

DESENVOLVIMENTO DE SENSORES APTAMÉRICOS
PARA MONITORAMENTO DE BIOMARCADORES DE CÉLULAS
CANCERÍGENAS PROSTÁTICAS

JOÃO PAULO RUIZ LUCIO DE LIMA PARRA

Botucatu

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Instituto de Biociências de Botucatu

João Paulo Ruiz Lucio de Lima Parra

**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES APTAMÉRICOS
PARA MONITORAMENTO DE BIOMARCADORES DE CÉLULAS
CANCERÍGENAS PROSTÁTICAS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia aplicada à saúde humana e animal.

Orientação: Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa

Co-orientação: Dr. Bruno Pereira Crulhas

Botucatu

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Parra, João Paulo Ruiz Lucio de Lima.

Desenvolvimento de sensores aptaméricos para monitoramento de biomarcadores de células cancerígenas prostáticas / João Paulo Ruiz Lucio de Lima Parra. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Valber de Albuquerque Pedrosa
Coorientador: Bruno Pereira Crulhas
Capes: 90300009

1. Biossensores. 2. Eletroquímica. 3. Próstata - Câncer. 4. Aptâmeros de nucleotídeos. 5. Antígeno prostático específico.

Palavras-chave: Biossensores; PSA; aptâmeros; câncer de próstata; eletroquímica.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sentado sobre ombros de gigantes.”

Sir Isaac Newton

Aos meus pais, Paulo e Marília

Aos meus tios, Paulo e Luciana

À minha irmã Gabriela

A minha namorada, Ana

Ao infinito, e além!

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Plano Maior pela oportunidade desta existência e passagem e aos meus guias que me intuem a todo o momento em busca da curiosidade constante.

Agradeço do fundo de minha alma aos meus pais e minha irmã, Paulo, Marília e Gabriela e aos meus tios, Paulo e Luciana, pelo apoio seja qual tenha sido a circunstância, mas todas recheadas de vida e de lindos momentos. Se vivo, são por vocês.

Ao meu orientador prof. Valber Pedrosa pela oportunidade dada e por todo o amparo, esforço, dedicação e paciência comigo desde a acolhida durante a iniciação científica até o mestrado, principalmente nos momentos difíceis.

À todos as professoras e professores que tive durante toda a minha vida: Elma, Elza, Fabiana, Veras, Lúcia, Elcione, Sato, Sebastião, Sérgio, Antônio, Sandras, Elizabeth, Lucianas, Denise, Mariza, Nelson, Fany, Rosine, Pedro, Christina, Anas Marias, Cláudias, Lídia, Etiene, Luís, Joel, José Luís, José Ricardo, Rezende, Vladmir, Ney, Fontes, Paulos, Roberto, José Roberto, Gustavo, William, Sônia, Júlio, Pedro Padilha, Giuseppina e Fernando. Em especial à professora Margarida Saeki por ter permitido o meu despertar pela dedicação à ciência e ao meu grande amigo e precioso professor, Murillo, por nunca ter desistido de mim quando eu quis desistir. Sem vocês, eu nunca teria conseguido chegar aqui.

Aos colegas de laboratório, Bruno, Carol, Claudia e Maria Eduarda pela convivência e rotina durante todos esses anos, das conversas descontraídas, de cafés à discussões

científicas ou não. Devo a vocês pelo conhecimento e maturidade adquiridos durante estes anos.

Aos amigos que Botucatu pode me proporcionar durante todos esses anos das Repúblicas PMD, RT, Carga Pesada entre outras e ao pessoal da VII Turma de Física Médica que por aqui ficaram e acompanharam-me nestes anos todos. Obrigado pelas eternas risadas e loucuras.

Aos funcionários do departamento de Química e Bioquímica: Gabriela, Danielle, Elaine, Silvia, Selma, Ivalde e Fabinho por todo o convívio e suporte durante todos esses anos.

Aos irmãos que a vida me presenteou, Renan (Ree), Pedros (PM, Xampa e Cirilo), Anderson (Sonson), Felipes (Reis e Joa), Gabriel (Biela) e Victor (Vitoka), vocês são a minha segunda família e um dos meus grandes tesouros guardados no fundo do coração. Devo a vida à vocês.

A minha namorada e companheira Ana Carolina, por ser o mais lindo presente que Deus me enviou, de forma leve e doce. Obrigado por dividir os melhores momentos da vida comigo sendo além de minha parceira e companhia favorita, minha melhor amiga.

À CAPES e a FAPESP pelo suporte financeiro para que a realização deste trabalho fosse possível.

Àqueles que contribuíram de forma direta ou indireta com este estudo.

