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 aptâméricos 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.).

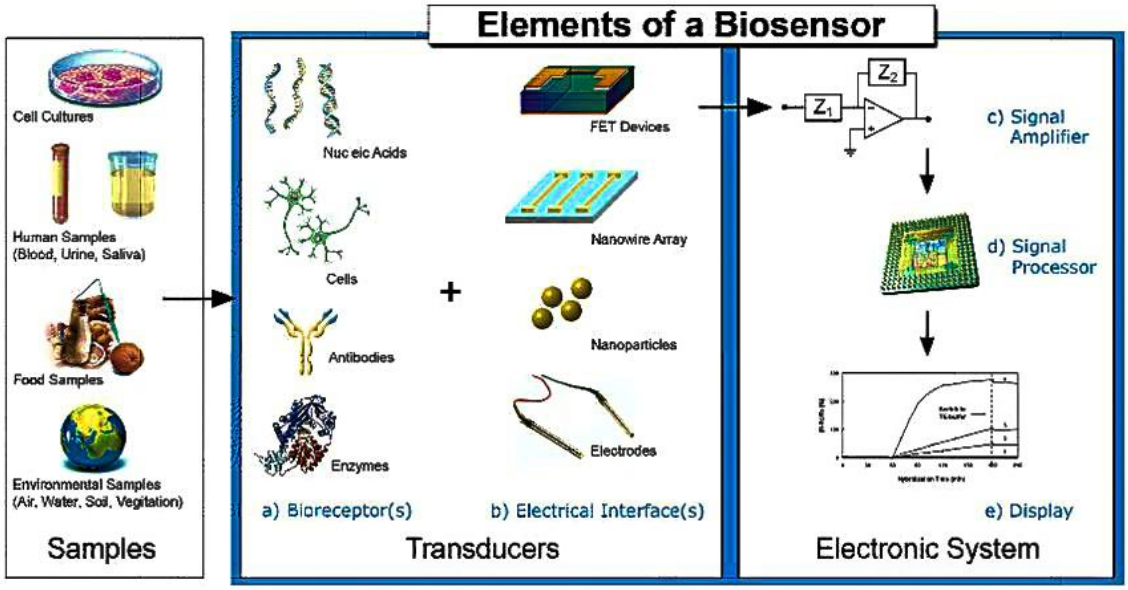


Figura 1. Elementos e componentes típicos de biossensores (Retirado de Kirsch et al. [24]).

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].

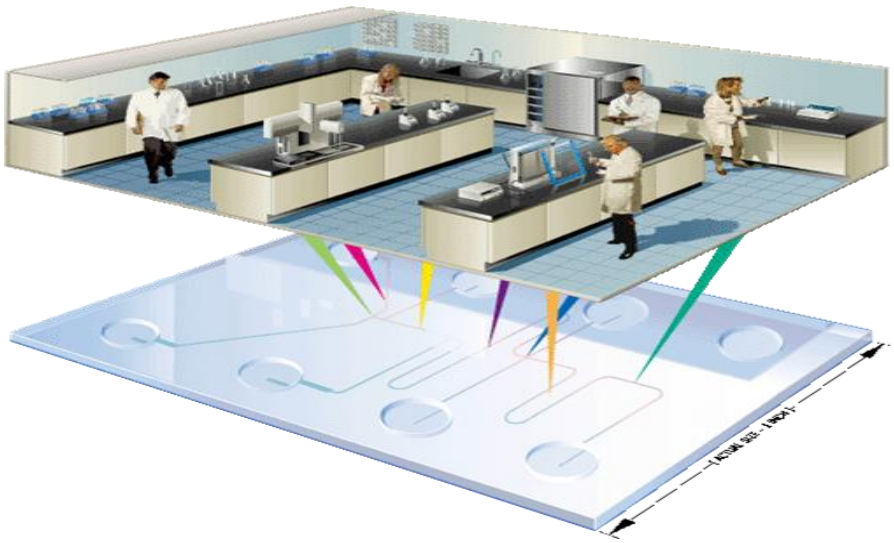


Figura 2. Esquema de biossensores *Lab-on-a-chip* (retirado de http://lab-on-chip.gene-quantification.info/)

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].

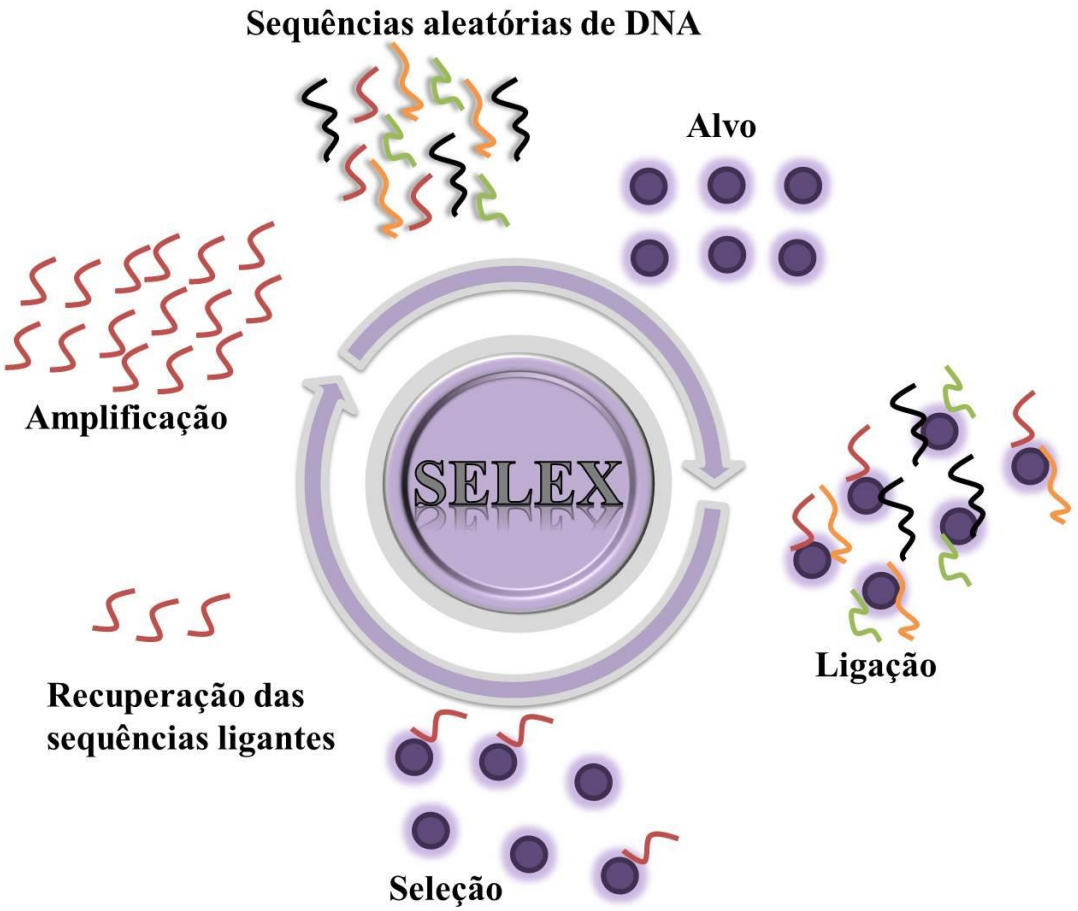


Figura 3. Esquema do processo de Evolução Sistemática dos Ligantes por Enriquecimento Exponencial para o desenvolvimento de novos aptâmeros (autoria própria).

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.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi desenvolver dispositivos eletroquímicos, combinando diferentes áreas do conhecimento para obter uma plataforma multianálitica para o monitoramento de células cancerígenas utilizando o câncer de próstata como modelo.

Objetivos específicos:

a) Otimização de biossensores enzimáticos utilizando matrizes poliméricas conjugadas com as enzimas glicose oxidase, lactato desidrogenase, superóxido dismutase e peroxidase.

b) Avaliar a detecção extracelular de superóxido dismutase e peróxido de hidrogênio liberados por linhagens de células cancerígenas em tempo real, utilizando biossensores.

c) Desenvolvimento de um biossensor multianálitico incorporados com aptâmeros específicos para biomarcadores liberados por células da próstata, dentre eles o antígeno prostático específico (PSA), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e mucina epitelial polimórfica (MUC1).

d) Aplicação do biossensor para diferenciar células benignas de cancerígenas, por meio das proteínas secretadas pelas diferentes linhagens celulares.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Biosensores enzimáticos

3.1.1. Materiais e Reagentes

Os reagentes utilizados foram: Polietilenoglicol diacrilato (PEG-DA, MW 575), 2-hidrox-2methilpropiofenona (fotoiniciador), 99.9% tolueno, glicose oxidase (GOX, EC 1.1.3.4, tipo II-S de *Aspergillus niger* (18 000 Ug^{-1}) , Lactato desidrogenase (LOX, EC 1.1.1.27), peroxidase (HRP, EC 1.11.1.7), superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), Ferroceno (Fc), D-(+)-glicose, N-hidroxissuccinimida (NHS), catequina, colágeno tipo I, ácido lático, 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), Ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA), citrato de sódio 98%, cloreto de ouro (III) tri-hidratado ($HAuCl_4$) 99,99%, e 3-(triclorosilil)propil metacrilato (TPM) (agente silanizador) foram obtidos da Sigma (St Louis, MO). Tampão fosfato (PBS) 10 mM foi utilizado como eletrólito em todos os experimentos eletroquímicos. Água utilizada para o preparo de soluções foi adquirida através de um sistema de purificação Millipore Direct-Q (18 MΩ cm^{-2}).

Soluções de D-(+)-glicose, ácido lático, catequina e peróxido de hidrogênio foram agitadas *overnight* em temperatura ambiente. Soluções estoques foram preparadas utilizando água deionizada e tampão fosfato e foram guardadas a 4 ºC no escuro.

3.1.2. Instrumentação

Para as medidas eletroquímicas foram utilizados o Potenciostato μAutoLabIII (Metrohm, NL) com o módulo FRA32M acoplado a um laptop com o software NOVA 1.10 (Metrohm, NL).

As análises de microscopia óptica foram realizadas utilizando o microscópio invertido Axio Observer (ZEISS, EUA) , a microscopiade transmissão eletrônica foi realizada através do microscópio eletrônico Tecnai Spirit (Fei Company, EUA) no centro de microscopia eletrônica do Instituto de Biociências (UNESP-Botucatu).

As análises dos dados e gráficos foram realizados no software Origin 8.0 (Oringlab Corporation, EUA).

3.1.3. Eletrodos

Para o estudo do monitoramento eletroquímico de subprodutos do metabolismo celular foi utilizado um sistema de eletrodo de ouro, composto por:

- Eletrodo de trabalho: lâminas de vidro interdigitadas com camada de Cr e Au.
- Eletrodo de referência: Ag/AgCl em KCl 3 mol/L (modelo ET073-3, eDAQ, EUA) .
- Eletrodo auxiliar: fio de platina (modelo ET078-1, eDAQ, EUA).

O layout dos eletrodos de trabalho foi projetado em AutoCAD e convertido em transparências plásticas pela DGM design (Curitiba, PR). O modelo dos eletrodos de ouro está representado na figura 4A.

A fabricação dos eletrodos for realizada no Laboratório Brasileiro de Nanotecnologia (LNNano/CNPEM, Campinas/SP), pelo método de *sputtering*, onde as lâminas de vidro (75 mm × 25 mm) foram cobertas com uma camada de 15 nm de Cr e100

nm de Au resultando um conjunto oito microeletrodos de trabalho, com cada eletrodo possuindo 300 μm de diâmetro (Figura 4A).

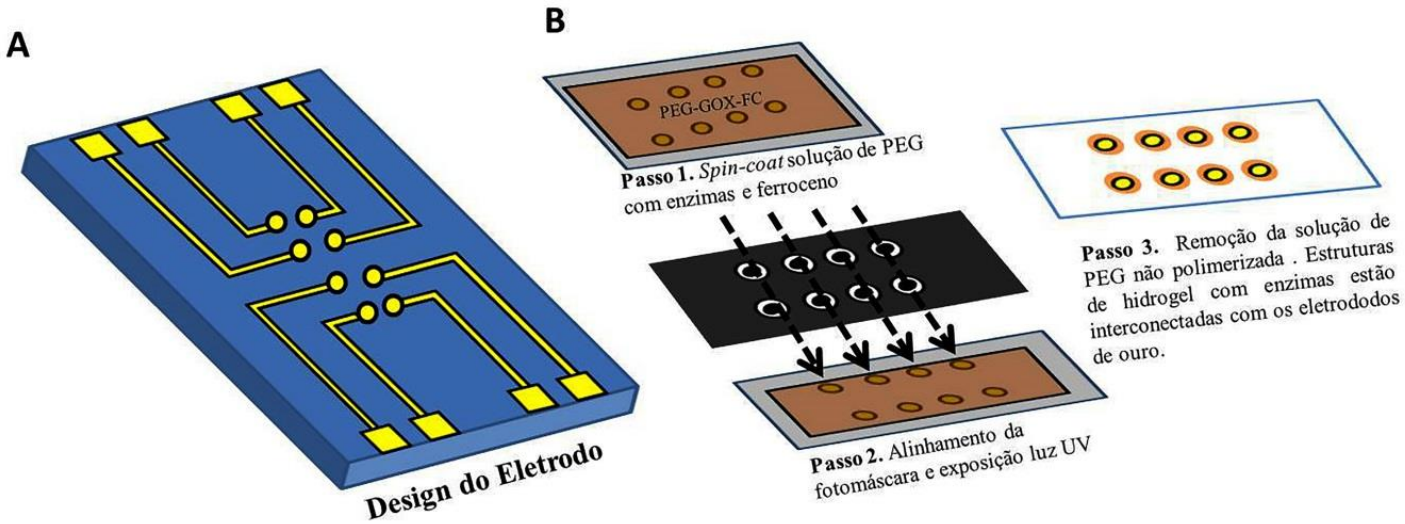


Figura 4. A) Layout da matriz de eletrodos. (B) Micropadronização das enzimas em hidrogel no topo dos eletrodos de ouro (Crulhas et al. [138]).

Para o estudo eletroanalítco, utilizamos célula de nylon com compartimento único, com capacidade de 1 mL.

3.1.4. Funcionalização dos eletrodos

Os eletrodos foram silanizados utilizando TPM para uma melhor adesão do hidrogel nas lâminas de vidro. Brevemente, as lâminas de vidro foram limpas em "solução piranha" consistindo de 3:1 de H_2SO_4 e H_2O_2 por 30 minutos, lavadas em água mili-Q e imersas em solução 2 mM de tolueno com *3-(trichlorosilyl)propyl methacrylate* (TPM) por uma hora para se obter uma monocamada auto-organizada, logo após o substrato foi lavado em

tolueno para remover o excesso de agente silanizador e finalmente foi colocado no forno por três horas a 100 ºC para que ocorresse o crosslink da camada de silano.

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

O biossensor for otimizado previamente aos testes envolvendo as enzimas. Desta forma, utilizamos cinco diferentes concentrações de Fc (2,5 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15mg/mL e 20 mg/mL) para avaliar a influência do par redox na matriz polimérica. GOX, LOX e SOD foram dissolvidas em tampão PBS 10 mM na concentração de 20 mg/mL e glutaraldeído foi adicionado na solução (2% v/v) para auxiliar na retenção e na funcionalidade da enzima no biossensor.

A solução pré-polimérica foi preparada pela adição de 2% (v/v) do fotoiniciador e Fc em solução contendo PEG-diacrilato (DA) (MW 575). A solução contendo enzimas e a pré-polimérica foram combinadas através da adição de 0,1 mL de solução enzimática em 0,4 mL de solução contendo PEG-DA/ferroceno por meio de agitação por 4 horas a 4 °C para assegurar dispersão homogênea das enzimas no polímero.

No próximo passo, a solução de PEG contendo enzimas (GOX, LOX e SOD) foi fotopolimerizada no topo dos eletrodos de ouro por um processo similar ao de fotolitografia (Figura 4B). Brevemente, uma fina camada de solução pré-polimérica de PEG-enzimas foi adicionada no topo dos eletrodos por meio de spin-coating (800 rpm) por quarto segundos. Logo após a adição desta camada, foi adicionada uma fotomáscara no topo do eletrodo/PEG-enzimas e o eletrodo foi exposto a luz UV (70 mW/cm^2 for 10 segundo para

converter o pré-polímero em cross-linked hidrogel, figura 4B). Logo após, a solução não polimerizada foi removida da superfície com água mili-Q.

As microestruturas de hidrogel/enzimas possuem diâmetros maiores que o eletrodo de ouro (600 μm e 300 μm de diâmetro para hidrogel e para o eletrodo de ouro, respectivamente), para garantir a adesão do polímero sobre o substrato de vidro silanizado, para ajudar na visualização da camada polimérica foi utilizado um microscópio acoplado com câmera digital.

3.1.6. Integração dos eletrodos de ouro com microestruras de hidrogel contendo enzima HRP

A preparação do eletrodo contendo HRP diferiu das outras enzimas devido à conjugação de nanopartículas de ouro (AuNPs) ao invés de Fc como par redox. A utilização de nanopartículas de ouro melhora a funcionalidade do biossensor, pois são bons condutores e estáveis quimicamente [139, 140]. As nanopartículas são fáceis de serem funcionalizadas e podem servir como arcabouço para imobilização de biomoléculas como enzimas, anticorpos, proteínas, entre outros [141].

As AuNPs foram preparadas conforme protocolos anteriores [142], resumidamente, 4 mg de $HAuCl_4$ foi diluído em 10 mL de água Mili-Q com 0,1 g de citrado de sódio, em seguida a solução foi aquecida até ebulição utilizando uma placa aquecedora acoplada com agitação magnética, após a ebulição 2 mL de citrato de sódio foram adicionados e a solução continuou sendo aquecida até atingir coloração vermelha escura, a solução foi refrigerada em temperatura ambiente e mantidas sob 4 °C.

A conjugação das AuNPs com a enzima HRP foi realizada através da conjugação química EDC/NHS conforme protocolo desenvolvido por Pedrosa et al. [142] (Figura 5.)

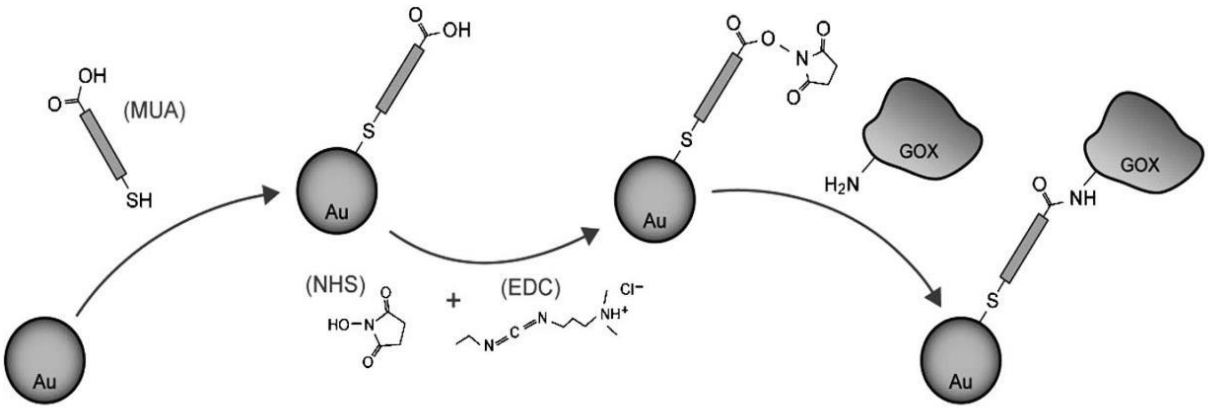


Figura 5. Conjugação da enzima HRP com AuNPs (Extraído de Yan et al. [142]).

Primeiramente, as AuNPs foram modificadas pela formação de monocamada auto-organizada de MUA através da ligação do grupamento tiol do MUA sob as AuNPs, resumidamente, 0,5 mL de solução contendo MUA (70% etanol) foram adicionados à 0,5 mL solução AuNPs e agitado por 4 horas, em seguida, as AuNPs modificadas com MUA foram conjugadas quimicamente com EDC/NHS, 1 mL de MUA-AuNPs foi incubada e agitada por 2 horas com solução contendo 100 mM de NHS e 200 mM de EDC e finalmente 50 mL de solução contendo HRP (15 mg/mL) foi adicionado e agitado por 18 horas.

3.1.7. Cultivo Celular

Para monitoramento de subprodutos metabólicos liberados por células de CaP, utilizou-se as linhagem PC-3 (ATCC® CRL-1435™). As células foram cultivadas em frascos de 75 cm² em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino, Estreptomicina (10mg) e Penicilina (10,000 U). Todos os reagentes foram adquiridos da Gibco® (Waltham, MA). As células foram cultivadas até atingirem ao menos 90% de confluência e logo após foram tripsinizadas por meio da tripsina-EDTA 0,25% (Gibco®, Waltham, MA). A viabilidade de células foi avaliada através da metodologia da câmara de Neubauer. Aproximadamente 100000,00 células foram utilizadas em todos os experimentos através da adição de 1 mL de solução contendo as células dentro da célula eletroquímica contendo o biossensor, devido as características únicas da matriz polimérica as células se aderiram ao redor do PEG, o que não comprometeu a funcionalidade do sensor.

3.1.8. Técnicas eletroquímicas

Os eletrodos (Figura 6A) foram analisados através de diferentes técnicas eletroquímicas para caracterização e detecção de atividade enzimática da GOX, LOX, HRP e SOD. Foram utilizadas: voltametria cíclica (VC), voltametria de onda quadrada (VOQ) e espectroscopia de impedância (EIS), conforme conjunto de eletrodos e a célula eletroquímica demonstrado na Figura 6B.

Primeiramente, para caracterização das propriedades redox dos eletrodos, a VC foi realizada em todas as modificações utilizadas (PEG-Fc-GOX, PEG-Fc-LOX, PEG-FC-SOD e PEG-AuNP-HRP) com diferentes velocidades de varredura, com valores 20 – 250 mV/s e intervalo de potencial -0,2 a 0,7 V vs Ag/AgCl, em tampão PBS 10 mM. A partir da VC, obtiveram-se os parâmetros cinéticos das reações eletroquímicas através da

separação dos picos de oxidação e redução e a suas correlações com a velocidade de varredura.

Em adição a VC, a EIS também foi utilizada com a finalidade de avaliar a resistência na transferência de cargas sobre a superfície eletródica, sendo realizada na faixa defrequência entre 0,1 Hz – 100 KHz em tampão PBS 10 mM.

Para detecção de glicose e lactato, VC foi utilizada no intervalo de potencial de -0,2 a 0,7 V vs Ag/AgCl. Por sua vez, a detecção de superóxido foi realizado por VOQ no intervalo de potencial de -0,2 a 0,8 V vs Ag/AgCl com amplitude de sinal de 40 mV e 60 Hz de frequência. Por último para detecção de peróxido de hidrogênio VC foram realizadas no intervalo de potencial de -0,7 a 0,7 V vs Ag/AgCl.

As curvas de calibração foram realizadas pela adição de concentrações conhecidas dos analitos-alvo e as variações eltroquímicas foram analisadas por regressão linear sendo possível determinar o limite de detecção, linearidade. Todos os experimentos foram realizados em quintuplicatas. Os estudos que envolveram o uso de células de CaP, a liberação do analito alvo foi realizado através das medidas eletroquímicas no intervalo de 20 minutos.

3.1.9. Análise de Interferentes

As medidas para determinação de interferentes foram efetuadas nas mesmas condições experimentais da caracterização dos eletrodos (VC com intervalo de potencial de

-0,2 a 0,7 V vs Ag/AgCl), com adição de soluções concentradas (100 µM) de ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (AU) em tampão PBS 10 mM.

