RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 20/02/2019.

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

"DESENVOLVIMENTOS DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA MONITORAMENTO DO METABOLISMO DE CÉLULAS CANCERÍGENAS"

BRUNO PEREIRA CRULHAS

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas - Estrutura e Função*.

Valber de Albuquerque Pedrosa

BOTUCATU – SP
2017

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

DESENVOLVIMENTOS DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA MONITORAMENTO DO METABOLISMO DE CÉLULAS CANCERÍGENAS

BRUNO PEREIRA CRULHAS

VALBER DE ALBUQUERQUE PEDROSA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas - Estrutura e Função*.

BOTUCATU – SP
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

Crulhas, Bruno Pereira.
Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para monitoramento do metabolismo de células cancerígenas / Bruno Pereira Crulhas. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Valber de Albuquerque Pedrosa
Capes: 20803001

1. Próstata - Câncer - Diagnóstico. 2. Metabolismo. 3. Biossensores.

Palavras-chave: Biossensores eletroquímicos; Câncer de próstata; Metabolismo enzimático; Metabolismo proteico.

“Life is an old wheel

You must learn it soon

Wheel of transformations

Everything goes and has their own purpose...”

Tuatha de Danann
-The wheel-

Dedico este trabalho aos meus avós Antônio e Neusa, aos meus pais José e Célia e a minha noiva Mariana pelo carinho, dedicação e apoio. Obrigado por sempre me incentivarem e torcerem por mim.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer profundamente todos que contribuíram de alguma maneira ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Primeiramente à minha família, aos meus amados pai e mãe José e Célia e aos meus avós paternos (pai e mãe de criação) “vô” Toninho, vulgo “Boneca” e a “vó” Neusa, vulga “Nega” e minha madrasta Eloísa, pelo constante incentivo e suporte nas minhas escolhas. Obrigado por tudo que fazem por mim e por tentar entender esse “mundo estranho” que é a Biologia.

Á toda minha família, em especial meus irmãos Fábio, João Pedro e Ana Carolina pelos momentos de descontração em Marília, pelas conversas, apoio e pelas “surras” que eu dei em vocês seja no futebol, vôlei, tênis ou jogando vídeo game.

Á minha noiva Mariana, em especial, por seu companheirismo, incentivo e amor incondicional, obrigado por estar sempre ao meu lado inclusive nos momentos mais difíceis sem a sua ajuda jamais chegaria até aqui. E aos meus sogros Marisa e Valdomiro e sua irmã Aline, pelos passeios e almoços de domingo, obrigado por me receberem tão bem.

Aos meus amigos “irmãos” de Marília: Amanda, Conrado, Fernanda, Leandro, Maria Paula, Vanessa e William, quem sempre tentam rir das minhas piadas e por nossas conversas sobre a vida, a verdade e o universo.

Aos meus amigos “irmãos” assisenses: Aurélio, Thaís (Caçula), Thais (Gon) e Kassandra que mesmo longe estão sempre presentes comigo.

Aos novos laços de amizade que criei em Botucatu: Bruno, Bruna, Fernanda, Lidiane, Héllen, Midori, Vicente e Vivian, obrigado pela presença diária seja fazendo exercícios na academia ou comendo um rodízio de pizza, vocês fizeram a minha vida mais alegre em Botucatu.

Ás amizades que criei durante meu doutorado sanduíche nos Estados Unidos, em especial ao meu orientador Dr. Alexander Revzin por me acolher em seu laboratório e

confiar e mim para realização dos experimentos e aos amigos de bancada Ali, Dustin, Gulnaz, Pantea e Ying pelo auxílio na execução dos experimentos e discussões que enriqueceram a minha percepção de mundo.

Á meus amigos brasileiros que conquistei na Califórnia: Clarissa, Fabio, Lia, Pedro, Paula e Vinicius, muito obrigado pela companhia e pelos churrascos, futebol, piadas e comilanças, nem parecia que estava em outro país.

À profª. Drª. Flávia Karina Delella, e sua equipe de alunos (Bruno, Brenda e Maira) pela importante e vital colaboração para o desenvolvimento deste trabalho, sendo responsáveis por fornecer as linhagens celulares. Agradeço também pela oportunidade de trabalhar com a Flávia no curso de extensão "Virando a Célula do Avesso" seja participando dos teatros ou batendo fotos.

A todos que passaram pelo Laboratório de Biomateriais e Técnicas Eletroquímicas (BIOTEL), do Prof°. Dr°. Valber de Albuquerque Pedrosa, em especial a Agnieszka, Caroline, João, Lucas e Naíra, pelo auxílio nos experimentos, seja dividindo as tarefas ou jogando conversa fora entre um café e outro.

Aos professores doutores presentes tanto na banca de qualificação quanto na defesa da tese, por aceitarem o convite e disponibilizarem seu tempo na avaliação do trabalho, além das enriquecedoras considerações.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

E, finalmente, agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa pela orientação. Obrigado primeiramente por aceitar um botânico que caiu de paraquedas no seu laboratório. Sou muito grato pela oportunidade, paciência, incentivo, puxões de orelhas, artigos publicados e pelos sets disputados de tênis. Serei eternamente grato por ter sido seu aluno de doutorado e espero que nossa parceria perdure ao longo da vida!

RESULTADOS OBTIDOS DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO

Artigos publicados em periódicos

- ✓ CRULHAS, B.P.; SEMPIONATTO, J.R.; CABRAL, M.F.; MINKO, S.; PEDROSA, V. A. Stimuli-Responsive Biointerface Based on Polymer Brushes for Glucose Detection. Electroanalysis (New York, N.Y.).v.26, p.n/a - n/a, 2014.

- ✓ CRULHAS, B.P.; RAMOS, N.P.; BASSO, C.R.; COSTA, V.E.; CASTRO, G.R.; PEDROSA,V.A. Fabrication and Characterization of Ferrocenece Containing Hydrogel for Glucose Biosensor Application. International Journal of Electrochemical Science (Online).v.9, p.7596 - 7604, 2014.

- ✓ RECCO, L.C.; CRULHAS, B.P.; PARRA, J.P.R.L.L.; PEDROSA, V.A. A new strategy for detecting dopamine in human serum using polymer brushes reinforced with carbon nanotubes. RSC Advances: an international journal to further the chemical sciences. v.6, p.47134 - 47137, 2016.

- ✓ CRULHAS, B.P.; RAMOS, N.P.; CASTRO, G.R.; PEDROSA, V.A. Detection of hydrogen peroxide releasing from prostate cancer cell using a biosensor. Journal of Solid State Electrochemistry (Print). p.1 - 7, 2016.

- ✓ RECCO, L.C.; CRULHAS, B.P.; BASSO, C.R.; CASTRO, G.R.; PEDROSA, V.A. Direct Electrochemical Detection of Estriol in Serum by Polymer Brushes Reinforced with Carbon Nanotubes. ECS Journal of Solid State Science and Technology.v.5, p.M3041 - M3044, 2016.

- ✓ CRULHAS, B.P., RECCO, L.C., DELELLA, F.K., PEDROSA, V.A. A Novel Superoxide Anion Biosensor for Monitoring Reactive Species of Oxygen Released by Cancer Cells. Electroanalysis, 2017.

Artigos submetidos

- ✓ CRULHAS, B.P., KARPIK, A.E., DELELLA, F.K., PEDROSA, V.A. An Aptamer-based Biosensor for Monitoring PSA and VEGF Released by Prostate Cancer Cells, 2017. (Submetido Biosensors and Bioelectronics).

- ✓ CRULHAS, B.P., KARPIK, A.E., DELELLA, F.K., PEDROSA, V.A. An Aptamer-based Biosensor for Monitoring MUC1 Released by Prostate Cancer Cells, 2017. (Submetido Analytical Chemistry).

- ✓ CRULHAS, B.P., HADLEY, D., LIU, Y., SHIN, D.-S., STYBAYEVA, G., HIL, A., PEDROSA, V.A., REVZIN, A. An Electrochemical aptasensor for detection of bovine interferon gamma, 2017 (submetido Analyst).

Bolsa de estudo

- ✓ Bolsista regular da pós-graduação em biologia geral pela Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES)
  Projeto: Desenvolvimento de biossensores para monitoramento celular.
  Período: Março/2013 – Fevereiro/2017.
  Instituição: Instituto de Biociências de Botucatu (IBB-UNESP)
  Orientador: Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa

- ✓ Bolsista doutorado-sanduíche pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)
  Projeto: Desenvolvimento de biossensores aptaméricos para detecção de biomarcadores inflamatórios liberados por células humanas e animais
  Período: Julho/2014 – Julho/2015
  Instituição: University of California, Davis, USA.
  Orientador: Dr. Alexander Revzin

Sumário

RESUMO v

ABSTRACT vi

1. Introdução 7

1.1. Biossensores para monitoramento celular 9

1.1.1. Biossensores *lab-on-a-chip* 12

1.2. Biomarcadores para Câncer de próstata 14

2. OBJETIVOS 22

3. PARTE EXPERIMENTAL 22

3.1. Biosensores enzimáticos 23

3.1.1. Materiais e Reagentes 23

3.1.2. Instrumentação 23

3.1.3. Eletrodos 24

3.1.4. Funcionalização dos eletrodos 25

3.1.5. Integração dos eletrodos de ouro com microestruras de hidrogel contendo enzimas GOX, LOX e SOD 26

3.1.7. Cultivo Celular 28

3.1.8. Técnicas eletroquímicas 29

3.2. Biosensores aptaméricos 31

3.2.1. Materiais e Reagentes 32

3.2.2. Instrumentação 33

3.2.4. Acoplamento dos aptâmeros em eletrodos de ouro 35

3.2.5 Cultivo Celular 36

3.2.6. Técnicas eletroquímicas 36

4. Resultados e discussão 38

4.1. Biossensores enzimáticos 38

4.1.1. Caracterização da superfície e otimização do biossensor 38

4.1.2. Detecção de glicose e ácido lático usando biossensor-enzimático 42

4.1.3. Biossensores enzimáticos para detecção de superóxido 45

4.1.3.1. Caracterizção eletroquímica do biossensor enzimáticos para detecção de super óxidos 46

4.1.3.2. Detecção eletroquímica de ROS por biossensores enzimáticos 47

4.1.3.2.1. Detecção eletroquímica de ROS liberados por CaP 50
4.1.4. Biossensores enzimáticos para detecção de peróxido de hidrogênio 52
4.1.4.1. Caracterização do Biossensor enzimáticos para detecção de peróxido de hidrogênio 52
4.1.2.2. Detecção eletroquímica de ROS por biossensores enzimáticos 56
4.2. Biossensores aptaméricos 61
4.2.1. Caracterização do eletrodo de silício recoberto com ouro 61
4.2.2. Caracterização eletroquímica e detecção de PSA, VEGF e MUC1 62
4.2.3. Detecção de PSA, VEGF e MUC1 por células prostáticas 67
5. Conclusões 76
6. Planos futuros 77
7. Referências Bibliográficas 78
8. Anexos 97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Elementos e componentes típicos de biossensores (Retirado de Kirsch et al. [27]). 10

Figura 2. Esquema de biossensores *Lab-on-a-chip* (retirado de http://lab-on-chip.gene-quantification.info/) 12

Figura 3. Esquema do processo de Evolução Sistemática dos Ligantes por Enriquecimento Exponencial para o desenvolvimento de novos aptâmeros (autoria própria) 20

Figura 4. A) Layout da matriz de eletrodos. (B) Micropadronização das enzimas em hidrogel no topo dos eletrodos de ouro (Crulhas et al. [150]). 25

Figura 5. Conjugação da enzima HRP com AuNPs (Extraído de Pedrosa et al. [155]) 28

Figura 6. (A) Visão geral do sensor contendo conjunto micropaternado de eletrodos de ouro. (B) Célula eletroquímica contendo Ag/AgCl como eletrodo de referência, filamento de Pt como contra eletrodo e Au como eletrodo de trabalho. (Modificado de Crulhas et al. [156]). 31

Figura 7. Estrutura dos aptâmeros (A) aptâmero específico para PSA, (B) Aptâmero específico para VEGF e (C) Aptâmero específico para MUC1. 33

Figura 8. Esquema do aptasensor eletroquímico. (A) Estrutura do aptâmero sobre o eletrodo de ouro, (B) Mudança na estrutura do aptâmero após ligação com a proteína-alvo, (C) Técnica de voltametria de onda quadrada para medir as diferenças na corrente na presença e ausência da proteína-alvo. Autoria própia 35