Lista de abreviações

AJCC – Comitê Conjunto Americano sobre o Câncer

BPH – Hiperplasia prostática benigna

CaP – Câncer de próstata

cPSA – Antígeno prostático específico na forma complexada

CT – Tomografia computadorizada

EEI – Espectroscopia eletroquímica de impedância

fPSA – Antígeno prostático específico na forma livre

HK2 – Calicreína humana 2

HKs – Família das calecreínas humanas

MCH – 6-mercapto-hexanol

PET – Tomografia por emissão de pósitrons

PSA – Antígeno prostático específico

SELEX – Evolução sistemática dos ligantes por enriquecimento exponencial

TNM – *Tissue, Nodes, Metastasis*

tPSA – Antígeno prostático específico total

UICC – União Internacional de Controle do Câncer

VC – Voltametria cíclica

VOQ – Voltametria de onda quadrada

Índice de Figuras

Figura 1: Exemplos mais utilizados de interface dos componentes no desenvolvimento de sistemas de biossensores (Retirado de Kirsch et al., 2013).....	8
Figura 2: Esquema da técnica de Evolução Sistemática dos Ligantes por Enriquecimento Exponencial (CRULHAS, 2017)	11
Figura 3: Estruturas das sequências aptaméricas (A) fPSA, (B) PSA e (C) HK2, com conformação <i>hairpin</i> que foram imobilizadas na superfície de um eletrodo de ouro adquiridas pelo software IDT OligoAnalyzer.	16
Figura 4: Representação da célula eletroquímica acoplada ao potenciostato (A) composta por um sistema de três eletrodos (B): eletrodo de trabalho de ouro (vermelho), eletrodo de referência (azul) e o contra-eletrodo (preto).	17
Figura 5: Esquematização da modificação da superfície do eletrodo de ouro e funcionamento dos aptasensores; imobilização das sequências aptaméricas tioladas na superfície do eletrodo de ouro e ordenadas com auxílio do 6-mercaptop-hexanol. Logo, pode-se aplicar as culturas de células prostáticas, que se aderem ao fundo para então liberar as proteínas biomarcadoras (Autoria própria).	18
Figura 6: Microscopia Eletrônica de Varredura das culturas de células cancerígenas da próstata PC-3 e LNCaP. Imagens de caracterização retirada do site da empresa ©ATCC.	3
Figura 7: VC obtida através do tratamento eletroquímico com 0,1 mol/L de H ₂ SO ₄ durante 25 ciclos com velocidade de varredura de 50 mV/s.	3
Figura 8: (A) VC da superfície de ouro em diferentes velocidades de varredura (a-m: 0,02, 0,03, 0,05, 0,06, 0,09, 0,1, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,50V/s. (B) Relação do pico de intensidade de corrente em função da raiz quadrada do potencial da	

velocidade de varredura. As medidas foram feitas em 10mM PBS (pH 7,4) utilizando a probe redox ferroceno..... 4

Figura 9: VOQ resultantes da estabilidade ao longo do tempo em 10 mM de tampão PBS dos aptasensores (A,B) PSA, (C,D) fPSA e (E,F) HK2, com amplitude 40 mV, frequência de 60 Hz e com intervalo entre as medidas de 20 minutos durante 2 horas e as respectivas porcentagens de supressão de sinal. 3

Figura 10: VOQ resultantes da estabilidade ao longo do tempo em meio de cultura RPMI-1640® dos aptasensores (A,B) PSA, (C,D) fPSA e (E,F) HK2 entre -0,5V e 0,0V, com amplitude 40 mV, frequência de 60 Hz e com intervalo entre as medidas de 20 minutos durante 2 horas e as respectivas porcentagens de supressão de sinal. 5

Figura 11: VOQ da análise de compostos interferentes com sinal de amplitude em 40 mV e frequência de 60 Hz no intervalo entre -0.50 a 0.7 V versus Ag/AgCl. Os compostos utilizados foram ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (AU) com concentração de 100 nM..... 7

Figura 12: Gráfico Nyquist a cada modificação realizada na superfície do eletrodo de trabalho de ouro realizada com a probe redox ferroceno (0,3V) no intervalo de frequência 1 mHz até 100 KHz, com perturbação de amplitude 5 mV para os aptâmeros de (A)fPSA, (B) PSA e (C) HK2..... 3

Figura 13: (A) VOQ resultantes da curva de calibração de fPSA ao longo do tempo durante a exposição dos aptasensores obtidos no intervalo entre -0,5V e 0 V, com amplitude 40 mV, frequência de 60 Hz e com intervalo entre as medidas de 20 minutos e as respectivas porcentagens de supressão de sinal (B). 6

Figura 14: VOQ resultantes da estabilidade ao longo do tempo durante a exposição dos aptasensores (A,B) PSA, (C,D) fPSA e (E,F) HK2 na linhagem celular PC-3, obtidos no intervalo entre -0,5V e 0,0V, com amplitude 40 mV, frequência de 60 Hz e com intervalo entre as medidas de 20 minutos durante 2 horas e as respectivas porcentagens de supressão de sinal. 3

Figura 15: VOQ resultantes da estabilidade ao longo do tempo durante a exposição dos aptasensores (A,B) PSA, (C,D) fPSA e (E,F) HK2 na linhagem celular LNCaP, obtidos no intervalo entre -0,5V e 0,0V, com amplitude 40 mV, frequência de 60 Hz e com

intervalo entre as medidas de 20 minutos durante 2 horas e as respectivas porcentagens de supressão de sinal. 5

Figura 16: VOQ resultantes da estabilidade ao longo do tempo durante a exposição dos aptasensores (A,B) PSA, (C,D) fPSA e (E,F) HK2 na linhagem celular PNT-2, obtidos no intervalo entre -0,5V e 0,0V, com amplitude 40 mV, frequência de 60 Hz e com intervalo entre as medidas de 20 minutos durante 2 horas e as respectivas porcentagens de supressão de sinal. 3

Sumário

Resumo	1
Abstract.....	2
1.Introdução.....	2
1.1 Câncer de próstata.....	2
1.2 Biomarcadores na detecção do câncer	5
1.3 Biossensores.....	8
1.3.1 Biossensores aptaméricos	11
2.1 Objetivos específicos	14
3. Materiais e Métodos	15
3.1 Reagentes e soluções	15
3.2 Célula e técnicas eletroquímicas.....	16
3.3 Metodologia	18
3.3.1 Preparação do eletrodo de trabalho de ouro	18
3.3.2 Imobilização das sequências aptaméricas na superfície dos eletrodos de trabalho de ouro.....	18
3.3.3 Cultivo de células prostáticas.....	19
4. Resultados e discussões.....	3

4.1 Caracterização.....	3
4.1.1 Caracterização eletroquímica do eletrodo de ouro.....	3
4.1.2 Caracterização eletroquímica dos biossensores aptaméricos fPSA, PSA e HK2 por voltametria de onda quadrada em função do tempo.....	5
4.1.2.1 Tampão PBS (pH 7,4).....	5
4.1.2.2 Meio de cultura RPMI-1640®	4
4.1.2.3 Interferentes.....	6
4.1.3 Caracterização dos aptasensores e detecção de proteína biomarcadora por espectroscopia eletroquímica de impedância	3
4.2 Aplicação dos biossensores aptaméricos.....	6
4.2.1 Curva de calibração dos biossensores fPSA e PSA	6
4.2.2 Monitoramento da liberação das proteínas biomarcadoras pela linhagem celular PC-3.....	3
4.2.3 Monitoramento da liberação das proteínas biomarcadoras pela linhagem celular LNCaP	4
4.2.3 Monitoramento da liberação das proteínas biomarcadoras pela linhagem celular PNT-2	7
5. Conclusão	5
6. Referências Bibliográficas.....	6