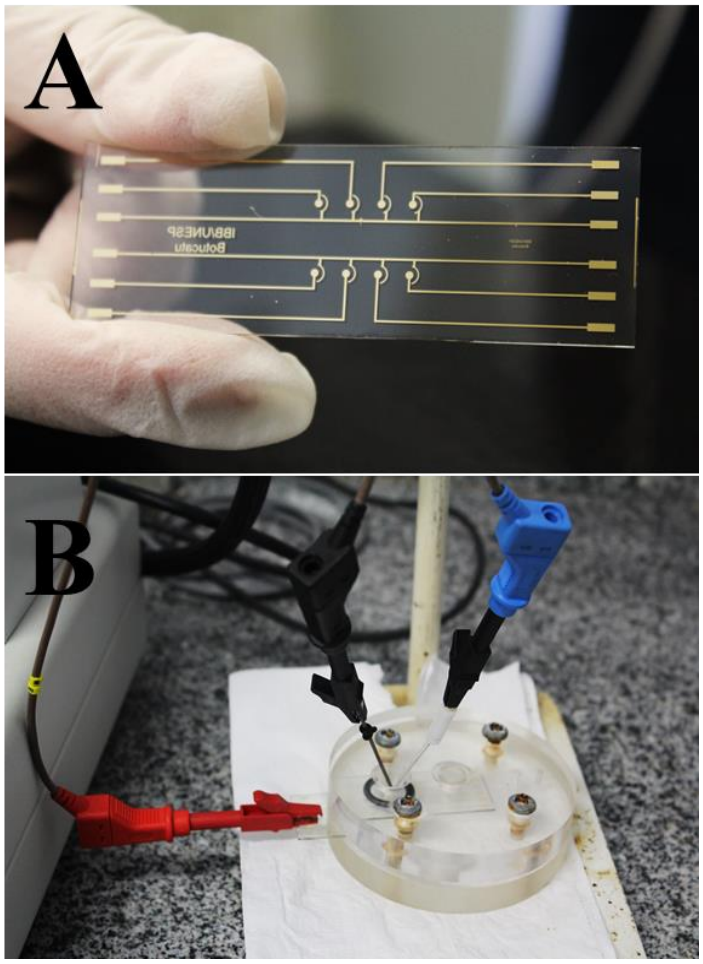


Figura 6. (A) Visão geral do sensor contendo conjunto micropaternado de eletrodos de ouro. (B) Célula eletroquímica contendo Ag/AgCl como eletrodo de referência, filamento de Pt como contra eletrodo e Au como eletrodo de trabalho. (Modificado de Crulhas et al. [78]).

3.2. Biosensores aptaméricos

3.2.1. Materiais e Reagentes

Os seguintes reagentes foram utilizados: ácido (N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico) (HEPES), bicarbonato de sódio (NaHCO3), 6-mercapto-1-hexanol (MCH) e membrana nucleopore *Track-Etch* (13 mm, 0,2 μm) (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO). A sequência do aptâmero específico para PSA usada foi: 5′-SH/-TTTTTAATTAAAGCTCGCCATCAAATAGCTGGGGG-3′-/MB; VEGF foi: 5′-SH/-TGTGGGGGTGGACGGGCCGGGTAGA-3′-/MB e MUC1 foi: 5′-SH/-GCAGTGAGTCCTTGGATACCCTGG-3′-/MB (Biosearch Technologies, Novato, CA), as conformações estruturais de cada aptâmero foram analizadas pelo software OlygoAnalyzer (disponível online em https://www.idtdna.com/calc/analyzer) (Figura 7). O aptâmero foi dissolvido em tampão Hepes 10 mM (pH 7,4 com 150 mM de NaCl) conforme protocolo informado pelo fabricante dos aptâmeros.

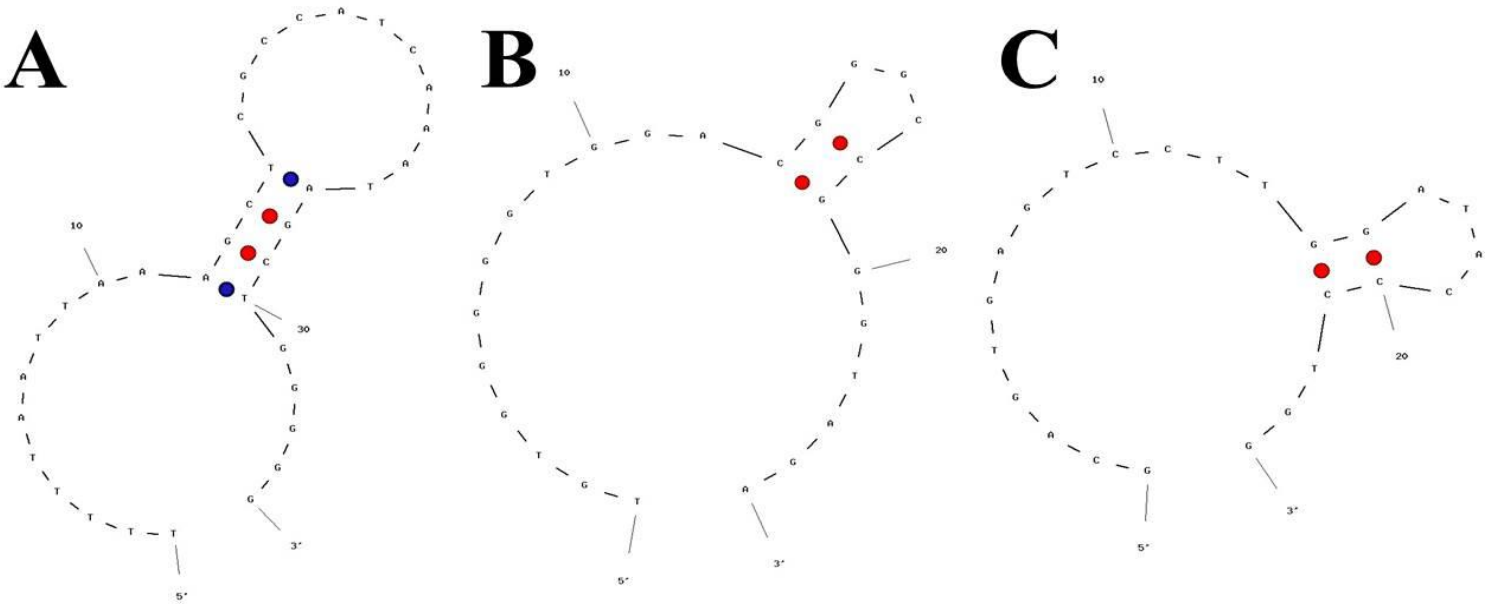


Figura 7. Estrutura dos aptâmeros (A) aptâmero específico para PSA, (B) Aptâmero específico para VEGF e (C) Aptâmero específico para MUC1.

3.2.2. Instrumentação

Para as medidas eletroquímicas foram utilizados o Potenciostato μAutoLabIII (Metrohm, NL) com o módulo FRA32M acoplado a um laptop com o software NOVA 1.10 (Metrohm, NL).

As análises de microscopia eletrônica de varredura foi realizada através do microscópio eletrônico de varredura Quanta 200 (Fei Company, EUA).

As análises dos dados e gráficos foram realizados no software Origin 8.0 (Oringlab Corporation, EUA).

3.2.3. Eletrodos

Para o estudo do monitoramento eletroquímico das proteínas-alvo liberadas por células CaP foi utilizado um sistema de eletrodo de ouro, composto por:

- Eletrodo de trabalho: discos de Silício recobertos com ouro.
- Eletrodo de referência: Ag/AgCl em KCl 3 mol/L (modelo ET073-3, eDAQ, EUA) .
- Eletrodo auxiliar: fio de platina (modelo ET078-1, eDAQ, EUA).

O substrato utilizado como eletrodo de trabalho para os biossensores aptaméricos foram discos de Silício (University wafers, Boston, MA) recobertos com uma camada de 5 nm ouro através da técnica de *sputtering*, realizada no departamento de química da Universidade de São Paulo (USP, São Carlos).

Os aptâmeros possuem a conformação e *hairpin* com duas modificações em suas extremidades (figura 7.). A primeira modificação é a adição de grupamento tiol na extremidade 5', que será responsável pela ligação do aptâmero sobre os eletrodos de ouro. A segunda modificação é a adição azul de metileno (MB) como par redox na extremidade 3'. O MB apresenta um típico pico catódico em -0,25V (vs Ag/AgCl) conforme demonstrado na figura 8. O funcionamento do aptâmero como biossensor é baseado na supressão de sinal. Resumidamente, após incubação dos aptâmeros na superfície dos eletrodos eles mantém sua conformação de *hairpin* mantendo o par redox (MB) próximo da superfície do eletrodo, ocasionando alta transferência de elétrons. Contudo, na presença do analito-alvo especifico para o aptâmero (p.ex. PSA, VEGF MUC1), o aptâmero tende a se desdobrar, deslocando assim o par redox de proximidade do eletrodo, diminuindo a transferência de elétrons causando a supressão do sinal, que pode ser mensurada por meio de técnicas eletroquímicas (Figura 8).

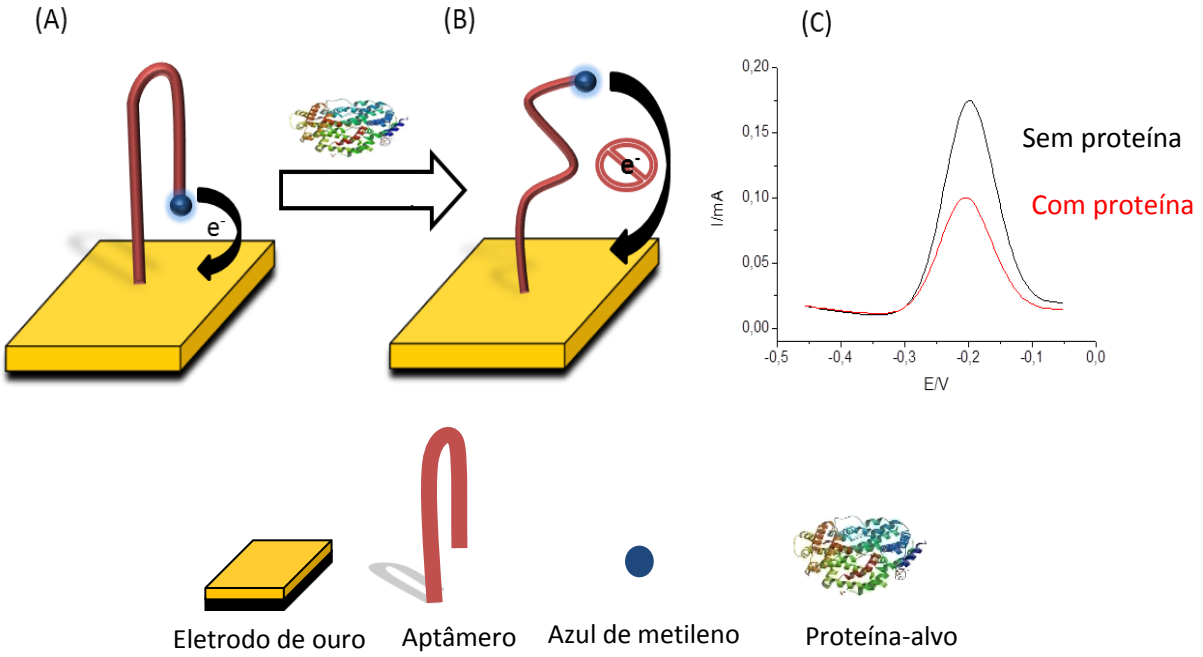


Figura 8. Esquema do aptasensor eletroquímico. (A) Estrutura do aptâmero sobre o eletrodo de ouro, (B) Mudança na estrutura do aptâmero após ligação com a proteína-alvo, (C) Técnica de voltametria de onda quadrada para medir as diferenças na corrente na presença e ausência da proteína-alvo. (Autoria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

3.2.4. Acoplamento dos aptâmeros em eletrodos de ouro

O sensor aptamérico foi fabricado utilizando um eletrodo de ouro. Os eletrodos foram limpos com solução "piranha" 3:1 de H_2SO_4:H_2O_2 e depois foram lavados com água deionizada, etanol e secados com nitrogênio. Antes da modificação dos eletrodos, a solução estoque (0,02 mM) foi reduzida em 10 mM de TCEP por 1 hora para clivar as pontes de dissulfeto. A solução resultante foi então diluída para 0,5 µM em Hepes. Na imobilização do aptâmero, os eletrodos de ouro foram incubados por 18 horas no escuro a 4 ºC. Após este período, os eletrodos foram lavados com água deionizada e imersos em solução 3 mM de MCH por 20 minutos, para evitar ligações inespecíficas na superfície do eletrodo.

3.2.5 Cultivo Celular

As linhagens utilizadas foram: células prostáticas benignas (RWPE-1; ATCC® CRL-11™), e duas linhagens neoplásicas sendo: linhagem mais agressiva (PC-3; ATCC® CRL-1435™) e uma linhagem menos agressiva (LNCaP; ATCC® CRL-1740™). O uso de diferentes linhagens celulares é importante, pois permite uma análise comparativa e refinada dos padrões de liberação de metabólitos e proteínas entre as células benignas e as neoplásicas. As células foram cultivadas de modo similar ao explicado no tópico 3.1.7 sobre cultivo celular (página 30).

3.2.6. Técnicas eletroquímicas

Os experimentos eletroquímicos foram realizados utilizando uma célula eletroquímica de Nylon com quatro câmaras independentes onde fragmentos dos discos de silício recobertos com ouro foram alocados.

Os biossensores aptaméricos foram caracterizados pela técnica de VOQ em tampão Hepes 10 mM, com intervalo do potencial -0,01 a -0,5 V vs Ag/AgCl com 40 mV de amplitude e frequência de 60 Hz. A caracterização e estabilidade foram averiguadas através de sucessivas medidas de VOQ a cada 20 minutos por 3 horas. As curvas de calibração também foram realizadas por VOQ com a adição de concentrações conhecidas da proteína-alvo

Os eletrodos modificados com o aptâmero foram alocados numa célula eletroquímica e as medidas foram realizadas com 20 minutos de intervalo, sendo analisadas posteriormente por regressão linear e assim calculados o limite de detecção e a linearidade.

Para a análise com células da próstata, VOQ foi utilizada com medidas sucessivas a cada 20 minutos por 3 horas.

4. Resultados e discussão

4.1. Biossensores enzimáticos

O uso de biossensores enzimáticos permitiu uma análise precisa do microambiente tumoral sendo uma plataforma importante para o diagnóstico e monitoramento do CaP.

4.1.1. Caracterização da superfície e otimização do biossensor

A primeira etapa desenvolvida do projeto consistiu em montar um biossensor multi-enzimáticos para detecção de glicose, lactato e superoxido. Utilizando as respectivas enzimas, sendo as mesmas conjugadas com Fc para posterior encapsulação em matrizes poliméricas de PEG, conforme proposto por Yan et al. [143]. A visão geral dos eletrodos está demonstrada na Figura 9A. O dispositivo consiste em um conjunto de quatro eletrodos em duas fileiras. Cada eletrodo consiste de um de diâmetro 300 μm, conectados por linhas de 10 μm de espessura. Após a fabricação dos eletrodos, os substratos foram silanizados com um agente metacrilato para garantir a ligação covalente entre as matrizes poliméricas de PEG no vidro (Figura 9B). Estudos iniciais demonstraram que a silanização não influenciou nos experimentos eletroquímicos.

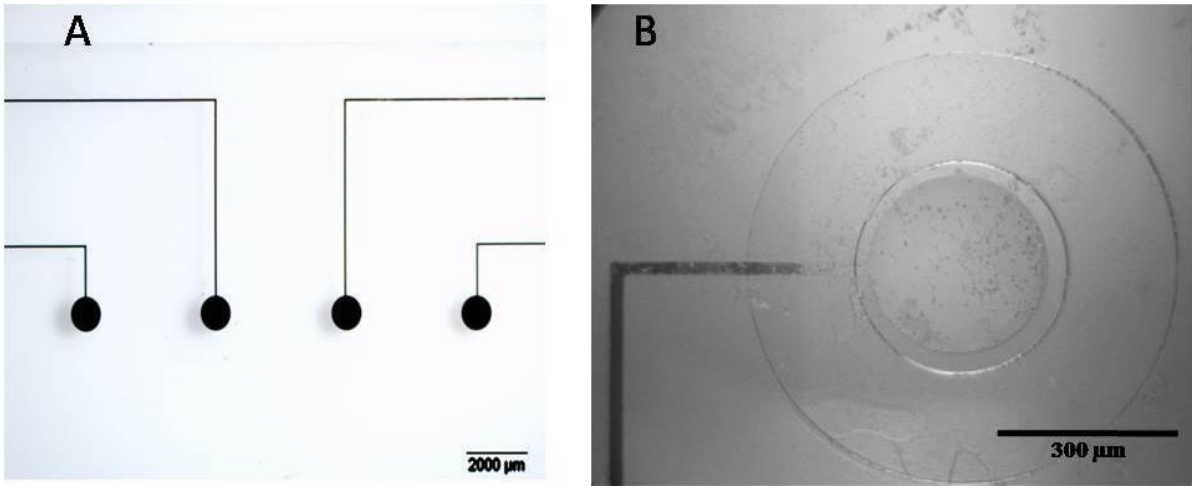


Figura 9. (A) Parte da matriz de eletrodos. (B) Adesão do compleo PEG-enzimas no topo dos eletrodos de ouro.

Para a construção de biossensores conjugados com Fc foi necessário aperfeiçoar a quantidade de Fc presente nas matrizes poliméricas, devido a dependência do par redox para as reações biocatalíticas, bem como o efeito de sua concentração na estabilidade e permeabilidade do filme. Na figura 10A, é possível verificar o voltamograma cíclico obtido do sensor na presença e ausência de Fc depositado no PEG. Somente a imobilização de PEG (linha preta) sobre o elétrodo de ouro resultou em isolamento eficaz dos eletrodos de ouro, e como esperado não foi possível verificar o aparecimento de nenhum pico de oxidação ou redução. Por sua vez, o encapsulamento de Fc dentro do PEG (linha vermelha) demonstrou a presença do par redox, onde podemos notar que em 0,3 V existe um pico anódico e 0,09 V a presença de um pico catódico (vs Ag/AgCl) característicos da presença do Fc. Logo aqui podemos confirmar que houve a encapsulação do Fc dentre a matriz polimérica do PEG.

O próximo passo otimizou-se a concentração de Fc presente na matriz polimérica conforme demonstrado na figura 10B. Pode-se verificar um aumento linear do pico anódico

proporcional ao aumento na concentração de Fc até a concentração de 10 mg/mL, ao invés de concentrações maiores encontradas na literatura (20 mg/mL) [144,145]. Apesar de altas concentrações de Fc virtualmente ocasionarem maior transferência de elétrons na superfície e assim garantir um sinal eletroquímico mais elevado, a mesma podem desestabilizar a matriz polimérica comprometendo o *cross-link* entre enzimas e PEG e inviabilizando a construção do biossensor. Por isso escolheu-se utilizar a concentração de 10 mg/mL para todos os outros experimentos a seguir.

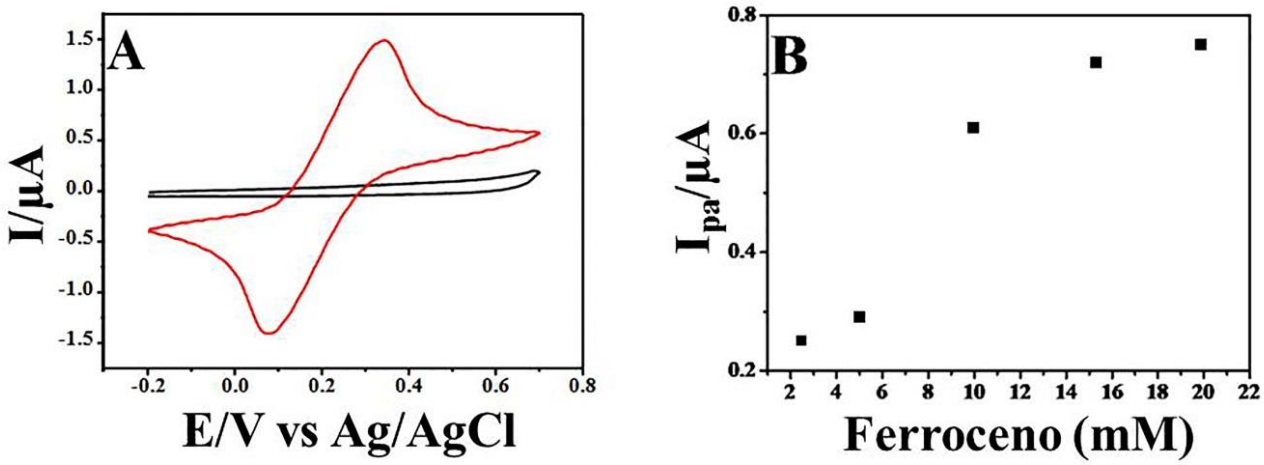


Figura 10. (A) VC de PEG-Fc em 0,1 mM PBS com velocidade de varredura de 50mV/s. PEG (linha preta); PEG-FC (linha vermelha). (B) Estado estacionário da corrente de pico do complexo PEG-Fc vs diferentes concentrações de Fc na matriz polimérica

Desta forma, avaliamos a cinética das reações que ocorreram no eletrodo modificado com PEG e Fc. Os experimentos foram realizados por voltametria cíclica variando a velocidade de varredura (Figura 11A). Os resultados demonstraram que os picos de oxidação e redução no potencial padrão para Fc, sendo 0,1 V e 0,3 V, respectivamente, com o aumento da velocidade ocorria uma progressiva separação linear do pico (Figura

11B), com a equação linear sendo I_{pa} (μA) = 0,56 + 0,27 (mV/s) (R^2=0,9994). O aumento na proporção do pico foi proporcional à raiz quadrada do potencial da velocidade de varredura o que indica que a transferência de cargas pode ser descrita através da equação de Randles-Sevcik [146], e que a mesma é controlada pelo transporte de massa, conforme resultados similares encontrados na literatura [147].

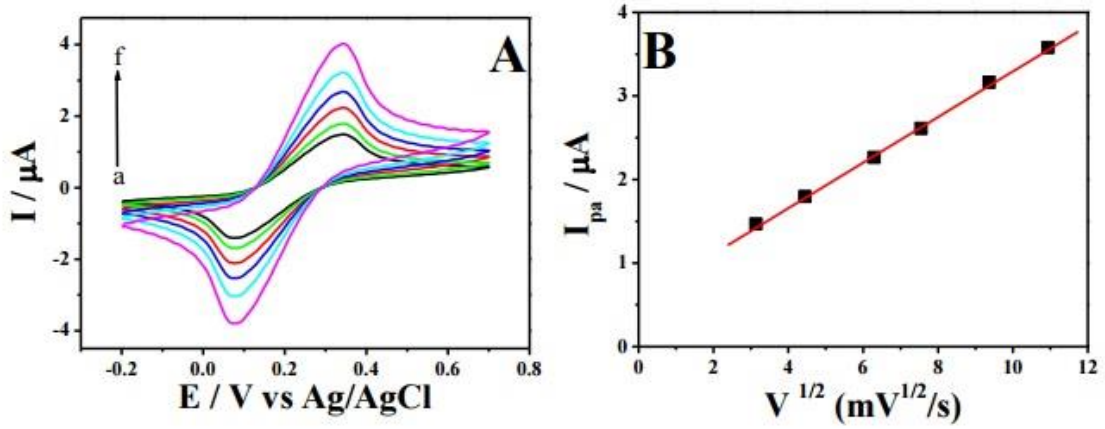


Figura 11. (A) VC do PEG-Fc em diferentes velocidade de varredura (a-f: 20, 30, 50, 60, 90, 100, 150, 200 e 250 mV/s. (B) Separação do pico em função do potencial da velocidade de varredura. As medidas foram feitas em 10mM PBS (pH 6,0).

