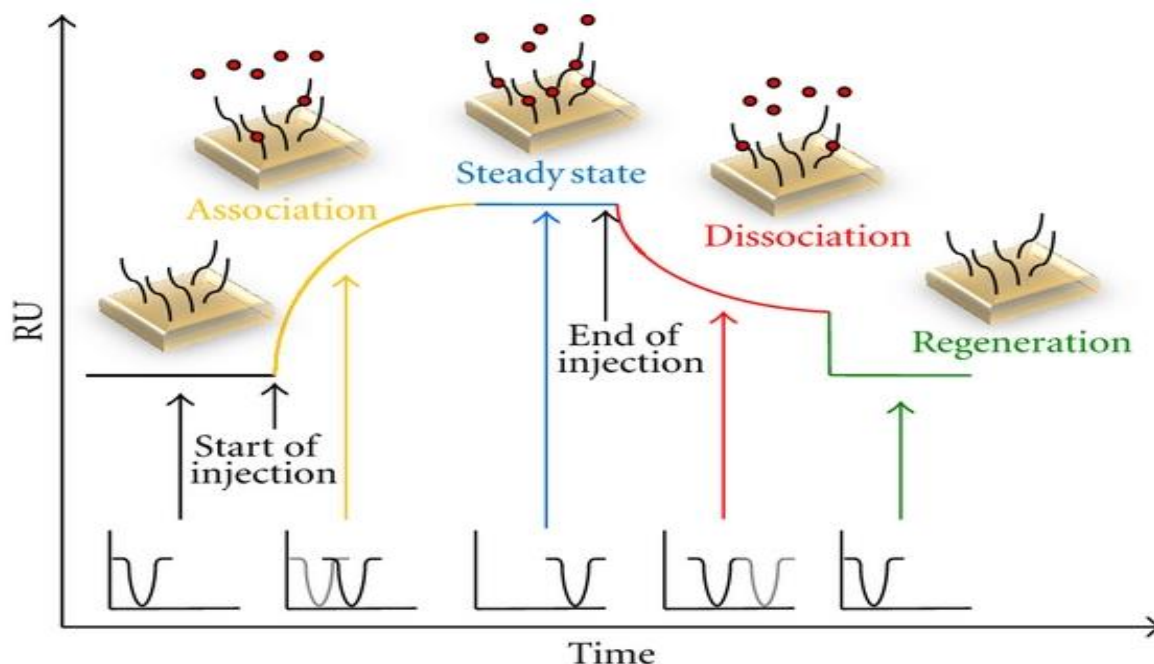
Fonte: Carvalho et. al. 2003 [32].

A figura 5 é um modelo de sensorgrama característico da SPR, onde visualizamos a interação em tempo real de um analito com uma molécula alvo imobilizada na superfície do

chip do sensor. A injeção inicial (tampão ou água deionizada, por exemplo) estabelece o valor da linha base e, à medida que a solução da amostra passa pela superfície do sensor, a interação molecular acontece. Durante a análise, a taxa de ligação observada é a diferença entre as moléculas que se ligam à superfície e as moléculas que deixam a superfície. Deste modo, a ligação parece mais rápida no início da injeção, uma vez que o elemento de reconhecimento biológico interage com a alta concentração de moléculas da amostra disponíveis na superfície do sensor. À medida que o fluxo continua, a taxa de ligação observada diminui à medida que menos moléculas estão disponíveis na superfície. Após o fim da injeção, o ligante fracamente ligado é dissociado e lavado pelo tampão. A superfície do sensor é regenerada de volta ao valor da linha base para a análise da próxima amostra [33].

A associação deve seguir uma única exponencial e ter alguma curvatura antes da injeção do analito finalizar. A parte inicial da curva indica uma interação livre de transporte de massa. A velocidade da formação depende da constante de taxa de associação, da concentração de analito e do número de locais de ligante livre. A fase estável é o nivelamento da curva (horizontalização), indica que o número de eventos de associação é igual ao número de eventos de dissociação. Uma taxa de dissociação lenta exigirá um longo período de injeção para atingir o estado estacionário. Quando a dissociação é rápida, o estado estacionário é alcançado rapidamente após a injeção do analito. E por fim, a dissociação, que deve ser exponencial. A dissociação depende apenas da constante de taxa de dissociação, mas em casos de forte interação, a curva pode ser quase horizontal. Quando há uma resposta residual após a dissociação, isso pode ser uma indicação de interação não específica com a matriz. É feita então uma injeção de tampão para dissociar o analito fracamente ligado sem interferir nas interações de interesse [34].



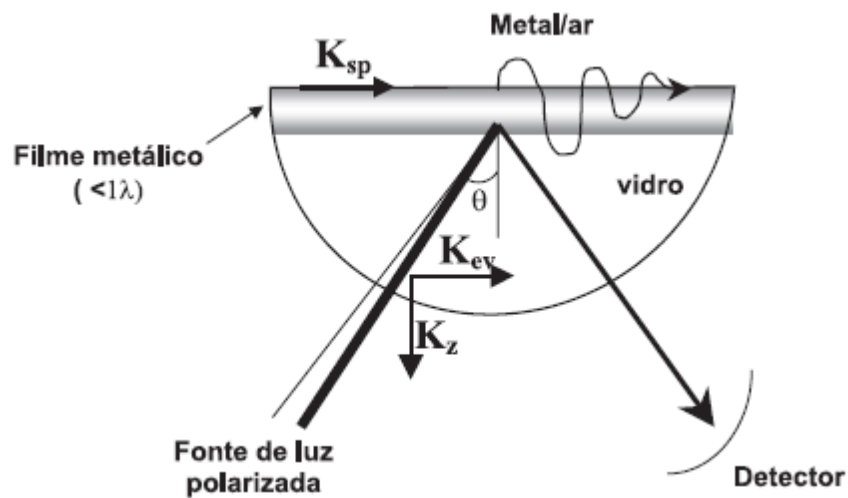


**Figura 5:** Sensorgrama característico da SPR dividido em quatro etapas: Fase de associação; fase estável; fase de dissociação e fase de regeneração.  
 Fonte: RITZEFELD; SEWALD, 2012 [35].