Resumo

Neste trabalho foram desenvolvidas metodologias para detecção de biomarcadores cancerígenos utilizando sensores aptaméricos. Aptâmeros são estruturas tridimensionais de DNA/RNA capazes de serem seletivos a alvos específicos. O uso destas sequências em plataformas eletroquímicas permite que o monitoramento do metabolismo celular se torne viável de uma forma rápida e exata. Para a caracterização das superfícies foram utilizadas as técnicas eletroquímicas. Foram utilizadas três proteínas biomarcadoras, PSA, fPSA e HK2 como modelos para os estudos. Os limites de detecção do aptasensor para PSA e fPSA obtidos foram de 1,1 ng/mL e 2,9 ng/mL, respectivamente. Ao final dos experimentos com linhagens celulares cancerígenas e controle, as correspondentes corroboraram com a classificação de risco do câncer de próstata bem como a capacidade de diferenciação por parte dos aptasensores entre os tipos celulares mais agressivos (PC-3, [PSA]: 23 ng/mL; [fPSA]: 6 ng/mL) e menos agressivos (LNCaP, [PSA]:12 ng/mL; [fPSA]: 7,8 ng/mL) em comparação aos grupos de referência (PNT-2, [PSA]: 1,95ng/mL; [fPSA]: 2,11 ng/mL). Para a HK2, foi possível detectá-la na presença de todos os tipos celulares prostáticos de maneira qualitativa.

Palavras-chave: biossensores, eletroquímica, câncer de próstata, aptâmeros.

Abstract

In this work, we developed methodologies for the detection of carcinogenic biomarkers using aptameric sensors. Aptamers are three-dimensional DNA / RNA structures capable of being selective to specific targets. The use of these sequences on electrochemical platforms allows the monitoring of cellular metabolism to become feasible in a fast and accurate way. Electrochemical techniques were used to characterize the surfaces. Three biomarker proteins, PSA, fPSA and HK2 were used as models for the studies. The detection limits of aptasensor for PSA and fPSA obtained were 1.1 ng / mL and 2.9 ng / mL, respectively. At the end of the experiments with cancer cell lines and control, the corresponding corroborated with the prostate cancer risk classification as well as the capacity of differentiation by aptasensores among the most aggressive cell types (PC-3, [PSA]: 23 ng/mL; [fPSA]: 6 ng/mL) and less aggressive (LNCaP, [PSA]:12 ng/mL; [fPSA]: 7,8 ng/mL) in comparison with reference control groups (PNT-2, [PSA]: 1,95ng/mL; [fPSA]: 2,11 ng/mL). For HK2, the detection was noticed it in the presence of all prostatic cells types qualitatively.

Keywords: biosensors, electrochemistry, prostate cancer, aptamers.

1.Introdução

1.1 Câncer de próstata

De acordo com o último senso feito pela Organização Mundial da Saúde em 2014, foram relatados 14,1 milhões de novos casos diagnosticados e 8,2 milhões de mortes previstas. Ao discriminar tais números de incidência, temos: pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). Os tipos mais comuns que atingem o sexo feminino possuem porcentagens referentes aos cânceres como o de mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%). Enquanto isso, os mais prevalentes dentre os homens foram pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%) (STEWART; WILD, 2014). Apesar da incidência de novos casos ocorrerem em maior número em países desenvolvidos (América do Norte, Europa Ocidental e Oceania), 80% das mortes

no mundo ocorre em países em desenvolvimento (FERLAY J. SOERJOMATARAM I. DIKSHIT R., ESER S., AND MORTALITY WORLD WIDE: IARC CANCERBASE, 2013). No caso do Brasil, espera-se que entre 2018 e 2019 sejam detectados 600 mil novos casos entre homens e mulheres sendo os cânceres de mama (60 mil) e próstata (68 mil) os mais frequentes (FERREIRA et al., 2017).

O câncer de próstata (CaP) atinge normalmente a população masculina após os 40 anos, possuindo diversos índices que podem desencadeá-lo como: fatores genéticos, dieta, comportamento sexual e baixa exposição à radiação ultravioleta (LEITZMANN; ROHRMANN, 2012). Este tipo de câncer não apresenta sintomas nos estágios iniciais da doença, apenas em casos de progressão avançada ou metástase (METTLIN et al., 1991). A avaliação do risco deste tipo de câncer pode ser diagnosticada com a combinação de três fatores principais: Escore de Gleason, estadiamento e o antígeno prostático específico (PSA) (ABELOFF et al., 2008) que juntos determinam a intensidade do risco da doença. Segue abaixo a classificação (HEIDENREICH et al., 2014; MOTTET et al., 2017; SCOTT et al., 2017):

- Baixo risco: Estadiamento T2a (tumor com cerca de metade do tamanho do órgão); [cPSA]: <10 ng/mL; Escore de Gleason menor ou igual a 6;
- Médio risco: Estadiamento T2b (tumor com mais da metade do órgão); [cPSA]: 10-20 ng/mL; Escore de Gleason de 7;
- Alto risco: Estadiamento T2c (envolve todo o órgão), T3 (ultrapassa os limites morfológicos do órgão) ou T4 (tumor com caráter metastático); [cPSA]: >20 ng/mL; Escore de Gleason maior ou igual a 8.

Tais variáveis utilizadas na classificação do risco e que compõe o diagnóstico médico são explanados: o Escore de Gleason leva em conta parâmetros celulares e histológicos constituintes da massa tumoral em análise. Para tanto, o método mais comum para avaliar tais fatores é a biópsia na qual uma sonda ultrassonográfica acompanhada de um coletor identifica a próstata e realiza retirada do tecido (CATALONA et al., 1994; NAM et al., 2013). Após a coleta, a amostra precisa passar por um tratamento laboratorial de fixação e coloração celular e assim receber a pontuação na escala de Gleason. Ou seja, a técnica é invasiva e necessita de contratação de mão-de-obra especializada além de demandar tempo desde a retirada do tecido até o prognóstico médico.

O estadiamento se baseia na determinação da fase da progressão tumoral na qual os médicos, dependendo do tipo do câncer, se utilizam de diagnósticos por imagem como: raios X, tomografia computadorizada (CT) e por emissão de pósitrons (PET), e ressonância magnética (MRI) e, convencionalmente, utiliza-se o padrão TNM (tecido, linfonodos e metástase) recomendado pela *American Joint Committee On Cancer* (AJCC) e pela União Internacional de Controle do Câncer (UICC) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). Tais técnicas de acompanhamento fazem uso de radiação ionizante e apesar dos níveis de segurança na qual operam (princípio ALARA – *As Low Reasonably Achievable*), são consideradas técnicas invasivas que podem produzir efeitos estocásticos no corpo em longo prazo (MUSOLINO; DEFRANCO; SCHLUECK, 2008).