Também foi possível observar uma correlação linear entre o potencial do pico e o logaritmo da velocidade de varredura. Em processos controlados pelo transporte de massa o coeficiente de transferência de carga (α) e a taxa de transferência de elétrons (ks) podem ser calculados a partir da variação dos potenciais catódicos e anódicos (E_{pa} e E_{pc}) juntamente com o logaritmo da velocidade de varredura segundo o modelo de Laviron (Figura 11). A equação de regressão linear pode ser caracterizada como $\Delta E(E_p\text{-}E^0$; E_p é o valor do potencial de pico anódico ou catódico e E^0 e o potencial padrão) *versus* o logaritmo do potencial da velocidade de varredura, sendo então expresso como E_p (ν) = 0,25 logν + 0,91 (r = 0,996). Combinando tal equação no modelo de Laviron, a inclinação da equação linear

é igual a $\alpha\log(1-\alpha) + (1-\alpha)\log\alpha - \log RT/nFv - (\alpha(1-\alpha)nF\Delta E_p/2,3RT)$, o qual pode ser usado para avaliar os parâmetros cinéticos dos eletrodos, as constantes R, T e F se referem, a gás, temperatura e a constante de Faraday, respectivamente. A taxa de transferência de elétrons (ks) foi calculada como 8,5 s^{-1} [148]. Este valor foi comparativamente maior em comparação com outros trabalhos publicados [149,150], o que demonstra que a matriz polimérica modificada com Fc exibiu uma rápida taxa na transferência de elétrons por meio da oxidação eletroquímica do ferroceno.

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

Após otimização do sensor, passou-se a construir um biossensor biconjugado com as enzimas GOX e LOX, aprisionadas dentro do hidrogel (PEG-Fc), e verificou-se a resposta eletroquímica do mesmo quando na presença do analito para cada enzima, sendo glicose e acido lático, respectivamente. As reações enzimáticas tanto da glicose e do ácido lático liberaram elétrons, aumentando a corrente elétrica, conforme demonstrado reação abaixo:

Glicose

(a) ß-D-Glicose + GOX(FAD) Ácido Glucônico + GOX($FADH_2$)

(b) GOX($FADH_2$) + O_2 GOX(FAD) + H_2O_2 $2H^+ + O_2 + 2e^-$ (eletrodo)

Lactato

(a) Lactato + LOX(FAD) Piruvato + LOX($FADH_2$)

(b) LOX($FADH_2$) + O_2 LOX(FAD) + H_2O_2 $2H^+ + O_2 + 2e^-$ (eletrodo)

A Figura 12A demonstra mudanças no perfil voltamétrico devido à adição de glicose ou lactato (linhas verde e preta, respectivamente) em comparação ao sensor

somente em tampão (linha vermelha). Podemos notar claramente um ganho de corrente atribuída as reações acima citadas, logo este resultado comprova que o biossensor é sensível as das moléculas em estudo. A Figura 12B demonstra uma curva de calibração à obtida a partir de diferentes concentrações de glicose adicionadas e medidas por VC. A faixa de concentração obtida foi entre 0,1 e 10 mM. A correlação linear da diferença de I_{pa} *vs* concentração de glicose foi descrita como: I_{pa} = 0,004 μA + 0,30 μA/μmolL^{-1} [glicose] com R^2= 0,997. O limite de detecção obtido foi de 2,0 μmol L^{-1}, definido como uma relação 3σ / *slope*, em que σ é o desvio padrão do valor médio para 10 voltamogramas do branco.

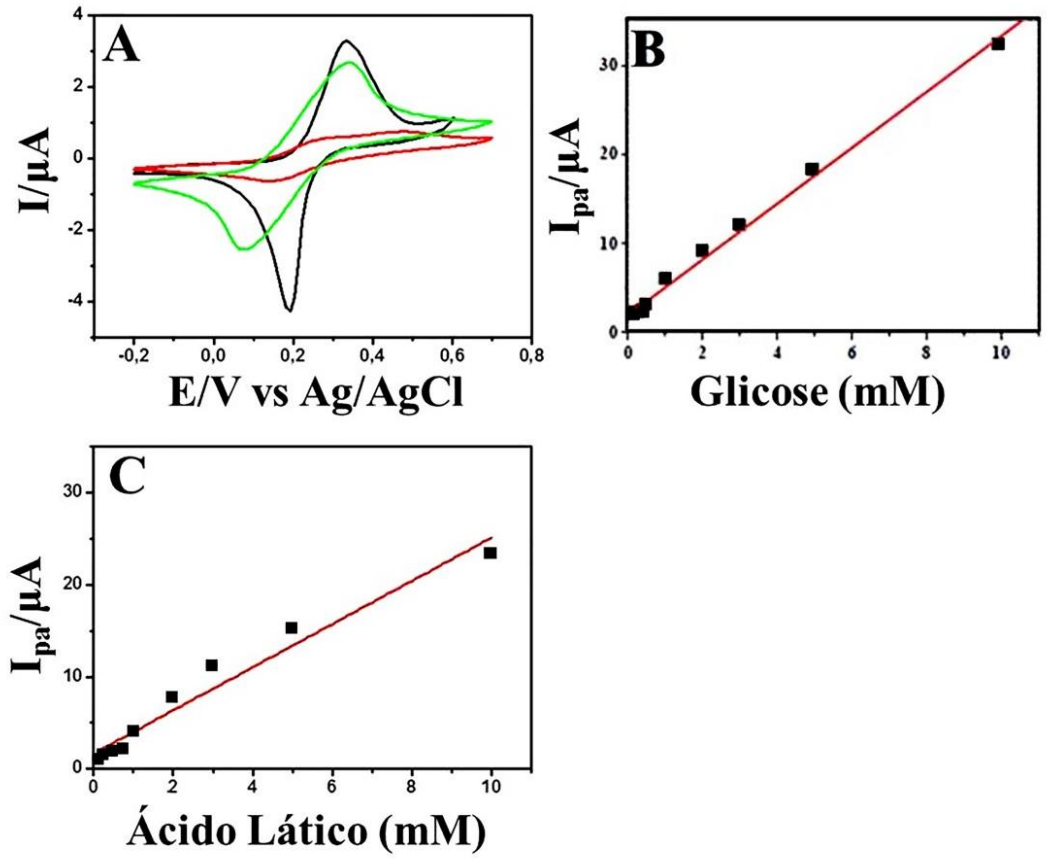


Figura 12. (A) Voltametria cíclica do biossensor com: ausência de analitos (linha vermelha), presença de glicose (linha verde) e presença de ácido lático (linha preta). (B) Correlação linear do pico da corrente com a concentração de glicose. (C) Correlação linear do pico da corrente com a concentração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

A repetibilidade da corrente de resposta do sensor foi investigada a uma concentração de glicose de 0,1 μmol L^{-1}. O coeficiente de variação (RSD) foi de 4,8% para dez injeções sucessivas da mesma concentração em tempos diferentes, o que implica boa reprodutibilidade do biossensor. Além disso, realizou-se uma série de experiências de referência utilizando outras espécies comuns de interferência, como frutose, lactose e ácido úrico. Nenhuns dos interferentes estudados foram detectados. Os resultados sugeriram a adequação do biossensor proposto para aplicações práticas.

O mesmo estudo foi realizado para a determinação de lactado utilizando o mesmo procedimento. A Figura 12C apresenta a correlação linear em diferentes concentrações de ácido lático vs I_{pa} sendo descrita como: I_{pa}= 0,005 μA + 0,20 μA/μmolL^{-1}, e R^2 = 0,996. O limite de detecção obtido foi de 2,0 μmol L^{-1}. O nosso biossensor possui baixo limite de detecção, sendo comparável com outras plataformas encontradas na literatura, como: as desenvolvidas por Cui et al. [151] (limite detecção = 5μM), Suman et al. [152] (limite de detecção = 100 μM) e Rahman et al. [153] (limite de detecção = 1μM).

A repetibilidade da corrente de resposta do sensor foi investigada a uma concentração de lactato de 0,1 μmol L^{-1}. O coeficiente de variação (RSD) foi de 4,8% para dez injeções sucessivas da mesma concentração em tempos diferentes, o que implica boa reprodutibilidade do biossensor, sendo comparável com outras plataformas encontradas na literatura, conforme valores encontrados por: Hernández-Ibáñez et al. [154] (3,8% de RSD), Claver et al. [155] (3,3% de RSD) e Huang et al. [156] (2% de RSD).

4.1.3. Biossensores enzimáticos para detecção de superóxido

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são grupamentos de oxigênio derivados da oxidação do O_2 e incluem: radical ânion superóxido, radical livre de dióxido de carbono, hidroxilas e peróxido de hidrogênio [157]. A produção ROS ocorre por meio de uma cascata de reações, as quais, normalmente começam com a liberação de ânions superóxidos. O superóxido é a ROS mais abundante e a sua produção em células saudáveis está relacionado com processos fisiológicos e patológicos através da oxidação de diversos componentes celulares (por exemplo: proteínas, lipídeos, DNA ou RNA) [158]. A concentração normal de ROS é benéfica para o sistema imune e homeostase, promovendo defesa contra vírus e bactérias além de atuar na apoptose [159].

O estresse oxidativo pode ocasionar mudanças no metabolismo celular e induzir condições patológicas como: acidentes vasculares cerebrais (AVC), doenças cardíacas, câncer e distúrbios neurodegenerativos como Alzheimer e Parkinson [160].

Especificamente, diversos canceres surgem a partir de sítios de irritação crônica, infecção ou inflamação e o stress oxidativo afetam diretamente as células cancerígenas na progressão do ciclo celular, adesão, motilidade, angiogênese, metástase, resistência à apoptose, instabilidade genômica e mudanças no metabolismo [161]. Em adição, a enzima SOD é um importante anti-oxidante essencial para catalisar ROSe proteger as células de danos causados pelos radicais livres.

Desta forma, a utilização de biossensores acoplado com SOD para detecção de ROS liberados por células cancerígenas é importante para avaliar o status metabólico celular e pode ser utilizado no monitoramento da evolução do quadro em pacientes.

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

Os eletrodos utilizados foram preparados similarmente aos biossensores relatados previamente, com a diferença de acoplamento da SOD sobre a superfície eletrodica. Para a caracterização eletroquímica, uma série de experimentos foram conduzidos utilizando VC. O primeiro teste variou-se a velocidade de varredura no intervalo entre 20 e 250 mV/s. Os resultados demonstraram um aumento gradual de corrente quando aumentada a velocidade de varredura, nos picos anódico (0,4 V) e catódico (0,2V) (Figura 13A).

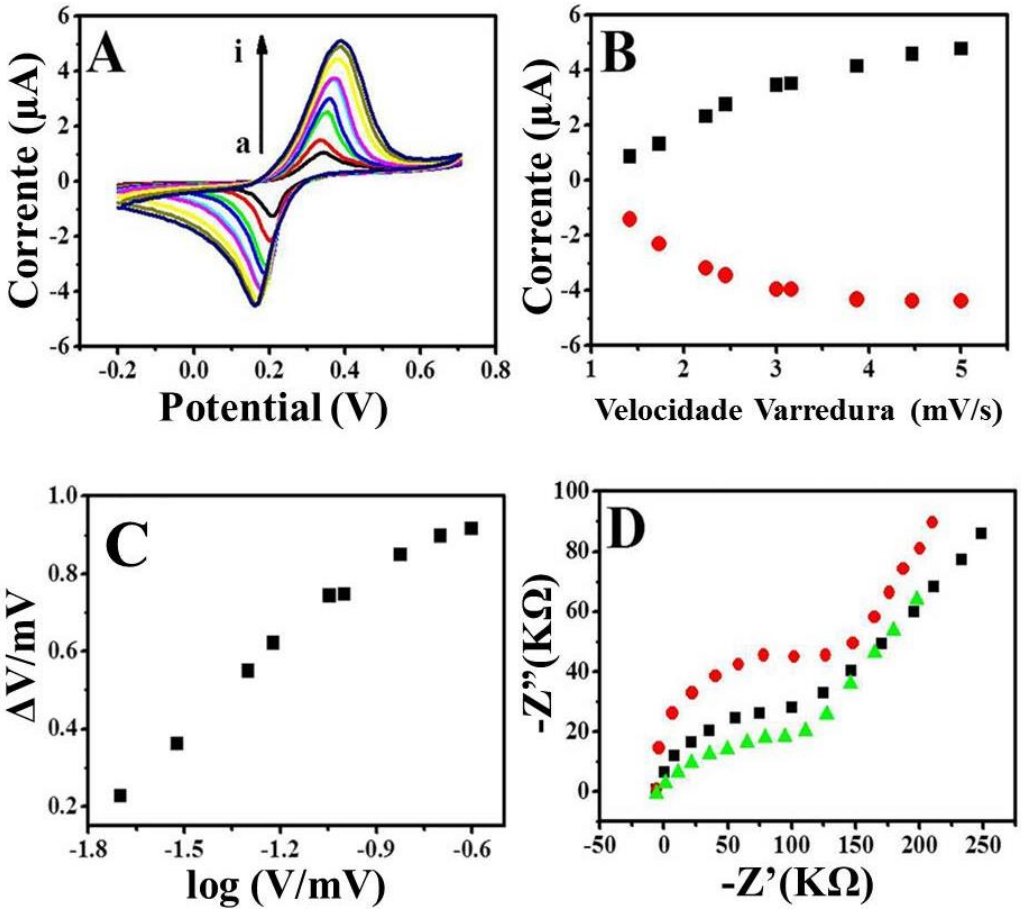


Figura 13. (A) Voltametria cíclica do biossensor em diferentes velocidades de varredura (a-i: 20, 30, 40, 50, 60, 90, 100, 150, 200, e 250 mV/s em 0,1 M PBS. (B) Separação do pico em função do potencial de varredura. (C) Gráfico Nyquist para PEG-Au electrodes contendo: PEG puro (PEG (■), (●) SOD-PEG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

Os resultados obtidos demonstram que a corrente é proporcional à raiz quadrada da velocidade de varredura ($\upsilon^{1/2}$), indicando um processo controlado por difusão (Figura 13B). Analisando o gráfico do potencial de pico *vs* velocidade de varredura (Figura 13C), a separação do pico (ΔEp) permaneceu constante até 60 mV o que sugere um sistema eletroquímico reversível confinado pela superfície da matriz de PEG sobre os eletrodos.

Em adição a caracterização por VC, espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foi utilizada para avaliar a resistência na transferência de cargas sobre a superfície eletrodica. A figura 13D apresenta o típico gráfico Nyquist de diferentes eletrodos, realizados na faixa de frequência entre 0.1 Hz – 100 kHz em 10 mM de PBS (pH 7,2). O diâmetro do semicírculo representa a cinética de transferências de elétrons, ou mais especificamente a resistência na transferência de cargas (R_{ct}) na superfície do eletrodo. A Figura 13D apresenta o espectro da EIS na modificação passo-a-passo do eletrodo de ouro com a matriz polimérica acoplada com SOD. A R_{ct} para PEG puro polimerizado no topo do eletrodo de ouro foi de 21 KΩ (■), após o encapsulamento de enzimas dentro da matriz de PEG a resistência aumentou para 40 KΩ (●), indicando que uma maior resistência na transferência de elétrons ocorreu devido a adição da camada enzimática no topo do eletrodo. No entanto, a adição de Fc na matriz de PEG contendo SOD reduziu a resistência para 10 KΩ (▲), demonstrando que a inclusão do par redox (Fc) melhorou a transferência de elétrons sem comprometer a matriz polimérica.

4.1.3.2. Detecção eletroquímica de ROS por biossensores enzimáticos

A curva de calibração foi realizada pela adição de concentrações conhecidas de catequina na célula eletroquímica contendo o biossensor formado de SOD-Fc-PEG. Os experimentos foram realizados na faixa de potencial entre -0,2 e 0,8 V utilizando VOQ. O superóxido foi produzido pela oxidação da catequina e se difundiu através da matriz de PEG e reagiu com a enzima SOD encapsulada no interior do hidrogel (Figura 14A). A figura 14B apresenta a curva de calibração (corrente do pico de oxidação *vs* a concentração de catequina no potencial de 0,3 V) para detecção de superóxido. O limite de concentração detectada foi de 1 nM ($R^2 = 0,991$), com intervalo linear entre 0,5 – 100 μM, e sensibilidade de 14,1 nA μM/mm². Quando comparado os resultados obtidos com outros tipos de biossensores publicados na literatura, nossa plataforma apresentou melhores resultados (Tabela 1.)

Tabela 1. Comparação da performance analítica de biossensores para detecção de ROS

ROS Biossensor	**Limite de detecção (μM)**	**Referência**
SOD-Fc-PEG	0,001	Tese
SOD-SA	0,23	[162]
Au-SN[b]-SOD	0,1	[163]
NiOx/GC electrode	2,66	[164]
Au-Pn[d]-SOD	0,1	[165]
SOD-Cys-Au	0,005	[166]
PtW/MoS_2	0,005	[167]

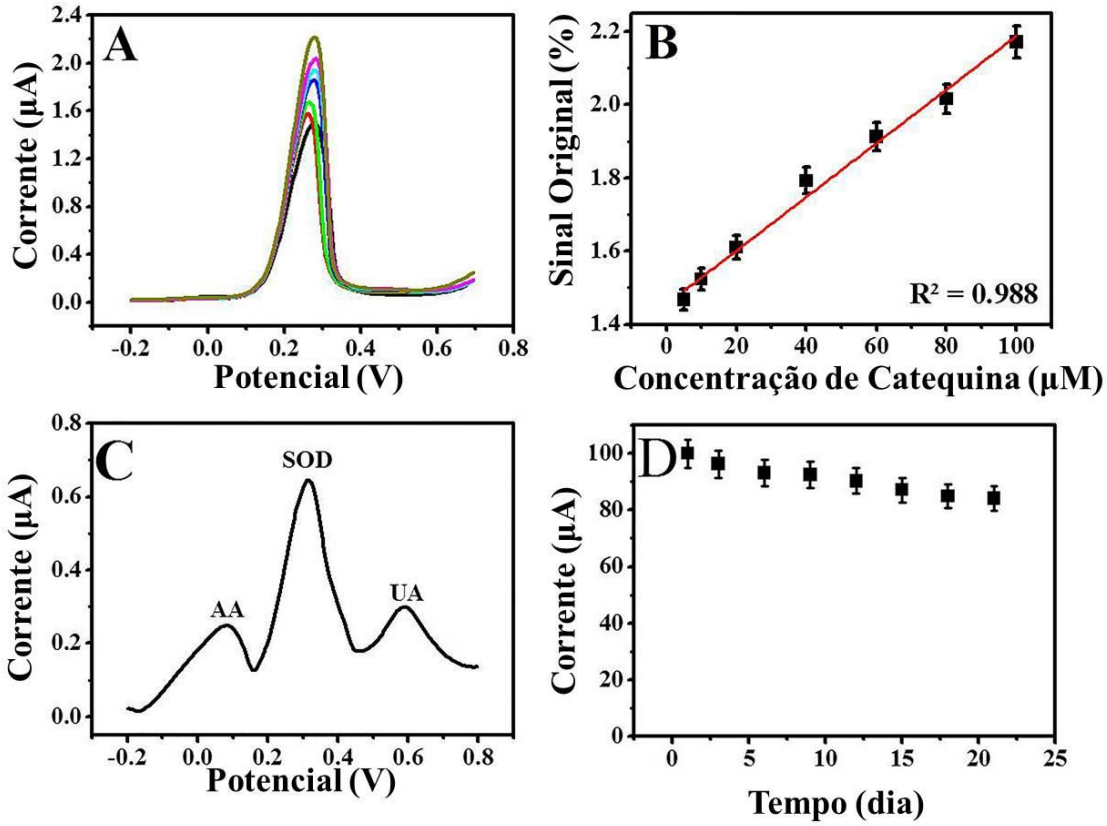


Figura 14. VOQ PEG-SOD-Fc biossensor no intervalo de potencial de -0,2 a 0,7 V vs Ag/AgCl. (B) Curva de calibração obtida a partir da variação do corrente do pico da VOQ em função de diferentes concentrações de catequina. (C) VOQ PEG-SOD-Fc na presença de 10µM catequina e 100µM de ácido ascórbico e úrico.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

Em ordem de evitar reações inespecíficas com outras moléculas tipicamente encontradas em fluídos fisiológicos, como ácido úrico e ácido ascórbico, nós verificamos os efeitos destes compostos interferentes, através de VOQ (Figura 14C), e o nosso sensor foi capaz de detectar a produção de superóxido mesmo na presença de altas concentrações de ácido úrico e ascórbico, pois o pico de oxidação do Fc foi avaliado em 0,3 V e os picos do ácido ascórbico e úrico estão em 0,1 e 0,6 respectivamente. O acoplamento de Fc com o hidrogel de PEG é uma técnica bem conhecida por proporcionar sítios de oxidação e

redução estáveis para plataformas de biossensores baseados em enzimas [90,121,129]. A nossa metodologia permitiu assim a criação de biossensores altamente reprodutíveis com desvio padrão de 6% na detecção de superóxidos, sendo estáveis após três semanas de testes (Figura 14D) sendo portanto uma plataforma viável para o monitoramento de superóxidos liberados por células de CaP.

4.1.3.2.1. Detecção eletroquímica de ROS liberados por CaP

Conforme as características únicas do biossensor SOD-Fc-PEG foi possível detectar superóxido produzido por células de CaP *in vitro*. A linhagem PC3, tipo agressivo de CaP com alta atividade inflamatória foi incubada na superfície do eletrodo contendo SOD-Fc-PEG utilizando colágeno. As células não se aderiram sobre os eletrodos devido as característica não incrustante do PEG e o colágeno forneceu meios para a adesão celular ao redor do biossensor (Figura 15A). Aproximadamente 100000,00 células foram adicionadas na célula eletroquímica durante o experimento de monitoração na liberação de superóxido.

A detecção de superânion foi realizada por VOQ por meio da difusão do superóxido através do matriz polimérica de PEG, as medidas foram realizadas a cada 20 minutos pro um período de 4 horas (Figura 15B). O aumento no corrente do pico de oxidação foi observado imediatamente após a primeira medida, demonstrando uma constante produção de superóxido pelas células PC3 (Figura 15C). A corrente de pico não saturou após as 4 horas de experimento, demonstrando a viabilidade e estabilidade do sensor, que não foi comprometido por proteínas e outros subprodutos liberados pelas células PC3. A figura 14C apresenta a resposta no aumento da corrente de pico pela produção e superóxidos por células PC3. A liberação de superóxido detectada pelo nosso sensor foi de 3 nM na

primeira análise temporal com uma extensão linear até 4,17 μM após 4 horas de experimento. Este foi o primeiro biossensor eletroquímico enzimático desenvolvido para monitora subprodutos inflamatórios liberados por células CaP, plataformas semelhantes foram utilizadas apenas para detecção de ROS em tampão [164-167], e apenas um estudo de Wang et al. [168], apresentou a detecção de ânions superóxido por macrófagos de ratos murinos (Raw 264.7, ATCC® TIB71™).