A SPR é uma oscilação da densidade de carga longitudinal, ao longo da interface de dois meios com constantes dielétricas de sinais opostos, onde um é metal e outro, um dielétrico. A escolha do metal a ser usado deve ser criteriosa, já que o metal deve exibir comportamento de elétrons livres. Os metais mais adequados são a prata, ouro, cobre e alumínio, entretanto, os mais empregados são a prata e o ouro. Dos sistemas desenvolvidos, o mais comumente usado é o que foi desenvolvido por Kretschmann, a configuração de refletância total atenuada [36-37].

Tal fenômeno ocorre (figura 6) quando a luz polarizada atravessa um meio óptico denso, no caso, o vidro e alcança uma interface entre este meio e um meio de densidade óptica menor (o ar), e é refletida novamente para o meio mais denso. Apesar da luz incidente ser totalmente refletida internamente, uma componente desta radiação, onda ou campo evanescente, penetra na interface do meio menos denso, até a distância de um comprimento de onda ( $1\lambda$ ). Num determinado ângulo de incidência, quando o vetor de onda do plasma é igual ao vetor de onda

do campo evanescente ( $K_{sp} = K_{ev}$ ), parte da radiação acopla o plasma (elétrons livres oscilantes) no filme metálico, acontecendo a ressonância de plasma de superfície. Conseqüentemente, ocorre a perda de energia da luz incidente para o filme metálico, reduzindo a intensidade da luz refletida, a qual pode ser detectada como um arranjo bidimensional de fotodiodos [32].



**Figura 6:** Representação do funcionamento da Ressonância de Plasma de Superfície segundo configuração de Kretschmann.  
Fonte: Carvalho et. al. 2003 [32].

A física de todo o processo que ocorre no equipamento, tal qual o valor do ângulo ( $K_x$ ) é demonstrada nas equações abaixo (1 e 2):

1ª Equação

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_p} \text{sen } \theta$$

Onde  $\Theta$ , é o ângulo de incidência da luz com a superfície metálica,  $\epsilon$  é a constante dielétrica do prisma,  $\omega$  é a frequência angular da luz incidente e  $c$ , a velocidade da luz. Complementarmente, a constante de propagação da OPS ( $K_{ops}$ ) em uma interface metal/dielétrico é expressa por:

2ª Equação

$$k_{OPS} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_a}{(\epsilon_a + \epsilon_m)}}$$

Onde  $\omega$ , é a frequência angular da onda,  $c$  é a velocidade da luz,  $\epsilon_p$  é a constante dielétrica da amostra (que interagem com a superfície) e  $\epsilon_m$  é a constante dielétrica do metal. Deste modo, é possível utilizar o ângulo da luz incidente como parâmetro de controle do fenômeno de OPS, por meio de um monitoramento da refletância versus ângulo de incidência de luz. No momento em que a componente paralela do fóton de luz incidente é equivalente à constante de propagação da OPS, isto é,  $K_x = K_{OPS}$  deve ocorrer uma queda na refletância, devido à formação da onda evanescente, que se propaga através da superfície de metal e interage com o meio externo [38].

A concentração de biomoléculas na superfície está relacionada diretamente com a mudança no sinal da SPR, denominada de resposta SPR presente nas unidades ressonantes (RU). A resposta da SPR de 120 RU é equivalente a concentração de  $1\text{ng/mm}^2$  na superfície do sensor [39]. A detecção máxima no índice de refração da SPR na superfície do sensor é de 300 nm. O acúmulo de analito na superfície do sensor provoca um aumento no índice de refração. Esta alteração do índice de refração é medida em tempo real (a amostragem em uma análise

cinética é tomada a cada 0,1 s) e o resultado traçado como unidades ressonantes (RU) em relação ao tempo (denominado sensorgrama). A mudança de ângulo da SPR é relatada como unidades de ressonância (RU), onde 1000 RU correspondem a uma mudança de ângulo de aproximadamente 0,1°. A relação exata entre RU e a quantidade/concentração de material ligado variará com o índice de refração do analito [40].

### **1.3 Câncer de próstata e biomarcador**

A próstata, é uma glândula exócrina, do sistema reprodutor masculino. Ela produz e armazena um fluido incolor e ligeiramente alcalino que constitui de 10% a 30% do volume do líquido seminal, que constituirá o sêmen, junto com os espermatozoides. É um órgão sólido que pesa aproximadamente 20 gramas (tamanho de uma noz). A próstata, anatomicamente, é subdividida em ápice, base, face anterior e duas faces ínfero-laterais e sendo atravessada em toda sua extensão pela uretra [41].

O PCa é uma doença caracterizada por crescimento descontrolado de células dentro da glândula prostática [42]. O PCa é a neoplasia mais frequente encontrada em homens e seu índice tem aumentado nas últimas décadas. As razões para isso são o aumento da expectativa de vida, o estilo de vida ocidental (dieta extremamente calórica aliada ao sedentarismo) e o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais modernos e precisos [41]. Ele é uma doença heterogênea, que exhibe uma vasta gama de comportamentos clínicos: de tumores com crescimento muito lento até tumores com rápido crescimento com progressão para estágios mais agressivos e metastáticos que não respondem aos tratamentos, reduzindo a sobrevida do paciente [43].

Tradicionalmente, o diagnóstico é realizado através do exame clínico (toque retal da próstata) e o exame de sangue para a dosagem do antígeno prostático específico (PSA). Quando

necessário, é recomendado à realização de uma ultrassonografia transretal, utilizada tanto para orientar a biópsia quanto para determinar o volume prostático e avaliar a extensão local da doença [44]. O exame do toque é utilizado na detecção e também na definição do tratamento. Os valores limites normais aceitos de PSA são de até 4 ng/ml, entretanto, podem existir tumores com PSA abaixo deste valor. Quando o PSA estiver acima de 10 ng/ml há indicação formal para biópsia. Para valores entre 4-10 ng/ml deve-se também levar em consideração a velocidade do PSA e a relação PSA livre/total [45].