Figura 9. (A) Parte da matriz de eletrodos. (B) Adesão do compleo PEG-enzimas no topo dos eletrodos de ouro. 39

Figura 10. (A) VC de PEG-Fc em 0,1 mM PBS com velocidade de varredura de 50mV/s. PEG (linha preta); PEG-FC (linha vermelha). (B) Estado estacionário da corrente de pico do complexo PEG-Fc vs diferentes concentrações de Fc na matriz polimérica 40

Figura 11. (A) VC do PEG-Fc em diferentes velocidade de varredura (a-f: 20, 30, 50, 60, 90, 100, 150, 200 e 250 mV/s. (B) Separação do pico em função do potencial da velocidade de varredura. As medidas foram feitas em 10mM PBS (pH 6,0). 41

Figura 12. (A) Voltametria cíclica do biossensor com: ausência de analitos (linha vermelha), presença de glicose (linha verde) e presença de ácido lático (linha preta). (B) Correlação linear do pico da corrente com a concentração de glicose. (C) Correlação linear do pico da corrente com a concentração de ácido lático. 43

Figura 13. (A) Voltametria cíclica do biossensor em diferentes velocidades de varredura (a-i: 20, 30, 40, 50, 60, 90, 100, 150, 200, e 250 mV/s em 0,1 M PBS. (B) Separação do pico em função do potencial de varredura. (C) Gráfico Nyquist para PEG-Au electrodes contendo: PEG puro (PEG (■), (●) SOD-PEG e (▲) SOD-Fc-SOD no intervalo de frequência entre 0,1 Hz e 100 KHz. 46

Figura 14. VOQ PEG-SOD-Fc biossensor no intervalo de potencial de -0,2 a 0,7 V vs Ag/AgCl. (B) Curva de calibração obtida a partir da variação do corrente do pico da VOQ em função de diferentes concentrações de catequina. (C) VOQ PEG-SOD-Fc na presença de 10µM catequina e 100µM de ácido ascórbico e úrico. (D) Reprodutibilidade do PEG-SOD-Fc biossensor. 49

Figura 15. (A) Imagem de microscópia óptica do biossensor SOD-Fc-PEG incubado com células PC3 ao redor da matriz polimérica. (B) VOQ do biossensor SOD-Fc-PEG polimerizado no top de eletrodos de Au em função do tempo (a-m: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 minutos). (C) Gráfico do valor absoluto da corrente de pico em função da liberação de superóxido liberados por células PC3..... 51

Figura 16. (A) Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das nanopartículas de Ouro. (B) Imagens da TEM de HRP conjugados com AuNP. (C) Imagens da TEM de HRP-AuNPs disperses na matriz de PEG. (D) Espectro UV-vis das AuNPs. 53

Figura 17. (A) Voltametria cíclica dos eletrodos de HRP-AuNP-PEG em diferentes velocidades de varredura (a–f: 20, 30, 60, 100, 200, 250 mV/s) na presença de 0,5mM Fc em 10mM PBS (pH 6,5). (B) Separação dos picos em função o potencial da velocidade de varredura. (C) Corrente do pico redox *versus* a raiz quadrada da velocidade de varredura, pico catódico (▪) e pico anódico (•). (D) Espectroscopia de impedância dos eletrodos PEG-AuNP. Gráficos Nyquist para os eletrodos de PEG-Au, na presença de HRP-PEG (▪) e HRP-AuNP-PEG (•). Intervalos de frequência foram de 0.1 Hz – 1 mHz. (E) Diagrama do circuito obtido pela EIS. 55

Figura 18. (A) VC de PEG(linha azul), AuNP-PEG(linha vermelha) e HRP-AuNP-PEG(linha preta) polimerizadas no topo de eletrodos de Au na presença de 5 0mg/mL de H_2O_2. (B) VC dos eletrodos em função da concentração de H_2O_2 (a-f: 1, 5, 10, 20, 50 e 100 mg/mL). (C) Curva de calibração obtida com valores absolutos na redução da corrente em função de diferentes concentrações de H_2O_2. (D) VC na presença de 100 mM de ácido ascórbico e 100 mM de ácido úrico. (E) Reprodutibilidade do HRP-AuNP-PEG biossensor. 57

Figura 19. Superfície do sensor (A) Microscopia óptica 10x de células PC3 aderidas no topo de eletrodos contendo HRP-AuNP-PEG (B) Microscopia óptica 40x de células PC3 aderidas no topo de eletrodos contendo HRP-AuNP-PEG e (C) Redução absoluta da corrente em função de H_2O_2 liberados pelas células 60

Figura 20. (A) MEV da superfície de silício recoberto com ouro. (B) EDS da superfície de silício recoberto com ouro. (C) VC do eletrodo de silício recoberto com ouro com velocidade de varredura de 50mV/s entre os potencial -0,2V – 1,5V em 10 mM PBS. 62

Figura 21. Esquema da técnica de preenchimento da superfície utilizando MCH (Autoria própria). 63

Figura 22. (A) VOQ da estabilidade do aptâmero para PSA ao longo do tempo (a-i: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 minutos) vs Ag/AgCl com amplitude de sinal de 40 mV e 60 Hz de frequência. (B) VOQ da estabilidade do aptâmero para VEGF ao longo do tempo (a-i: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 minutos) vs Ag/AgCl com amplitude de sinal de 40 mV e 60 Hz de frequência 65

Figura 23. (A) VOQ da estabilidade do aptâmero para PSA ao longo do tempo (a-i: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 minutos) na faixa de potencial entre 0,0 e -0,5V com amplitude de sinal de 40 mV e 60 Hz de frequência. (B) VOQ da estabilidade do aptâmero para VEGF ao longo do tempo (a-i: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 minutos) na faixa de potencial entre 0,0 e -0,5V com amplitude de sinal de 40 mV e 60 Hz de frequência.... 66

Figura 24. Visão geral do design experimental do biossensor aptamérico para detecção e proteínas liberadas por células prostáticas..... 68

Figura 25. (A) VOQ vs Ag/AgCl da detecção de PSA liberado por células RWPE-1 ao longo do tempo. (B) supressão o sinal, em porcentagem, na redução do pico da VOQ pela liberação de PSA por células RWPE-1. (C) VOQ vs Ag/AgCl da detecção de PSA liberado por células LNCaP ao longo do tempo. (D) supressão o sinal, em porcentagem, na redução do pico da VOQ pela liberação de PSA por células LNCaP. (E) VOQ vs Ag/AgCl da

detecção de PSA liberado por células PC3 ao longo do tempo. (F) supressão o sinal, em porcentagem, na redução do pico da VOQ pela liberação de PSA por células PC3 71

Figura 26. (A) VOQ vs Ag/AgCl da detecção de VEGF liberado por células RWPE-1 ao longo do tempo. (B) supressão o sinal, em porcentagem, na redução do pico da VOQ pela liberação de VEGF por células RWPE-1. (C) VOQ vs Ag/AgCl da detecção de VEGF liberado por células LNCaP ao longo do tempo. (D) supressão o sinal, em porcentagem, na redução do pico da VOQ pela liberação de VEGF por células LNCaP. (E) VOQ vs Ag/AgCl da detecção de VEGF liberado por células PC3 ao longo do tempo. (F) supressão o sinal, em porcentagem, na redução do pico da VOQ pela liberação de VEGF por células PC3. .. 73

Figura 27. (A) VOQ vs Ag/AgCl da detecção de MUC1 liberado por células RWPE-1 ao longo do tempo. (B) supressão o sinal, em porcentagem, na redução do pico da VOQ pela liberação de MUC1 por células RWPE-1. (C) VOQ vs Ag/AgCl da detecção de MUC1 liberado por células LNCaP ao longo do tempo. (D) supressão o sinal, em porcentagem, na redução do pico da VOQ pela liberação de MUC1 por células LNCaP. (E) VOQ vs Ag/AgCl da detecção de MUC1 liberado por células PC3 ao longo do tempo. (F) supressão o sinal, em porcentagem, na redução do pico da VOQ pela liberação de MUC1 por células PC3. 74

RESUMO

O câncer de próstata é uma das principais causas de mortalidade masculina. Na atualidade, a detecção do câncer depende fortemente de métodos tradicionais baseados na análise da morfologia celular por meio de biopsias e análise do tecido. Por isso, o desenvolvimento de novos dispositivos para monitorar o metabolismo celular no diagnóstico de doenças é necessário. Atualmente pesquisas utilizando biossensores para esta finalidade possibilitaram a criação de novos dispositivos com alta sensibilidade de detecção, especificidade e capacidade de multiplexação em dispositivos portáteis para uso em diferentes áreas. Nesse estudo abordamos o monitoramento dos produtos secretados por células cancerígenas utilizando biossensores. O trabalho se desenvolveu em duas frentes de pesquisa para o estudo dos compostos liberados por células cancerígenas. A primeira tratou-se de uma plataforma de biossensor integrada para monitorar a detecção de multi-analitos (glicose, lactato, superóxidos e peróxido de hidrogênio) onde o microambiente celular pode ser definido com precisão. O biossensor eletroquímico para detecção de glicose, lactato e superóxidos se baseou na utilização do hidrogel de polietileno glicol (PEG) acoplado com as enzimas: glicose oxidase (GOX), lactato desidrogenase (LOX) e superóxido dismutase (SOD) e ferroceno (Fc) como par redox utilizado nas análises eletroquímicas, em adição, a enzima peroxidase (HRP) foi conjugada com nanopartículas de ouro e foram encapsuladas na matriz de PEG. Na segunda estratégia utilizou-se de biossensores aptâmericos com ênfase em biomarcadores proteicos para monitoramento a detecção do antígeno prostático específico (PSA), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e mucina (MUC1) *in vitro*. As linhagens celulares utilizadas para monitoramento do metabolismo foram, a RWPE-1 (células prostáticas benignas), LNCaP e PC3 (células prostáticas tumorais). Desta forma a partir da combinação de diferentes metodologias na construção de biossensores eletroquímicos, foi possível a detecção de: glicose, lactato, superóxidos e peróxido de hidrogênio, além das proteínas PSA, VEGF e MUC1 com alta estabilidade, reprodutibilidade e seletividade. Portanto, as plataformas desenvolvidas neste trabalho poderão ser utilizadas, no futuro como uma ferramenta adicional para diagnóstico e monitoramento do câncer de próstata.

Palavras-chave: biossensores eletroquímicos, câncer de próstata, metabolismo enzimático, metabolismo proteico.

ABSTRACT

The prostate cancer is a leading cause of dead worldwide and currently methods for cancer detection rely on traditional techniques based on analysis of cell morphology using biopsy and tissue evaluation. Therefore, the development of new devices for monitoring cell metabolism and disease diagnosis expanded over the recent years. Nowadays the research on biosensors for clinical diagnostics enabled the development of new devices with refined detection sensitivity, specificity, and multiplexing capacity for use in portable devices different areas. Herein, we approached the monitoring of byproducts released by cancer cells by using different type of biosensors. This work was based on development of two fronts of research to study compounds released by cancer cells. The first platform was an integrated biosensor for multi-analyte detection and monitoring of glucose, lactate, superoxide and hydrogen peroxide, in which the cellular microenvironment was precisely defined. The electrochemical biosensor to detect glucose, lactate and superoxide was based on polyethylene (PEG) hydrogel linked with specific enzymes for each analytes, being: glucose oxidae (GOX), lactate dehydrogenase (LOX) and superoxide dismutase (SOD) with ferrocene (Fc) as redox pair for electrochemical analysis, moreover, for hydrogen peroxide detection, the enzyme horseradish peroxidade (HRP) was coupled with gold nanoparticles (redox pair) and entrapped inside PEG matrix. The second platform was based on aptamer-based biosensor with focus on protein biomarkers to monitoring and detection of the prostate specific antigen (PSA), vascular endothelial growth factor (VEGF) and mucin (MUC1) *in vitro.* The cellular lineages used was, RWPE-1 (normal prostate cells), LNCaP and PC3 (prostate cancer cells). Therefore, the combination of several methodologies for electrochemical biosensor manufacturing allowed the precisely detection of: glucose, lactate, superoxide, hydrogen peroxide and also the proteins: PSA, VEGF and MUC1 with enhanced stability, reproducibility and selectivity, being a suitable platform to be used, in near future as an additional tool for clinical diagnostic and monitoring of prostate cancer.

Keywords: electrochemical biosensors, prostate cancer, enzymatic metabolism, protein metabolism.