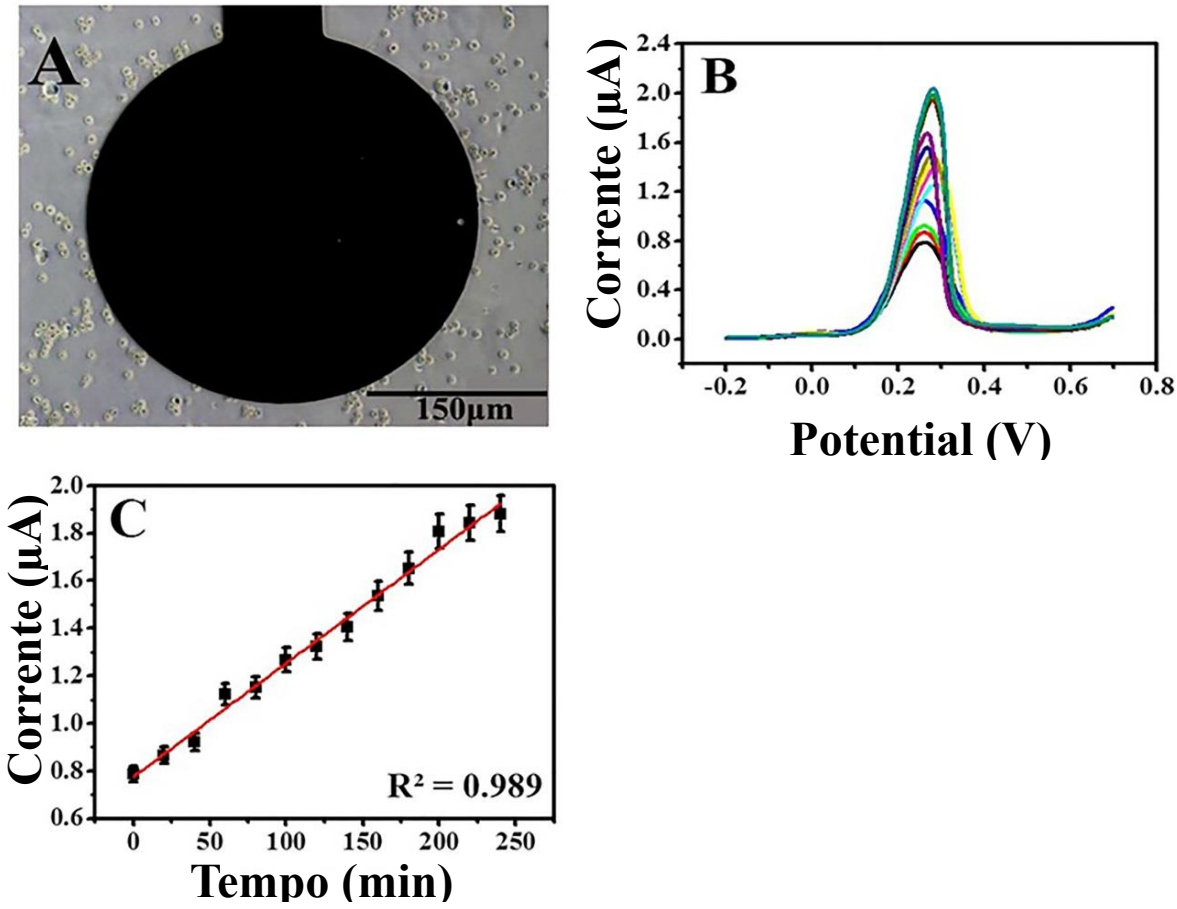


Figura 15. (A) Imagem de microscópia óptica do biossensor SOD-Fc-PEG incubado com células PC3 ao redor da matriz polimérica. (B) VOQ do biossensor SOD-Fc-PEG polimerizado no top de eletrodos de Au em função do tempo (a-m: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 minutos). (C) Gráfico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

4.1.4. Biossensores enzimáticos para detecção de peróxido de hidrogênio

4.1.4.1. Caracterização do Biossensor enzimáticos para detecção de peróxido de hidrogênio

O biossensor para detecção de Peróxido de Hidrogênio foi fabricado através da combinação de nanopartículas de ouro com a HRP com posterior incorporação do complexo HRP-AuNPs com PEG na tentativa de aumentar a estabilidade e sensibilidade do sensor bem como a retenção das enzimas na matriz polimérica. As morfologias das AuNPs e HRP-AuNPs foram caracterizadas através da microscopia eletrônica de transmissão. Na Figura 16A é possível ver uma boa dispersividade das AuNPs e com um diâmetro médio de 22nm. A modificação das AuNPs com a HRP apresentou uma maior agregação nas partículas (Figura 16B), sendo possível verificar um aumento no diâmetro (30-50 nm) e uma mudança no formato das partículas devido à presença da enzima. A Figura 16C apresenta a dispersão do complexo HRP-AuNPs na matriz de PEG de modo semelhante à dispersão no tampão. O espectro uv-vis das AuNPs (Figura 16D) apresentou pico em 520nm o que confirma a presença de Au em nossas amostras.

Para caracterização voltamétrica do sensor, uma séria de experimentos foi conduzida utilizando a voltametria cíclica na presença de 0,5 mM Fc em 10 mM PBS com velocidade de varredura entre 20 – 250 mV/s. Os resultados obtidos demonstram que com o aumento da velocidade de varredura, as correntes dos picos de oxidação e redução também amentaram gradualmente (Figura 17A).

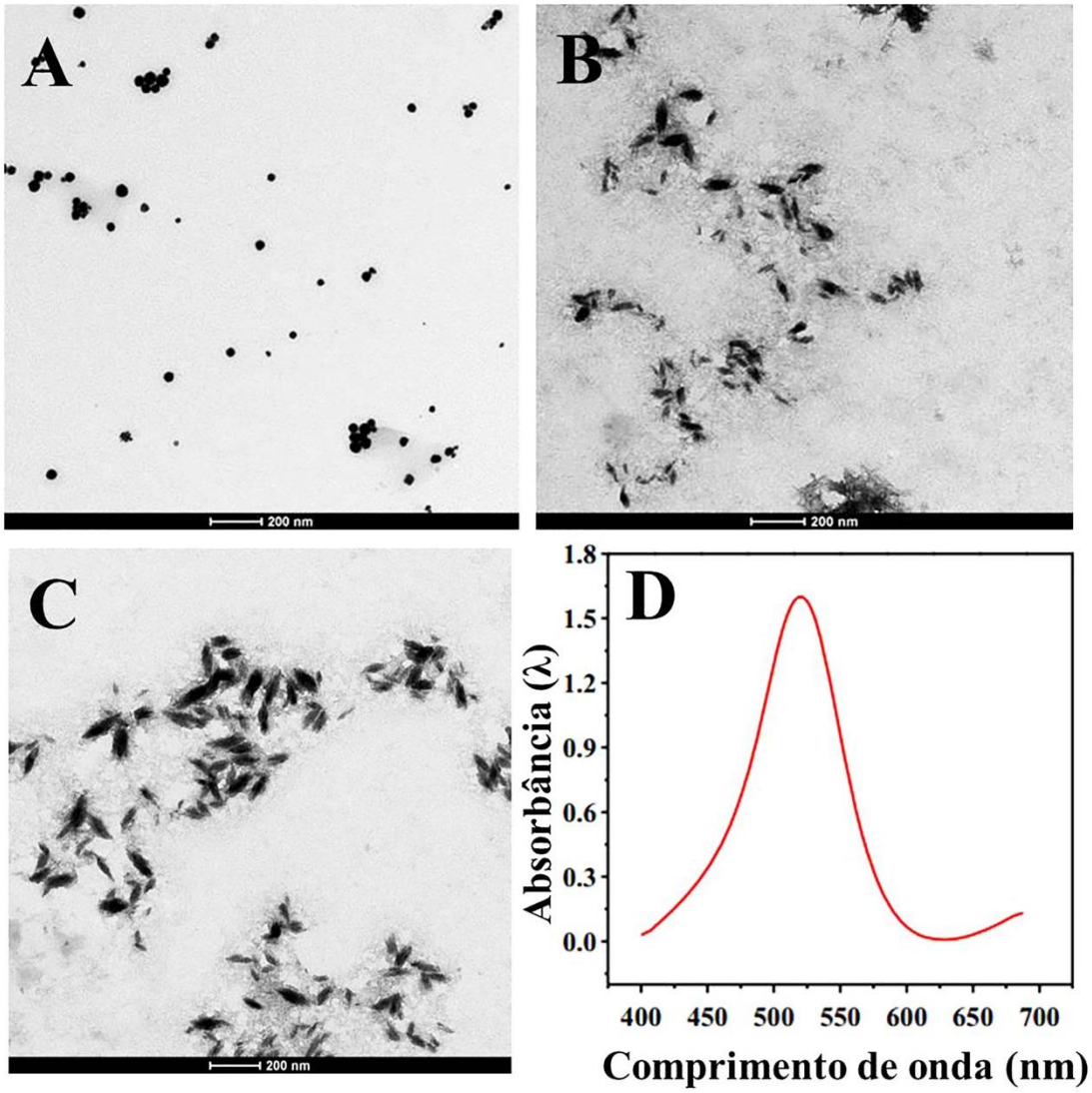


Figura 16. (A) Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das nanopartículas de Ouro. (B) Imagens da TEM de HRP conjugados com AuNP. (C) Imagens da TEM de HRP-AuNPs disperses na matriz de PEG. (D) Espectro UV-vis das AuNPs.

A correlação entre a corrente dos picos de oxidação e redução foi proporcional à raiz quadrada da velocidade de varredura, indicando um processo controlado por difusão. A separação de cada pico também foi analisada, permanecendo constante até 60 mV, o que demonstra um processo reversível confinado pela superfície (Figura 17B e Figura 17C). Em adição, experimentos utilizando EIS foram realizados para investigar a resistência na taxa de transferência de cargas. A cinética na transferência de elétrons como a resistência na taxa de transferência de elétrons (Rct), resistência da solução (Rs), capacitância da dupla camada (Cd) e a transferência de massa (*W*, impedância de Warburg), podem ser extraídas dos dados da EIS (Figura 16E). Desta maneira, a resistência na transferência de elétrons (Ret, o diâmetro do semicírculo) do par redox e sua reatividade no microelétrodo de ouro (linha vermelha) e após a modificação com enzimas (linha preta) foi de 30 e 45 KΩ, respectivamente (Figura 16D), o que significa que a resistência aumentou com as camadas HRP-AuNPs-PEG depositadas no topo do microelétrodo. Este resultado está de acordo com o esperado, pois com adeposição da enzima aumentou-se a camada depositada sobre o eletrodo, aumentando assim o caminho para a transferência eletrônica.

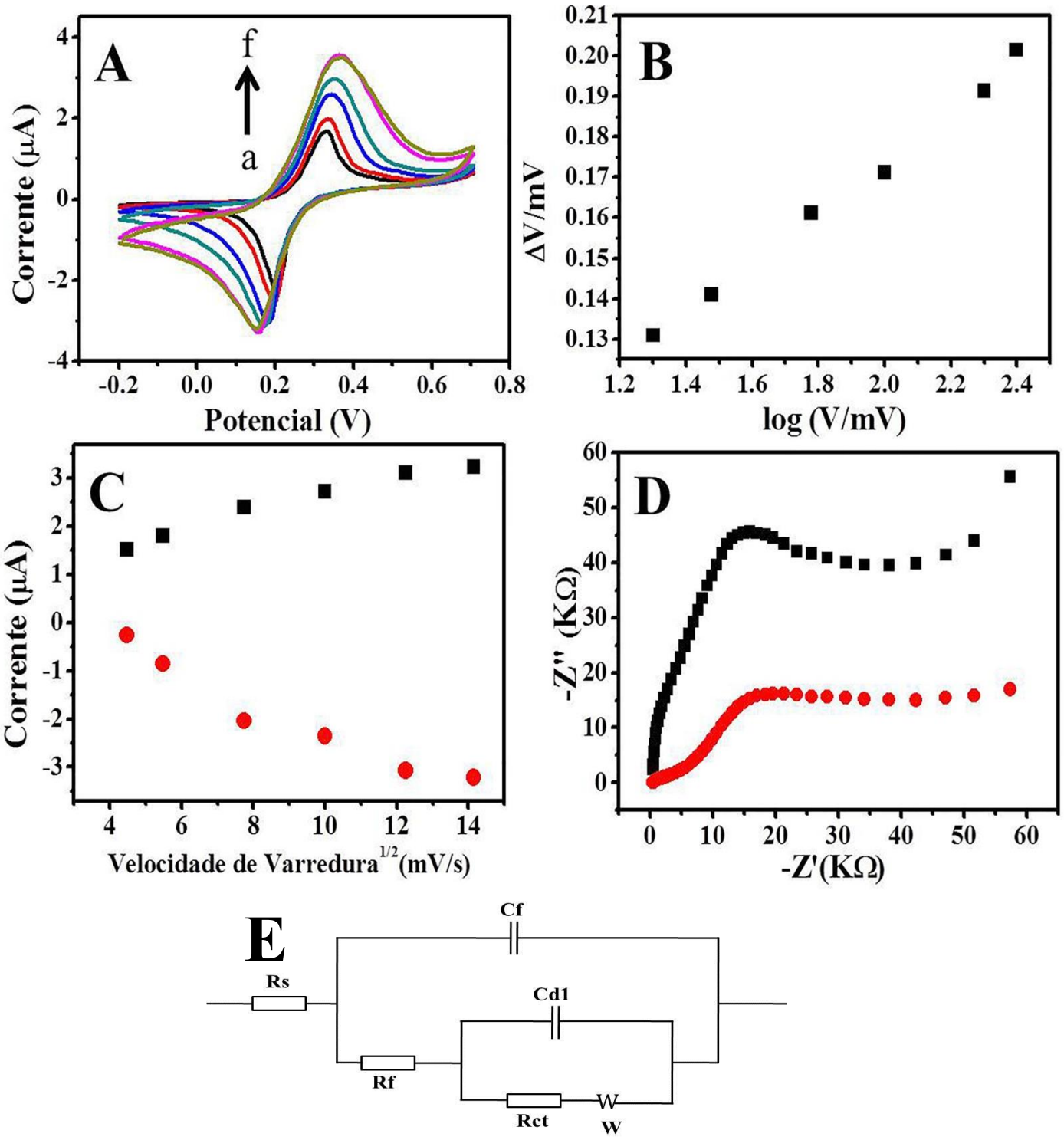


Figura 17. (A) Voltametria cíclica dos eletrodos de HRP-AuNP-PEG em diferentes velocidades de varredura (a–f: 20, 30, 60, 100, 200, 250 mV/s) na presença de 0,5mM Fc em 10mM PBS (pH 6,5). (B) Separação dos picos em função o potencial da velocidade de

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.

4.1.2.2.Detecção eletroquímica de ROS por biossensores enzimáticos

Na Figura 18A é possível avaliar as voltametrias cíclicas de AuNPs-PEG na ausência e presença da HRP conjugadas com AuNPs. A incorporação de enzimas conjugadas com AuNPs e PEG aumentou a corrente quando comparados somente com a resposta para PEG-AuNPs (Figura 18A). Esta mudança no sinal é devido a incorporação de enzimas eletroquimicamente ativas conjugadas com AuNPs na matriz de PEG. Por conseguinte, um aumento na redução da corrente foi obtido após a adição de H_2O_2 na célula eletroquímica contendo os microelétrodos, o que indica redução e difusão de H_2O_2 pela matriz de PEG. Em contraste, eletrodos contendo apenas PEG não apresentaram mudanças na corrente após adição de H_2O_2 (Figura 18A), confirmando assim que a HRP acentua a redução de H_2O_2.

A curva de calibração do biossensor HRP-AuNPs-PEG foi realizada através da adição de concentrações conhecidas de H_2O_2 (1, 5, 10, 20, 50 e 100 mg/mL), na célula eletroquímica com monitoramento da redução na corrente por meio da voltametria cíclica na faixa de potencial de -0,8 a +0,8V. O H_2O_2 adicionado é capaz de se difundir através do PEG e reagir com a HRP encapsulada dentro da matriz (Figura 18B). Na Figura 18C é possível observar a curva de calibração para a detecção de peróxido de hidrogênio O limite de detecção H_2O_2 calculado foi de 0,01 µM (R^2 = 0,991). A sensibilidade do sensor foi de 18,5 nA µM/mm² e a estabilidade do complexo HRP-AuNP-PEG foi verificar no intervalo

de duas semana através da adição de 20 µM de H_2O_2 dentro da célula eletroquímica contendo o biossensor (Figura 18E) com um coeficiente de variação (RSD) de 2,5%.

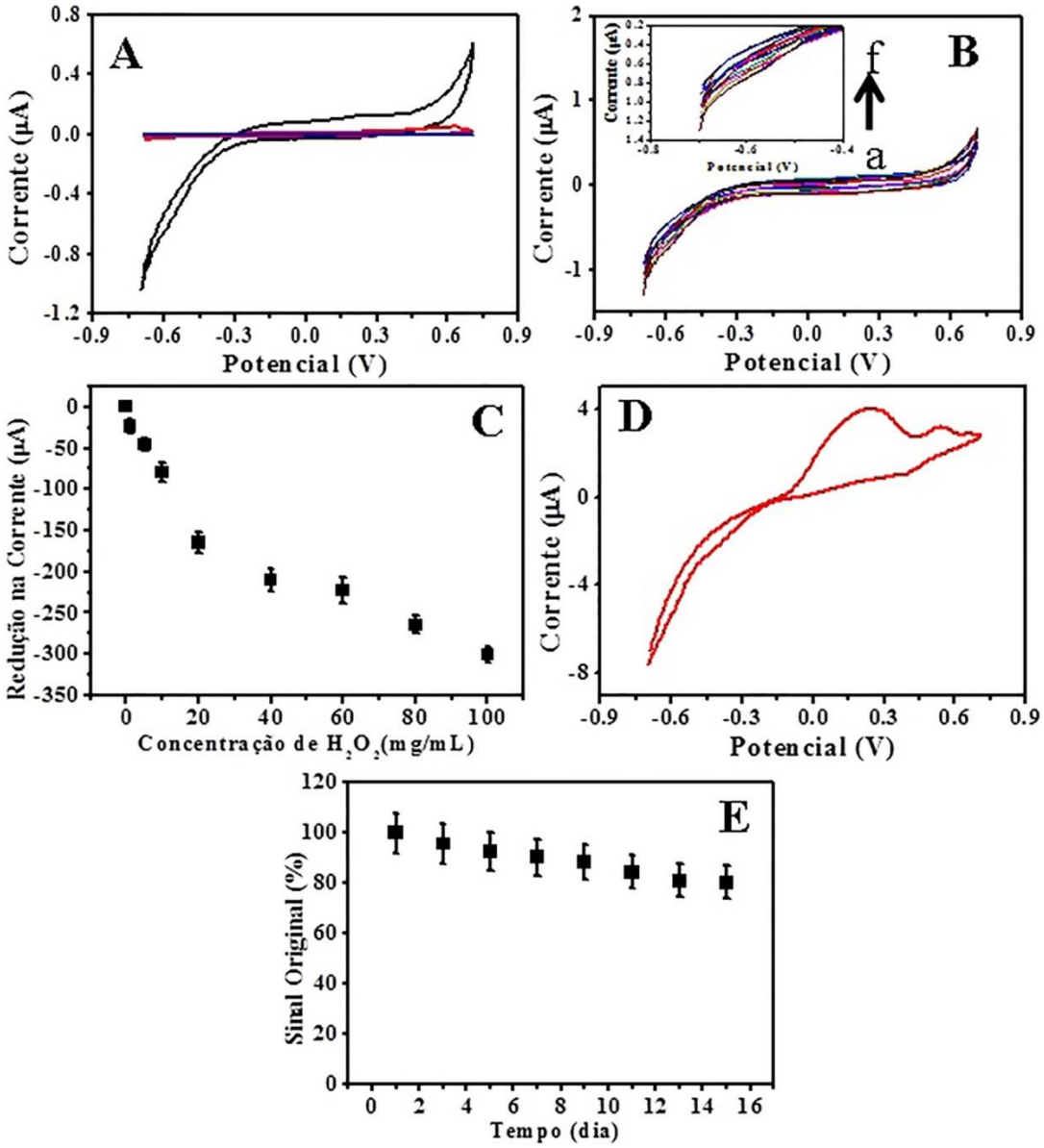


Figura 18. (A) VC de PEG (linha azul), AuNP-PEG (linha vermelha) e HRP-AuNP-PEG(linha preta) polimerizadas no topo de eletrodos de Au na presença de 5 0mg/mL de H_2O_2. (B) VC dos eletrodos em função da concentração de H_2O_2 (a-f: 1, 5, 10, 20, 50 e 100 mg/mL). (C) Curva de calibração obtida com valores 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.

Por conseguinte, para evitarmos interações inespecíficas com outros interferentes normalmente encontrados em fluidos fisiológicos, como ácido ascórbico e úrico, nós verificamos o efeito destes compostos interferentes em nosso sensor através de voltametria cíclica, conforme demonstrado na figura 18D, o biossensor foi capaz detectar H_2O_2 e não respondeu sob altas concentrações dos interferentes, pois, a redução da corrente para a detecção de peróxido de hidrogênio foi calculada no potencial de -0,4V e o pico do ácido ascórbico e ácido úrico são aparentes nos potenciais de 0,2V e 0,6V respectivamente.

Logo podemos notar que não houve interferência na detecção de H_2O_2 na presença de tais compostos o que corrobora que nosso eletrodo é sensível, reprodutível e seletivo para se determinar peróxido de hidrogênio (Figure 18E). A menor concentração de H_2O_2 que o biossensor pode detectar foi de 0.01 µM (R^2 = 0,991). A sensibilidade do sensor foi de 18,5 nA µM/mm² e a estabilidade do complexo HRP-AuNP-PEG foi verificar no intervalo de duas semana através da adição de 20 µM de H2O2 dentro da célula eletroquímica contendo o biossensor (Figura 18E).

Tabela 2. Comparação na performance analítica de biossensores para detecção de H_2O_2

H_2O_2 Biossensor	Limite de Detecção (mM)	Referência
HRP-AuNP-PEG	0.001	Este trabalho
HRP-AuNP	0.003	[169]
HRP-Ferroceno	2.32	[170]
HAP-α-zirconium phosphate/GC	12	[171]
HRP-nano-Au-carbon ceramic	61	[172]
HRP-DNA/GC	25	[173]

Quando comparado com biossensores similares encontrados na literatura, nosso sensor atingiu melhores valores de sensibilidades, estabilidade e limite de detecção; p.ex.: Amine et. al. [169], produziram um biossensor amperométrico através da conjugação de HRP com AuNPs com limite de detecção de 0,03µM e sensibilidade de 0,01µM; Goswami et. al.[170] Desenvolveram um bioeletrodo usando a HRP conjugada com Fc com um limite de detecção de 2,32 µM e sensibilidade de 150 µA/mM/cm².

Após avaliar a especificidade para a detecção de H_2O_2, o biossensor HRP-AuNP-PEG foi utilizado em amostras biológicas reais. As células da linhagem PC3foram escolhidas. Resumidamente, as células foram depositadas na superfície dos eletrodos contendo o complexo HRP-AuNP-PEG (Figura 19A e 19B) através da adição de colágeno ao redor do eletrodo contendo PEG, o uso de colágeno auxilia na adesão celular precisa ao redor do eletrodo e evita adesão celular na matriz polimérica. O dispositivo foi mantido a 37°C durante todo o experimento e aproximadamente 100000,00 células foram cultivadas dentro da célula eletroquímica durante o experimento para detecção de peróxido de hidrogênio.

A liberação de H_2O_2 foi detectada através de voltametria cíclica pela difusão do peróxido de hidrogênio através da matriz polimérica, as medidas foram realizadas a cada 20 minutos no intervalo de 2,5 horas. O Aumento na corrente de redução foi observado logo após a primeira medida, demonstrando assim uma constante produção de H_2O_2 pelas células (Figura 19C). A redução na corrente não saturou após 2,5h de experimento, comprovando a viabilidade e estabilidade do sensor, a qual não foi comprometida por adsorção de proteínas não específicas e outros subprodutos do metabolismo liberados pelas células PC3.

Em adição, este foi o primeiro biossensor conjugado com AuNPs e matrizes poliméricas para detecção de peróxido de hidrogênio por células cancerígenas, trabalho similares encontrados na literatura detectaram espécies reativas de oxigênio por células imunes [171-173]. Contudo o biossensor fabricado possui melhores resultados na sensibilidade, estabilidade e limite de detecção (Tabela 2).