Entretanto, o diagnóstico e o tratamento do câncer de próstata possuem lacunas que necessitam de aprimoramento: um biomarcador validado para complementar o PSA para rastreamento; a diferenciação molecular da doença benigna e maligna e biomarcadores prognósticos com utilidade clínica [46].

Biomarcador é uma molécula biológica encontrada no sangue, outros fluidos corporais ou tecidos que é sinal de um processo normal ou anormal. Um biomarcador pode ser utilizado para avaliação da resposta corporal a um determinado tratamento. Os biomarcadores ideais para a detecção do PCa auxiliam na triagem, na tomada de decisão referente aos pacientes que irão ou não se beneficiar de uma biópsia ou rebiópsia. Auxiliam também na diferenciação entre tumores agressivos e com baixo grau de agressividade e na seleção do tratamento mais efetivo a curto e longo prazo [4].

A mucina epitelial polimórfica tipo 1 (MUC1) são proteínas glicosiladas expressas por células epiteliais [47]. As MUC1 além de protegerem o revestimento epitelial do ambiente externo, são uma classe importante de moléculas expressas de maneira aberrante em várias patologias e estão relacionadas a distúrbios inflamatórios e câncer epitelial. Elas são úteis como marcadores prognósticos e de diagnóstico, bem como potenciais alvos terapêuticos [48].

As funções da MUC1 são proporcionar proteção contra patógenos, desidratação, alterações no pH e enzimas degradativas. As mucinas são divididas em dois grupos principais:

secretadas e associadas à membrana. A MUC 1 é associada à membrana, tem peso molecular de 120-225 kDa que muda para 250-1000 kDa com a glicosilação. Ela é uma das mucinas mais desreguladas durante a carcinogênese sendo super expressada na maioria dos cânceres epiteliais humanos. Embora não exista consenso no reconhecimento da MUC1 como oncogene, seu envolvimento na proliferação, angiogênese, invasão e metastização está agora bem documentado. Hipóteses sugerem que, globalmente, a MUC1 participa no controle do microambiente local, permitindo que o tumor se adapte, sobreviva e prolifere em contextos desafiadores durante invasão e metástase [49].

Portanto, as tarefas desafiantes desta dissertação foram: a) estudar o desenvolvimento de uma nova plataforma de utilização dos aptâmeros e b) avaliar MUC1 para o diagnóstico de câncer de próstata de forma mais precisa e seletiva.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivos Gerais**

O objetivo do projeto foi desenvolver uma metodologia mais simples e acessível utilizando SPR para detectar MUC1 relacionada ao câncer de próstata.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Preparação e caracterização das monocamadas auto organizadas sobre a superfície de ouro da SPR.
- Desenvolvimento de uma metodologia analítica associada à aptâmeros específicos para biomarcadores liberados por células prostáticas para a detecção de proteína relacionadas ao PCa.
- Detecção da proteína MUC1.

### **3 PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1 Reagentes Utilizados**

Os reagentes utilizados foram 11 – ácido mercaptoundecanóico (MUA), N- (3-dimetilaminopropil) - N'-etilcarbodiimida (EDC), o N – hidroxissuccinimida (NHS), etanol, detergente Alconox, tampão fosfato salino (PBS), (III) cloreto de ouro trihidrato (HAuCl<sub>4</sub>) e citrato de sódio (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A sequência do aptâmero específico para MUC1 foi 5'-SH/- GCAGTGAGTCCTTGGATACCCTGG-3' /MB (Biosearch Technologies, Novato, CA). A água deionizada utilizada nos preparos das soluções foi adquirida de uma unidade Millipore Milli-Q (EUA). As soluções estoques foram guardadas a 4 °C no escuro. Sobrenadante da linhagem celular (LNCaP; ATCC® CRL-1740™), cultivadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> em meio RPMI, soro fetal bovino suplementado, Estreptomicina (10mg) e Penicilina (10,000 U), tripsina-EDTA 0,25%, todos adquiridos da (Gibco®, Waltham, MA).

#### **3. 2 Cultivo das células**

Os sobrenadantes das células utilizadas foram fornecidos pela Profa. Dra. Flávia Karina Delella vinculada ao Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências campus da UNESP de Botucatu. Neste trabalho, os sobrenadantes das células prostáticas utilizadas eram de uma linhagem derivada de sítio metastático e dependente de andrógeno (LNCaP; ATCC® CRL-1740™). As células foram cultivadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino, Estreptomicina (10mg) e Penicilina (10,000 U) até atingirem ao menos 90% de confluência e logo após foram tripsinizadas por meio da tripsina-EDTA 0,25% (para



desprender as células do frasco) (Gibco®, Waltham, MA). A viabilidade das células foi avaliada pelo método da câmara de Neubauer.

### **3.3 Equipamento**

#### ***3.3.1 Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)***

As análises das interações moleculares entre o aptâmero-proteínas e o aptâmero-sobrenadante foram realizadas no equipamento de Ressonância Plasmônica de Superfície - SPR (AutoLab Springle®, Eco Chemie, Holanda). O sensor do equipamento é um disco de ouro adquirido da (AutoLab Springle®, Eco Chemie, Holanda). Possui diâmetro de 17 mm e com espessura de 50 nm de ouro. O sensor de ouro foi inserido em um prisma semicilíndrico e introduzido no equipamento AutoLab SPR para realização das análises.

### **3.4 Procedimentos**

#### ***3.4.1 Limpeza do sensor e preparação das SAMs (Monocamadas auto organizadas)***

A limpeza do sensor de ouro da SPR foi realizada inserindo-o em um beaker com água deionizada e detergente industrial durante 10 minutos no ultrassom. Após, o sensor foi lavado três vezes com água deionizada, álcool e seco em papel de lente. Depois da etapa de limpeza, o disco foi colocado no equipamento e modificado pela deposição das SAMs (monocamadas auto organizadas). As SAMs foram formadas através do uso de alcanotióis, resultado da deposição de solução de alcanotiól, ocorrendo a adsorção irreversível do tiol à superfície do disco de ouro.