1. Introdução

O Câncer é uma das principais causas de morte no mundo, e sua incidência continua a aumentar, sendo a segunda causa de morte em países desenvolvidos [1]. Nos EUA, em 2016 o número aproximado de mortes de acordo com o tipo de câncer foi, dentre homens: câncer de próstata (26.120 pacientes, 14,4% dos casos), pulmão e brônquios (85.920 pacientes, 72% dos casos), colo retal (21.450 pacientes, 54,5% dos casos) e pâncreas (21.450 pacientes, 77.5% dos casos) [1-3]. Para as mulheres os quatros tipos mais comuns de câncer são: câncer de mama (40.450 pacientes, 16,4% dos casos), pulmão e brônquios (72.160 pacientes, 67% dos casos), colo retal (23,170 pacientes, 48,7% dos casos) e pâncreas (20,330 pacientes, 80% dos casos) [1].

O câncer é uma neoplasia maligna que ocorre devido à acumulação progressiva de alterações moleculares múltiplas no genoma (genéticos e epigenético), nos níveis da transcrição, tradução e pós-traducional. O câncer é composto de mais de 200 doenças diferentes que afetam mais de 60 órgãos humanos. Os tumores malignos são capazes de invadir tecidos adjacentes a partir do crescimento primário seguido de implantação e proliferação em locais distantes de sua origem através do processo de metástase [4-7].

O câncer de próstata (CaP) é uma das principais causas de mortalidade masculina [2]. Mundialmente, o CaP é o segundo tipo mais comum e prevalente em homens e sua taxa de incidência é seis vezes maior em países desenvolvidos em comparação aos países em desenvolvimento, em 2016 segundo dados da *American Cancer Society* foram estimados em torno de 180 mil casos novos de CaP. No Brasil, o câncer de próstata é segundo em incidência e o primeiro em óbitos entre homens segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa de novos casos foi de 61.200 para 2016.

A incidência do CaP é influenciada por diversos fatores, dentre os quais estão:

a) *Idade:* é um dos principais fatores de risco e o CaP é comumente diagnosticado em homens com mais de 50 anos [8].

b) *Histórico familiar:* O risco de desenvolver o CaP é aumentado em homens com casos diagnosticados na família sendo diretamente proporcional ao grau de parentesco e número de pessoas afetadas [9].

c) *Etnia:* A população de etnia africana estão mais propensos a desenvolver o CaP [10]. Mais especificamente, nos EUA a incidência é maior em afro descendentes que nas demais etnias [11], supõe-se que fatores socioeconômicos, culturais e genéticos possam estar envolvidos com a predisposição de CaP entre afro descendentes [12].

d) *Dieta:* A predisposição de CaP é maior em homens obesos e em pacientes com dieta rica em gordura animal [13].

Contudo, mesmo com a evolução no tratamento e diagnóstico da doença, o câncer prostático continua sendo uma doença com alta incidência na população mundial, e o resultado do tratamento clínico depende principalmente do estágio em que o mesmo é diagnosticado. Portanto a detecção nos estágios iniciais e o tratamento eficaz são fundamentais para aumentar a taxa de sobrevivência da população [14]. Os métodos existentes de detecção de câncer dependem fortemente de métodos tradicionais, que se baseiam na análise morfológica das células por meio de análises biológicas e moleculares. Estas técnicas são invasivas e baseadas em biopsias com análise posterior do tecido, utilizando técnicas de fixação e morfologia celular para identificar e detectar as células cancerígenas [15,16].

Diversos avanços das ferramentas moleculares possibilitaram entender o funcionamento do câncer prostático no nível molecular. A análise de biomarcadores,

como microRNAs e proteínas no sangue, urina e outros fluidos corporais são os métodos mais refinados e menos invasivos utilizados para a detecção do CaP [17,18]. Em adição, perfis de multi-marcadores podem ser essenciais para o diagnóstico no início da doença. Estes métodos devem fornecer informações para auxiliar os médicos na tomada de decisões de tratamento e aumentar a taxa de sobrevida dos pacientes. Diante disto, a ideia central desse projeto foi a de se desenvolver uma nova metodologia molecular para auxiliar no diagnóstico do CaP.

1.1. Biossensores para monitoramento celular

A história do desenvolvimento de biossensores é um excelente exemplo de como uma ideia simples pode fomentar um avanço na ciência e tecnologia [19,20]. A criação deste campo foi iniciada na década de 60 pelos trabalhos de Clark e Lyons, onde combinaram um sensor eletroquímico de oxigênio (eletrodo de Clark) e a enzima glicose oxidase, e conseguiram medir quantitativamente glicose em meio aquoso [21]. Posteriormente, Updike e Hicks recobriram o eletrodo de Clark com uma membrana de gel de poliacrilamida contendo glicose oxidase, e criaram o primeiro eletrodo enzimático para a determinação rápida e quantitativa de glicose. Já Guilbault e Montalvo desenvolveram um eletrodo de vidro com a urease imobilizada para medir a concentração de ureia [22].

De acordo com a IUPAC, o biossensor deve ser um dispositivo integrado capaz de fornecer informações quantitativas ou semi-quantitativas, específicas, usando um elemento de reconhecimento biológico em contato direto com um transdutor [23]. Eles podem ser classificados com base no tipo do elemento de bioreconhecimento (p.ex., enzima, anticorpo, DNA, RNA, proteínas) e as estratégias para a transdução do sinal biológico

podem ser divididas em: eletroquímica [24,25], óptica [26,27], gravimétrica [28,29], ou térmica [30] (Figura 1.).

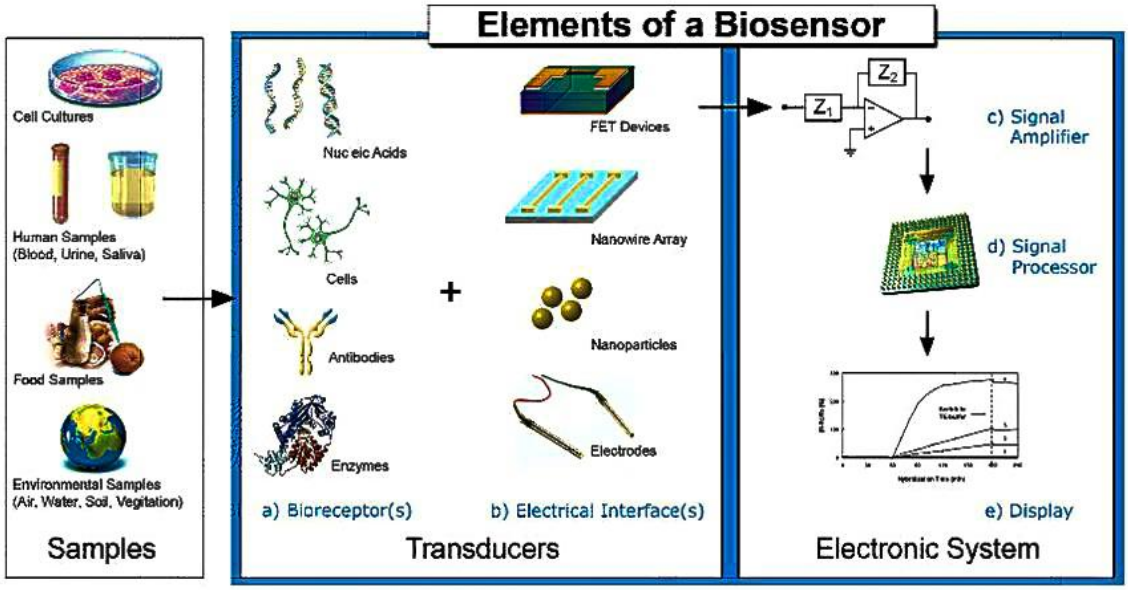

Figura 1. Elementos e componentes típicos de biossensores (Retirado de Kirsch et al. [24]).

O campo de biossensores esta se expandindo exponencialmente, devido à versatilidade em seu uso em diferentes campos, como: processamento de alimentos (controle da qualidade e segurança) [31,32]; indústria (processos de fermentação) [33]; medicina (diagnóstico, tratamento e monitoramento de doenças) [34,35], indústria farmacêutica (produção de novos fármacos e desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos) [36,37]; biossegurança (controle de ameaças biológicas e químicas) [38].

Atualmente na área médica o uso de biossensores para estudar os sistemas vivos (células, tecidos, órgãos e organismos) tem despertado grande interesse nas últimas duas décadas, por causa do desenvolvimento de diversos tipos sensores para análise celular. Estes sensores são capazes de analisar células vivas com transdutores de sinal e podem

ser utilizados para detecção de parâmetros fisiológicos; análises dos efeitos de fármacos; avaliação de citotoxicidade, entre outros [39-41], com análise precisa e *in situ* do microambiente celular [42,43].

Tradicionalmente as análises celulares *in vitro* utilizam conjunto grande de células e revelam apenas informações escassas sobre as dinâmicas metabólicas, não sendo adequados para monitoramento de eventos metabólicos que requerem alta resolução temporal [44,45]. Devido às limitações da tecnologia de instrumentação existente, pesquisas tradicionais com cultura celular tendem a se concentrar sobre a monitoração de grandes populações celulares [46]. A análise celular individual ou de pequenos grupos demonstra uma representação mais precisa do comportamento das células [47, 48]. Deste modo, ao desenvolvimento de novos métodos bioanalíticos para análise celular [49].

A dinâmica dos produtos secretados pelas células, por meio de biossensores, tem sido estudado para o monitoramento de doenças e desenvolvimento de novos tratamentos [50-52]. A avaliação do metabolismo celular é fundamental para o diagnóstico clínico e pode ser realizada precisamente por meio de sensores específicos para diversos subprodutos metabólicos liberados por células, tais como: hormônios, proteínas, neurotransmissores, fatores tróficos e entre outros [53-55]. Também é importante os estudos de sinais químicos e físicos em células, tais como: variações no pH, consumo de oxigênio, concentrações de íons, mudanças no potenciais de membrana, liberação de proteínas e metabólitos [56-58]. Utilizando um transdutor adequado, os sinais podem ser medidos quantitativamente e garantir informações comparativas importantes sobre a resposta das células a diferentes estímulos [59].

1.1.1. Biossensores *lab-on-a-chip*

Biossensores *Lab-on-a-chip* (LOC) são dispositivos que possuem como objetivo a miniaturização de processos químicos e biológicos em sistemas de alta precisão [60]. As pesquisas com LOC são parte de uma tendência no desenvolvimento de biossensores em direção a sistemas de alto rendimento com maior integração e miniaturização (Figura 1.) [69]. Estes sistemas têm sido utilizados em diversas pesquisas, como: a amplificação de DNA em tempo real para a detecção do vírus do papiloma humano (HPV) [61]; plataforma de microfluídos para o isolamento de células específicas a partir de amostras de sangue [62]; isolamento de células e purificação de baixa abundância [63]; detecção de mutações de uma única base através de matrizes eletroquímicas [65] e monitoramento do metabolismo celular [65].

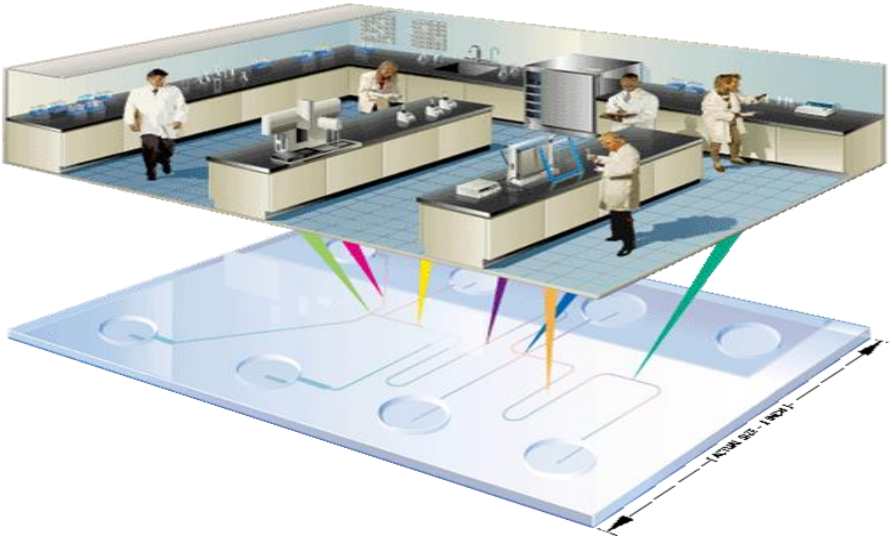

Figura 2. Esquema de biossensores *Lab-on-a-chip* (retirado de http://lab-on-chip.gene-quantification.info/)

As técnicas eletroquímicas empregadas em conjunto com as plataformas de lab-on-a-chip têm sido uma importante ferramenta no desenvolvimento de testes de diagnóstico de diversas doenças [66-68], oferecendo uma excelente sensibilidade analítica e uma

instrumentação simplificada de baixo custo [69]. Nos ensaios eletroquímicos, o metabolismo celular é normalmente quantificado através da medição da corrente elétrica gerada pela oxidação ou redução eletroquímica do elemento de biorreconhecimento (p.ex., um anticorpo marcador ou enzima que gera produto eletroativo). Portanto, a combinação de técnicas eletroquímicas e sistemas microfluídicos permitem uma análise invasiva, porém não destrutiva das células e deste modo diversas manipulações da amostra podem ser integradas no microssistema e o controle é simples e automatizado [70,71].