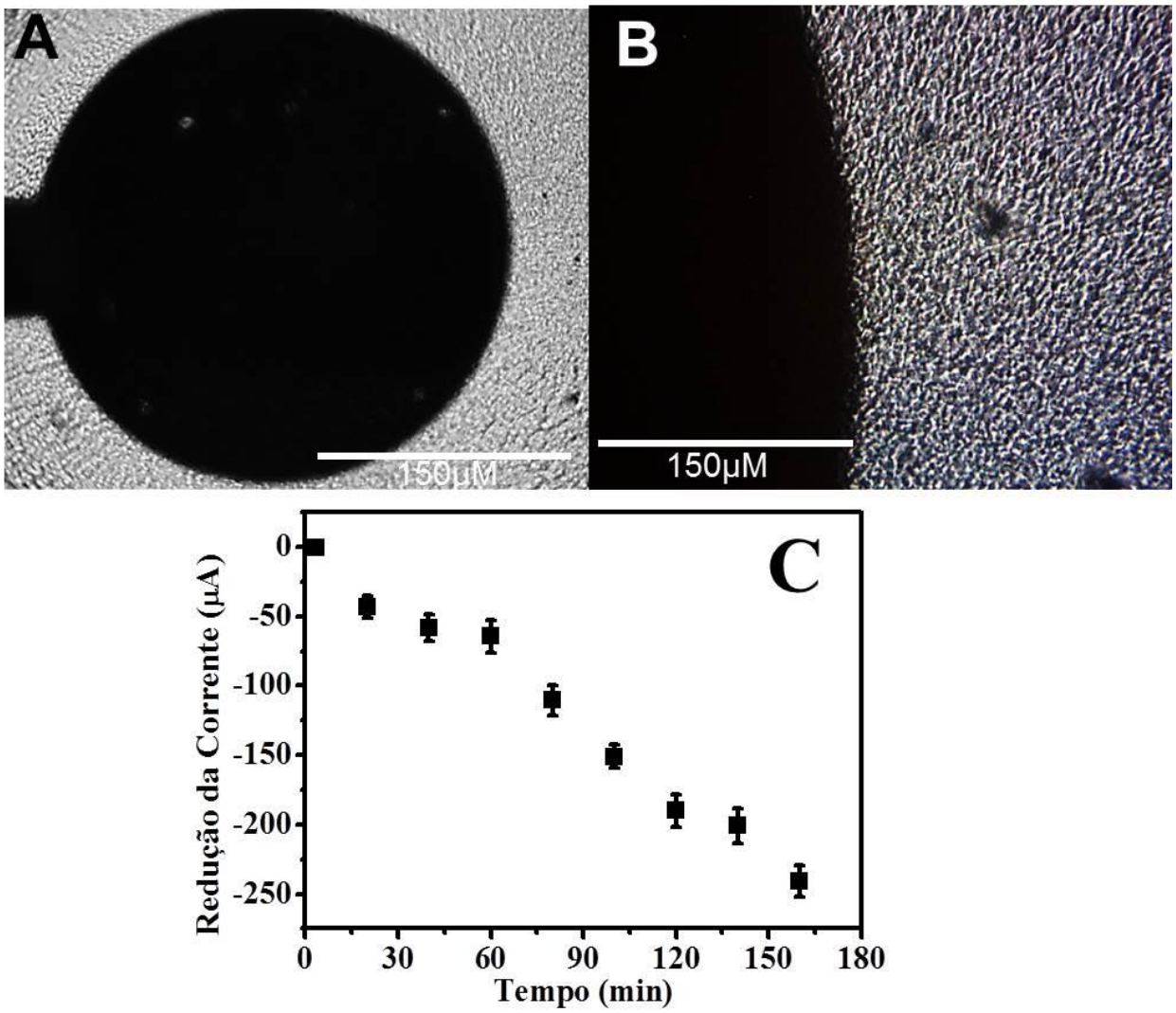


Figura 19. Superfície do sensor (A) Microscopia óptica 10x de células PC3 aderidas no topo de eletrodos contendo HRP-AuNP-PEG (B) Microscopia óptica 40x de células PC3 aderidas no topo de eletrodos contendo HRP-AuNP-PEG e (C) Redução absoluta da corrente em função de H_2O_2 liberados pelas células

4.2. Biossensores aptaméricos

Nesta seção estão apresentados os resultados obtidos a partir da detecção de importantes biomarcadores proteicos liberados por células prostáticas (benignas e neoplásicas), sendo uma nova proposta para o monitoramento e diagnóstico de CaP.

4.2.1. Caracterização do eletrodo de silício recoberto com ouro

A segunda parte do projeto teve como foco de estudo o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos baseados em aptâmeros para detecção e monitoramento de importante proteínas biomarcadoras para o CaP (PSA, VEGF e MUC1).

A superfície do silício foi analisada por MEV e EDS para assegurar a formação de uma camada de ouro uniformemente dispersa sobre o substrato, esta camada possui uma função dupla, primeiramente ela atua como eletrodo de trabalho nas análises eletroquímicas e também serve como substrato para ancorar os aptâmeros tiolados em sua superfície. Figura 20A representa a análise de MEV do wafer puro de silício (região cinza escuro) parcialmente recoberto com ouro, onde é possível observar a formação de uma camada fina uniformemente distribuída sem espaços vazios ou aglomerados de ouro sobre a superfície (região cinza clara). A Figura 20B confirma, por meio da varredura de EDS, a presença de átomos de ouro na superfície através dos picos no espectro de emissão eletromagnética do ouro e do silício.

Em adição a caracterização por imagem, VC foi realizada para avaliar a eletroatividade da superfície recoberta de ouro, a figura 20C demonstra varredura de VC típica para a qual podemos notar a presença de dois picos, o primeiro em 1,0 V e o segundo

na região catódica em 0,5 V, picos estes característicos da superfícies de ouro, o que corrobora os resultados obtidos por microscopia.

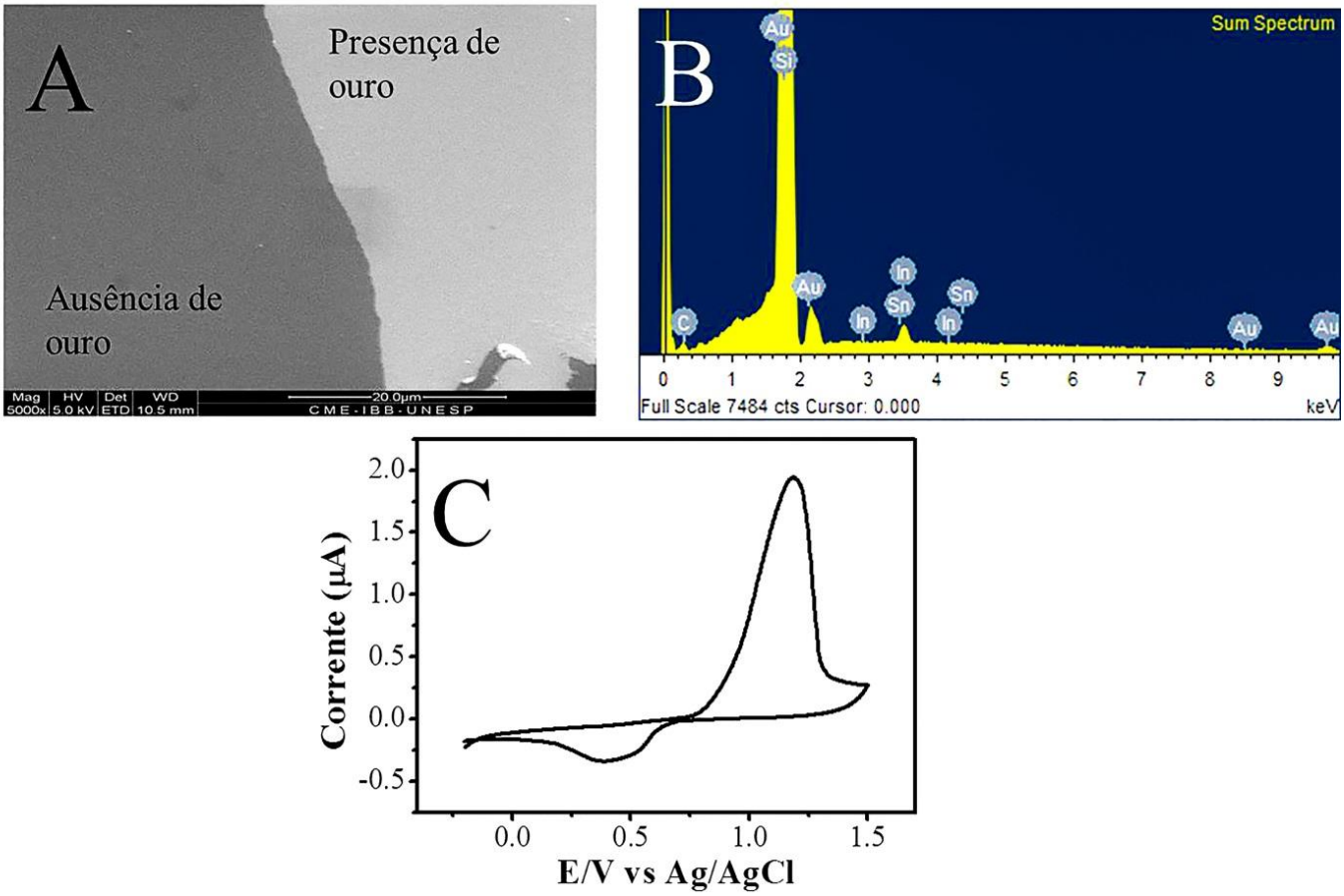


Figura 20. (A) MEV da superfície de silício recoberto com ouro. (B) EDS da superfície de silício recoberto com ouro. (C) VC do eletrodo de silício recoberto com ouro com velocidade de varredura de 50mV/s entre os potencial -0,2V – 1,5V em 10 mM PBS.

4.2.2. Caracterização eletroquímica e detecção de PSA, VEGF e MUC1

A imobilização dos aptâmeros na superfície do eletrodo foi realizada por reação química coordenada na superfície, do eletrodo, através do uso de ligantes tióis nas regiões terminais dos aptâmeros, que se ligam à superfície de ouro e formam monocamadas auto-organizadas (SAMs). Após a imobilização dos aptâmeros, a superfície foi passivada por

meio da técnica de preenchimento com MCH, esta técnica é amplamente utilizada no trabalho de biossensores com DNA tiolado, na qual o MCH recobre a área do eletrodo ausente de aptâmeros (Figura 21), evitando assim a adsorção de proteínas inespecíficas na superfície do eletrodo, o que poderia ocasionar uma redução no sinal eletroquímico [174].

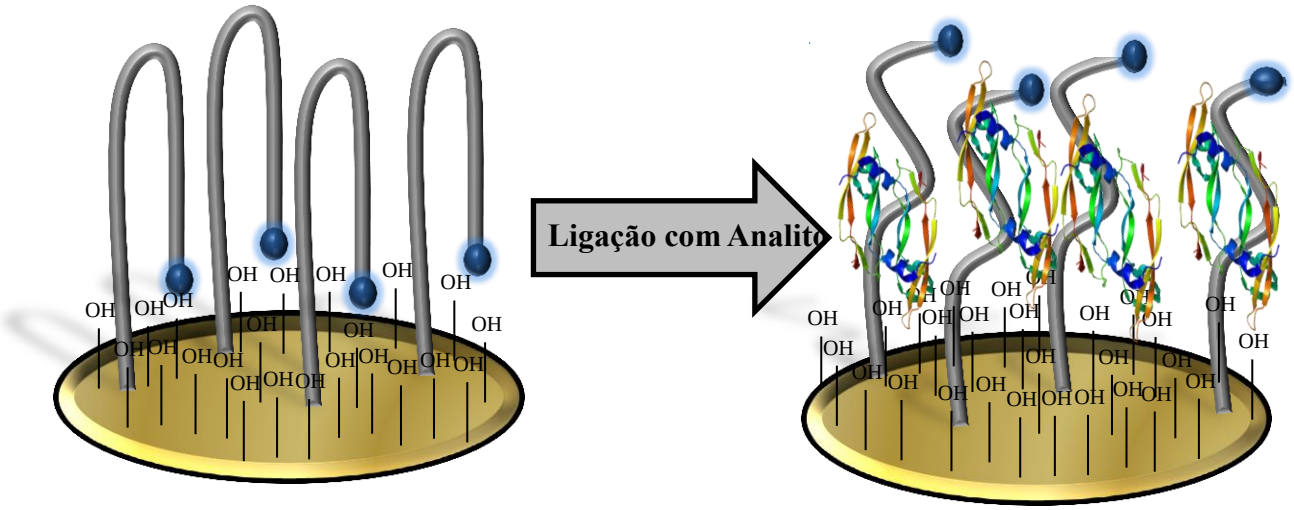


Figura 21. Esquema da técnica de preenchimento da superfície utilizando MCH (Autoria própria).

O comportamento eletroquímico do sensor aptamérico foi avaliado por VOQ utilizando MB como para redox. A escolha do MB foi devido a possibilidade da conjugação com os aptâmeros, sendo, o MB, um par redox comumente utilizado no desenvolvimento de aptâmeros para detecção de diferentes marcadores como proteínas e citocinas. Anteriormente a detecção das proteínas-alvo (PSA, VEGF e MUC1) a estabilidade do sensor foi avaliada por VOQ em 10 mM em PBS em função do tempo, para se verificar a sensibilidade do sinal e o decaimento do pico. As figuras 22A e 22B

representam a estabilidade do sinal do sensor para PSA e VEGF, respectivamente, ao longo do tempo. A variação do pico foi estabilizada após 1 hora de experimento a supressão de sinal foi em torno de 10%, sendo estes valores comparáveis com outros tipos de biossensores eletroquímicos baseados em aptâmeros [64, 73, 75].

Posteriormente a otimização da estabilidade do sensor, curvas de calibração foram realizadas para quantificar o limite de detecção e a faixa de detecção linear para PSA e VEGF através da adição de concentrações conhecidas da proteína-alvo (faixa entre 5 mg/mL e 100 ng/mL). A figura 23A, representa o gráfico de VOQ para a curva de calibração do aptâmero para PSA, onde a redução do sinal foi diretamente proporcional ao aumento na concentração de PSA na célula eletroquímica. A Figura 23B apresenta a redução do sinal devido à ligação do PSA nos aptâmeros, sendo calculada como: $\Delta I = I_{pb} - I_{pa}$ (ΔI = variação no pico da corrente, I_{pb} = corrente de pico anterior a adição da proteína e I_{pa} = corrente de pico após adição de proteína), a variação do pico foi convertida em porcentagem de supressão do sinal (ss).

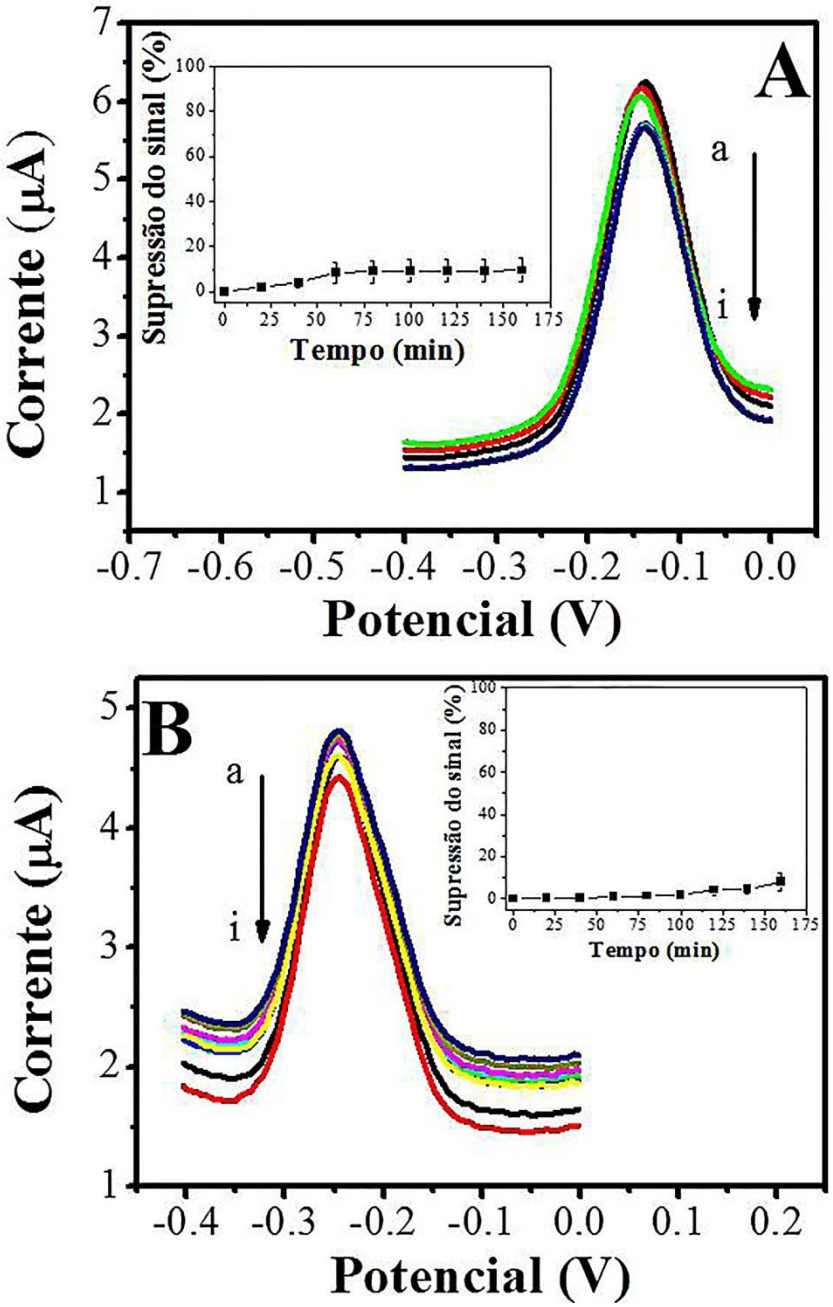


Figura 22. (A) VOQ da estabilidade do aptâmero para PSA ao longo do tempo (a-i: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 minutos) vs Ag/AgCl com amplitude de sinal de 40 mV e 60 Hz de frequência. (B) VOQ da estabilidade do aptâmero para VEGF ao longo do tempo (a-i: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160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

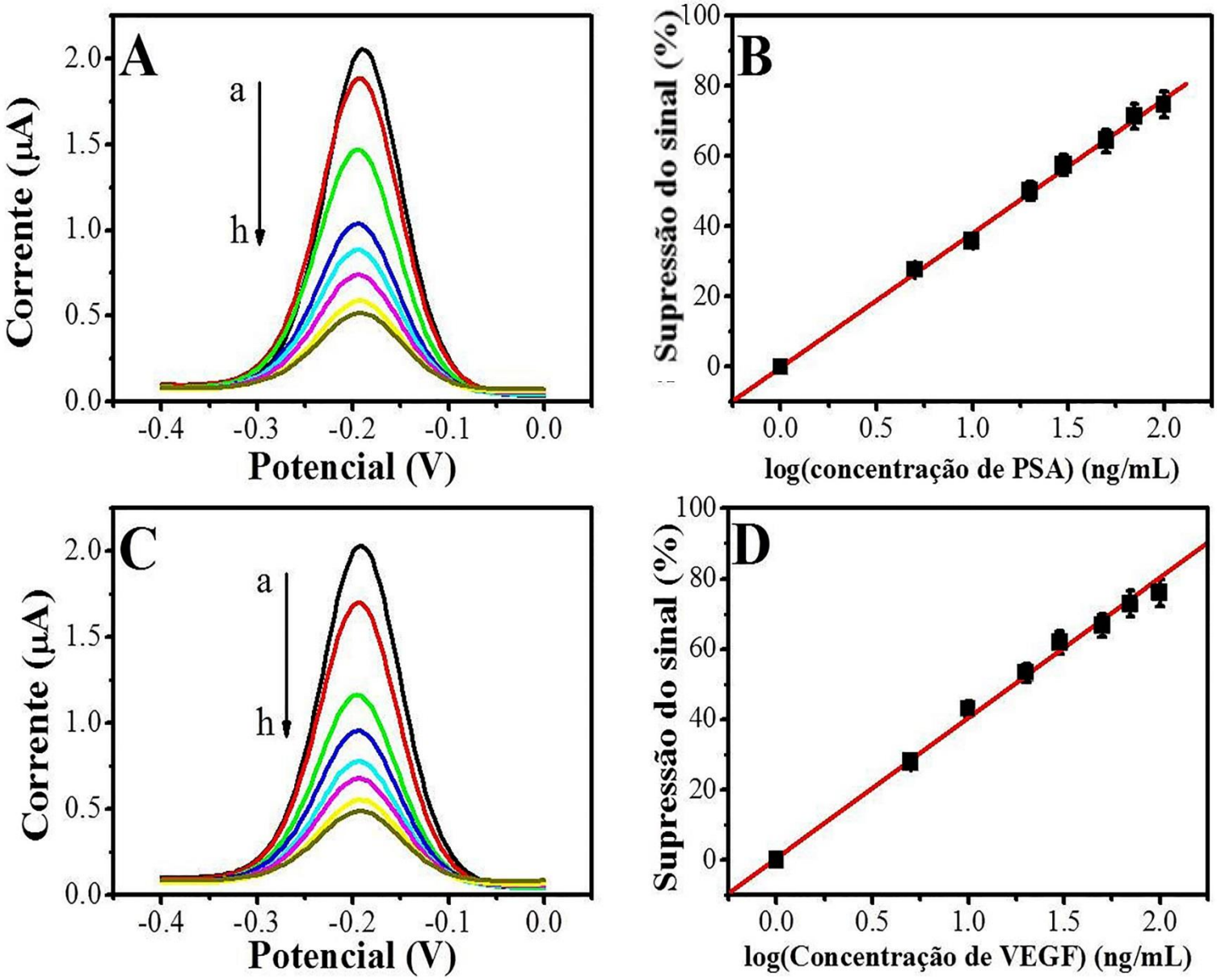


Figura 23. (A) VOQ da estabilidade do aptâmero para PSA ao longo do tempo (a-i: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 minutos) na faixa de potencial entre 0,0 e -0,5V com amplitude de sinal de 40 mV e 60 Hz de frequência. (B) VOQ da estabilidade do aptâmero para VEGF ao longo do tempo (a-i: 0, 20, 40,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

A ss para PSA (Figura 23B) aumentou linearmente com a concentração de PSA, onde: SS = 0,09 + 38,02 x (R^2= 0,997) e o limite de detecção foi 0,08 ng/mL com linearidade até 100 ng/mL, desta forma esta plataforma permite a detecção de PSA em amostras clínicas e no monitoramento de células de CaP, pois a variação em CaP normalmente é usualmente maior que 4 ng/mL.

Paralelamente a detecção de PSA, o aptâmero para VEGF foi analisado seguindo os mesmos protocolos descritos acima. A figura 23C demonstra a VOQ da curva de calibração para VEGF, onde foi possível verificar redução no sinal para cada concentração de proteína utilizada. A figura 23D apresenta o aumento na ss proporcional a concentração de VEGF, onde: ss = 1,67 + 38,6 x (R^2 = 0,992) com limite de detecção de 0,15 ng/mL com linearidade até 100 ng/mL. Este resultado é comparável com outros sensores para detecção de VEGF, demonstrando a viabilidade do sensor para detecção VEGF liberados por CaP.

4.2.3. Detecção de PSA, VEGF e MUC1 por células prostáticas

A estratégia no preparo do biossensor aptaméricos consistiu no monitoramento em tempo real de diferentes proteínas liberadas pelo metabolismo das células prostáticas (PSA, VEGF e MUC1). A utilização de diferentes linhagens de células da prostáta nos permitiu traçar o perfil do metabolismo especifico das linhagens de CaP: LNCaP e PC3 em comparação com uma linhagem benigna (RWPE-1). A figura 24 representa o design experimental para o experimento envolvendo células prostáticas, onde após a incubação dos aptâmeros sobre o eletrodo, uma membrana foi adicionada servindo como substrato para fixação das células, impedindo que as mesmas colonizassem a superfície do eletrodo, o que poderia desestabilizar a monocamada de aptâmeros e comprometer as análises

eletroquímicas. A membrana utilizada possuía poros pequenos o suficiente para impedir a passagem de células, porém permitia a passagem das proteínas-alvo de nosso estudo (PSA, VEGF e MUC1).