Por sua vez, o monitoramento do antígeno prostático específico é realizado através de triagens na qual são realizados exames de sangue para avaliar a concentração do mesmo, pois este é um biomarcador bastante estudado e difundido pela sua correlação com a formação de neoplasias prostáticas (LIN et al., 2011; MOTTET et al., 2017; SCOTT et al., 2017). Não obstante, outros biomarcadores para o câncer já foram reportados na literatura devida à sua expressão em linhagens de células cancerígenas, inclusive as prostáticas (BORGONHO; DIAMANDIS, 2004; EMAMI; DIAMANDIS, 2008)

1.2 Biomarcadores na detecção do câncer

A definição de biomarcador é “alguma característica que é objetivamente medida e avaliada como indicador de processos biológicos, patológicos ou de respostas farmacológicas para uma intervenção terapêutica”(ATKINSON et al., 2001). É possível detectá-los em diversos tipos de modelos experimentais, tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo*. Ou seja, isto inclui tecnologias e ferramentas que possibilitam a avaliação da predição da causa, da progressão/regressão e do tratamento de doenças (MAYEUX, 2004).

O uso de biomarcadores como ferramenta analítica em aplicações biomédicas pode fornecer informações rápidas e precisas sobre parâmetros biológicos que predispõe a condição patológica, e podem monitorar as respostas terapêuticas ao tratamento relacionado com o nível de toxicidade de doenças, como o câncer. Neste caso, um

biomarcador utilizado na detecção, pode fornecer informações complementares àquelas relacionadas a estudos clínicos e patológicos que permitem, por exemplo, a avaliação do desenvolvimento e otimização de novas drogas para o aumento da eficácia e segurança no tratamento (LU; MADU, 2014). Há um vasto catálogo de biomarcadores reportados na literatura para estes fins, no qual se podem citar àqueles utilizados na detecção de cardiopatologias, infecções, anomalias gênicas e imunológicas bem como os do câncer, incluindo o prostático (BALLARD-BARBASH et al., 2012; BREWSTER; HULKA; LAVY, 1992; PRENSNER et al., 2012) e que podem ser encontrados em amostras sólidas e fluídicas como o sangue, saliva, urina e fezes.

O biomarcador sérico mais difundido e estudado para o câncer de próstata é o antígeno prostático específico (PSA) que se apresenta na forma de glicoproteína (33-kDa), sintetizada pelo epitélio glandular prostático e secretado no fluído seminal (ZHU et al., 2003) que também pode ser referido como HK3, faz parte da família da calicreínas humanas (HKs). A expressão destas calicreínas e sua atividade proteolítica são desreguladas em tumores, principalmente em adenocarcinomas (BORGONHO; DIAMANDIS, 2004). Dentre elas, é a mais estudada e recomendada nas triagens do câncer de próstata, pois fornece informações sobre os estágios iniciais da doença, na fase assintomática (ABELOFF et al., 2008). O PSA possui diferenças moleculares e pode se apresentar no soro sanguíneo tanto na forma livre (fPSA) quanto na forma complexada (cPSA), e tem-se o PSA total (tPSA) dado pela soma entre as subformas. Quando complexado, interage com α 1-antiquimotripsina e α 2-macroglobulina que são inibidores de proteases.

Existem algumas dificuldades na triagem de pacientes na utilização do PSA, pois doenças como hiperplasia benigna da próstata (BPH) e prostatite também alteram o seu nível sérico e podem induzir um falso-positivo que acarreta no aumento de custos com a utilização de técnicas mais invasivas (LU; MADU, 2014) recomendadas na fase de diagnóstico. Em contra partida, Jung et al., (2000), Luderer et al., (1995) e Zhu et al., 2003 exploraram as relações entre as concentrações das subformas do PSA com o intuito de promover maior eficiência na discriminação entre neoplasias benignas e malignas. Há uma faixa de concentrações conhecida como “zona cinzenta”, entre 4 – 10 ng/ mL, e é caracterizada pela dificuldade nesta diferenciação. Porém, a razão em porcentagem entre o fPSA e tPSA mostrou capacidade de inferir uma melhora na distinção entre os casos (NAIR; SHARIFF, 2017). Entretanto, ainda assim há indícios

de que apenas 25% dos casos com concentração sérica ligeiramente alta estão relacionados ao câncer de próstata (VICKERS et al., 2010). Logo, o monitoramento de outras calicreínas biomarcadoras para o câncer de próstata como a calicreína humana 2 se torna indispensável em complemento a análise do PSA e suas subformas, para que seja possível melhor correlacionar as concentrações séricas provenientes de diagnósticos com o nível de distinção entre as patologias, além de melhor compreender a dinâmica metabólica do câncer e seus níveis de agressividade.

A calicreína humana 2 (HK2) é uma glicoproteína (34-kDa) que possui níveis de homologia em torno de 80% com a estrutura de aminoácidos do PSA. Tal característica revela relações intrínsecas entre as duas proteínas biomarcadoras, como sua localização na próstata (epitélio glandular) bem como sua rota fisiológica e regulatória (RITTENHOUSE et al., 1998;). Apresenta caráter tripsínico com clivagem seletiva em resíduos de arginina e, apesar do contraste com o PSA, possui forte atividade como protease cujos valores médios considerados normais estão entre 0,33 e 0,37 ng/ml, e se eleva em pacientes com doença prostática (0,86 ng/ml para HPB e 6,77 ng/ml para CaP). (MIKOLAJCZYK et al., 1997; SHANG et al., 2014).

A proteína HK2 possui alta expressão em tecidos malignos em relação aos benignos e é utilizada como biomarcador de câncer de próstata dada a sua concentração sérica ser mais elevada para este caso em comparação com as outras enfermidades prostáticas (BECKER et al., 2000; DARSON et al., 1997; RECKER et al., 1998). Se comparada as concentrações séricas de ambas, HK2 possui de 50 a 100 vezes menor em relação ao PSA em condições normais (HENTTU; VIHKO, 1994; VAN GILS et al., 2005). Dadas às características, torna-se necessária a investigação dos níveis séricos deste biomarcador que participa da regulação de outras calicreínas, como no caso do próprio PSA e suas subformas (LINTULA et al., 2005; PRASSAS et al., 2015), liberadas por células prostáticas.