A imobilização de distintos elementos de biorreconhecimento (p.ex., glicose oxidase, lactato dehidrogenase e peróxido de hidrogênio oxirredutase) em diferentes membros do conjunto de eletrodos e a detecção multianalítica continua a ser um desafio. Uma forma de realizar o teste para múltiplos analitos é combinar diversos imunoensaios eletroquímicos num único teste [72]. Conforme o observado nos trabalhos de Mataharu *et. al.* onde foi imobilizada a peróxido de hidrogênio oxiredutase em microeletrodos de ouro para verificar a liberação de peróxido de hidrogênio por macrófagos [73]. Por sua vez, Revzin *et. al.* desenvolveram um biossensor de filmes finos poliméricos depositados sobre microeletrodos de ouro para analisar peróxido de hidrogênio liberado por macrófagos [74]. Recentemente, Liu *et. al.* descreveram a aplicação de biossensores LOC em aplicações para monitoramento celular e diagnóstico de doenças como AIDS, câncer, doenças inflamatórias e infecções bacterianas [75].

Outra vantagem de sistemas LOC é o uso em sistemas microfluídicos que permite a manipulação dos mesmos em pequenos canais. Tais dispositivos podem ser concebidos para executar várias etapas de alta resolução de ensaios biológicos ou químicos. Muitos são fabricados utilizando processos de moldagem ou o uso da fotolitografia, quartzo, sílica, ou substratos de vidro [76,77]. Recentemente, nosso grupo de pesquisa a desenvolveu um

biossensor sensível a peróxido de hidrogênio pela modificação de polímeros com a enzima peroxidase para avaliação do metabolismo de células de CaP [78].

Por isso sistemas microfluídicos oferecem oportunidades únicas para controlar e observar mudanças na composição do microambiente celular [79]. O fluxo laminar e a falta de mistura convectiva no interior dos canais fluídicos levam à aplicação das plataformas microfluídicas como dispositivos geradores de gradiente [81-82]. Estes dispositivos operam através do encaminhamento de dois ou mais reagentes de concentrações definidas por meio de uma rede de canais causando diluição em série e criando várias concentrações de reagentes na saída.

1.2. Biomarcadores para Câncer de próstata

Conforme o Instituto Nacional do Câncer dos EUA (NCI), um biomarcador é uma molécula biológica encontrada no sangue, fluídos corporais ou em tecidos, sendo um sinal de um processo normal ou anormal, ou de uma condição ou doença como o câncer [83]. A expressão de biomarcadores normalmente difere entre pessoas com CaP e saudáveis e tais alterações podem ocorrer devido à: mutações somáticas, mudanças transcricionais ou pós-transcricionais [84]. Atualmente, há uma grande variedade de biomarcadores, os quais podem incluir: proteínas, ácidos nucléicos, anticorpos, peptídeos, entre outros, a sua detecção deve ser possível na circulação (sangue, soro ou plasma) ou em excreções e secreções (fezes, urina, saliva, entre outros) de forma a ser facilmente analisado por meios não invasivos para avaliação de múltiplos contextos clínicos como: estimativa do risco de câncer; rastreio de tumores no estágio inicial; diferenciar tumores benignos e malignos e para o prognóstico e monitoramento do câncer [85-87].

Concomitantemente aos biomarcadores tradicionais utilizados para detecção e monitoramento de CaP, surgem novas alternativas para monitoramento de células cancerígenas através de subprodutos metabólicos liberados. Devido ao complexo microambiente celular, diferentes subprodutos são liberados para regulação do metabolismo celular e manutenção da homeostase.

Normalmente, o meio celular cancerígeno é caracterizado pela depleção de oxigênio e glicose, bem como elevada acidose extracelular e liberação de diversos marcadores inflamatórios como os superóxidos, peróxido de hidrogênio e lactato [88]. Estes fatores levam a uma grande variabilidade dos gradientes de concentração de oxigênio, do pH e da glicose [89] que podem potencializar ou modular a regulação metabólica das células cancerígenas, definindo a susceptibilidade ou resistência dessas células às terapias aplicadas [90]. Por isso, diferentes tipos biossensores utilizando as enzimas glicose oxidase, lactato desidrogenase, superóxido dismutase e peroxidase vêm sendo utilizados para detecção de importantes analitos-alvo liberados por diferentes linhagens celulares, por exemplo, Kennedy et al. [91] detectaram consumo de glicose por células de Langerhans, Cooper et al. [92] detectaram a liberação de lactato por miócitos, Revzin et al. [93] detectaram a liberação de peróxido de hidrogênio por macrófagos e Che et al. [94] demonstraram a importância da superóxido dismutase na regulação e evolução de tumores.

Também há os biomarcadores proteicos estão sendo avaliados para potencial uso na análise clínica. Dentre eles, o antígeno prostático específico (PSA) é o mais comumente utilizado e amplamente estudado sendo, uma glicoproteína que contém 237-amino-ácido (33 kDa) que pertence a família calicreína humana produzida pelo epitélio glandular da próstata humana e secretado no fluído seminal [95]. O PSA desempenha

um papel principal no câncer de próstata, que pode estimular o desprendimento de células, facilitando a progressão tumoral ou metástase. Atualmente o diagnóstico de CaP é acompanhado pela dosagem sérica de PSA. No sangue, a maior parte do PSA se apresenta complexado com inibidores de proteases, predominantemente α1-antiquimotripsina e α2-macroglobulina. Mas uma pequena fracção de PSA livre (fPSA) permanece presente na amostra, apesar de um grande excesso dos inibidores [96]. O PSA total (tPSA), é a soma das formas de fPSA e complexos no soro. No entanto, para uma melhor discriminação de doenças prostáticas benignas contra o câncer de próstata é adequado para detecção de todas as subformas de PSA específicas, em vez de se medir apenas o PSA total, pois, conforme Cantalona et al. [97] pacientes saudáveis com concentrações normais de tPSA podem ter câncer se a concentração de fPSA for menos que 10%.

Outro importante biomarcardor é a mucina (MUC1), que é uma glicoproteína com alto peso molecular encontrada exclusivamente na superfície apical de epitélios glandulares (gastrointestinais, respiratórios, urinários e reprodutivos) [98,99]. A MUC1 é uma glicoproteína transmembrana do tipo 1, com aproximadamente 1000-2200 aminoácidos. A função primária da MUC1 é a proteção contra ataques bacteriológicos e danos físicos [100,101]. Contudo, recentemente foi descrito papel importante da MUC1 na progressão de diversos tipos de câncer, como: câncer de mama, colo do útero, prostático, gástrico e pancreático. A sua expressão em tumores é geralmente aumentada e acompanhada pela glicolisação alterada e padrão de expressão aberrante, sendo mais difuso quando comparado com o padrão em células saudáveis [102,103].

No CaP, o papel da MUC1 é pouco entendido, porém é possível verificar variações em sua expressão em células saudáveis e cancerígenas. Estudos recentes sugerem que a

MUC1 está envolvida na progressão e na atividade metastática do CaP com alta resposta imunorreativa e expressão alterada [104]. Os métodos mais utilizados para detecção de MUC1 foram reportado por Cheng et al. [105], sendo baseado na intensidade da fluorescência do oligonucleotídeo marcado com "*quatum dots"* e por Pang et al. [106], onde utilizaram ensaios com óxido de grafeno como inibidor da fluorescência do MC1 aptâmero, porém ainda existe uma lacuna a ser preenchida por experimentos no monitoramento da MUC1 no CaP.

Outro biomcardor importante é o Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF). O VEGF é uma proteína composta por 232 aminoácidos, sendo um importante marcador presente em diversos tipos de câncer, como: o de próstata, pulmão, trato urinário, mama, entre outros [107,108]. O VEGF é responsável pelo processo de angiogênese, vasculogênese, sendo um fator de agressividade relacionado com o câncer, que, em altas concentrações aumentam os riscos de metástase [109]. Diversos sistemas para detecção de VEGF em linhagens celulares de câncer de próstata já foram desenvolvidos através das técnicas de ELISA, fluorescência e eletroquímica, porém nenhuma tecnologia permitiu a detecção de VEGF com precisão [110,111].

O desenvolvimento de biossensores para detecção destes biomarcadores pode ser dividido em dois grandes grupos, os com detecção direta e os indiretos para biomarcadores cancerígenos [112]. Os biosensores para diagnóstico e monitoramento do câncer utilizado comumente são os de detecção direta, onde a reação entre o sensor e o analito-alvo pode ser medida diretamente. Os biossensores indiretos, que são caracterizados como aqueles que necessitam um ligante secundário para a detecção do analito-alvo (p.ex., sensores eletroquímicos), normalmente utiliza o ligante secundário como anticorpos conjugados com enzimas, sequências de DNA, proteínas, entre outros [113-115].

No desenvolvimento de biossensores para diagnóstico e monitoramento do câncer o componente biológico do sensor é fundamental para obtenção do êxito na pesquisa. O componente biológico pode variar desde pequenas moléculas 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*) [116]. Diversos biossensores são desenvolvidos para análise de proteínas, indicando assim o seu potencial na detecção de proteínas biomarcadoras para o câncer, porém, um dos gargalos é a disponibilidade de uma gama de elementos de reconhecimento que sejam específicos para os diversos biomarcadores cancerígenos. Enquanto que anticorpos são excelentes elementos, nos termos de ligação, especificidade e seletividade, porém eles são relativamente caros para produzir e algumas vezes incompatíveis com metodologias de alto rendimento, em adição ao uso de anticorpos, novas alternativas estão sendo o foco de diversos grupos de pesquisa com promissores alvos, como os aptâmeros [117-119].

Atualmente os aptâmeros são utilizados para detecção de diversas doenças. Os aptâmeros são oligonucleotídeos de DNA ou RNA (70 a 100 nucleotídeos) que se ligam a proteínas com alta afinidade [120]. 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 epítopos dos antígenos [121].

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 com de macromoléculas com conjuntos de sequências de DNA e RNA [122,123]. Contudo, as

sequências de DNA e RNA existentes nos bancos de dados são avaliadas pela sua habilidade de reconhecer biomarcadores específicos através de um processo conhecido como SELEX (Evolução Sistemática dos Ligantes por Enriquecimento Exponencial), o que combina enriquecimento dos aptâmeros via seleção interativa por afinidade de ligação e reação em cadeia da polimerase (PCR) para selecionar sequências específicas de DNA e RNA (cadeia dupla ou simples) com alta afinidade à molécula alvo (Figura 3.).

Enquanto que aptâmeros possuem afinidade similar aos anticorpos, eles também possuem outras vantagens como: a produção *in vitro* não necessitando de imunização, fusão celular ou fermentação para a produção em massa, otimizando assim o processo de fabricação e diminuindo os custos finais no desenvolvimento de biossensores. Portanto, o uso de aptâmeros representa uma nova geração de biomoléculas com alta afinidade e versatilidade para o desenvolvimento de biossensores para o diagnóstico e monitoramento de diversas doenças, como o câncer [124-126].