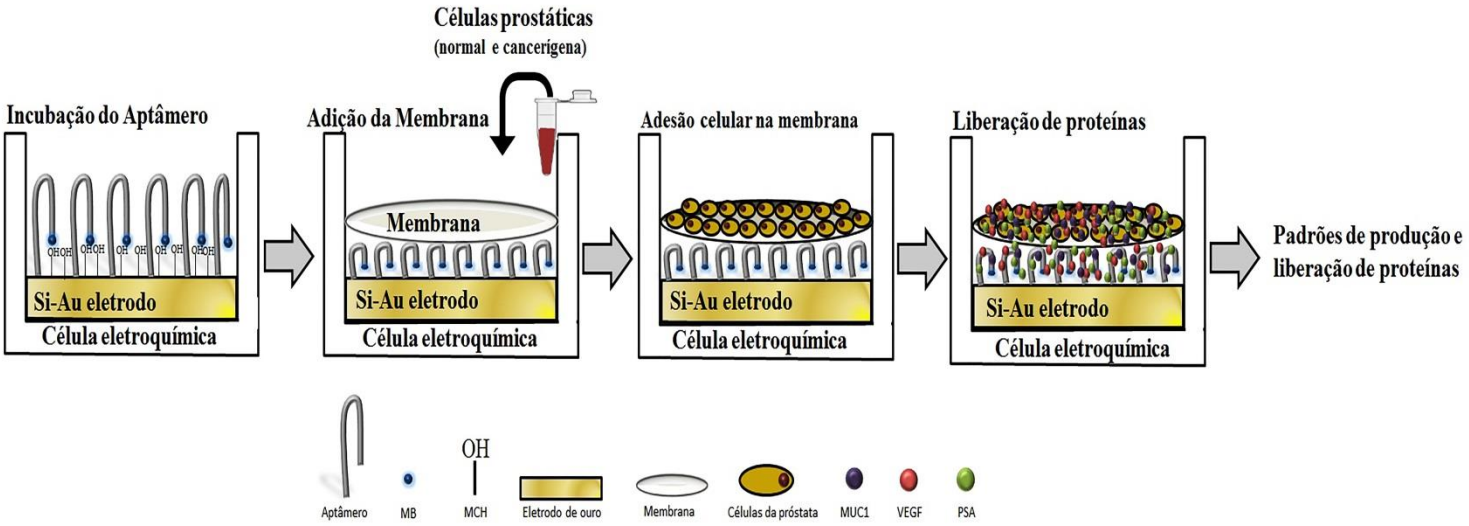


Figura 24. Visão geral do design experimental do biossensor aptamérico para detecção e proteínas liberadas por células prostáticas

A utilização de linhagens diferentes de células cancerígenas prostáticas é extremamente importante para o desenvolvimento de novas ferramentas para monitoramento do CaP e análise clínica. As linhagens utilizadas foram: PC3, LNCaP e RWPE-1. A linhagem PC3 é uma linhagem andrógena independente. Por sua vez, a linhagem LNCaP é andrógena dependente com menor atividade metastácia e a linhagem RWPE-1 consiste em células normais da próstata. Desta forma, o uso de biossensores aptaméricos permitiu a detecção específica pra cada proteína (PSA, VEGF e MUC1) para as três linhagens celulares (Figuras 25, 26 e 27).

O monitoramento de PSA (Figura 25) foi realizado por VOQ, a qual foi realizada 1 hora após a adição das células a fim de estabilizar os aptâmeros e reduzir instabilidades nas

medidas eletroquímicas. A figura 25A apresenta a VOQ para monitoramento de PSA liberado por RWPE-1, a figura 25B apresenta a ss devido à ligação do PSA liberado por RWPE-1 ao longo do tempo onde foi possível quantificar a liberação de aproximadamente 2 ng/mL no final do experimento, valor comparável à concentração de PSA encontrada no sangue de pacientes saudáveis [175]. Conforme esperado, no monitoramento de PSA liberado pela linhagem LNCaP (figuras 25C e 25D) foi observado uma expressão aumentada na liberação de PSA sendo de, aproximadamente, 5 ng/mL no final do experimento e em contra partida, a liberação de PSA por PC3 (Figuras 24E e 24F) foi praticamente nula (valores similares ao de estabilização do aptâmero).

Sendo assim, os padrões de liberação de PSA pelas linhagens utilizadas estão de acordo com as dinâmicas de PSA e podem ser associadas com a agressividade do tumor. A linhagem LNCaP são capazes de liberar altas concentrações de PSA em RPMI, sendo possível verificar uma ampla faixa de detecção na literatura com valores entre 0.1 – 110 ng/mL [176-177]. Em adição aos múltiplos resultados encontrados para liberação de PSA por LNCaP, nosso biossensor pode ser relacionado com experimento *in vivo* onde estímulos crônicos e agudos podem modular a expressão de PSA por célular cancerígenas [178-179]. Por sua vez, a não detecção de PSA por células PC3 era esperado e pôde ser correlacionado com a agressividade dessa linhagem celular devido à independência de andrógeno para sua proliferação [180-182].

O monitoramento da liberação de VEGF por células prostáticas estão demonstrados na figura 26. Conforme o esperado, a linhagem controle (RWPE-1) apresentou produção nula de VEGF (Figuras 26A e 26B) com a supressão de sinal sendo a mesma encontra no experimento de estabilidade do sensor. Por outro lado, LNCaP (Figuras 24C e 24D) e PC3 (Figuras 26E e 26F) apresentaram uma produção maior de VEGF com altos valores na

supressão do sinal no final do experimento o que pode ser convertido em liberação de 5 ng/mL para LNCaP e 30 ng/mL para PC3. A maior liberação de VEGF demonstra a o potencial metastático dessa linhagem em comparação com LNCaP (linhagem menos agressiva de CaP) [183-186]. A dinâmica da liberação de VEGF avaliada pelo nosso sensor está de acordo com resultados de trabalho prévios, onde uma alta expressão de VEGF é encontrada em paciente com metástase [187,188].

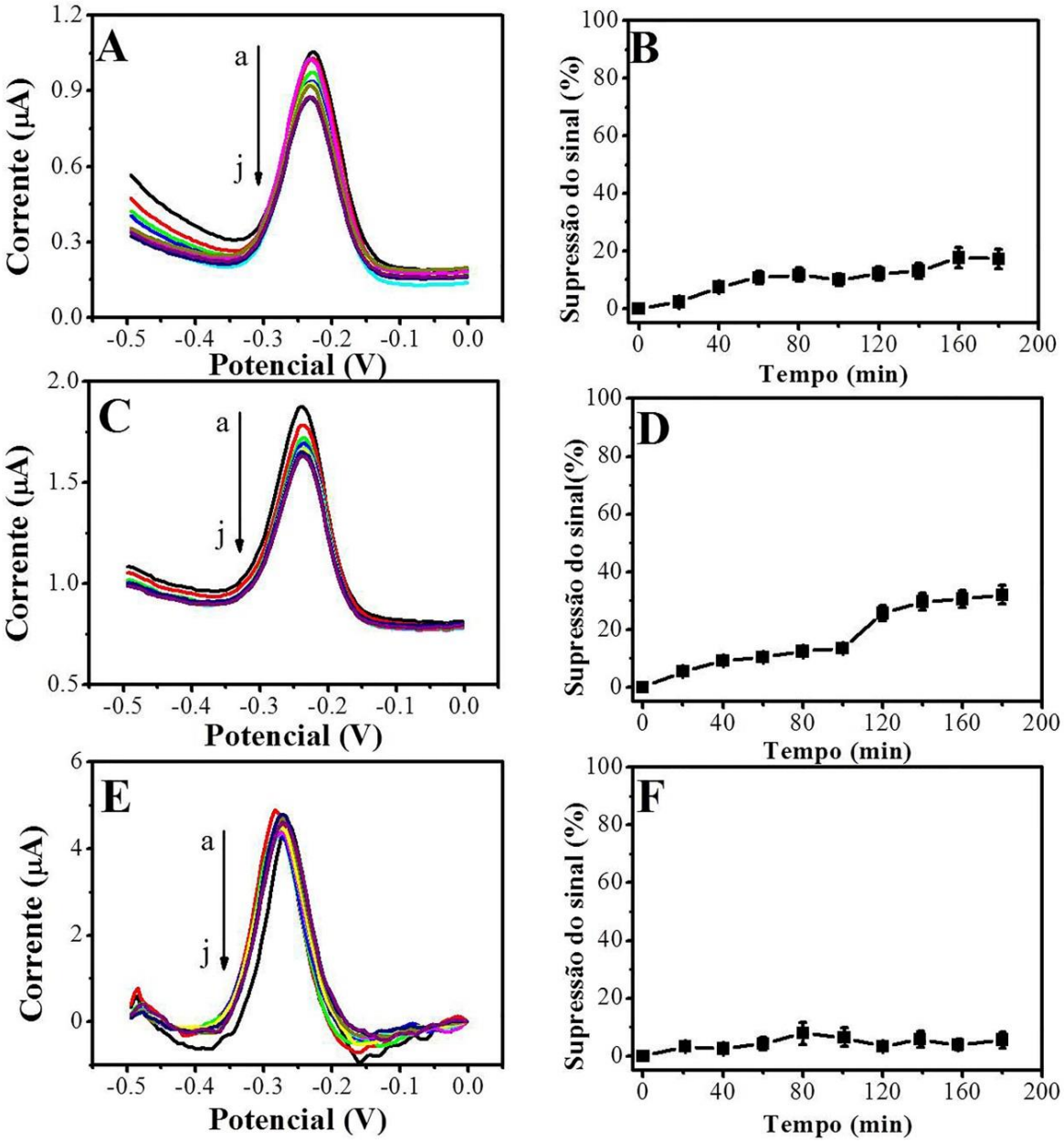


Figura 25. (A) VOQ vs Ag/AgCl da detecção de PSA liberado por células RWPE-1 ao longo do tempo. (B) supressão o sinal, em porcentagem, na redução do pico da VOQ pela liberação de PSA por células RWPE-1. (C) VOQ vs Ag/AgCl da detecção de PSA liberado por células LNCaP ao longo do tempo. (D) supressão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

Em adição ao uso de aptâmeros para monitorar VEGF, também utilizamos biossensores aptaméricos para detecção de MUC1, outro biomarcador importante para o CaP. A produção e liberação de MUC1 foi avaliada utilizado os mesmos procedimentos para a detecção de VEGF e PSA. A figura 27A e 27B apresenta o padrão na liberação de MUC1 pela linhagem RWPE-1, através da VOQ e a supressão do sinal, respectivamente. Após as 3 horas de experimento a ss encontrada foi relativamente maior que a variação da corrente em tampão (15% de ss) o que indica uma pequena produção de MUC1 por esta linhagem celular.

O padrão de liberação de MUC1 por linhagens celulares de CaP (LNCaP e PC3) diferiu em comparação com a RWPE-1. O monitoramento de MUC1 produzido por LNCaP (Figuras 27C e 27D) apresentou um decaimento no sinal após 40 minutos de experimento atingindo 30% de ss no após 3 horas de análise, o que indica uma produção aumentada de MUC1, a qual pode estar relacionada com a progressão do CaP[189].

Finalmente, o padrão na produção de MUC1 por células PC3 (Figuras 27E e 27F) diferiu das linhagens LNCaP e RWPE-1, apresentando redução no sinal logo após a primeira medida com redução de 45% do sinal no final do experimento, indicando uma produção maior de MUC1 que é proporcional à alta capacidade proliferativa da linhagem PC3.

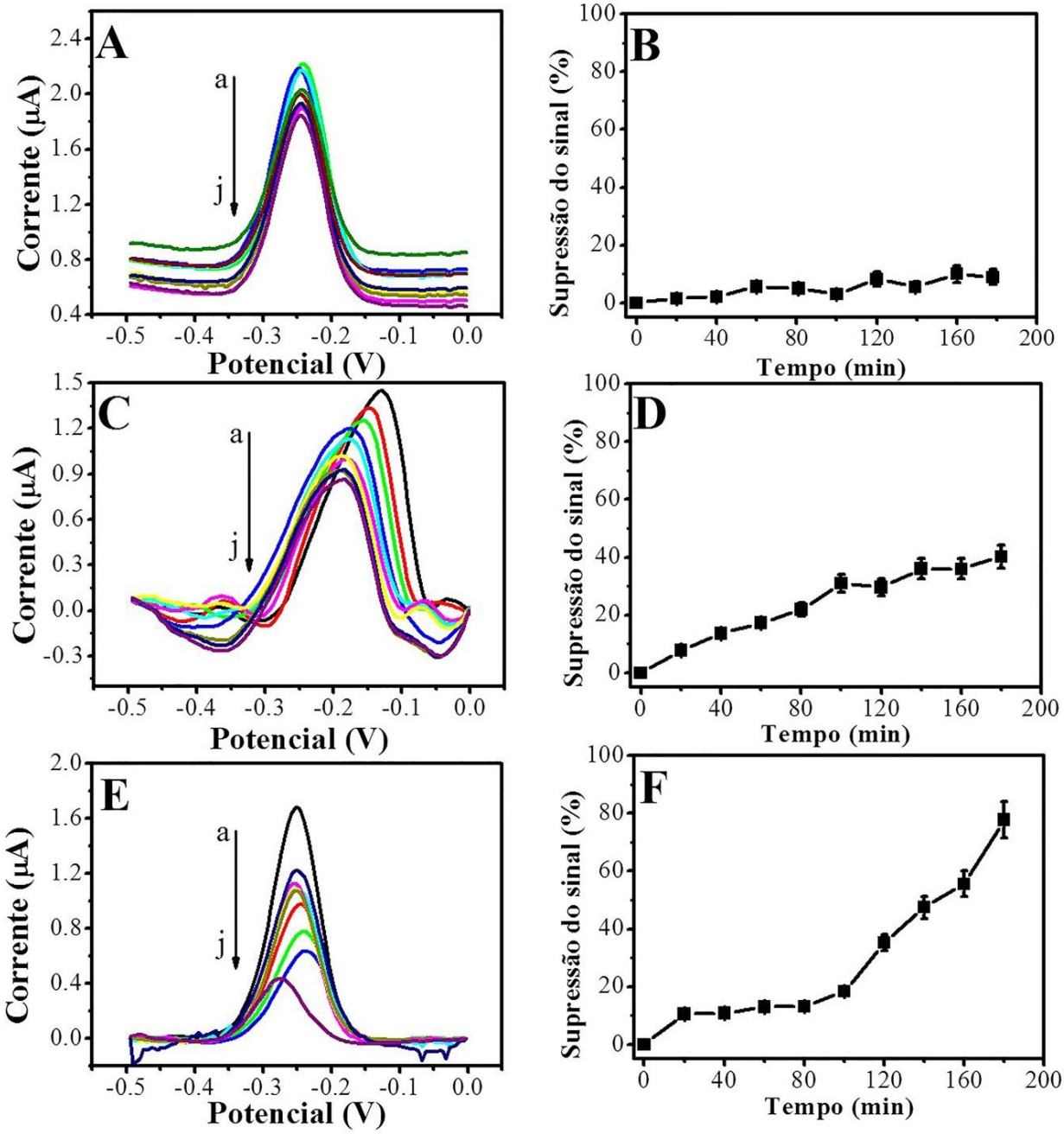


Figura 26. (A) VOQ vs Ag/AgCl da detecção de VEGF liberado por células RWPE-1 ao longo do tempo. (B) supressão o sinal, em porcentagem, na redução do pico da VOQ pela liberação de VEGF por células RWPE-1. (C) VOQ vs Ag/AgCl da detecção de VEGF liberado por células LNCaP ao longo do tempo. (D) supressão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

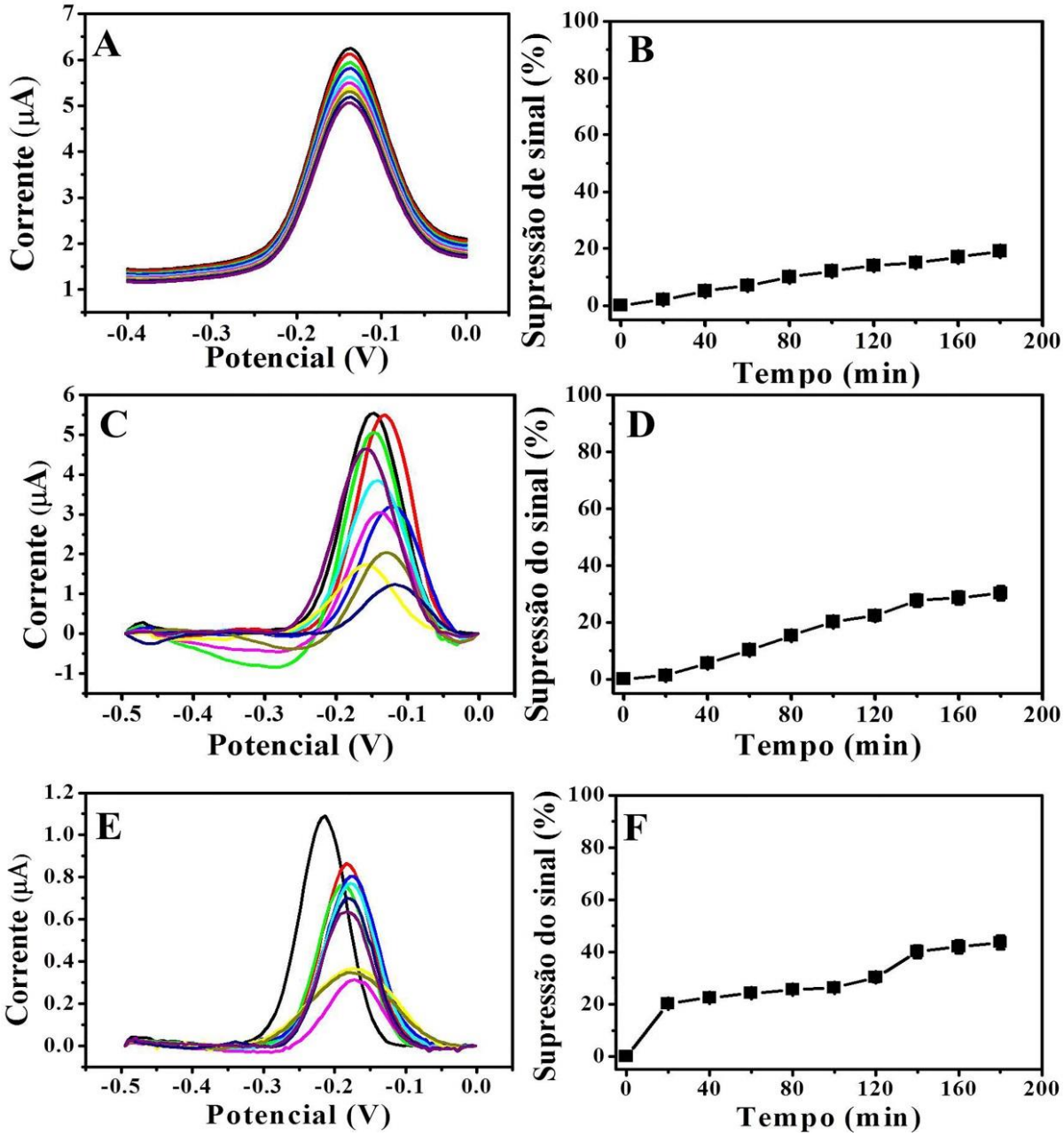


Figura 27. (A) VOQ vs Ag/AgCl da detecção de MUC1 liberado por células RWPE-1 ao longo do tempo. (B) supressão o sinal, em porcentagem, na redução do pico da VOQ pela liberação de MUC1 por células RWPE-1. (C) VOQ vs Ag/AgCl da detecção de MUC1 liberado por células LNCaP ao longo do tempo. (D) supressão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

Portanto, a utilização de biossensores aptaméricos nos permitiu detectar importantes biomarcadores proteicos liberados por células benignas e neoplásicas, sendo possível avaliar as diferenças nos padrões de produção em relação ao tipo celular utilizado (normal ou cancerígeno), fornecendo assim valiosas informações sobra a dinâmica do CaP e demonstrando-se uma plataforma com potencial uso para ensaios clínicos para detecção de monitoramento de CaP.

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.

8. Anexos

Relatório do trabalho realizado durante o doutorado-sanduíche na University of California, Davis, USA, sob orientação do Dr. Alexander Revzin



Desenvolvimento de biossensores para monitoramento do metabolismo celular

"Relatório das atividades desenvolvidas"

01/07/2014 – 01/07/2015

Bolsista: Bruno Pereira Crulhas

Nº Processo: Doutorado Sanduíche 246779/2013-6

Orientador no Brasil: Prof. Valber de Albuquerque Pedrosa

Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador no Exterior: Alexander Revzin

Universidade da Califórnia, Davis

RESUMO

O desenvolvimento de novos dispositivos para monitorar o metabolismo celular e o diagnóstico de doenças expandiu as pesquisas com biossensores que, aliados principalmente com a nanotecnologia, possibilitou a criação de novos elementos com alta sensibilidade de detecção, especificidade e capacidade de multiplexação em dispositivos portáteis para uso em diferentes áreas. Desta forma, o monitoramento dos produtos secretados pelas células, por meio de biossensores, possui grande interesse nas áreas biomédicas e de saúde, pois, as células transmitem uma ampla variedade de sinais químicos e físicos que são fundamentais para o diagnóstico clínico. Atualmente os estudos de biocompatibilidade e as respostas das células a estímulos físicos ou químicos são avaliados em dispositivos microfluídicos e meios eletroquímicos. Os biossensores são recorrentemente utilizados para a avaliação de diferentes doenças, porém, a construção de um biossensor integrado para monitorar estes compostos é um desafio. Sendo assim, o objetivo desta proposta é desenvolver uma plataforma de biossensor integrada para monitorar a detecção de multi-analitos em um dispositivo fabricado onde o microambiente celular pode ser definido com precisão, possibilitando a avaliação do metabolismo energético de culturas celulares no contexto da mimetização do microambiente celular e oferecendo novas perspectivas sobre os eventos moleculares do metabolismo.

Palavras-chave: biosensor, eletroquímica, biotecnologia, metabolismo celular.

Atividades desenvolvidas

Durante o período do relatório, o bolsista acompanhou diferentes projetos em andamento no laboratório e se adaptou a rotina de trabalho. Logo após o período de adaptação o trabalho foi especificamente relacionado com a produção de biossensores para monitoramento do metabolismo celular. Deste modo, dois diferentes projetos foram realizados. Todos os projetos envolveramm o uso de aptâmeros para a fabricação de biossensores.

O primeiro projeto se baseou na produção de biossensores para monitoramento da liberação de interferon-gamma bovino (BoIFN-γ). Por sua vez, o segundo projeto foi a utilização de plataformas microfluídicas para análise de fator de crescimento de hepatócitos (HGF).

Ambos os projetos (biossensor de IFN-γ bovino e plataformoas microfluídicas para detecção de HGF) foram uma novidade no laboratório e sendo assim, realizamos experimentos prévios, desde a escolha da sequência ideal para o aptâmero e sua otimização, além de testes prévios para verificar estabilidade e especificidade em tampão. Após otimização do processo de fabricação dos mesmos, os sensores foram utilizados em amostras clínicas.

Projeto 1: *Aptasensores para detecção de IFN-γ bovino*

Para este projeto, um artigo já foi escrito e experimentos adicionais foram realizados, conforme segue abaixo:

Electrochemical aptasensor for detection of bovine interferon gamma

Crulhas, B.P., Liu, Y., Shin, D., Stybayeva, G., Hill, A., Pedrosa, V.A., Revzin, A.

Abstract

Bovine tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by Mycobacterium tuberculosis (MTB) in which it is hard to identifying the pathological symptoms. Bovine interferon gamma (BoIFN-γ) released by T cells plays very important roles in early diagnosis of MTB infections. In this work, we developed for the first time a label-free electrochemical aptasensor for highly sensitive and specific determination of BoIFN-γ. Here we describe an electrochemical DNA aptasensor to detect bovine interferon-gamma (BoIFN)-γ. A thiolated IFN-γ-binding aptamer was conjugated with methylene blue (MB) and immobilized on a gold electrode by self-assembly. Binding of IFN-γ caused the aptamer hairpin to unfold, pushing MB redox molecules away from the electrode and decreasing electron-transfer efficiency. The change in redox current was quantified using square wave voltammetry (SWV) and was found to be highly sensitive to IFN-γ concentration. The limit of detection for optimized biosensor was 0.06 nM with linear response extending to 10 nM. This aptasensor was specific to BoIFN-γ in the presence of

several serum proteins, whole blood and bovine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Instead standard sandwich immunoassays, the aptasensor described was able to detect IFN-γ binding directly without the need for multiple washing steps and reagents. An electrochemical biosensor for simple and sensitive detection of BoIFN-γ in real time will have future applications in point of care blood analysis and infectious disease monitoring.