Para a formação das SAMs, foi preparada uma solução utilizando 0,02g de MUA em 100  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto. Da solução, foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  em 4,95  $\mu\text{L}$  de etanol obtendo-se a solução final. Desta solução final, foram adicionadas à superfície do sensor 200  $\mu\text{L}$ , permanecendo a noite toda. No dia seguinte, a superfície foi lavada com água deionizada três vezes.

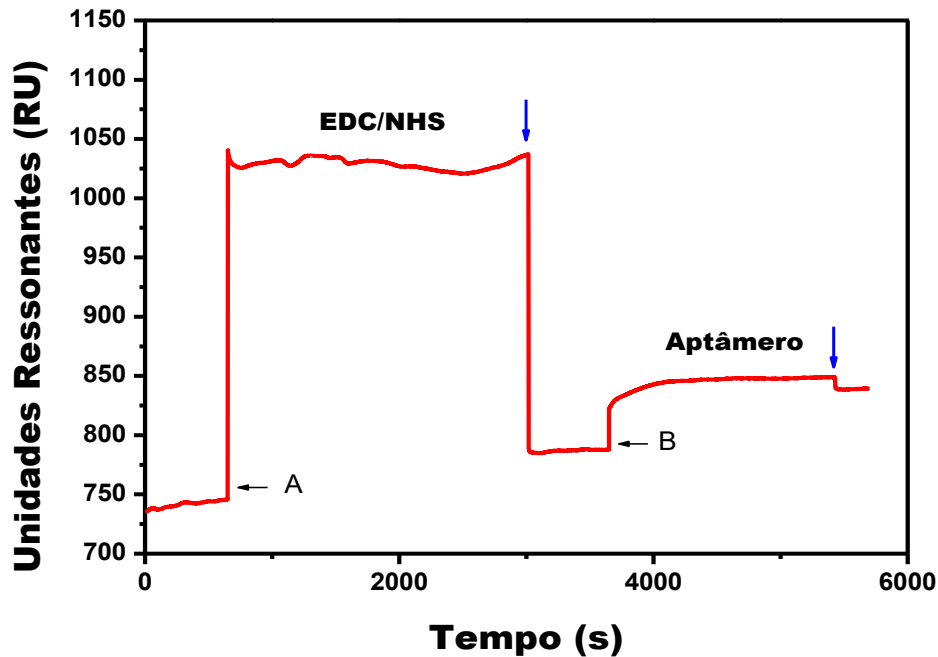
### ***3.4.2 Preparação das nanopartículas de ouro***

As nanopartículas de ouro foram produzidas a partir da mistura de duas soluções,  $\text{HAuCl}_4$  1,0  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  39  $\text{mmol L}^{-1}$ . A primeira solução foi preparada diluindo 0,005 g de  $\text{HAuCl}_4$  em 10 mL de água deionizada Milli-Q e a segunda, a partir da diluição de 0,1 g de citrato de sódio em 10 mL de água deionizada Milli-Q. Passada esta etapa, em um erlenmeyer sobre um agitador magnético foram adicionados 3,0 mL da solução de  $\text{HAuCl}_4$  juntamente com 17,0 mL de água Milli-Q. Essa solução foi misturada utilizando uma barra magnética e aquecida até o ponto de ebulição. Então, 2 mL da solução de  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  foi adicionada ao erlenmeyer fazendo com que a solução que apresentava uma cor amarelada passasse para um vermelho intenso em apenas alguns segundos. Quando a solução atingiu essa coloração, a temperatura foi desligada e a solução permaneceu em agitação por mais 5 minutos. A solução, foi então, transferida para um tubo falcon até seu resfriamento em temperatura ambiente e armazenada em um vidro escuro na geladeira. Os íons do ouro foram reduzidos a nanopartículas de ouro metálico através do citrato de sódio e o excesso de ânions do citrato na solução manteve a superfície metálica do ouro, dando carga negativa para cada nanopartícula [50].

## **4 RESULTADO E DISCUSSÃO**

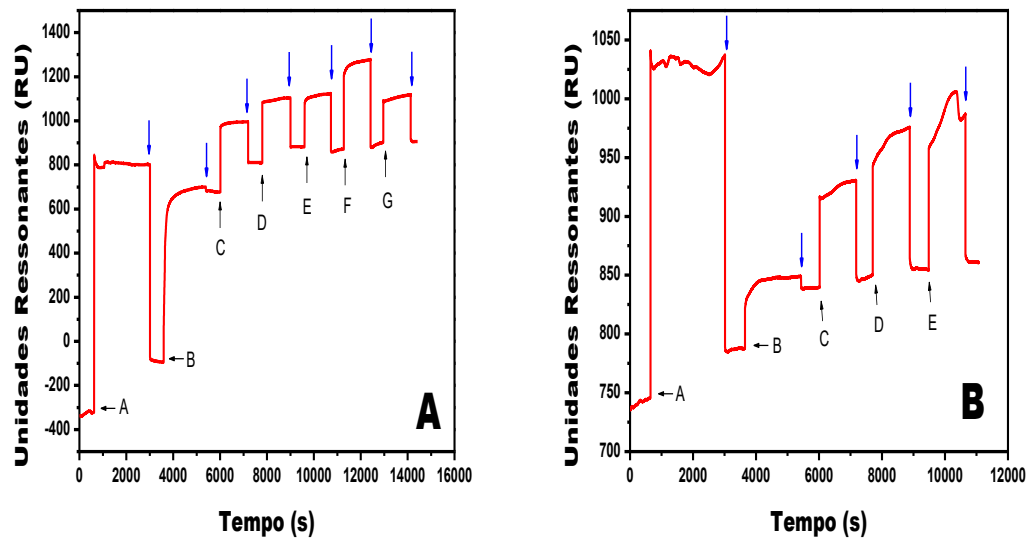
### **4.1 Detecção da MUC1 e sobrenadante das células da linhagem (LNCaP; ATCC® CRL-1740™) utilizando Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)**