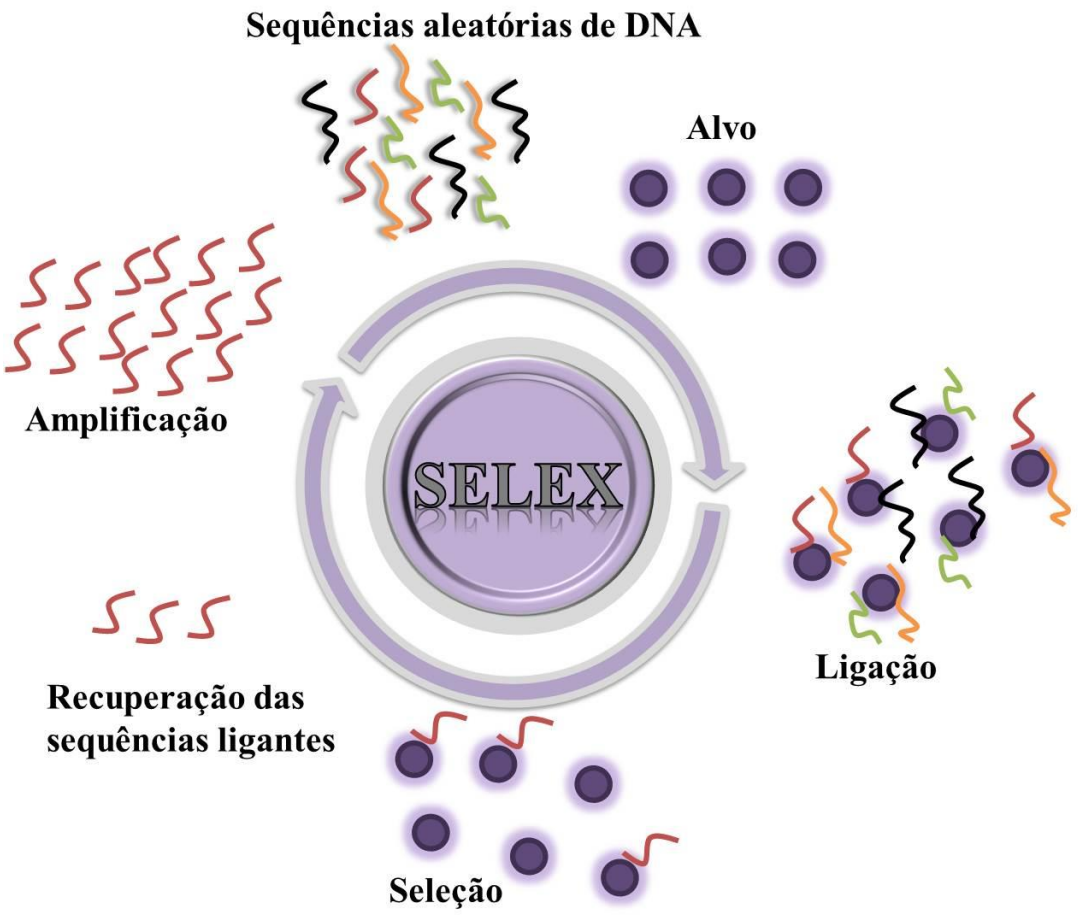

Figura 3. Esquema do processo de Evolução Sistemática dos Ligantes por Enriquecimento Exponencial para o desenvolvimento de novos aptâmeros (autoria própria).

Os Biossensores eletroquímicos baseados em aptâmeros possuem diversas vantagens no desenvolvimento de novas plataformas para diagnóstico e monitoramento do câncer, sendo as mais importantes a grande diversidade de eletrodos de trabalho existentes na literatura, bem como, a possibilidade de miniaturização da plataforma em *lab-on-a-chip* e *point-of-care* [127]. Tais biossesensores são capazes de processar ensaios químicos e biológicos com múltiplas etapas como: a amplificação de DNA em tempo real para a detecção [128], o isolamento e purificação de células específicas [129], a detecção de mutações de uma única base através de matrizes eletroquímicas [130] e monitoramento do metabolismo celular [131]. Diversos sensores voltamétricos utilizando aptâmeros já foram

desenvolvidos, os quais possuem moléculas oxirredutoras acopladas nas sequências de DNA ou RNA. Desta forma, Plaxco et al. desenvolveram diferentes tipos de biossensores com aptâmeros marcados com indicadores oxirredutores, onde a ligação do analito afetou diretamente a eficiência na transferência de elétrons entre o aptâmero e o eletrodo, e o resultado provoca aumento ou diminuição da corrente proporcional à concentração do analito, o que pode ser quantificado conforme uma curva de calibração [132-134]

Já Xiao et al. [135] conjugaram azul de metileno (MB) em um aptâmero antitrombina, que foi imobilizado sobre eletrodos de ouro, via ligação tiol, e através de medidas de corrente alternada foi possível detectar trombina adicionada em soro fetal bovino em concentrações fisiológicas (10nM – 100nM). Sistemas similares aos desenvolvidos acima também foram desenvolvidos por Revzin e colaboradores para detecção de diferentes alvos: como proteínas [136] e as citocinas Interferon gamma (INF-γ) e fator de necrose tumoral (TNF-α) [137].

Portanto, as tarefas desafiantes desta tese foram: 1) estudar o acoplamento do processo biocatalítico (reconhecimento molecular) para análise de importantes metabólitos liberados por células cancerígenas, como: superóxidos e peróxido de hidrogênio, por meio do uso das enzimas superóxido dismutase e peroxidase. 2) O desenvolvimento de uma nova plataforma pela utilização de aptâmeros para detecção e monitoramento de proteínas biomarcadoras para o CaP (PSA, VEGF e MUC1) 3) Avaliar os biomarcadores para criação de dispositivos precisos e seletivos para o diagnóstico de câncer de próstata.

5. Conclusões

A presente tese de doutorado apresentou a fabricação de duas linhas diferentes de sensores, enzimáticos e os baseados em aptâmeros. O desenvolvimento de biossensores enzimáticos contou com a fabricação de quatro plataformas diferentes para detecção de glicose, lactato, superóxidos e peroxidase com baixos valores de LOD, sendo: para glicose e lactato 2 µM, superóxido 1 nM e peróxido de hidrogênio 0,01 µM. Os biossensores enzimáticos se mostraram reprodutíveis e sensíveis aos analitos, sem alteração de reposta devido à presença de interferentes. Além disso, a detecção de marcadores inflamatórios (como: superóxido e peróxido de hidrogênio) avaliadas pelos biossensores em tempo real e utilizando células de CaP *in vitro* forneceu novas informações sobre a produção de tais metabólitos por uma linhagem agressiva de câncer, evidenciando assim seu potencial uso, no futuro, como uma plataforma adicional para avaliação de subprodutos liberados por diferentes linhagens celulares.

Por sua vez, o desenvolvimento de biossensores baseados em aptâmeros gerou três diferentes plataformas de detecção, sendo cada uma específica para um tipo de proteína entre PSA, VEGF e MUC1. As plataformas utilizadas se mostraram estáveis, reprodutíveis e sensíveis para as proteínas-alvo. Os limites de detecção dos biossensores aptaméricos foi de 0,08 ng/mL para PSA e 0,15 ng/mL para VEGF, com linearidade até a concentração de 100 ng/m, estes valores se encontram na faixa de concentração das proteínas no sangue, demonstrando assim a possibilidade de testes utilizando amostras clínicas. Além disso, o monitoramento em tempo real e *in vitro* da produção de proteínas por diferentes linhagens celulares (normal e cancerígenas) forneceu novas informações sobre a liberação de PSA,

VEGF e MUC1 e pode no futuro ser utilizado como uma ferramenta adicional para diagnóstico e monitoramento do câncer de próstata.

6. Planos futuros

Com os resultados da presente tese de doutorado, nós traçamos um novo projeto para o desenvolvimento de plataformas baseadas em aptâmeros com o objetivo de estudar novos biomarcadores específicos para o câncer liberados como: hexoquinase tipo 2 (hK2), antígeno prostático específico de membrana (PSMA), receptor de andrógeno (AR) e a enzima fosfatase ácida prostática (PAP). Em adição, temos também a colaboração com a equipe do Dr. Alexander Revzin (Mayo Clinic, Rochester, MN) para testes utilizando os biomarcadores em amostras clínicas, possibilitando assim o uso de nossos biossensores para o diagnóstico e monitoramento do câncer de próstata.

7. Referências Bibliográficas

1. World Health Organization (WHO). Global Health Observatory Data Repository. Geneva: World health Organization, 2008. Disponível em: http://apps.who.int/ghodata/.
2. Guerra, M. R., Gallo, C. D. M., Mendonça, G. A. S., & Silva, G. A. (2005). Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Rev bras cancerol*, *51*(3), 227-34.
3. Waters, W. F. (2001). Globalization, socioeconomic restructuring, and community health. *Journal of Community Health*, *26*(2), 79-92.
4. Ukraintseva, S. V., & Yashina, A. I. (2004). Cancer as "rejuvenescence". *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1019*(1), 200-205.
5. Sobin, L. H., & Compton, C. C. (2010). TNM seventh edition: What's new, what's changed. *Cancer*, *116*(22), 5336-5339.
6. Chuaqui, R. F., Herold, K. E., & Rasooly, A. (2012). Cancer and the Use of Biosensors for Cancer Clinical Testing. In *Biosensors and Molecular Technologies for Cancer Diagnostics* (pp. 3-40). Taylor & Francis.
7. de Lima, R. B., & Hahn, G. V. (2016). CÂNCER DE PRÓSTATA E SUA RELAÇÃO COM A SEXUALIDADE MASCULINA: PRODUÇÃO CIENTÍFICA BRASILEIRA. *Revista Destaques Acadêmicos*, *8*(3).
8. Stangelberger, A., Waldert, M., & Djavan, B. (2008). Prostate cancer in elderly men. *Rev Urol*, *10*(2), 111-119.
9. Brandt, A., Bermejo, J. L., Sundquist, J., & Hemminki, K. (2010). Age-specific risk of incident prostate cancer and risk of death from prostate cancer defined by the number of affected family members. *European urology*, *58*(2), 275-280.
10. Grönberg, H. (2003). Prostate cancer epidemiology. *The Lancet*, *361*(9360), 859-864.
11. Brawley, O. W. (1998, November). Prostate cancer and black men. In *Seminars in urologic oncology* (Vol. 16, No. 4, pp. 184-186).

12. Gaston, K. E., Kim, D., Singh, S., Ford, O. H., & Mohler, J. L. (2003). Racial differences in androgen receptor protein expression in men with clinically localized prostate cancer. *The Journal of urology*, *170*(3), 990-993.

13. Nomura, A. M. (2016). Body size and prostate cancer. *Epidemiologic reviews*, *23*(1), 126-31.

14. Catalona, W. J., Richie, J. P., Ahmann, F. R., M'liss, A. H., Scardino, P. T., Flanigan, R. C., ... & Waters, W. B. (2016). Comparison of Digital Rectal Examination and Serum Prostate Specific Antigen in the Early Detection of Prostate Cancer: Results of a Multicenter Clinical: Trial of 6,630 Men. *The Journal of urology*.

15. Khezrian, S., Salimi, A., Teymourian, H., & Hallaj, R. (2013). Label-free electrochemical IgE aptasensor based on covalent attachment of aptamer onto multiwalled carbon nanotubes/ionic liquid/chitosan nanocomposite modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, *43*, 218-225.

16. Shahdost-fard, F., Salimi, A., & Khezrian, S. (2014). Highly selective and sensitive adenosine aptasensor based on platinum nanoparticles as catalytical label for amplified detection of biorecognition events through H 2 O 2 reduction. *Biosensors and Bioelectronics*, *53*, 355-362.

17. Rasooly, A., & Jacobson, J. (2006). Development of biosensors for cancer clinical testing. *Biosensors and Bioelectronics*, *21*(10), 1851-1858.

18. Bohunicky, B., & Mousa, S. A. (2011). Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. *Nanotechnology, science and applications*, *4*(1), 1-10.

19. Lilja, H., Christensson, A., Dahlén, U., Matikainen, M. T., Nilsson, O., Pettersson, K., & Lövgren, T. (1991). Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha 1-antichymotrypsin. *Clinical chemistry*, *37*(9), 1618-1625.

20. Zhu, L., Leinonen, J., Zhang, W. M., Finne, P., & Stenman, U. H. (2003). Dual-label immunoassay for simultaneous measurement of prostate-specific antigen (PSA)-α1-antichymotrypsin complex together with free or total PSA. *Clinical chemistry*, *49*(1), 97-103.

21. Clark, L. C., & Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of sciences*, *102*(1), 29-45.

22. Guilbault, G. G. (1982). Analytical uses of immobilized enzymes. In *Enzyme engineering* (pp. 395-404). Springer US.

23. Chambers, J. P., Arulanandam, B. P., Matta, L. L., Weis, A., & Valdes, J. J. (2008). *Biosensor recognition elements*. TEXAS UNIV AT SAN ANTONIO DEPT OF BIOLOGY.