Keywords: Aptamers, Bovine IFN-γ, square wave voltammetry, biosensor

Introduction

Bovine tuberculosis (TB) is a chronic and infectious disease occurring in cattle, domestic small ruminants, humans and a wide range of wild mammals (1,2). TB is a complex and intractable disease caused by *Mycobacterium bovis,* (3) and leads to a high budget spent in several countries to promote preventive precautions, assessment and survey for infection spots (4).

In cattle, infected cows with typical clinical symptoms (e.g., diarrhea, poor body condition and decreased milk production) are only about ten percent (3). Typically, most part of infected animals would remain as unapparent carriers without developing clinical disease. However, this latent infection will be active, and eventually develop into TB disease if the organism of bovine has a low resistance to diseases (4).

Pathological signs are difficult to detect in early stage of infection (5). As an intracellular pathogen, M. *bovis* replicates inside reticuloendothelial cells and have adapted to survive and thrive within intramacrophage environment, using different strategies, including ways to subvert or incapacitate macrophage bactericidal activity and also able to

block and neutralize various macrophage functions, affecting various immune factors, including IFN-γ. (7)

Interferon gamma (IFN-γ) is a cytokine produced primarily by activated T lymphocytes and natural killer cells in response to mitogen or antigen stimulation (8, 9, 10). At the early phase of TB infection, bovine IFN-γ (BoIFN-γ) level released in response to specific antigen increases significantly (11,12). Therefore, BoIFN-γ produced by T cells can be used as a good indicator for early diagnosis of TB infection (13). Moreover, using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed to detect BoIFN-γ (14), but ELISA has low detection sensitivity and it is labor-intensive and time-consuming method.

Furthermore, it is important to enhance new methodologies for precise detection of BoIFN-γ, thereby, with evolution of nanotechnology; microfabrication and biotechnology is possible to engineer affinity probes from nucleic acids (DNA or RNA), known as aptamers (15). Aptamers can be assembled in electrochemical biosensors like Antibody-based biosensors (10).

Aptamers-based biosensors own more advantages than antibody-based biosensor include low cost, stability, reusability, and affinity. Aptamers to detect a wide range of analytes (e.g., cytokines, growth factors and hormones) by using several electrochemically active labels (e.g., redox compounds, enzymes, or metal nanoparticles), have been reported in literature (10, 16-23)

Therefore, with urgent need to generate more sensitive, rapid, and cost-effective means of diagnosing M. *bovis* infection in cattle, our paper describes a new platform to detect and monitoring BoIFN-γ using self-assembly aptamer hairpin on gold electrode for electrochemical sensing (figure 1.)

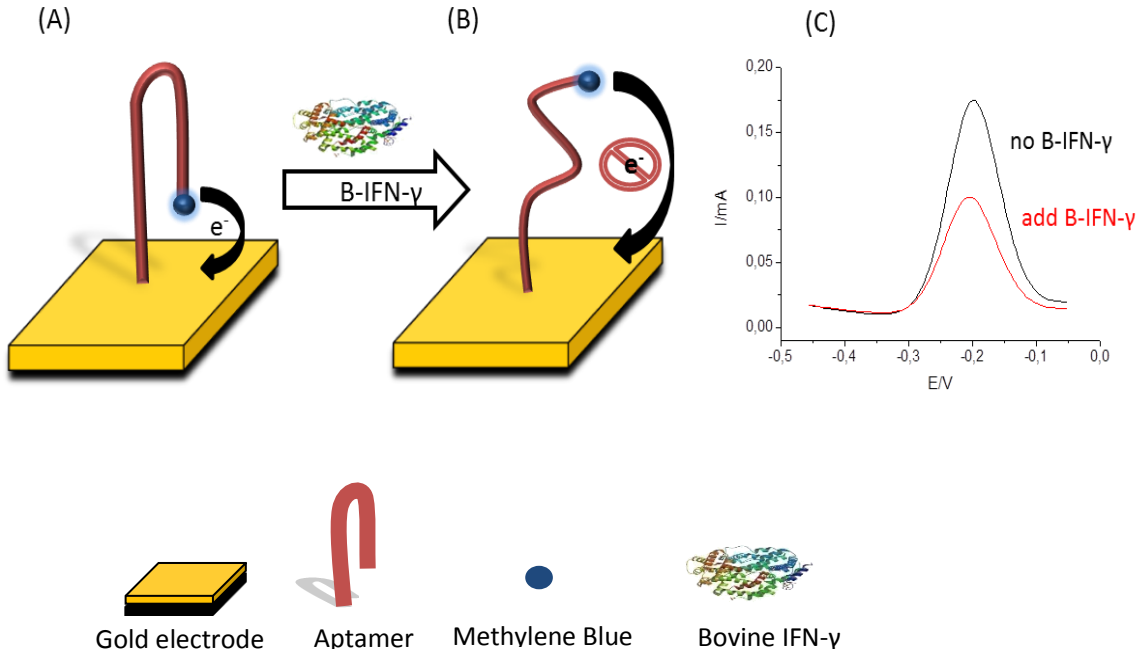


Figure 1. Scheme of B-IFN-γ aptamer-based electrochemical sensor. (A) Self-assembled hairpin structure, (B) Hairpin changed conformation after binding with B-IFN-γ, (C) Square wave voltammetry technique to measure differences in faradaic current with and without B-IFN-γ.

Materials

4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), sodium bicarbonate (NaHCO3), magnesium chloride (MgCl2), potassium chloride (KCl), sodium chloride (NaCl), 6-mercapto-1-hexanol (MCH), tris-(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP), bovine serum albumin (BSA) (98%) and Lectin from Phytolacca

americana (pokeweed) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Methylene blue (MB), carboxylic acid, succinimidyl ester were purchased from Biosearch Technologies, INC. (Novato,CA). Cell culture medium RPMI 1640 (1×, with L-glutamine;VWR) was supplemented with fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin purchased from Invitrogen. Recombinant bovine IFN-γ was purchased from R&D systems (Minneapolis, MN). The 19-mer BoIFN-γ-binding aptamer sequence (IDT Technologies, San Diego, CA) was as follows: 5′/5AmMC6T/-TTGCCCAAGCTGGTTATCA-SH-3′. Aptamer was modified at 3′-terminus with C6-disulfide linker for binding to gold electrode and at 3′-end with an amine group for redox probe (MB) conjugation. 10 mM of HEPES buffer was used to dissolve aptamer (pH 7.4 with 150 mM NaCl) and this buffer was also employed in all Bovine IFN-γ sensor experiments (SPR and electrochemical experiments).

Conjugating of Redox Labels to Aptamers

MB-tagged aptamer was prepared using a similar procedure described by Plaxco and co-workers (23). Briefly, NHS-labeled MB was chemically conjugated to 3′-end of an amino-modified DNA aptamer through succinimide ester coupling. MB-NHS (1 μmol) was dissolved in 10 μL of DMF/50 μL of 0.5 M NaHCO3 and then added to 10 μL of 200 μM aptamer solution, stirred, and allowed to react for 4 h at room temperature in the dark. After reaction, the sample was filtered using desalting collum a centrifugal filter (Millipore, Amicon Ultra 3K 0.5 mL) in order to purify and concentrate MB-modified aptamers. The stock aptamer solution (50 μM) was stored at -20 °C.

Coupling of aptamers in gold electrode

The BoIFN-γ sensor was fabricated using a gold coated silicon wafer as working electrode with a thickness layer of 1000Å (LGA Thin Films, Santa Clara, CA). Prior to electrodes modification, aptamer stock solution (50 mM) was diluted in HEPES buffer to achieve the desired aptamer concentration of 0.5µM. For aptamer immobilization, gold electrodes were kept in a solution of thiolated aptamer for 18 h in the dark at 4 °C. Following incubation and after aptamer incubation the electrodes were rinsed with DI water and immersed in an aqueous solution of 3mM 6-mercapto-1-hexanol solution (MCH) for 1 h to displace nonspecifically adsorbed aptamer molecules and to passivate electrode surface and finally they were washed again with DI water and were ready to use for electrochemical measurements.(21,22)

Surface Plasmon Resonance Analysis of Aptamer Assembly and IFN-γ Binding

Surface plasmon resonance (SPR) experiments were performed by using a two-channel BIAcore T3000 instrument (Uppsala, Sweden) with bare gold chips. Aptamer was dissolved in HEPES buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl) to a 0.5 μM concentration and was loaded into an SPR device at a flow rate of 40 μL/min and was allowed to interact with the chip for 5 min. Assembly of aptamer was followed by flowing 3 mM MCH in HEPES buffer at a flow rate of 40 μL/min for 5 min to block gold surface after aptamer assembly in order to prevent nonspecific adsorption. BoIFN-γ was dissolved in HEPES buffer and then introduced into an SPR instrument at a flow rate of 40 μL/min, remaining in contact with

SPR chip until saturation of the signal. After injection of BoIFN-*γ*, chip was washed with HEPES buffer for 270 s to dissociate BoIFN-*γ* and 7 M urea buffer was used to regenerate aptamer, this is a widely used method in research involving the production of aptasensors and did not compromise sensitivity of the aptamer layer, allowing us to challenge the same aptamer layer with several concentrations of BoIFN-*γ*.

SPR results were analyzed using a kinetic Langmuir 1:1 fitting model on BIAvaluation 4.0 software to determine equilibrium constants (*K*D) of aptamer-BoIFN-*γ* binding.

Electrochemical Characterization of Aptasensor and Detection of Bovine IFN-γ

Electrochemical measurements were made using a CHI 840C Electrochemical Workstation (CHInstruments, Austin, TX) with a three electrode system consisting of Ag/AgCl (3M KCl) as reference electrode, Pt wire as counter electrode, and a gold working electrode. Electrochemical experiments were performed by using square wave voltammetry (SWV) with a 40 mV amplitude signal at a frequency of 60 Hz, over the range from -0.10 to -0.50 V versus Ag/AgCl references.

Electrodes were modified with aptamer molecules as described above and were placed into a custom-made Teflon electrochemical cell. The sensor was allowed to equilibrate, as determined by stable faradaic current. For control experiments (without adding recombinant BoIFN-γ), working electrode conjugated with aptamer was left only in HEPES buffer, RPMI with 10% of bovine serum and whole bovine blood solution and measurements were made every 15 minutes for 2 hours. For calibration curve analysis, bovine IFN-γ aptamer was challenged with several concentrations of bovine recombinant

IFN-γ *(*ranging from 1ng/mL to 230ng/mL) before each measurement the sensor was allowed to react with analyte for 15 min.

For measurements using bovine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), blood samples were collected from healthy cattle by venipuncture into tubes containing EDTA. PBMCs were isolated using Lymphoprep^{TM} (Axis-Shield, Dundee, Scotland), briefly, blood was diluted by adding an equal volume of 0.9% NaCl and 6mL of diluted blood was add over 3mL Lymphoprep^{TM} and was centrifuged at 800x g for 20 minutes at 20°C, after centrifugation mononuclear cells were removed using a Pasteur pipette and were cultured in 75 cm^2 tissue culture flasks incubated in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS and 100 U/mL penicillin/streptomycin and L-glutamine, under a 5% CO_2/95% air humidified atmosphere at 37 °C.

Electrochemical measurements with bovine PBMCs were made using same procedures describe above with minor modification, to know, electrochemical Teflon cell was placed inside an incubator (TS1500, Techne, Burlington, NJ) and experiments were made under 5% CO_2/95% air humidified atmosphere at 37°C and prior to electrochemical measurements the PBMCs were allowed to stabilize for 1 hour and finally, to activated bovine PBMCs to produce BoIFN-γ we used 10μg/mL of pokeweed.

Results ans Discussions

Characterization and optimization of aptamer-based electrode

BoIFN-γ aptamer sequences conjugated with MB (redox tag) were self-assembled on top of gold electrodes. In order to verify signal from MB attached to apatamer, SWV

was chosen because it provides faster and reliable results when compare to other electrochemical measurements (e.g. spectroscopy impedance and cyclic voltammetry) and moreover, change in peak height is easy to verify and can readily be converted in percentage of signal suppression (7,20).

After incubation of MB-aptamer, SWV was done using HEPPES buffer. Optimization of aptamer was made following same procedures from previous work and frequency of 60Hz was used for all electrochemical measurements (10).

Behavior of BoIFN-γ aptamer under electrochemical measurement was very stable, as shows in Figure 2A and 2B, a typical MB reduction peak at -0.25 V (vs Ag/AgCl), differences in peak height and signal suppression in solution with only buffer was stable and low, background signal reach maximum value of 10% after 30 minutes of measurement and maintain stable until 2 hours of experiment.

Upon verify stability of signal on electrochemical experiments, aptamer assembly were evaluated by SPR in order to determine equilibrium binding constant (K_D), into a kinetic (Langmuir 1:1) fitting model, affinity constant were $K_D = 3.14 \pm 0.38 \times 10^{-10}$M (n=3).

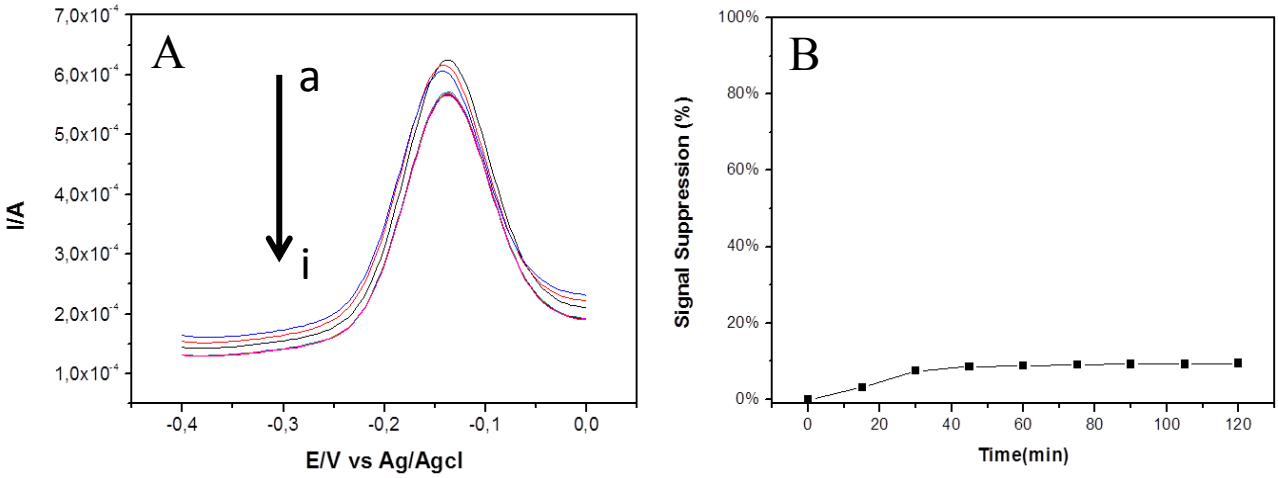


Figure 2. Characterization of sensor response to BoIFN-γ. (A) Square wave voltammograms in HEPES buffer only (a-i represents measurements made every 15minutes). (B) Background signal expressed as loss of signal suppression in HEPES buffer.

Detection of BoIFN-y using aptamer modified electrodes

Following optimization of BoIFN- γ aptamer, we sought to detect recombinant BoIFN-γ using gold electrodes functionalized with aptamers. Thus, aptamer was conjugated with MB and in absence of BoIFN-γ, aptamer folds into a hairpin structure placing redox tag close to electrode surface. In this way, high electron-transfer is acquired (Figure 1). Binding of BoIFN-γ molecule leads to aptamer hairpin structure to unfolding, forming a protein-aptamer complex which displace MB near from electrode and inhibits electron transfer resulting in signal suppression (Figure 1)

Detection of BoIFN-γ was performed by spiking several concentrations of recombinant BoIFN-γ, ranging from 1ng/mL to 230ng/mL. Figure 3A shows a proportional decreasing in signal for SWV in different concentrations of recombinant BoIFN-γ.

Moreover, loss in signal due to binding of BoIFN-γ to aptamer was reported as change in current before and after binding and as a percentage of loss in peak height, figure 3B and 3C respectively. Calibration curve of signal decreasing and BoIFN- γ concentration was calculated and indicates a limit of detection of 0.06nM with linear range to 13nM (y = 9.37x + 0,3213 and R^2 = 0.95711). Therefore, our aptasensor is able to detect IFN-y in serum or in activated immune cells (26, 27).

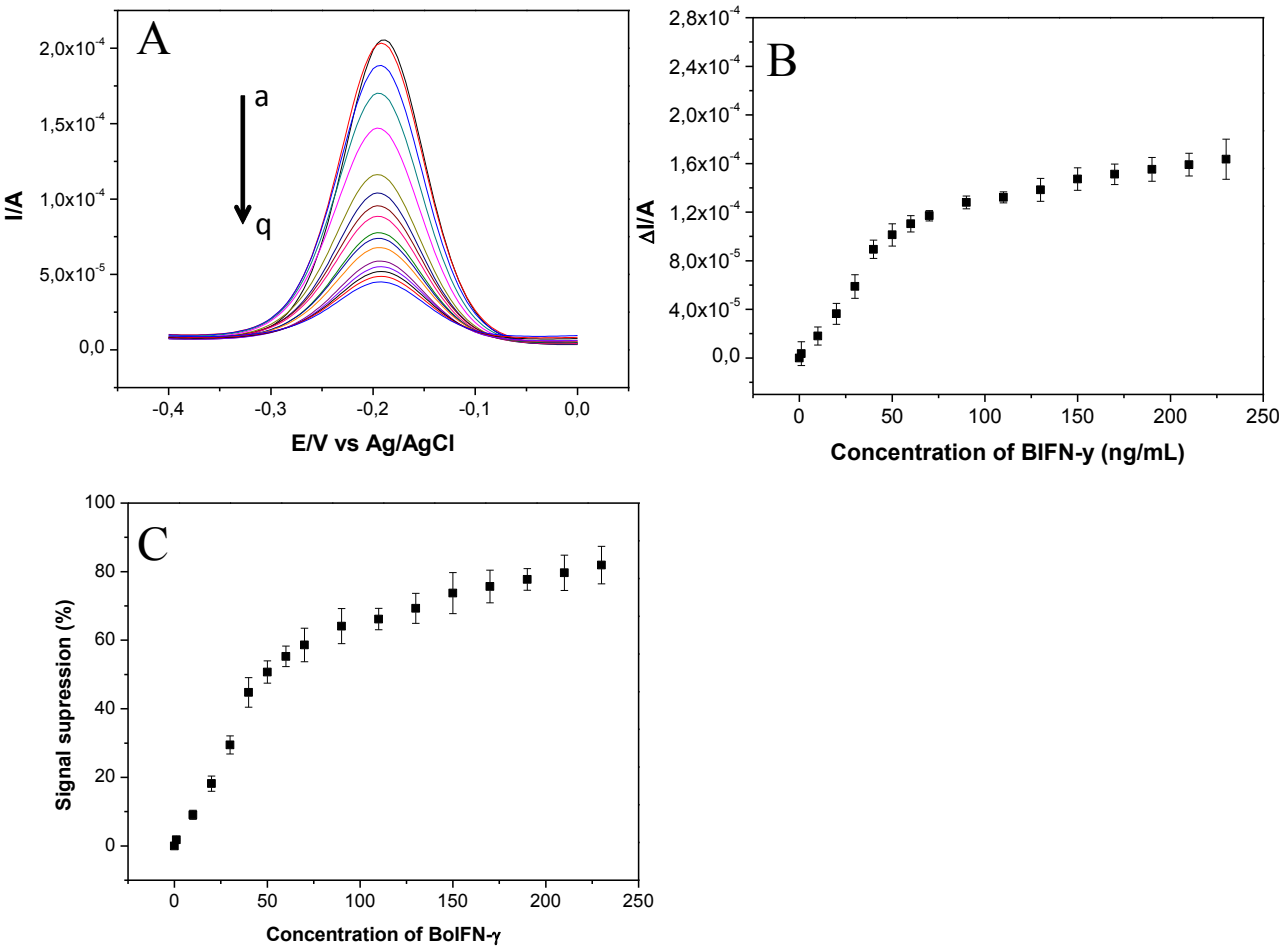


Figure 3. Detection of BoIFN-γ by aptasensor. (A) Square wave voltammograms showed decreasing in faradic current was proportional to recombinant BoIFN-γ concentration (a-q represents different concentrations ranging from 1ng/mL to 230ng/mL). (B) Calibration curve of current vs BoIFN-γ concentration. (C) Signal suppression upon binding of several concentrations of BoIFN-γ.

Detection of BoIFN-y in complex media

Upon optimization in buffer we evaluated the stability and specificity of aptasensor in complex media to verify if was possible to use our platform for cell analysis. As show in figure 4A., changing buffer to RPMI shift MB peak to negatives values and addition of 10% serum into RPMI cause a large decrease in signal, although this signal loss, was possible to achieve measurable changes in redox current after spiking recombinant BoIFN-γ into media with serum (Figure 4B).

When comparing signal suppression in buffer and media under different concentrations of recombinant BoIFN-γ, was possible to achieve same pattern but in media the changes in redox current had a lower decreasing pattern, but even then, signal suppression was higher than background signal, demonstrating ability to selectively detect BoIFN- γ in presence of lager amounts of nonspecific proteins (Figure 4C).

However, to evaluate possibility of using this platform for clinical diagnostics we tested our aptasensor in whole bovine blood solution with several concentrations of spiked recombinant BoIFN-γ and signal suppression was similar to RPMI, demonstrating a powerful and specific tool to precisely detect bovine IFN-γ in real samples (Figure 4C).

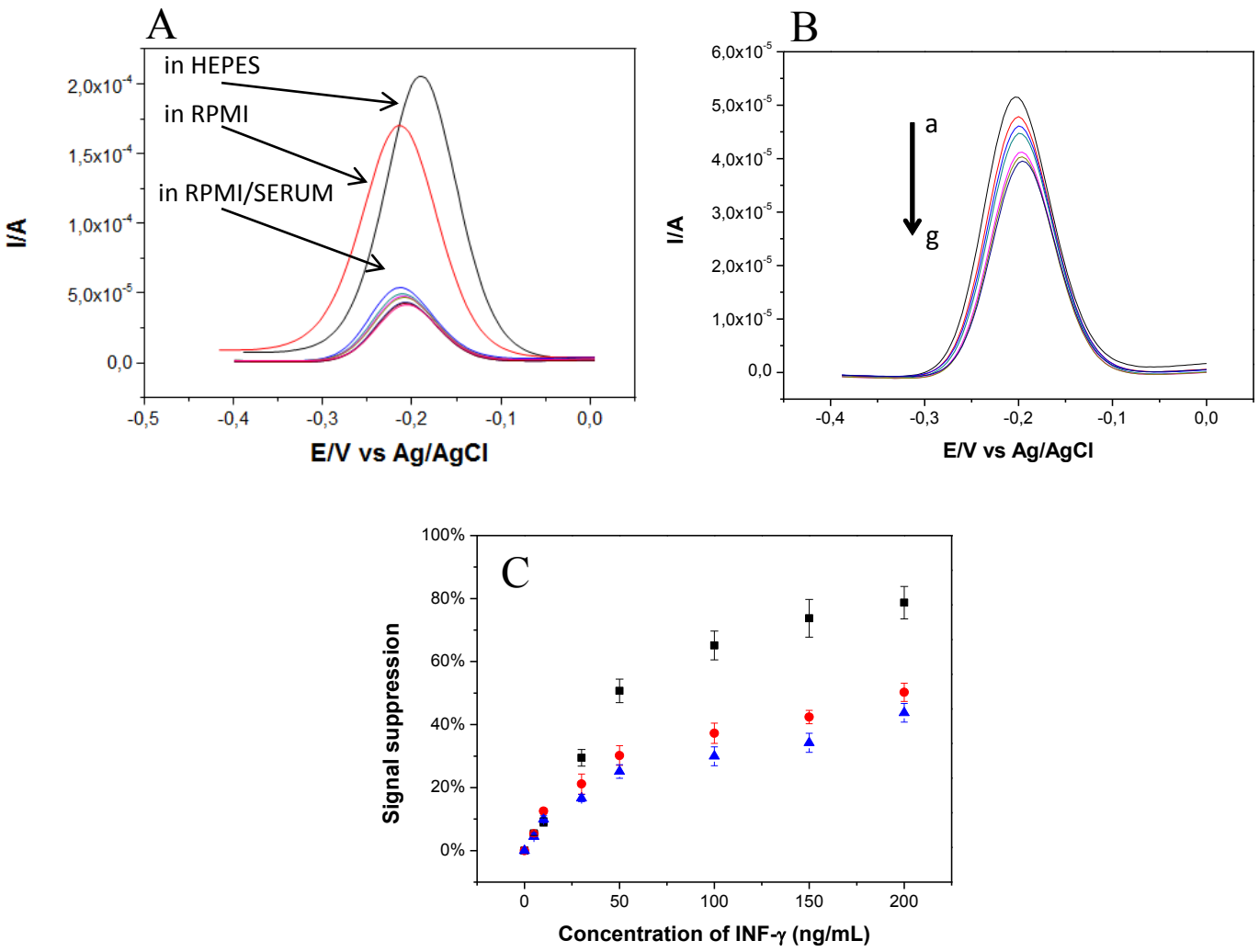


Figure 4. Detection of BoIFN-γ by aptasensor in complex media. (A) Aptasensor response in HEPES buffer, RPMI media and RPMI with 10% of serum. (B) Close-up showing response of aptasensor to BoIFN-γ loaded into serum-containing media. Calibration curve of current vs BoIFN-γ concentration (a-g represents different concentrations of recombinant BoIFN-γ). (C) Signal suppression upon binding of several concentrations of BoIFN-γ in different solutions (■ HEPES Buffer, ● RPMI/Serum and ▲ Bovine whole blood).