Logo, o uso de biossensores é uma alternativa interessante - pois apresentam alto grau de sensibilidade e especificidade, devido ao conjunto de componentes que permitem uma resposta em curto período de tempo e por ser uma técnica não invasiva para os pacientes. Em contrapartida com a necessidade de retirada de tecido via biopsia, método mais indicado para a confirmação da presença do câncer, além de outras

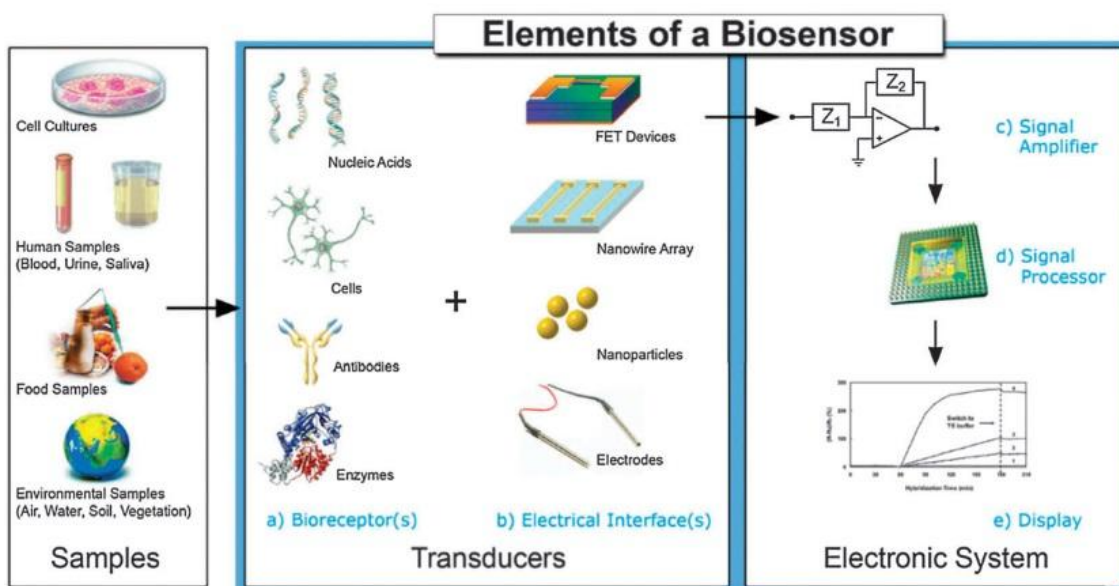
técnicas que realiam o monitoramento das concentrações séricas destes biomarcadores do câncer de próstata.

1.3 Biossensores

O surgimento do campo de biossensores deu-se por volta dos anos de 1960 por Clark e Lyons, ao combinar um módulo eletroquímico sensível à oxidação da glicose por meio da enzima glicose oxidase e assim medi-la de forma quantitativa (CLARK, 1956; CLARK; LYONS, 1962). O sistema proposto no eletrodo de Clark sofreu algumas modificações como o revestimento com uma membrana de poli-acrilamida para a imobilização da mesma glicose oxidase, e assim surgiu o primeiro eletrodo enzimático para a determinação rápida e quantitativa de glicose. Pouco depois, com o desenvolvimento de um eletrodo de vidro sensível a variação do pH, a enzima urease imobilizada na superfície para a quantificação da concentração de ureia (GUILBAULT; MONTALVO, 1969).

O esquema de funcionamento de um biossensor é exemplificado na Figura 2 e sua definição segue pela capacidade de uma interface composta por três elementos principais: alvo de interesse, transdutores biológicos e sistemas eletrônicos de coleta e processamento de sinais. Quando combinados entre si, devem ser capazes de fornecer informações sobre mudanças físico-químicas de forma quantitativa ou semi-quantitativa, específicas, com o uso de um elemento que realiza o reconhecimento biológico de um analito-alvo em contato direto com um transdutor que gera um sinal mensurável pelo componente eletrônico (D’ORAZIO, 2011; JUSTINO; DUARTE; ROCHA-SANTOS, 2017; THEVENOT et al., 2001; THEVENOT, 1999; TOTHILL, 2009). A classificação pode ser feita com base na estrutura transdutora biológica (i.e enzimas, anticorpos, DNA, RNA) e na técnica utilizada para a análise das reações de reconhecimento que geram sinais biológicos, e podem ser divididos em: eletroquímicos (LEE; POVICH; KIM, 2010; POHANKA; REPUBLIC, 2008), ópticos (KO et al., 2011), gravimétricos (NAM et al., 2013; WALTON et al., 1993), entre outros.

Figura 2: Exemplos mais utilizados de interface dos componentes no desenvolvimento de sistemas de biossensores (Retirado de Kirsch et al., 2013)



Os biossensores eletroquímicos tornaram-se bastante difundidos atualmente. As propriedades ofertadas permitem o surgimento de novas combinações entre os componentes, e isto difunde a versatilidade de aplicações. A principal vantagem encontra-se na instrumentação de baixo custo e na capacidade de miniaturização para realizações de processos químicos e biológicos com as análises realizadas em curtos períodos de tempo (*point-of-care*). O sinal coletado proveniente da reação é medido através de processos de transferência de elétrons, causados por fenômenos de oxidação e redução que na superfície de um eletrodo de trabalho, onde acontece a transdução e leitura do sinal. Podem ser divididos em dois principais tipos de biossensores: os eletroquímicos catalíticos e por afinidade (RACKUS; SHAMSI; WHEELER, 2015).