24. Pohanka, M., & Skládal, P. (2008). Electrochemical biosensors–principles and applications. *J. Appl. Biomed*, *6*(2), 57-64.

25. Lee, K., Povlich, L. K., & Kim, J. (2010). Recent advances in fluorescent and colorimetric conjugated polymer-based biosensors. *Analyst*, *135*(9), 2179-2189.

26. Ko, W., Yim, C., Jung, N., Joo, J., Jeon, S., Seo, H., ... & Park, J. C. (2011). A visible light-induced photocatalytic silver enhancement reaction for gravimetric biosensors. *Nanotechnology*, *22*(40), 405502.

27. Walton, P. W., O'Flaherty, M. R., Butler, M. E., & Compton, P. (1993). Gravimetric biosensors based on acoustic waves in thin polymer films. *Biosensors and Bioelectronics*, *8*(9-10), 401-407.

28. Nam, D. H., Lee, J. O., Sang, B. I., Won, K., & Kim, Y. H. (2013). Silaffin peptides as a novel signal enhancer for gravimetric biosensors. *Applied biochemistry and biotechnology*, *170*(1), 25-31.

29. Rasooly, A., & Jacobson, J. (2006). Development of biosensors for cancer clinical testing. *Biosensors and Bioelectronics*, *21*(10), 1851-1858.

30. Arora, P., Sindhu, A., Dilbaghi, N., & Chaudhury, A. (2011). Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens. *Biosensors and Bioelectronics*, *28*(1), 1-12.

31. Ercole, C., Del Gallo, M., Mosiello, L., Baccella, S., & Lepidi, A. (2003). Escherichia coli detection in vegetable food by a potentiometric biosensor. *Sensors and actuators B: Chemical*, *91*(1), 163-168.

32. Yan, C., Dong, F., Chun-yuan, B., Si-rong, Z., & Jian-guo, S. (2014). Recent progress of commercially available biosensors in china and their applications in fermentation processes. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*, *21*(4), 73-85.

33. Lee, M., Zine, N., Baraket, A., Zabala, M., Campabadal, F., Caruso, R., ... & Errachid, A. (2012). A novel biosensor based on hafnium oxide: Application for early stage detection of human interleukin-10. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *175*, 201-207.

34. Chen, Y. W., Liu, M., Kaneko, T., & McIntyre, P. C. (2010). Atomic layer deposited hafnium oxide gate dielectrics for charge-based biosensors. *Electrochemical and Solid-State Letters*, *13*(3), G29-G32.

35. Nicholson, R. L., Welch, M., Ladlow, M., & Spring, D. R. (2007). Small-molecule screening: advances in microarraying and cell-imaging technologies. *ACS chemical biology*, *2*(1), 24-30.

36. Willmann, J. K., Van Bruggen, N., Dinkelborg, L. M., & Gambhir, S. S. (2008). Molecular imaging in drug development. *Nature reviews Drug discovery*, *7*(7), 591-607.

37. Mehrotra, P. (2016). Biosensors and their applications–A review. *Journal of oral biology and craniofacial research*, *6*(2), 153-159.

38. Liu, Q., Wu, C., Cai, H., Hu, N., Zhou, J., & Wang, P. (2014). Cell-based biosensors and their application in biomedicine. *Chemical reviews*, *114*(12), 6423-6461.

39. Ahmed, M. U., Hossain, M. M., Safavieh, M., Wong, Y. L., Rahman, I. A., Zourob, M., & Tamiya, E. (2016). Toward the development of smart and low cost point-of-care biosensors based on screen printed electrodes. *Critical reviews in biotechnology*, *36*(3), 495-505.

40. Ding, L., Du, D., Zhang, X., & Ju, H. (2008). Trends in cell-based electrochemical biosensors. *Current medicinal chemistry*, *15*(30), 3160-3170.

41. Tront, J. M., Fortner, J. D., Plötze, M., Hughes, J. B., & Puzrin, A. M. (2008). Microbial fuel cell biosensor for in situ assessment of microbial activity. *Biosensors and Bioelectronics*, *24*(4), 586-590.

42. Naal, R. M. Z., Tabb, J., Holowka, D., & Baird, B. (2004). In situ measurement of degranulation as a biosensor based on RBL-2H3 mast cells. *Biosensors and bioelectronics*, *20*(4), 791-796.

43. Kramer, N., Walzl, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengstschläger, M., & Dolznig, H. (2013). In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *752*(1), 10-24.

44. Lyons, A. B., Blake, S. J., & Doherty, K. V. (2013). Flow cytometric analysis of cell division by dilution of CFSE and related dyes. *Current protocols in cytometry*, 9-11.

45. Jeddi, I., & Revzin, A. (2012). Sensing cell-secreted molecules. *Bioanalytical Reviews*, *4*(2-4), 87-95.

46. Wang, D., & Bodovitz, S. (2010). Single cell analysis: the new frontier in 'omics'. *Trends in biotechnology*, *28*(6), 281-290.

47. Chao, T. C., & Ros, A. (2008). Microfluidic single-cell analysis of intracellular compounds. *Journal of The Royal Society Interface*, *5*(Suppl 2), S139-S150.

48. Sundberg, S. A. (2000). High-throughput and ultra-high-throughput screening: solution-and cell-based approaches. *Current opinion in biotechnology*, *11*(1), 47-53.

49. Konry, T., Dominguez-Villar, M., Baecher-Allan, C., Hafler, D. A., & Yarmush, M. L. (2011). Droplet-based microfluidic platforms for single T cell secretion analysis of IL-10 cytokine. *Biosensors and Bioelectronics*, *26*(5), 2707-2710.

50. Justino, C. I., Rocha-Santos, T. A., & Duarte, A. C. (2010). Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *29*(10), 1172-1183.

51. Dittrich, P. S., & Manz, A. (2006). Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, *5*(3), 210-218.

52. Singh, R., Mukherjee, M. D., Sumana, G., Gupta, R. K., Sood, S., & Malhotra, B. D. (2014). Biosensors for pathogen detection: A smart approach towards clinical diagnosis. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *197*, 385-404.

53. Sin, M. L., Mach, K. E., Wong, P. K., & Liao, J. C. (2014). Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases. *Expert review of molecular diagnostics*, *14*(2), 225-244.

54. Janegitz, B. C., Cancino, J., & Zucolotto, V. (2014). Disposable biosensors for clinical diagnosis. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, *14*(1), 378-389.

55. Wang, Y., Chen, Q., & Zeng, X. (2010). Potentiometric biosensor for studying hydroquinone cytotoxicity in vitro. *Biosensors and Bioelectronics*, *25*(6), 1356-1362.

56. El-Ali, J., Sorger, P. K., & Jensen, K. F. (2006). Cells on chips. *Nature*, *442*(7101), 403-411.

57. Spegel, C., Heiskanen, A., Skjolding, L. H. D., & Emnéus, J. (2008). Chip based electroanalytical systems for cell analysis. *Electroanalysis*, *20*(6), 680-702.

58. Neužil, P., Campos, C. D. M., Wong, C. C., Soon, J. B. W., Reboud, J., & Manz, A. (2014). From chip-in-a-lab to lab-on-a-chip: towards a single handheld electronic system for multiple application-specific lab-on-a-chip (ASLOC). *Lab on a Chip*, *14*(13), 2168-2176.

59. van Reenen, A., de Jong, A. M., den Toonder, J. M., & Prins, M. W. (2014). Integrated lab-on-chip biosensing systems based on magnetic particle actuation–a comprehensive review. *Lab on a Chip*, *14*(12), 1966-1986.

60. Gulliksen, A., Solli, L. A., Drese, K. S., Sörensen, O., Karlsen, F., Rogne, H., ... & Sirevåg, R. (2005). Parallel nanoliter detection of cancer markers using polymer microchips. *Lab on a Chip*, *5*(4), 416-420.

61. Kurita, R., Hayashi, K., Horiuchi, T., Niwa, O., Maeyama, K., & Tanizawa, K. (2002). Differential measurement with a microfluidic device for the highly selective continuous measurement of histamine released from rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3). *Lab on a Chip*, *2*(1), 34-38.

62. Furdui, V. I., & Harrison, D. J. (2004). Immunomagnetic T cell capture from blood for PCR analysis using microfluidic systems. *Lab on a Chip*, *4*(6), 614-618.

63. Hashimoto, K., & Ishimori, Y. (2001). Preliminary evaluation of electrochemical PNA array for detection of single base mismatch mutations. *Lab on a Chip*, *1*(1), 61-63.

64. Chao, T. C., & Ros, A. (2008). Microfluidic single-cell analysis of intracellular compounds. *Journal of The Royal Society Interface*, *5*(Suppl 2), S139-S150.

65. Folch, A., & Toner, M. (2000). Microengineering of cellular interactions. *Annual review of biomedical engineering*, *2*(1), 227-256.

66. Zhou, Q., Liu, Y., Shin, D. S., Silangcruz, J., Tuleuova, N., & Revzin, A. (2012). Aptamer-containing surfaces for selective capture of CD4 expressing cells. *Langmuir*, *28*(34), 12544-12549.

67. Nagel, T., Ehrentreich-Förster, E., Singh, M., Schmitt, K., Brandenburg, A., Berka, A., & Bier, F. F. (2008). Direct detection of tuberculosis infection in blood serum using three optical label-free approaches. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *129*(2), 934-940.

68. Park, T. H., & Shuler, M. L. (2003). Integration of cell culture and microfabrication technology. *Biotechnology progress*, *19*(2), 243-253.

69. Woods, L. A., Powell, P. R., Paxon, T. L., & Ewing, A. G. (2005). Analysis of mammalian cell cytoplasm with electrophoresis in nanometer inner diameter capillaries. *Electroanalysis*, *17*(13), 1192-1197.

70. Revzin, A., Tompkins, R. G., & Toner, M. (2003). Surface engineering with poly (ethylene glycol) photolithography to create high-density cell arrays on glass. *Langmuir*, *19*(23), 9855-9862.

71. Revzin, A. F., Sirkar, K., Simonian, A., & Pishko, M. V. (2002). Glucose, lactate, and pyruvate biosensor arrays based on redox polymer/oxidoreductase nanocomposite thin-films deposited on photolithographically patterned gold microelectrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *81*(2), 359-368.

72. Matharu, Z., Enomoto, J., & Revzin, A. (2012). Miniature enzyme-based electrodes for detection of hydrogen peroxide release from alcohol-injured hepatocytes. *Analytical chemistry*, *85*(2), 932-939.

73. Sirkar, K., Revzin, A., & Pishko, M. V. (2000). Glucose and lactate biosensors based on redox polymer/oxidoreductase nanocomposite thin films. *Analytical chemistry*, *72*(13), 2930-2936.

74. Liu, Y., Matharu, Z., Howland, M. C., Revzin, A., & Simonian, A. L. (2012). Affinity and enzyme-based biosensors: recent advances and emerging applications in cell analysis and point-of-care testing. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *404*(4), 1181-1196.

75. Stokes, D. L., Griffin, G. D., & Vo-Dinh, T. (2001). Detection of E. coli using a microfluidics-based antibody biochip detection system. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, *369*(3), 295-301.

76. Wang, P. C., Gao, J., & Lee, C. S. (2002). High-resolution chiral separation using microfluidics-based membrane chromatography. *Journal of chromatography A*, *942*(1), 115-122.

77. Crulhas, B. P., Ramos, N. P., Castro, G. R., & Pedrosa, V. A. (2016). Detection of hydrogen peroxide releasing from prostate cancer cell using a biosensor. *Journal of Solid State Electrochemistry*, *20*(9), 2427-2433.

78. Whitesides, G. M., Ostuni, E., Takayama, S., Jiang, X., & Ingber, D. E. (2001). Soft lithography in biology and biochemistry. *Annual review of biomedical engineering*, *3*(1), 335-373.

79. Chung, B. G., Flanagan, L. A., Rhee, S. W., Schwartz, P. H., Lee, A. P., Monuki, E. S., & Jeon, N. L. (2005). Human neural stem cell growth and differentiation in a gradient-generating microfluidic device. *Lab on a Chip*, *5*(4), 401-406.

80. Irimia, D., Geba, D. A., & Toner, M. (2006). Universal microfluidic gradient generator. *Analytical chemistry*, *78*(10), 3472-3477.