A primeira etapa do projeto consistiu no desenvolvimento de uma metodologia de acoplamento do aptâmero conjugado com nanopartículas de ouro (AuNPs) sobre o disco de ouro do SPR. Foram utilizados grupos carboxílicos para o acoplamento do aptâmero conjugado com as AuNPs sobre o sensor de ouro. Inicialmente utilizamos uma monocamada auto-organizada (MUA). Após o qual o aptâmero foi imobilizado por meio da formação de ligações com as aminas. O grupamento EDC/NHS foi utilizado para ativar e promover a formação de ligações covalentes através da formação de grupos N-hidroxisuccinimida. A figura 7 mostra a resposta obtida pela SPR após injeções de: MUA formando as monocamadas auto-organizadas, ativação dos grupos carboxílicos utilizando solução de EDC/NHS e a imobilização do aptâmero conjugado. A linha base inicial foi obtida quando a superfície do ouro já tinha sido tratada utilizando MUA. Após a injeção da solução de EDC/NHS que permaneceu por 40 minutos, foi realizada a injeção de 100 µL da solução de aptâmero sobre a superfície do sensor de ouro permanecendo por 30 minutos acompanhada por uma mudança no ângulo de ressonância monitorada continuamente pelo sistema SPR. A mudança do ângulo da SPR foi utilizada para calcular a quantidade de aptâmero adsorvido na superfície. O ângulo de ressonância deslocou aproximadamente 50,5 RU o que corresponde a 0,42 ng/mm<sup>2</sup>.



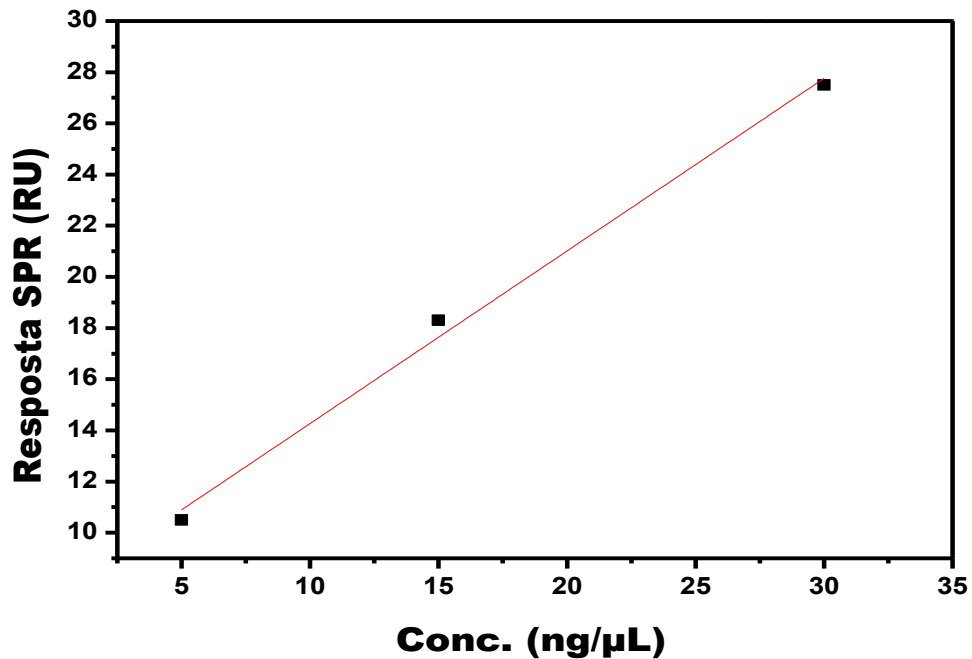
**Figura 7:** Sensorgrama exemplificando o experimento: Ativação dos grupos carboxílicos utilizando solução de EDC/NHS e a imobilização do aptâmero. As setas azuis indicam o início do passo de lavagem com água deionizada Milli-Q.

A figura 8A e 8B mostram a resposta em tempo real do sensor de SPR. Primeiro a ativação das monocamadas auto-organizadas com EDC/NHS, segundo lavagem com água deionizada Milli-Q para a retirada do material fracamente ligado, seguido pela injeção do aptâmero conjugado com AuNP à superfície do sensor. A ligação do aptâmero com as monocamadas auto-organizadas resultou em um deslocamento no ângulo de ressonância de aproximadamente 357,4 RU, que corresponde a 2,9 ng mm<sup>2</sup> e 11,8 RU, correspondendo a 0,09 ng mm<sup>2</sup>. Cada adição de MUC1 permaneceu por 20 minutos na superfície do sensor e entre uma amostra e outra, a superfície foi lavada para a remoção do analito não ligado. Todo o processo ocorreu em tempo real.



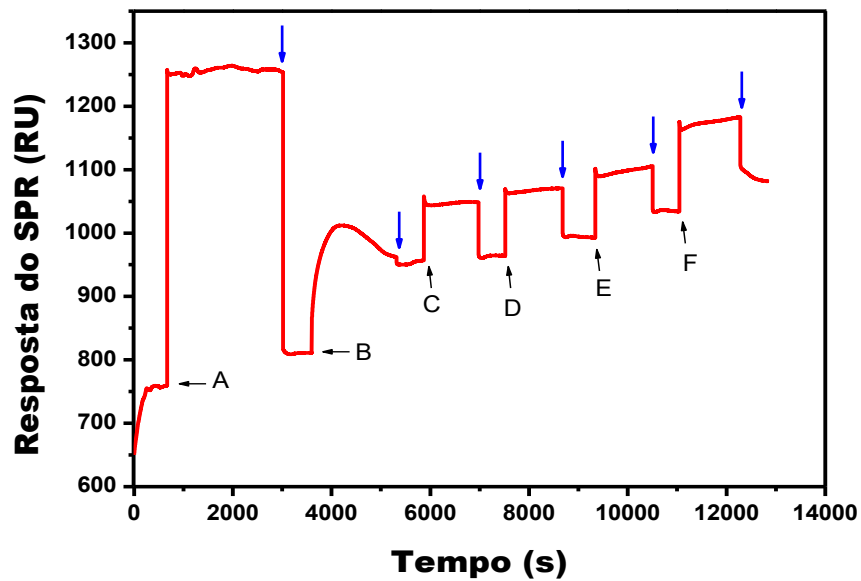
**Figura 8A:** Gráfico de detecção da proteína MUC1 obtido pela técnica SPR. (A) Ativação com EDC/NHS; (B) injeção do aptâmero conjugado com AuNP; (C, D, E, F) adição da proteína MUC1  $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ,  $70 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ,  $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  e  $140 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  respectivamente; (G) sobrenadante celular LNCaP. As setas azuis indicam lavagem com água deionizada Milli-Q. **Figura 8B:** Primeiros passos iguais ao da figura 8A; (C, D, E) adição da proteína MUC1  $5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ,  $15 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ,  $30 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  respectivamente. As setas azuis indicam lavagem com água deionizada Milli-Q.