Monitoring BoIFN-γ released by Bovine PBMCs

As our main goal, we expected to evaluate the binding of our aptasensor to BoIFN-γ secreted from bovine PBMCs. For BoIFN-γ secretion experiments, 200K bovine PBMCs were added into the top of aptasensor, upon addition, cells was stimulated with 10µg/mL of pokeweed mitogen, known to activate T cells to produce IFN-γ (28,29). Prior starting activation, PBMCs were kept in our platform for 1 hour to stabilize electrochemical measurements.

Electrochemical signals were continuously monitored by SWV. To ensure viability and function, the device with PBMCs were kept under physiological temperature (37 C) and 5% CO_2 during the 4h experiment.

Therefore, as shown in Figure 5, was possible to detect and monitoring the releasing of BoIFN-γ by cells. Control had same signal suppression as background signal (10% of signal suppression) and was very stable and activated cells achieve high signal suppression values and behavior similar to spike experiment in RPMI.

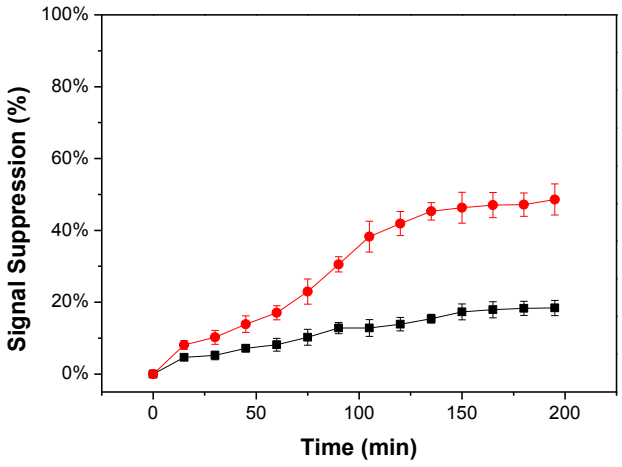


Figure 5. Detection of BoIFN-γ release by bovine PBMC (■PBMC unstimulated, ●PBMC stimulated with 10µg/mL of pokeweed).

Conclusions

In this paper, we developed a new electrochemical aptamer-based biosensor for detection of BoIFN-γ released by cells. Biorecognition element was design as a DNA hairpin and MB was the redox tag. Aptasensor showed a Faradaic current consistent with reduction potential of MB and in presence of BoIFN-γ current decrease due to unfold of hairpin structure, thus providing a basis for detection in terms of signal suppression. Aptasensor has high specific to BoIFN-γ and showed limit of detection of 0.06 nM with linear range extending to 13 nM. While traditional BoIFN-γ ELISA kit as advantage to detect lower concentrations from 31.2 pg/ml to 2000 pg/mL of BoIFN-γ, the electrochemical aptasensor described here offers several advantages: (1) our aptasensor responds directly and specific to cytokine presence in real samples without need for multiple labeling/washing steps, (2) our aptasensor can dynamic monitoring BoIFN-γ over time, (3) Aptasensor layer is chemically stable so the biosensor is very stable and have a great shelf live. In addition, further modifications of aptamer might lead to development of more sensitive BoIFN-γ aptasensors.

Compared to other electrochemical biosensors (p. eg. electrochemical impedance spectroscopy) for BoIFN-γ reported in the literature, our aptsensor has has a simple and straightforward interpretation of data, despite higher detection limit our platform was able to detect concentrations of BoIFN-γ similar in serum or in proximity of activated immune cells even under presence of high concentrations of different proteins without losing specificity and sensitivity. Moreover, impedance based measurements have a significant drawback because they are difficult to interpret in complex physiological samples where a several types of molecules can disrupt the resistance/capacitance components of impedance

signal. Avoiding all this disadvantages our BoIFN-γ aptasensor described here utilizes a redox tag (MB) and simply depends on measurement of changes in Faradaic current. In the future, we will seek to utilize our electrochemical aptasensor for detecting IFN-γ release from small groups of cells or single cells and may be used in point of care blood analysis and clinical diagnostics.

References

[1] O'Reilly, L. M.; Daborn, C. J. 1995. The epidemiology of Mycobacterium bovis infections in animals and man. Int. J. Tuberc. Lung. Dis. (1995) 1–46.

[2] Domingo, M.; Vidal, E.; Marco, A. Res. Vet. Sci. (2014) 520-529.

[3] Yang, Z.; Jian, Z.; Chen, X.; Li, J.; Qin, P.; Zhao, J.; Jiao, X.; Hu, X. Biosens. Bioelectron. (2015) 63,190–195.

[4] Denis, M.; Wedlock, D. N.; Buddle, B. M. Immunol. Cell. Biol. (2005) 83,643–650.

[5] A. Shittu, A.; Clifton-Hadley, R. S.; Ely, E. R.; Upton, P.U.; Downs, S.H. Prev. Vet. Med. (2013) 110, 395-404.

[6] Vazquez, P.; Garrido, J. M.; Juste, R. A. PLoS ONE (2013) 8(5): e64568.

[7] Collins, M.T.; Gardner, I.A.; Garry, F. B.; Roussel, A. J.; Wells, S. J. J. Am. Vet. Med. Assoc. (2006) 229: 1912–1919.

[8] Farrar,M. A.; Schreiber, R. D. Annu.Rev.Immunol. (1993) 11, 571–611.

[9] Billiau, A. Adv.Immunol. (1996) 62,61–130.

[10] Liu, Y.; Tuleouva, N.; Ramanculov, E.; Revzin, A. Anal.Chem. (2010) 82,8131–8135.

[11] Andersen, P.; Munk, M. E.; Pollock, J. M.; Doherty,T. M. Lancet (2000) 356,1099–1104.

[12] Walravens, K.; Wellemans, V.; Weynants, V.; Boelaert, F.; deBergeyck, V.; Letesson, J. J.; Huyen, K.; Godfroid, J. Vet.Immunol.Immunopathol. (2002) 84,29–41.

[13] Wood, P. R.; Corner, L. A.; Plackett, P. Res. Vet. Sci. (1990) 49,46–49.

[14] Rothel, J. S.; Jones, S. L.; Corner, L. A.; Cox, J. C.; Wood, P. R. Aust.Vet.J. (1990) 67,134–137.

[15] Ellington, A. D.; Szostak, J. W. Nature (1990) 346, 818–22.

[16] Liu, J. W.; Cao, Z. H.; Lu, Y. Chem. Rev. (2009) 109, 1948–1998.

[17] Song, S. P.; Wang, L. H.; Li, J.; Zhao, J. L.; Fan, C. H. Trends Anal. Chem. (2008) 27, 108–117.

[18] Drummond, T. G.; Hill, M. G.; Barton, J. K. Nat. Biotechnol. (2003) 21, 1192–1199.

[19] Hianik, T.; Wang, J. Electroanal. (2009) 21, 1223–1235.

[20] Sassolas, A.; Blum, L. J.; Leca-Bouvier, B. D. Electroanal (2009) 21, 1237– 1250.

[21] Ricci, F.; Bonham, A. J.; Mason, A. C.; Reich, N. O.; Plaxco, K. W. Anal. Chem. (2009) 81, 1608–1614.

[22] Lubin, A. A.; Plaxco, K. W. Acc. Chem. Res. (2010) 43, 496–505.

[23] Xiao, Y.; Lai, R. Y.; Plaxco, K. W. Nat. Protoc. (2007) 2, 2875–2880.

[24] Steel, A. B.; Herne, T. M.; Tarlov, M. J. Anal. Chem. (1998) 70, 4670–4677.

[25] Herne, T. M.; Tarlov, M. J. J. Am. Chem. Soc. (1997) 119, 8916–8920.

[26] de Metz, J.; Sprangers, F.; Endert, E.; Ackermans, M. T.; ten Berge, I. J. M.; Sauerwein, H. P.; Romijn, J. A. J. Appl. Physiol. (1999) 86, 517–522.

[27] Zhu, H.; Stybayeva, G.; Macal, M.; Ramanculov, E.; George, M. D.; Dandekar, S.; Revzin, A. Lab. Chip. (2008) 8, 2197–2205.

[28] Bosward, K. L.; Dhand, N. K.; Begg, D. J.; Thomson, P. C.; Emery, D. L.; Whittington, R. J. J. Vet. Diagn. Invest. (2010) 22, 210-217.

[29] Oh, Y.; Fleming, L.; Statham, B.; Hamblin, P.; Barnett, P.; Paton, D. J.; Park, J. H.; Joo, Y. S.; Parida, S. PLoS ONE (2012) 7(9): e44365

Projeto 2: *Biossensor para detecção de Fator de Crescimentos de Hepatócitos (HGF)*

Atividades desenvolvidas

Após a escolha do aptâmero-alvo para detecção, desenvolvemos uma plataforma microfluídica composta de polidimetilsiloxano (PDMS) acopladas no topo de eletrodos interdigitados de ouro (Figura 1). Concomitantemente ao preparo das plataformas microfluídicas, o aptâmero foi otimizado, sendo verificada sua estabilidade em tampão e meio de cultura e sangue humano, para avaliar a habilidade de detectar HGF de forma específica em meios complexos.

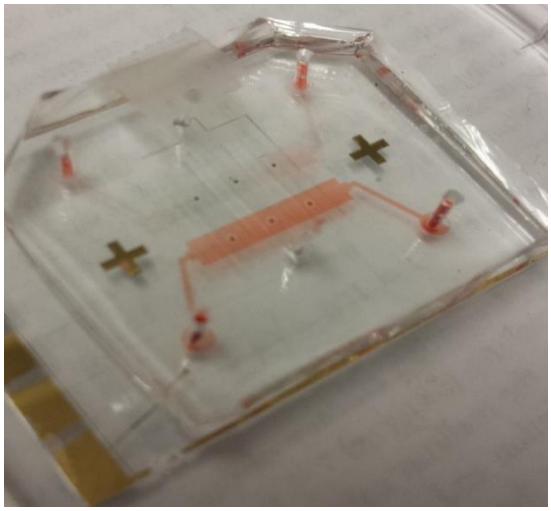


Figure 1. Vista geral do eletrodo e plataforma microfluídica para detecção de fator de crescimento de hepatócitos.

Materiais e Métodos

Os seguintes reagents foram utilizados: ácido (N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico) (HEPES), bicarbonato de sódio (NaHCO3), 6-mercapto-1-hexanol (MCH), tris-(2-carboxyethyl)-fosfina cloridrato, albumina do soro bovina (BSA, 98%) (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO), meio de cultura DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA). A sequência do aptâmero específico para HGF usada foi modificada com azul de metileno na extremidade 5' e com um grupo Tiol (-SH) na extremidade 3', conforme segue: MB-5'-TGTGGGTGGCCACCCT-3-SH' (Biosearch Technologies, Novato, CA). Polidimetilsiloxano (PDMS) e agente de polimerização (Dow Corning, Midland, MI). O aptâmero foi dissolvido em tampão Hepes 10mM (pH 7,4 com 150 mM de NaCl).

Acoplamento dos aptameros no eletrodo de ouro

O sensor para HGF foi fabricado utilizando um eletrodo de ouro acoplado em plataforma microfluídica. Os eletrodos foram limpos com solução "piranha" 3:1 de H_2SO_4:H_2O_2 e depois foram lavados com água deionizada, etanol e secados com nitrogênio. Antes da modificação dos eletrodos, a solução estoque (0,02 mM) foi reduzida em 10 mM de TCEP por 1 hora para clivar as pontes de dissulfeto. A solução resultante foi então diluída para 0,5 µM em Hepes. Na imobilização do aptâmero, os eletrodos de ouro foram incubados por 18 horas no escuro a 4 ºC. Após este período, os eletrodos foram lavados com água deionizada e imersos em solução 3 mM de MCH por 20 minutos, para evitar ligações inespecíficas na superfície do eletrodo.

Previamente ao uso da plataforma microfluídica, o arranjo eletrodo/microfluídos foi avaliado a partir do uso de fotos tiradas por uma câmera digital acoplada ao microscópio. Corantes alimentares de diferentes cores (vermelho e verde) foram utilizados para verificar a capacidade do PDMS de impedir o vazamento de liquido pelas câmaras juntamente da habilidade de proteger os eletrodos durante a incubação com células (Figura 2).

Caracterização eletroquímica do sensor

Medidas eletroquímicas foram feitas utilizando a estação de trabalho eletroquímica CHI 842B (CH Instruments, Austin, TX) com um sistema de três eletrodos, sendo: Ag/AgCl (3M KCl) como o eletrodo de referência, filamento de Pt como o contra eletrodo e um eletrodo de ouro como de trabalho. Os experimentos eletroquímicos foram feitos em tampão Hepes 10mM, DMEM e sangue humano, usando a voltametria de onda quadrada de -0,01 a -0,5 V com 40 mV de amplitude e frequência de 60 Hz. As medidas foram realizadas com 15 minutos de intervalo.

Resultados e Discussão

Validação da plataforma microfluídica

Primeiramente, o sensor foi avaliado do ponto de vista de sua funcionalidade para utilização de amostras reais. Desse modo, conforme verificado na Figura 2 (A-F), a combinação eletrodo e PDMS obteve sucesso, sendo possível controlar os líquidos dentro dos canais microfluídicos a partir do uso de pressão positiva e negativa. De forma mais específica, ao redor dos eletrodos há uma válvula de proteção que pode ser levantada a partir da aplicação de vácuo na camada de controle do PDMS, desse modo é ocorre a proteção dos eletrodos e os aptâmeros durante a fase de incubação de células e após a

mesma é possível liberar os eletrodos para ficarem em contato com a solução e o analito de interesse.

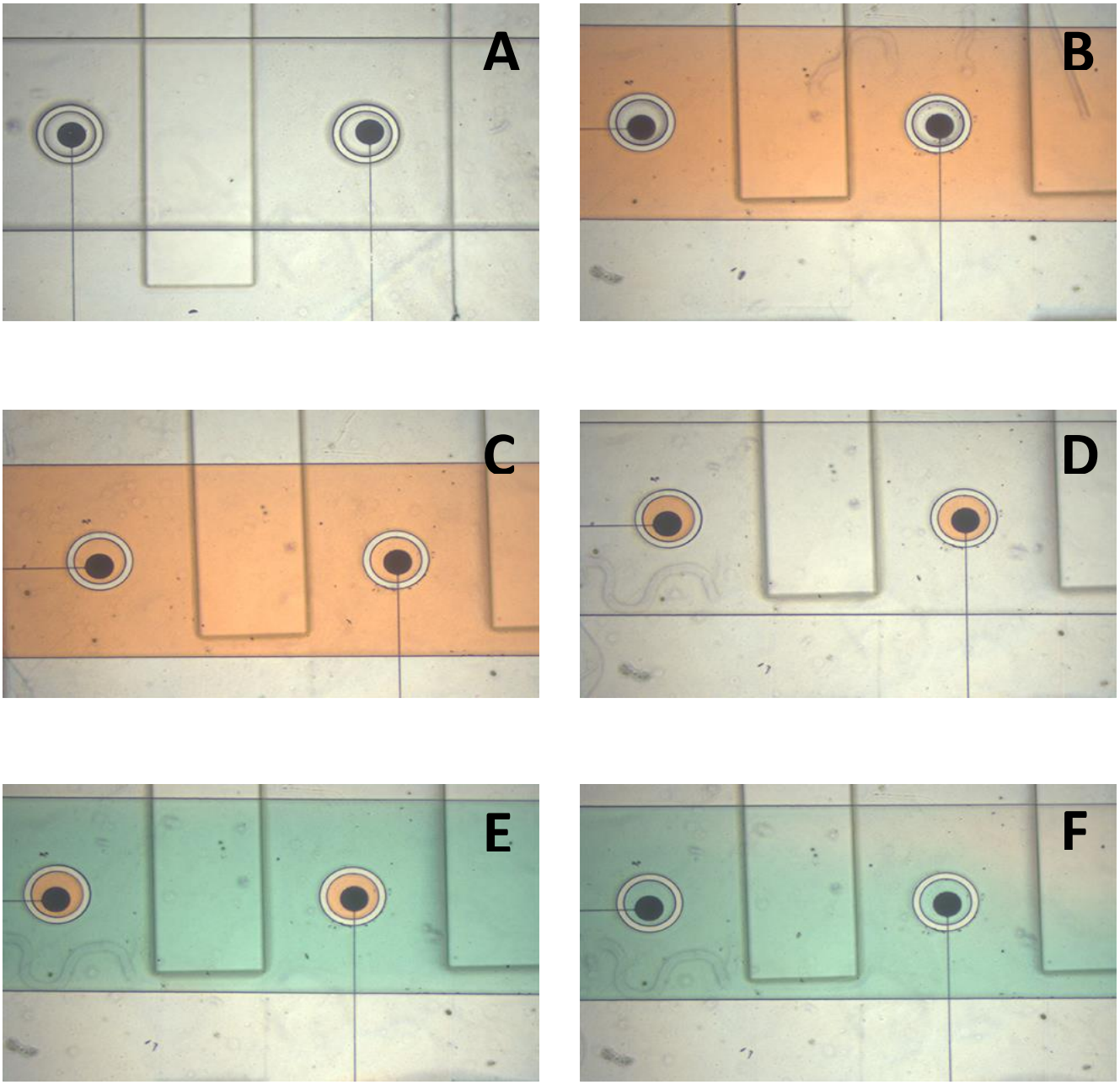


Figura 2. Prova de conceito da plataforma microfluídica adicionada no topo de eletrodos de ouro. (A) Vista geral da plataforma com tampão. (B) Adição de corante vermelho sobre pressão positiva.

(C) Aplicação de vácuo para ocorrem o contato do liquido com os eletrodos. (D) Aplicação de pressão positiva para fechar os eletrodos e lavagem da câmara com tampãos. (E) Adição de corante verde sobre pressão positiva. (F) Aplicação de vácuo para ocorrer troca de líquido nos eletrodos.

Estabilidade do sensor em tampão e meio de cultura

O sensor apresentou alta estabilidade em tampão Hepes e em meio de cultura DMEM (Figura 3.). As medidas foram realizadas a cada 15 minutos por 2 horas e 30 minutos, o aptasensor demonstrou um pequeno aumento nas primeiras medidas e após 30 minutos o sinal foi estabilizado em torno de 7% de supressão de sinal para DMEM e em torno 12% para tampão HEPES.

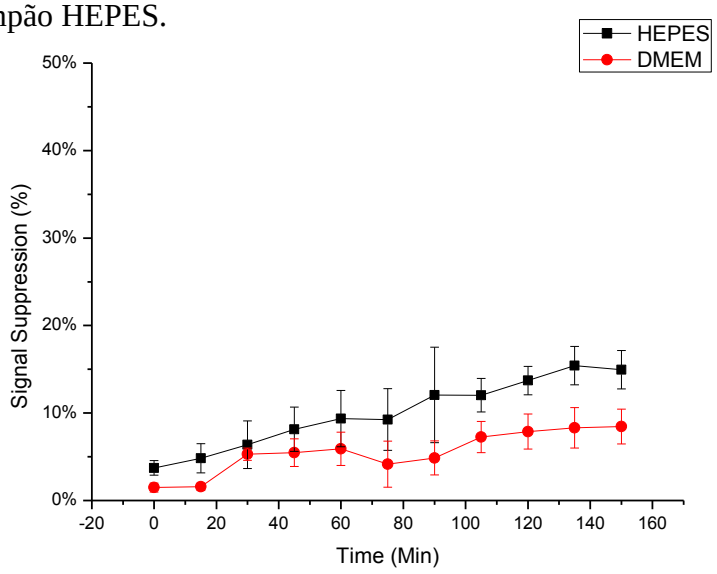


Figura 3. Curva de estabilidade do aptasensor para HGF humano em tampão Hepes e meio de cultura DMEM.

Curva de Calibração

A supressão de sinal foi avaliada pelo decréscimo do pico da voltametria de onda quadrada em diferentes concentrações de HGF recombinante (0ng/mL – 80 ng/mL). Conforme figura 4, ao aumentarmos a concentração de HGF recombinante foi possível verificar o decréscimo do pico, demonstrando assim o comportamento de "signal-off" do sensor.

A curva de calibração (Figura 4.) foi realizada através da adição de diferentes concentrações de HGF e a análise foi feita pela correção do decréscimo do pico com a linha de base. O sensor apresentou como limite de detecção a concentração de 1ng/mL e com uma supressão de sinal bem mais acentuada que no controle com DMEM. Na concentração de 80ng/mL de HGF foi possível verificar uma supressão de sinal de 35% em contraste, em DMEM sem a presença de HGf a supressão de sinal foi em torno de 7%.

Desta forma, podemos afirmar que o sensor possui a capacidade de reconhecer HGF e que possui um funcionamento de "signal-off", ou seja, conforme o analito entra em contato com o sensor, o azul de metileno que está conjugado no aptâmero é deslocado para longe do eletrodo de trabalho, reduzindo assim o sinal eletroquímico.

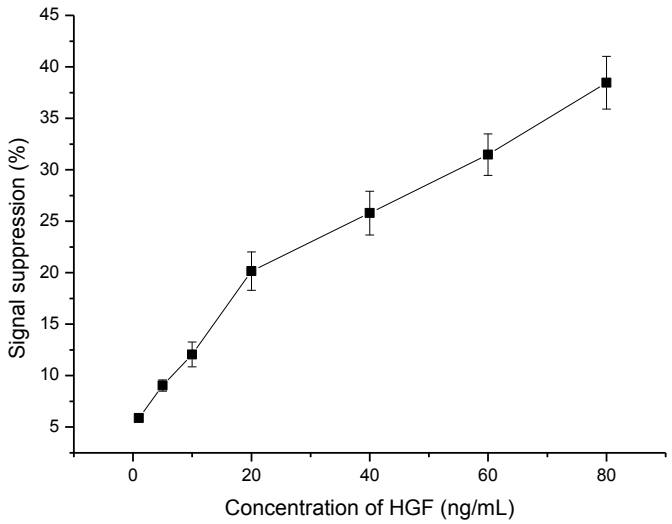


Figura 4. Curva de calibração mostrando a supressão de sinal do aptasensor em diferentes concentrações de HGF recombinante em meio de cultura DMEM.