Os biossensores eletroquímicos catalíticos são caracterizados pela interação entre a catálise promovida por uma estrutura biológica (i.e enzima) e um analito-alvo cuja reação em questão produz ou consome espécies eletroativas de uma solução. Ocorre nas proximidades da superfície do eletrodo de trabalho na variação de um potencial aplicado que gera uma corrente (GRIESHABER et al., 2008) em resposta ao fenômeno. Existem várias estratégias para realizar a imobilização de moléculas catalíticas na superfície de um eletrodo, dentre elas por ancoramento covalente, adsorção física ou camadas poliméricas com capacidade de oxirredução (DING et al., 2008; KUZNETSOV et al., 2001; WANG et al., 2014). A transdução dos elétrons de

substratos com atividade redox pode acontecer diretamente no sítio enzimático ou por meio de mediadores. Devido à sua flexibilidade de uso e disponibilidade, tem uso muito comum em técnicas eletroquímicas e os mais encontrados são os derivados do ferroceno, ferricianídeos, benzoquinona, fenazina - N- metil e azul de metileno (GRIESHABER et al., 2008). Trabalhos que utilizam este tipo de biossensor eletroquímico são reportados na literatura, como aqueles utilizados para determinação de glicose sérica com a imobilização de enzimas, como a glicose oxidase, na superfície de um eletrodo de ouro ancorada por nanotubos de carbono de parede única (PATOLSKY; WEIZMANN; WILLNER, 2004) ou da glicose desidrogenase modificada covalentemente com nanopartículas de ouro e pirroloquinolina quinona, capazes de detectar a oxidação da glicose através da quantificação das transferências de elétrons promovidas pelos processos de oxidação em técnicas eletroquímicas de voltametria (ZAYATS et al., 2005).

Os biossensores eletroquímicos por afinidade utilizam estruturas que se ligam ao alvo de interesse com alta especificidade e seletividade, como é o caso de anticorpos e ácidos nucleicos e são desenvolvidos em torno de diversas técnicas eletroquímicas como potenciometria (PURVIS et al., 2003), condutometria (LIANG et al., 2006) e impedância (YANG; LI; ERF, 2004). Tipos à base de anticorpos são denominados imunossensores, cujo formato mais utilizado é através de imunoensaios voltamétricos do tipo “sanduíche”, no qual um anticorpo primário interage com um secundário por intermédio de um analito, que por sua vez se liga covalentemente a uma enzima sensível às espécies eletroativas a serem detectadas (PAMPALAKIS; KELLEY, 2009). Há exemplos desenvolvidos em plataformas que utilizam imunossensores para a detecção de proteínas biomarcadoras do câncer de próstata (BECKER et al., 2000; RAMANATHAN et al., 2016; VÄISÄNEN et al., 2004; ZHU et al., 2003). Apesar de obterem ótimos resultados, estas técnicas são caras e demandam tempo para a obtenção e purificação dos anticorpos.

Em contrapartida, os biossensores eletroquímicos à base de ácidos nucleicos possibilitam maior eficiência na parte de síntese e a um custo menor se comparado com anticorpos, além de possuir o mesmo nível de especificidade e afinidade, tal é o caso dos biossensores que utilizam aptâmeros como agente transducional de bioreconhecimento.

1.3.1 Biossensores aptaméricos

A utilização de ácidos nucleicos em sistemas eletroquímicos foi proposta inicialmente por Paleček (PALEČEK, 1960) no qual se investigou as propriedades de oxirredução de uma sequência de DNA em um eletrodo de mercúrio. Desde então, a variedade de sensores que utilizam este tipo de molécula como instrumento de detecção, sejam marcados ou não marcados, para reconhecimento em técnicas eletroquímicas vem se desenvolvendo com o passar dos anos e uma dessas abordagens inclui a utilização de sequências aptaméricas.

Aptâmeros são ácidos nucleicos de DNA ou RNA de comprimento reduzido (30 – 100 nucleotídeos) que são sintetizados para obterem uma conformação tridimensional capaz de serem afins de moléculas-alvo com alta especificidade e sensibilidade. Devido a esta capacidade de tal afinidade, é possível utilizar suas propriedades para o monitoramento ou detecção de diversos tipos de macromoléculas como ATP, adenosina e proteínas (CHO; LEE; ELLINGTON, 2009; PEREIRA et al., 2018). Os primeiros relatos da produção deste tipo de composto ocorreram em 1990, por Tuerk, Gold, Ellington e Szostak com o desenvolvimento da técnica de Evolução Sistemática dos Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX)(TUERK; GOLD, 1990). Nesta técnica, se parte de uma biblioteca randômica de sequências nucleotídicas (na ordem de $10^{12} - 10^{15}$) que são submetidas a um alvo de interesse para seleciona-las em processos *in vitro* em rodadas iterativas e ao término amplifica-las por PCR (AHMAD et al., 2011; HAMULA et al., 2006; RUFF; PAI; STORICI, 2012), como ilustra a Figura 3.

Figura 3: Esquema da técnica de Evolução Sistemática dos Ligantes por Enriquecimento Exponencial (CRULHAS, 2017)



Em comparação com sensores eletroquímicos que utilizam anticorpos, o uso de aptâmeros vem se consolidando ao demonstrar capacidade igual ou semelhante nos níveis de sensibilidade, afinidade e especificidade além de que todo o processo de síntese é realizado quimicamente, tornando-o menos custoso, versátil e rápido (GOLD et al., 2012; SHAMAH; HEALY; CLOAD, 2008). Dada à alta capacidade de reconhecimento proveniente da seleção, a aplicação destas estruturas nucleicas para o diagnóstico, monitoramento e progressão de doenças através da detecção de biomarcadores, como no caso do câncer, em plataformas eletroquímicas é bastante promissora.

O pioneirismo do uso de aptâmeros como biossensores eletroquímicos deu-se por Plaxco e colaboradores cujos trabalhos (BAKER et al., 2006; XIAO et al., 2005a; XIAO; ROWE; PLAXCO, 2007) envolveram sequências aptaméricas selecionadas para alvos específicos na superfície de um eletrodo de trabalho de ouro. Após torna-las específicas, foram necessárias algumas modificações: na extremidade 5', encontram-se grupamentos tióis (-SH) que possuem forte interação com a superfície (Au) e permitem a imobilização dos agentes transducionais aptaméricos, enquanto que na extremidade 3' foi marcada com pares redox (i.e azul de metileno), moléculas que permitem gerar sinal em técnicas eletroquímicas. A intensidade de corrente no sinal gerado nestes

dispositivos depende da proximidade com a superfície do eletrodo ao provocar o fenômeno de oxirredução. Ou seja, a eficiência na transferência de elétrons entre par redox/superfície acontece com maior ou menor facilidade, isto irá depender da conformação estrutural das sequências aptaméricas utilizadas que ao sofrerem interação com o alvo, que se aproximam ou se distanciam da superfície. Pode-se classificar estas características como modelos “*signal-on*”(XIAO et al., 2005a) e “*signal-off*”(XIAO et al., 2005b).