Condições experimentais adversas, como o pH, o tampão e as concentrações dos analitos podem interferir na resposta do biossensor. A figura 9 mostra a curva de calibração para a concentração de MUC1. A resposta linear caracteriza o sinal medido para concentrações de MUC1 entre  $5 \text{ e } 30 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  com coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,99.



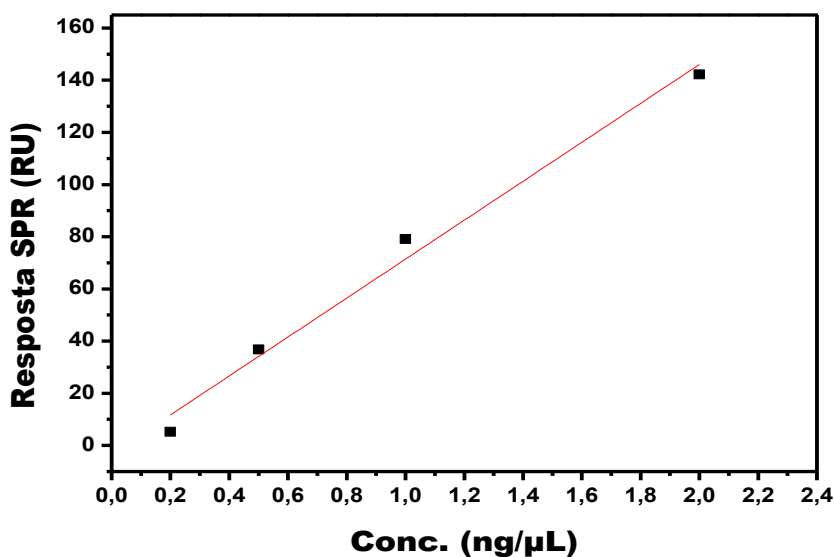
**Figura 9:** Resposta SPR (RU) versus concentração de MUC1. O gráfico mostra as respostas SPR em cada injeção de proteína.

No segundo experimento relacionado ao PCa, foi investigado o potencial de adsorção do sobrenadante das células da linhagem (LNCaP; ATCC® CRL-1740™) ao aptâmero conjugado com AuNP (figura 10). Os procedimentos de modificação, lavagem e ativação da superfície do sensor foram realizados utilizando a mesma metodologia do experimento anterior, apenas houve a troca da proteína MUC1 pelo sobrenadante. A letra (D) da figura mostra a adsorção de 1/200 de sobrenadante sobre a superfície do sensor. É possível observar que após as lavagens e sem a regeneração da superfície do sensor com qualquer reagente, que o sobrenadante continua ligando. Ainda na figura 10, observa-se um deslocamento de 31,8 RU, equivalente a 0,265 ng mm<sup>2</sup>. Todas as adsorções e ligações que ocorreram em cada etapa do experimento estão presentes na figura 10, monitorada em tempo real.



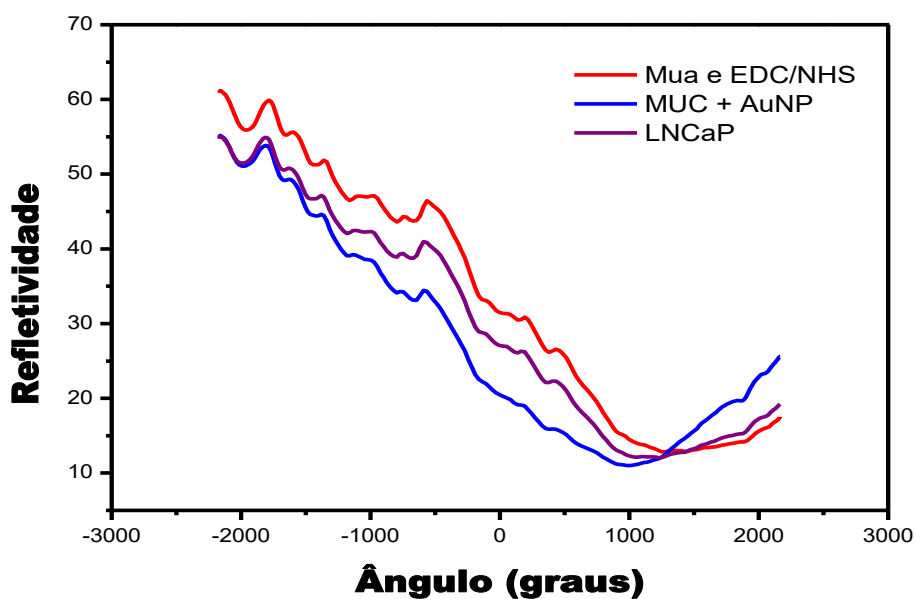
**Figura 10:** Gráfico de detecção do sobrenadante celular da linhagem (LNCaP; ATCC® CRL-1740™). (A) Ativação com EDC/NHS; (B) injeção do aptâmero conjugado com AuNP; (C, D, E, F) adição do sobrenadante da linhagem (LNCaP; ATCC® CRL-1740™) nas seguintes diluições: 1/50; 1/100; 1/200 e 1/500. As setas azuis indicam lavagem com água deionizada Milli-Q.