81. Pepe, M. S., Etzioni, R., Feng, Z., Potter, J. D., Thompson, M. L., Thornquist, M., ... & Yasui, Y. (2001). Phases of biomarker development for early detection of cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *93*(14), 1054-1061.

82. Allegra, A., Alonci, A., Campo, S., Penna, G., Petrungaro, A., Gerace, D., & Musolino, C. (2012). Circulating microRNAs: new biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (review). *International journal of oncology*, *41*(6), 1897-1912.

83. Hernández, J., & Thompson, I. M. (2004). Prostate-specific antigen: a review of the validation of the most commonly used cancer biomarker. *Cancer*, *101*(5), 894-904.

84. Ballard-Barbash, R., Friedenreich, C. M., Courneya, K. S., Siddiqi, S. M., McTiernan, A., & Alfano, C. M. (2012). Physical activity, biomarkers, and disease outcomes in cancer survivors: a systematic review. *Journal of the National Cancer Institute*, *104*(11), 815-840.

85. Finn, O. J. (2005). Immune response as a biomarker for cancer detection and a lot more.

86. Vaupel, P. (2004, July). Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. In *Seminars in radiation oncology* (Vol. 14, No. 3, pp. 198-206). WB Saunders.

87. Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M., & Jain, R. K. (1997). Interstitial pH and pO2 gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nature medicine*, *3*(2), 177-182.

88. Höckel, M., & Vaupel, P. (2001). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute*, *93*(4), 266-276.

89. Lundwall, Å., & Lilja, H. (1987). Molecular cloning of human prostate specific antigen cDNA. *FEBS letters*, *214*(2), 317-322.

90. Kauri, L. M., Jung, S. K., & Kennedy, R. T. (2003). Direct measurement of glucose gradients and mass transport within islets of Langerhans. *Biochemical and biophysical research communications*, *304*(2), 371-377.

91. Cai, X., Klauke, N., Glidle, A., Cobbold, P., Smith, G. L., & Cooper, J. M. (2002). Ultra-low-volume, real-time measurements of lactate from the single heart cell using microsystems technology. *Analytical chemistry*, *74*(4), 908-914.

92. Yan, J., & Revzin, A. (2012). Micropatterned Biosensing Surfaces for Detection of Cell-Secreted Inflammatory Signals. *Biosensors and Molecular Technologies for Cancer Diagnostics*, 389-404.

93. Che, M., Wang, R., Li, X., Wang, H. Y., & Zheng, X. S. (2016). Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. *Drug discovery today*, *21*(1), 143-149.

94. Lilja, H., Christensson, A., Dahlén, U., Matikainen, M. T., Nilsson, O., Pettersson, K., & Lövgren, T. (1991). Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha 1-antichymotrypsin. *Clinical chemistry*, *37*(9), 1618-1625.

95. Zhu, L., Leinonen, J., Zhang, W. M., Finne, P., & Stenman, U. H. (2003). Dual-label immunoassay for simultaneous measurement of prostate-specific antigen

(PSA)-α1-antichymotrypsin complex together with free or total PSA. *Clinical chemistry*, *49*(1), 97-103.

96. Catalona, W. J., Richie, J. P., Ahmann, F. R., M'liss, A. H., Scardino, P. T., Flanigan, R. C., ... & Waters, W. B. (2016). Comparison of Digital Rectal Examination and Serum Prostate Specific Antigen in the Early Detection of Prostate Cancer: Results of a Multicenter Clinical: Trial of 6,630 Men. *The Journal of urology*.

97. O'connor, J. C., Julian, J., Lim, S. D., & Carson, D. D. (2005). MUC1 expression in human prostate cancer cell lines and primary tumors. *Prostate cancer and prostatic diseases*, *8*(1), 36.

98. Gendler, S. J. (2001). MUC1, the renaissance molecule. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, *6*(3), 339-353.

99. Gendler, S. J., & Spicer, A. P. (1995). Epithelial mucin genes. *Annual review of physiology*, *57*(1), 607-634.

100. Lagow, E., DeSouza, M. M., & Carson, D. D. (1999). Mammalian reproductive tract mucins. *Human Reproduction Update*, *5*(4), 280-292.

101. Taylor-Papadimitriou, J., Burchell, J., Miles, D. W., & Dalziel, M. (1999). MUC1 and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, *1455*(2), 301-313.

102. Zhang, S., Zhang, H. S., Reuter, V. E., Slovin, S. F., Scher, H. I., & Livingston, P. O. (1998). Expression of potential target antigens for immunotherapy on primary and metastatic prostate cancers. *Clinical Cancer Research*, *4*(2), 295-302.

103. Hu, R., Wen, W., Wang, Q., Xiong, H., Zhang, X., Gu, H., & Wang, S. (2014). Novel electrochemical aptamer biosensor based on an enzyme–gold nanoparticle dual label for the ultrasensitive detection of epithelial tumour marker MUC1. *Biosensors and Bioelectronics*, *53*, 384-389.

104. Cheng, A. K., Su, H., Wang, Y. A., & Yu, H. Z. (2009). Aptamer-based detection of epithelial tumor marker mucin 1 with quantum dot-based fluorescence readout. *Analytical chemistry*, *81*(15), 6130-6139.

105. He, Y., Lin, Y., Tang, H., & Pang, D. (2012). A graphene oxide-based fluorescent aptasensor for the turn-on detection of epithelial tumor marker mucin 1. *Nanoscale*, *4*(6), 2054-2059.

106. Lin, C. W., Wei, K. C., Liao, S. S., Huang, C. Y., Sun, C. L., Wu, P. J., ... & Ma, C. C. M. (2015). A reusable magnetic graphene oxide-modified biosensor for vascular endothelial growth factor detection in cancer diagnosis. *Biosensors and Bioelectronics*, *67*, 431-437.

107. Kwon, O. S., Park, S. J., & Jang, J. (2010). A high-performance VEGF aptamer functionalized polypyrrole nanotube biosensor. *Biomaterials*, *31*(17), 4740-4747.

108. Lang, S. B. (2008). Guide to the Literature of Piezoelectricity and Pyroelectricity. 29. *Ferroelectrics*, *366*(1), 122-237.

109. Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature medicine*, *1*(1), 27-30.

110. Di Francia, M., Barbier, D., Mege, J. L., & Orehek, J. (1994). Tumor necrosis factor-alpha levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *150*(5), 1453-1455.

111. Chuaqui, R. F., Herold, K. E., & Rasooly, A. (2012). Cancer and the Use of Biosensors for Cancer Clinical Testing. In *Biosensors and Molecular Technologies for Cancer Diagnostics* (pp. 3-40). Taylor & Francis.

112. Wu, G., Datar, R. H., Hansen, K. M., Thundat, T., Cote, R. J., & Majumdar, A. (2001). Bioassay of prostate-specific antigen (PSA) using microcantilevers. *Nature biotechnology*, *19*(9), 856-860.

113. Cheng, M. M. C., Cuda, G., Bunimovich, Y. L., Gaspari, M., Heath, J. R., Hill, H. D., ... & Ferrari, M. (2006). Nanotechnologies for biomolecular detection and medical diagnostics. *Current opinion in chemical biology*, *10*(1), 11-19.

114. Homola, J. (2006). Electromagnetic theory of surface plasmons. In *Surface plasmon resonance based sensors* (pp. 3-44). Springer Berlin Heidelberg.

115. Ludwig, J. A., & Weinstein, J. N. (2005). Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nature Reviews Cancer*, *5*(11), 845-856.

116. Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, *16*(1), 121-131.

117. Ladd, J., Zhang, Z., Chen, S., Hower, J. C., & Jiang, S. (2008). Zwitterionic polymers exhibiting high resistance to nonspecific protein adsorption from human serum and plasma. *Biomacromolecules*, *9*(5), 1357-1361.

118. Lausted, C., Hu, Z., & Hood, L. (2008). Quantitative serum proteomics from surface plasmon resonance imaging. *Molecular & Cellular Proteomics*, *7*(12), 2464-2474.

119. Hu, M., & Zhang, K. (2013). The application of aptamers in cancer research: an up-to-date review. *Future Oncology*, *9*(3), 369-376.

120. Paulovich, A. G., Whiteaker, J. R., Hoofnagle, A. N., & Wang, P. (2008). The interface between biomarker discovery and clinical validation: the tar pit of the protein biomarker pipeline. *Proteomics-Clinical Applications*, *2*(10-11), 1386-1402.

121. Cho, E. J., Lee, J. W., & Ellington, A. D. (2009). Applications of aptamers as sensors. *Annual Review of Analytical Chemistry*, *2*, 241-264.

122. Cui, Y., Kim, S. N., Naik, R. R., & McAlpine, M. C. (2012). Biomimetic peptide nanosensors. *Accounts of chemical research*, *45*(5), 696-704.

123. Mairal, T., Özalp, V. C., Sánchez, P. L., Mir, M., Katakis, I., & O'Sullivan, C. K. (2008). Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *390*(4), 989-1007.

124. Tan, D. S. (2005). Diversity-oriented synthesis: exploring the intersections between chemistry and biology. *Nature chemical biology*, *1*(2), 74-84.

125. Yu, H., Dong, X. Y., & Sun, Y. (2004). An alternating elution strategy for screening high affinity peptides from a phage display peptide library. *Biochemical engineering journal*, *18*(3), 169-175.

126. Abrantes, M., Magone, M. T., Boyd, L. F., & Schuck, P. (2001). Adaptation of a surface plasmon resonance biosensor with microfluidics for use with small sample volumes and long contact times. *Analytical chemistry*, *73*(13), 2828-2835.

127. Kurita, R., Hayashi, K., Horiuchi, T., Niwa, O., Maeyama, K., & Tanizawa, K. (2002). Differential measurement with a microfluidic device for the highly selective

continuous measurement of histamine released from rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3). *Lab on a Chip*, *2*(1), 34-38.

128. D'Mello, F., & Howard, C. R. (2001). An improved selection procedure for the screening of phage display peptide libraries. *Journal of immunological methods*, *247*(1), 191-203.

129. Wang, P. C., Gao, J., & Lee, C. S. (2002). High-resolution chiral separation using microfluidics-based membrane chromatography. *Journal of chromatography A*, *942*(1), 115-122.

130. Hashimoto, K., & Ishimori, Y. (2001). Preliminary evaluation of electrochemical PNA array for detection of single base mismatch mutations. *Lab on a Chip*, *1*(1), 61-63.

131. Lawrence, C., Vallée-Bélisle, A., Pfeil, S. H., Mornay, D., Lipman, E. A., & Plaxco, K. W. (2014). A comparison of the folding kinetics of a small, artificially selected DNA aptamer with those of equivalently simple naturally occurring proteins. *Protein Science*, *23*(1), 56-66.

132. Ferguson, B. S., Hoggarth, D. A., Maliniak, D., Ploense, K., White, R. J., Woodward, N., ... & Plaxco, K. W. (2013). Real-time, aptamer-based tracking of circulating therapeutic agents in living animals. *Science translational medicine*, *5*(213), 213ra165-213ra165.

133. Porchetta, A., Vallée-Bélisle, A., Plaxco, K. W., & Ricci, F. (2012). Using distal-site mutations and allosteric inhibition to tune, extend, and narrow the useful dynamic range of aptamer-based sensors. *Journal of the American Chemical Society*, *134*(51), 20601-20604.

134. Xiao, Y., Lubin, A. A., Heeger, A. J., & Plaxco, K. W. (2005). Label-free electronic detection of thrombin in blood serum by using an aptamer-based sensor. *Angewandte Chemie*, *117*(34), 5592-5595.

135. Liu, Y., Tuleouva, N., Ramanculov, E., & Revzin, A. (2010). Aptamer-based electrochemical biosensor for interferon gamma detection. *Analytical chemistry*, *82*(19), 8131-8136.

136. Liu, Y., Matharu, Z., Rahimian, A., & Revzin, A. (2015). Detecting multiple cell-secreted cytokines from the same aptamer-functionalized electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, *64*, 43-50.

137. Crulhas, B. R., Ramos, N. P., Basso, C. R., Costa, V. E., Castro, G. R., & Pedrosa, V. A. (2014). Fabrication and Characterization of Ferrocenece Containing Hydrogel for Glucose Biosensor Application. *Int. J. Electrochem. Sci*, *9*, 7596-7604.

138. Pingarrón, J. M., Yáñez-Sedeño, P., & González-Cortés, A. (2008). Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochimica Acta*, *53*(19), 5848-5866.