Neste trabalho, foram estudados tanto o desenvolvimento como a modificação de um eletrodo a base de ouro para formar biossensores (aqui referidos como aptasensores) com três sequências aptaméricas: PSA, fPSA e HK2, separadamente. Os dispositivos eletroquímicos foram caracterizados por diversos parâmetros como: a modificação da superfície, a estabilidade em diferentes meios (incluindo interferentes) bem como a sua exposição aos biomarcadores correspondentes para a verificação da sensibilidade (curvas de calibração), seja esta por administração manual ou pelo monitoramento da liberação dos mesmos, promovida pela atividade das culturas celulares prostáticas. Devido às propriedades de afinidade através do processo de seleção, a interação aptâmero/proteína biomarcadora nas aplicações da investigação do microambiente celular permitem a avaliação do metabolismo prostático ao monitorar sua atividade e estabelecer concentrações proteicas bem como relaciona-las de maneira mais eficiente com a agressividade do câncer para melhor discrimina-lo e evitar falso-positivos e abre novas perspectivas quanto a futuras triagens em pacientes humanos.

2. Objetivos

O objetivo geral desse projeto foi desenvolver uma plataforma eletroquímica a base de sequências aptaméricas para diagnóstico e monitoramento de produtos liberados por células cancerígenas da próstata.

2.1 Objetivos específicos

a) Desenvolvimento e caracterização de biossensores incorporados com aptâmeros específicos para biomarcadores liberados por células da próstata, dentre eles o antígeno HK2, o antígeno prostático específico (PSA) e o antígeno prostático específico na forma livre (fPSA) para melhor correlaciona-los com a agressividade;

b) Padronização da metodologia em fruto dos parâmetros estabelecidos na caracterização ao realizar as curvas de calibração e monitorar a estabilidade em diferentes meios;

c) Exposição dos três aptasensores em células de diferentes linhagens de câncer de próstata, duas linhagens cancerígenas (LNCaP e PC-3) e uma controle (PNT-2) para monitorar as concentrações séricas das proteínas biomarcadoras do câncer de próstata;

3. Materiais e Métodos

3.1 Reagentes e soluções

As sequências de aptâmeros utilizadas neste estudo foram:

PSA: 5'-SH/-TT TTT AAT TAA AGC TCG CCATCA AATAGC TGG GGG-3'-/MB;

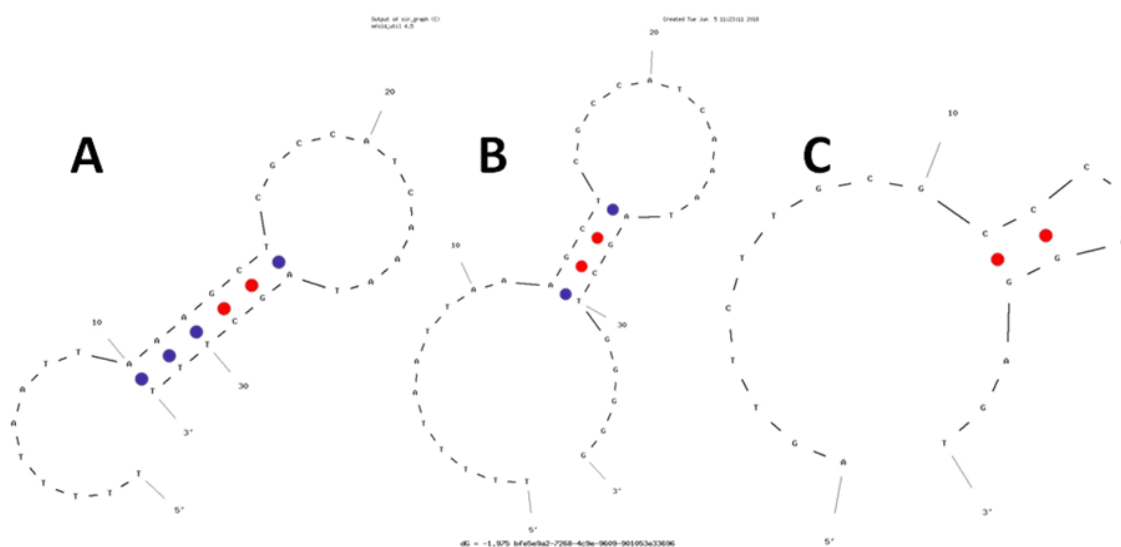
fPSA: 5'-SH/-TT TTT AAT TAA AGC TCG CCA TCA AAT AGC TTT-3'-/MB;

HK2: 5'-SH/- AGT TCT TGC GCC CCA GGA GT-3'-/MB.

Tais sequências foram adquiridas e devidamente marcadas pela empresa Biosearch Technologies (Novato, CA, USA) e foram submetidas na análise da plataforma IDT OligoAnalyzer onde foi possível observar uma estrutura de *hairpin*, dada as condições dos sais utilizados, como mostra a Figura 4.

Outros reagentes utilizados nos experimentos foram: solução de tampão fosfato salino PBS, ácido ascórbico, ácido úrico, ferroceno (Fc), 6- mercapto-1-hexanol (MCH), antígeno prostático específico (PSA) de sêmen humano e proteína calicreína humana 2 (HK2) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Etanol padrão analítico (Merck), alumina (Metrohm, NL), H₂SO₄ (Dinâmica). Água ultrapura do sistema de purificação Milli-Q (Millipore Inc.) (18,2 MΩ cm), foi utilizadas tanto na lavagem dos materiais quanto na preparação de soluções.