A figura 11 mostra a curva de calibração para a diluição do sobrenadante da célula. A resposta linear caracteriza o sinal medido para diluição dos sobrenadantes entre 1/50; 1/100; 1/200 e 1/500 em tampão fosfato pH 7,4 apresentando coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,98.



**Figura 11:** Resposta SPR (RU) versus diluição de sobrenadante. O gráfico mostra as respostas SPR em cada injeção.

O gráfico da refletividade pelo ângulo (figura 12) fornecido pela SPR, através de seu deslocamento corrobora todo o processo de modificação e adsorção que ocorre na superfície do sensor.



**Figura 12:** Gráfico da refletividade pelo ângulo (SPR). A linha vermelha refere-se à modificação da superfície com a solução de MUA ativada com EDC/NHS. A linha azul representa a adsorção do aptâmero e a linha roxa é a adição do sobrenadante.



A linha vermelha no gráfico refere-se à modificação da superfície do sensor com a solução de MUA, ativada com EDC/NHS medindo um ângulo de 1216,49 graus. A adsorção do aptâmero conjugado com AuNP na superfície do sensor é representada pela linha azul onde ocorre um deslocamento do ângulo ao longo da curva em relação à linha vermelha que passa a ser de 1123,71 graus. A injeção do sobrenadante é representada pela linha roxa do gráfico mostrando que houve uma ligação específica entre o antígeno e o aptâmero.

## 5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi demonstrado a detecção da MUC1 utilizando aptâmeros por meio da técnica de SPR. A SPR mostrou ser uma poderosa ferramenta analítica, permitindo realizar análises cinéticas de todo processo de adsorção e dessorção do aptâmero em tempo real, tornando possível a detecção da proteína em diferentes concentrações mesmo sem regeneração da superfície. Até o momento, conseguimos desenvolver uma nova metodologia para diagnóstico de um biomarcador que apresentou alta eficiência e um pequeno tempo para obtenção dos resultados. Podendo deste modo, ser utilizado no futuro como uma ferramenta adicional para diagnóstico e monitoramento do câncer de próstata.

## REFERÊNCIAS

1. A.C.Camargo Cancer Center. Tudo sobre o Câncer [Internet]. São Paulo. c2017 – [cited 2017 Jun 15]. Available from: <http://www.accamargo.org.br/tudo-sobre-o-cancer>.
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. PNAD - Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios [Internet]. Rio de Janeiro. [cited 2017 Feb 11]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/trabalhoerendimento/pnad98/saude/metodologia.shtm>.
3. Instituto Nacional de Câncer. Câncer [Internet]. Rio de Janeiro. [cited 2017 Feb 11]. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2>.
4. Alvarez, M. A. (2014). Prostate Cancer Biomarkers, 9, 95–98.
5. Otero, J. R., D, M., Gomez, B. G., D, M., Juanatey, F. C., D, M., ... D, M. (2014). Prostate cancer biomarkers : An update, 32, 252–260.
6. Stephan, C., Ralla, B., & Jung, K. (2014). Biochimica et Biophysica Acta Prostate-specific antigen and other serum and urine markers in prostate cancer, 1846, 99–112.
7. Wang, J. Biosensors and Bioelectronics, 2006;21(10):1887-1892.
8. Resnick, K.E., Alder, H., Hagan, J.P., Richardson, D.L., Croce, C.M., Cohn, D.E. Gynecologic Oncology, 2009;112(1)55-59.
9. Herr, J. K., Smith, J. E., Medley, C. D., Shangguan, D., Tan, W. Analytical Chemistry, 2006;78(9): 2918-2924.
10. Smith, J. E., Medley, C. D., Tang, Z., Shangguan, D., Lofton, C., Tan, W. Analytical Chemistry, 2007;79(8): 3075-3082.
11. Tamayo, J., Kosaka, P. M., Ruz, J. J., San Paulo, Á., & Calleja, M. (2013). Biosensors based on nanomechanical systems. *Chem. Soc. Rev.*, 42(3), 1287–1311.
12. Mehrotra, P. (2016). ScienceDirect Biosensors and their applications – A review, 6.
13. Jain, P., Arora, D., & Bhatla, S. C. (2016). Surface Plasmon Resonance Based Recent Advances in Understanding Plant Development and Related Processes. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 5(4).
14. GS, S., CV, A., & Mathew, B. B. (2014). Biosensors: A Modern Day Achievement. *Journal of Instrumentation Technology*, 2(1), 26–39. <https://doi.org/10.12691/JIT-2-1-5>
15. Calil, S. S., & Roberto, P. (2011). Biossensores : estrutura , funcionamento e aplicabilidade. *6ª Mostra de Produção Científica Da Pós-Graduação Lato Sensu Da PUC Goiás*, 1–20. Retrieved from [http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE SAAD CALIL PAULO ROBERTO QUEIROZ.pdf](http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE%20SAAD%20CALIL%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf).

16. Theâvenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S. 1999. *Pure and Applied Chemistry*, 1999;71:2333–2348.
17. Ladd, J., Zhang, Z., Chen, S., Hower, J.C., Jiang, S. *Biomacromolecules*, 2008;9:1357–1361.
18. Lausted, C., Hu, Z.Y., Hood, L. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2008;7:2464–2474.
19. Paulovich, A.G., Whiteaker, J.R., Hoofnagle, A.N., Wang, P. *Proteomics Clinical Applications*, 2008;2:1386–1402.
20. Mairal, T., Özalp, V.C., Sánchez, P.L., Mir, M., Katakis, I., O’Sullivan, C.K. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2008;390(4):989-1007.
21. Cui, Y., Kim, S.N., Naik, R.R., McAlpine, M.C. *Accounts of Chemical Research*, 2012;45(5):696-704.
22. Hernández, F. J., Andrea, J., & Hincapié, B. (2012). Aptámeros : agentes diagnósticos y terapéuticos, *25(2)*, 159–168.
23. Moreno, M., Domingo, A., Jim, A., & Gonz, M. (2003). Selection of aptamers against KMP-11 using colloidal gold during the SELEX process, *308*, 214–218.
24. Ma, C., Liu, H., Tian, T., Song, X., Yu, J., & Yan, M. (2016). Biosensors and Bioelectronics a simple and rapid detection assay for peptides based on the specific recognition of aptamer and signal amplification of hybridization chain reaction, *83*, 15–18.
25. Hong, P., Li, W., & Li, J. (2012). Applications of aptasensors in clinical diagnostics. *Sensors*, *12(2)*, 1181–1193.
26. Liu, Y., Tuleouva, N., Ramanculov, E., & Revzin, A. (2010). Aptamer-Based Electrochemical Biosensor for Interferon Gamma Detection, *82(19)*, 8131–8136.
27. Svobodová, M., Skouridou, V., Luz, M., Jauset-rubio, M., Schubert, T., Bashammakh, A. S., Sullivan, C. K. O. (2017). The characterization and validation of 17 b -estradiol binding aptamers, *167*, 14–22.
28. Moreno, M. (2015). Aptasensor. 01-03.
29. Mariani, S., & Minunni, M. (2014). Surface plasmon resonance applications in clinical analysis, *2303–2323*.
30. Karlsson, R., Pol, E., & Frostell, Å. (2016). Comparison of surface plasmon resonance binding curves for characterization of protein interactions and analysis of screening data, *502*.
31. Victoria, S. (2012). Application of Surface Plasmon Resonance (SPR) for the Detection of Single Viruses and Single Biological Nano-objects. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, *3(7)*.

32. De Carvalho, R. M., Rath, S., & Kubota, L. T. (2003). SPR - Uma nova ferramenta para biossensores. *Quimica Nova*, 26(1), 97–104.
33. Campbell, K., Rawn, D. F. K., Niedzwiadek, B., & Elliott, C. T. (2011). Paralytic shellfish poisoning (PSP) toxin binders for optical biosensor technology: problems and possibilities for the future: a review. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 28(6), 711–25.
34. SprPages. A curve [Internet]. [cited 2017 Jun 18]. Available from: <https://www.sprpages.nl/sensorgram-tutorial/a-curve>.
35. Ritzefeld, M., & Sewald, N. (2012). Real-Time Analysis of Specific Protein-DNA Interactions with Surface Plasmon Resonance. *Journal of Amino Acids*, 2012, 816032.
36. Patskovsky, S., Kabashin, A. V., Meunier, M., & Luong, J. H. T. (2004). Near-infrared surface plasmon resonance sensing on a silicon platform, 97, 409–414.
37. Scarano, S., Mascini, M., Turner, A. P. F., & Minunni, M. (2010). Biosensors and Bioelectronics Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors, 25, 957–966.
38. Damos, F. S., Mendes, R. K., & Kubota, L. T. (2004). Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. *Quimica Nova*, 27(6), 970–979.
39. De Mol, N. J.; Fischer, M. J. E. MANUAL AUTOLAB, 1-64.
40. BIAcore. Surface Plasmon Resonance (SPR) – BIAcore T200 [Internet]. Edinburgh: The University of Edinburgh; [cited 2017 Jun 10]. Available from: [http://ctcb.bio.ed.ac.uk/CTCB/SPR\\_-\\_BIAcore\\_T200.html](http://ctcb.bio.ed.ac.uk/CTCB/SPR_-_BIAcore_T200.html).
41. Salvajoli, J. V.; Souhami, L.; Faria, S. L. Tumores do Trato Geniturinário Masculino. In: Silva, J. L. F. da., et. al. Radioterapia em Oncologia. São Paulo: Atheneu, 2013; p. 875-912  
Sawaya, M. C. T., Rolim, M. R. S. Prostate-Specific Antigen in Biologics Fluids: Forensic Application. *Rev. Visão Acadêmica*, 2004; 05(02): 109-116.
42. Britannica Academic. Prostate câncer [Internet]. [cited 2017 Feb 22]. Available from: <http://academic-eb-britannica.ez87.periodicos.capes.gov.br/levels/collegiate/article/prostate-cancer/126090>.
43. Premaratne, P., Welen, K., Damber, J. E., Hansson, G. C., & Backstrom, M. (2011). O-glycosylation of MUC1 mucin in prostate cancer and the effects of its expression on tumor growth in a prostate cancer xenograft model. *Tumour Biol*, 32(1), 203–213.
44. Gomes, R. (n.d.). REVISÃO REVIEW A prevenção do câncer de próstata : uma revisão da literatura Prostate cancer prevention : a review of the literature, 235–246.
45. Ministério da Saúde. Programa nacional de controle do câncer da próstata - documento de consenso [Internet]. Brasília. [cited 2017 Feb 21]. Available from: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cancer\\_da\\_prostata.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cancer_da_prostata.pdf).

46. Attard, G., Parker, C., Eeles, R. A., Schröder, F., Tomlins, S. A., Tannock, I., ... Bono, J. S. De. (2016). Prostate cancer, 70–82.
47. Putten, J. P. M. Van, & Strijbis, K. (2017). Transmembrane Mucins : Signaling Receptors at the Intersection of Inflammation and Cancer, 281–299.
48. Kumar, S., Cruz, E., Joshi, S., Patel, A., Jahan, R., Kbatra, S., & Jain, M. (2016). Genetic variants of mucins : unexplored conundrum, 1–9.
49. Sousa, A. M., Grandgenett, P. M., David, L., Almeida, R., & Hollingsworth, M. A. (2016). Reflections on MUC1 glycoprotein : the hidden potential of isoforms in carcinogenesis, 913–924.
50. McFarland, A. D., Haynes, C. L., Mirkin, C.A., Van Duyne, R. P., Godwin, H. A. (2004). Color My Nanoworld. *Journal of Chemical Education*; 81(4): 544.