139. Yanez-Sedeno, P., & Pingarron, J. M. (2005). Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *382*(4), 884-886.

140. Basso, C. R., Tozato, C. C., Junior, J. P. A., & Pedrosa, V. A. (2015). A fast and highly sensitive method for the detection of canine distemper virus by the naked eye. *Analytical Methods*, *7*(6), 2264-2267.

141. Pedrosa, V. A., Yan, J., Simonian, A. L., & Revzin, A. (2011). Micropatterned nanocomposite hydrogels for biosensing applications. *Electroanalysis*, *23*(5), 1142-1149.

142. Yan, J., Pedrosa, V. A., Simonian, A. L., & Revzin, A. (2010). Immobilizing enzymes onto electrode arrays by hydrogel photolithography to fabricate multi-analyte electrochemical biosensors. *ACS applied materials & interfaces*, *2*(3), 748-755.

143. Revzin, A., Russell, R. J., Yadavalli, V. K., Koh, W. G., Deister, C., Hile, D. D., ... & Pishko, M. V. (2001). Fabrication of poly (ethylene glycol) hydrogel microstructures using photolithography. *Langmuir*, *17*(18), 5440-5447.

144. Koh, W. G., & Pishko, M. (2005). Immobilization of multi-enzyme microreactors inside microfluidic devices. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *106*(1), 335-342.

145. Revzin, A., Russell, R. J., Yadavalli, V. K., Koh, W. G., Deister, C., Hile, D. D., ... & Pishko, M. V. (2001). Fabrication of poly (ethylene glycol) hydrogel microstructures using photolithography. *Langmuir*, *17*(18), 5440-5447.

146. Koh, W. G., & Pishko, M. (2005). Immobilization of multi-enzyme microreactors inside microfluidic devices. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *106*(1), 335-342.

147. Drumheller, P. D., & Hubbell, J. A. (1995). Densely crosslinked polymer networks of poly (ethylene glycol) in trimethylolpropane triacrylate for cell-adhesion-resistant surfaces. *Journal of biomedical materials research*, *29*(2), 207-215.

148. Quinn, C. P., Pathak, C. P., Heller, A., & Hubbell, J. A. (1995). Photo-crosslinked copolymers of 2-hydroxyethyl methacrylate, poly (ethylene glycol) tetra-acrylate and ethylene dimethacrylate for improving biocompatibility of biosensors. *Biomaterials*, *16*(5), 389-396.

Kandimalla, V. B., Tripathi, V. S., & Ju, H. (2006). A conductive ormosil encapsulated with ferrocene conjugate and multiwall carbon nanotubes for biosensing application. *Biomaterials*, *27*(7), 1167-1174.

149. Cui, X., Li, C. M., Zang, J., & Yu, S. (2007). Highly sensitive lactate biosensor by engineering chitosan/PVI-Os/CNT/LOD network nanocomposite. *Biosensors and Bioelectronics*, *22*(12), 3288-3292.

150. Suman, S., Singhal, R., Sharma, A. L., Malthotra, B. D., & Pundir, C. S. (2005). Development of a lactate biosensor based on conducting copolymer bound lactate oxidase. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *107*(2), 768-772.

151. Rahman, M. M., Shiddiky, M. J., Rahman, M. A., & Shim, Y. B. (2009). A lactate biosensor based on lactate dehydrogenase/nictotinamide adenine dinucleotide (oxidized form) immobilized on a conducting polymer/multiwall carbon nanotube composite film. *Analytical biochemistry*, *384*(1), 159-165.

152. Hernández-Ibáñez, N., García-Cruz, L., Montiel, V., Foster, C. W., Banks, C. E., & Iniesta, J. (2016). Electrochemical lactate biosensor based upon chitosan/carbon nanotubes modified screen-printed graphite electrodes for the determination of lactate in embryonic cell cultures. *Biosensors and bioelectronics*, *77*, 1168-1174.

153. Claver, J. B., Mirón, M. V., & Capitán-Vallvey, L. F. (2009). Disposable electrochemiluminescent biosensor for lactate determination in saliva. *Analyst*, *134*(7), 1423-1432.

154. Huang, J., Li, J., Yang, Y., Wang, X., Wu, B., Anzai, J. I., ... & Chen, Q. (2008). Development of an amperometric l-lactate biosensor based on l-lactate oxidase immobilized through silica sol–gel film on multi-walled carbon nanotubes/platinum nanoparticle modified glassy carbon electrode. *Materials Science and Engineering: C*, *28*(7), 1070-1075.

155. Fridovich, I. (1983). Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *23*(1), 239-257.

156. Barja, G. (2004). Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production–DNA damage mechanism?. *Biological Reviews*, *79*(2), 235-251.

157. Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, *43*, 205-227.

158. Colton, C., Wilt, S., Gilbert, D., Chernyshev, O., Snell, J., & Dubois-Dalcq, M. (1996). Species differences in the generation of reactive oxygen species by microglia. *Molecular and chemical neuropathology*, *28*(1), 15-20.

159. Benhar, M., Engelberg, D., & Levitzki, A. (2002). ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO reports*, *3*(5), 420-425.

160. Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., & Crowe, S. E. (2014). Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological reviews*, *94*(2), 329-354.

161. Katz, E., & Willner, I. (2003). Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors. *Electroanalysis*, *15*(11), 913-947.

162. Liu, H., Tian, Y., & Xia, P. (2008). Pyramidal, rodlike, spherical gold nanostructures for direct electron transfer of copper, zinc-superoxide dismutase: application to superoxide anion biosensors. *Langmuir*, *24*(12), 6359-6366.

163. Liu, Y., Du, Y., & Li, C. M. (2013). Direct electrochemistry based biosensors and biofuel cells enabled with nanostructured materials. *Electroanalysis*, *25*(4), 815-831.

164. Tian, Y., Mao, L., Okajima, T., & Ohsaka, T. (2002). Superoxide dismutase-based third-generation biosensor for superoxide anion. *Analytical chemistry*, *74*(10), 2428-2434.

165. Zhu, L., Zhang, Y., Xu, P., Wen, W., Li, X., & Xu, J. (2016). PtW/MoS 2 hybrid nanocomposite for electrochemical sensing of H 2 O 2 released from living cells. *Biosensors and Bioelectronics*, *80*, 601-606.

166. Wang, L., Wen, W., Xiong, H., Zhang, X., Gu, H., & Wang, S. (2013). A novel amperometric biosensor for superoxide anion based on superoxide dismutase immobilized on gold nanoparticle-chitosan-ionic liquid biocomposite film. *Analytica chimica acta*, *758*, 66-71.

167. Attar, A., Cubillana-Aguilera, L., Naranjo-Rodríguez, I., de Cisneros, J. L. H. H., Palacios-Santander, J. M., & Amine, A. (2015). Amperometric inhibition biosensors based on horseradish peroxidase and gold sononanoparticles immobilized onto different electrodes for cyanide measurements. *Bioelectrochemistry*, *101*, 84-91.

168. Chinnadayyala, S. R., Kakoti, A., Santhosh, M., & Goswami, P. (2014). A novel amperometric alcohol biosensor developed in a 3rd generation bioelectrode platform using peroxidase coupled ferrocene activated alcohol oxidase as biorecognition system. *Biosensors and Bioelectronics*, *55*, 120-126.

169. Yang, X., Chen, X., Yang, L., & Yang, W. (2008). Direct electrochemistry and electrocatalysis of horseradish peroxidase in α-zirconium phosphate nanosheet film. *Bioelectrochemistry*, *74*(1), 90-95.

170. Lei, C. X., Hu, S. Q., Gao, N., Shen, G. L., & Yu, R. Q. (2004). An amperometric hydrogen peroxide biosensor based on immobilizing horseradish peroxidase to a nano-Au monolayer supported by sol–gel derived carbon ceramic electrode. *Bioelectrochemistry*, *65*(1), 33-39.

171. Zeng, X., Li, X., Liu, X., Liu, Y., Luo, S., Kong, B., ... & Wei, W. (2009). A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized on DNA functionalized carbon nanotubes. *Biosensors and Bioelectronics*, *25*(4), 896-900.

172. Stakenborg, T., Peeters, S., Reekmans, G., Laureyn, W., Jans, H., Borghs, G., & Imberechts, H. (2008). Increasing the stability of DNA-functionalized gold nanoparticles using mercaptoalkanes. *Journal of Nanoparticle Research*, *10*(1), 143.

173. Nicotera, T. M., Schuster, D. P., Bourhim, M., Chadha, K., Klaich, G., & Corral, D. A. (2009). Regulation of PSA secretion and survival signaling by calcium-independent phopholipase A2β in prostate cancer cells. *The Prostate*, *69*(12), 1270-1280.

174. Zhu, Y. S., Cai, L. Q., You, X., Cordero, J. J., Huang, Y., & Imperato-McGinley, J. (2003). Androgen-Induced Prostate-Specific Antigen Gene Expression Is Mediated via Dihydrotestosterone in LNCaP Cells. *Journal of andrology*, *24*(5), 681-687.

175. Schally, A. V., Comaru-Schally, A. M., Plonowski, A., Nagy, A., Halmos, G., & Rekasi, Z. (2000). Peptide analogs in the therapy of prostate cancer. *The prostate*, *45*(2), 158-166.

176. Fujii, Y., Kawakami, S., Okada, Y., Kageyama, Y., & Kihara, K. (2004). Regulation of prostate-specific antigen by activin A in prostate cancer LNCaP cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *286*(6), E927-E931.

177. Gkonos, P. J., Kwok, C. K., Block, N. L., & Roos, B. A. (1994). Identification of the human seminal TRH-like peptide pGlu-Phe-Pro-NH 2 in normal human prostate. *Peptides*, *15*(7), 1281-1283.

178. Lee, C., Sutkowski, D. M., Sensibar, J. A., Zelner, D., Kim, I., Amsel, I., ... & Kozlowski, J. M. (1995). Regulation of proliferation and production of prostate-specific antigen in androgen-sensitive prostatic cancer cells, LNCaP, by dihydrotestosterone. *Endocrinology*, *136*(2), 796-803.

179. Tsui, K. H., Feng, T. H., Chung, L. C., Chao, C. H., Chang, P. L., & Juang, H. H. (2008). Prostate specific antigen gene expression in androgen insensitive prostate carcinoma subculture cell line. *Anticancer research*, *28*(4A), 1969-1976.

180. König, J. E., Senge, T., Allhoff, E. P., & König, W. (2004). Analysis of the inflammatory network in benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *The Prostate*, *58*(2), 121-129.

181. Sandvig, K., & Llorente, A. (2012). Proteomic analysis of microvesicles released by the human prostate cancer cell line PC-3. *Molecular & Cellular Proteomics*, *11*(7), M111-012914.

182. Gupta, A., Zhou, C. Q., & Chellaiah, M. A. (2013). Osteopontin and MMP9: Associations with VEGF expression/secretion and angiogenesis in PC3 prostate cancer cells. *Cancers*, *5*(2), 617-638.

183. Martin, D. B., Gifford, D. R., Wright, M. E., Keller, A., Yi, E., Goodlett, D. R., ... & Nelson, P. S. (2004). Quantitative proteomic analysis of proteins released by neoplastic prostate epithelium. *Cancer research*, *64*(1), 347-355.

184. Lin, C. W., Wei, K. C., Liao, S. S., Huang, C. Y., Sun, C. L., Wu, P. J., ... & Ma, C. C. M. (2015). A reusable magnetic graphene oxide-modified biosensor for vascular endothelial growth factor detection in cancer diagnosis. *Biosensors and Bioelectronics*, *67*, 431-437.

185. Kwon, O. S., Park, S. J., & Jang, J. (2010). A high-performance VEGF aptamer functionalized polypyrrole nanotube biosensor. *Biomaterials*, *31*(17), 4740-4747.

186. Ferrer, F. A., Miller, L. J., Andrawis, R. I., Kurtzman, S. H., Albertsen, P. C., Laudone, V. P., & Kreutzer, D. L. (1997). Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human prostate cancer: in situ and in vitro expression of VEGF by human prostate cancer cells. *The Journal of urology*, *157*(6), 2329-2333.

187. Papadopoulos, I., Sivridis, E., Giatromanolaki, A., & Koukourakis, M. I. (2001). Tumor angiogenesis is associated with MUC1 overexpression and loss of prostate-specific antigen expression in prostate cancer. *Clinical cancer research*, *7*(6), 1533-1538.