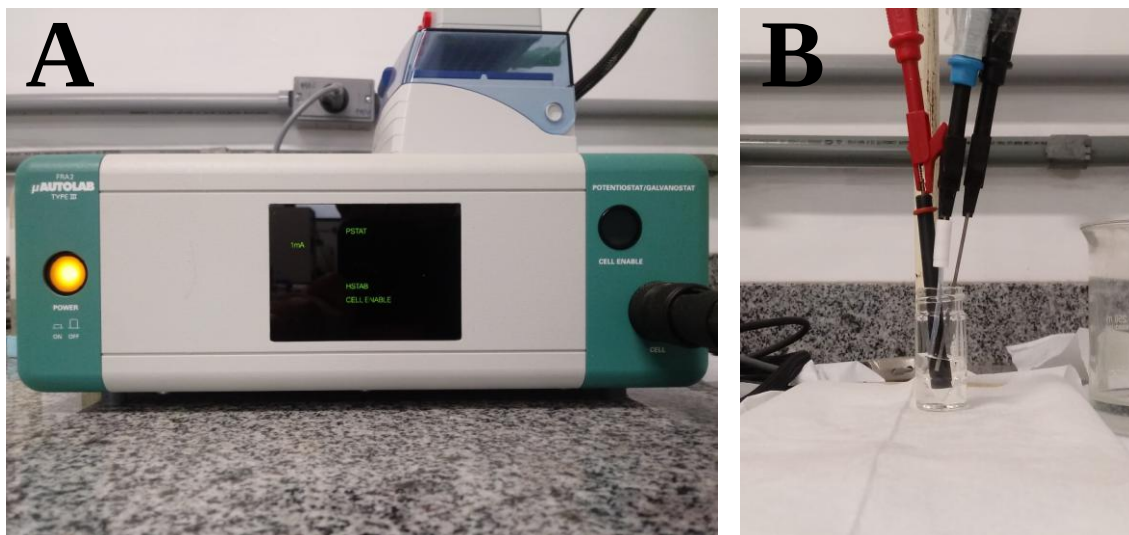
Figura 4: Estruturas das sequências aptaméricas (A) fPSA, (B) PSA e (C) HK2, com conformação *hairpin* que foram imobilizadas na superfície de um eletrodo de ouro adquiridas pelo software IDT OligoAnalyzer.



3.2 Célula e técnicas eletroquímicas

As medidas foram realizadas em um sistema padrão de três eletrodos ilustrados na Figura 5. Foi utilizado um eletrodo de trabalho de ouro (área = 0,028 cm²), um eletrodo de referência de Ag/AgCl/KCl (3 mol/L) e o contra-eletrodo Pt/Ti ET078-1, todos componentes de uma célula eletroquímica padrão (eDAQ modelo ET-073). Acoplado a este sistema: potenciostato μ AutoLabIII (Metrohm, NL) com o módulo FRA32M e um notebook contendo o software NOVA 1.10 para o processamento dos dados.

Figura 5: Representação da célula eletroquímica acoplada ao potenciostato (A) composta por um sistema de três eletrodos (B): eletrodo de trabalho de ouro (vermelho),



eletrodo de referência (azul) e o contra-eletrodo (preto).

As técnicas eletroquímicas utilizadas na caracterização dos aptasensores constituem de Voltametria Cíclica (VC), Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) e Espectroscopia de Impedância (EI). As voltametrias cíclicas foram realizadas de 0,0V até 1,8V com 25 ciclos e velocidade de varredura de 50 mV/s para avaliar o perfil de dessorção de oxigênio da superfície provenientes do eletrodo de ouro (BURK; NUGENT, 1997). As voltametrias de onda quadrada realizam a amostragem de em módulo de corrente, ou seja, tanto no pulso negativo quanto o positivo de forma paralela. Isto permite a obtenção dos picos de oxidação e redução das espécies eletroativas de maneira rápida quando comparadas a outras técnicas eletroquímicas (OSTERYOUNG; O'DEAL, 1993) e por este motivo será a técnica majoritária de análise neste trabalho. As medidas foram feitas utilizando uma amplitude 40 mV e frequência 60 Hz. Tal intervalo de potencial escolhido refere-se à oxirredução do azul de metileno marcado na terminação 3' das sequências aptaméricas. O monitoramento da estabilidade dos três aptasensores, na presença ou não das proteínas biomarcadoras, identifica oscilações na intensidade de corrente elétrica e o cálculo de sua variação é dado por $\Delta I = I_{pa} - I_{pd}$, onde I_{pa} é o pico antes da presença de proteína e I_{pd} o pico depois dos aptasensores interagirem com a mesma, cujo procedimento foi realizado em outros trabalhos publicados pelo nosso grupo de pesquisa (CRULHAS et al., 2017a; KARPIK et al., 2017; PEREIRA CRULHAS, 2017).

Por fim, a técnica de espectroscopia eletroquímica de impedância foi empregada para avaliar a resistência de transferência de carga a cada modificação feita na superfície do eletrodo de trabalho. Utilizou-se a probe redox ferroceno, cujo potencial de oxirredução ocorre por volta de 0,3 V, com uma perturbação de 10 mV em uma faixa de frequência de 1 mHz a 100 kHz.

3.3 Metodologia

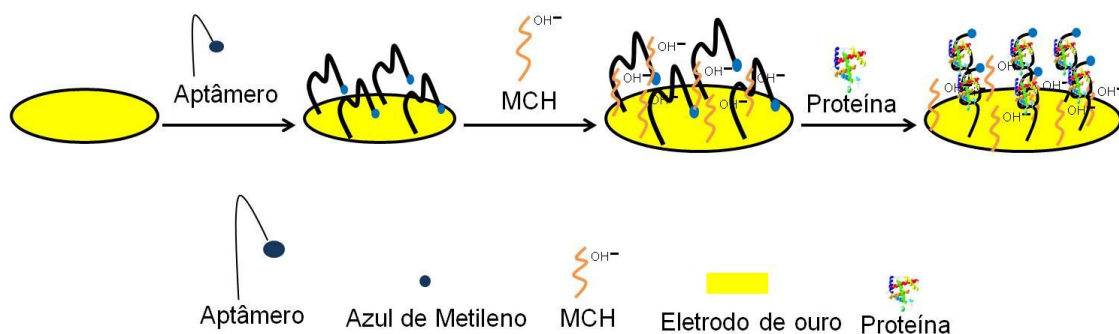
3.3.1 Preparação do eletrodo de trabalho de ouro

O eletrodo de ouro foi polido em suspensão de alumina com água deionizada em um feltro até a superfície mostrar-se com aspecto homogêneo. Em seguida, o eletrodo foi submetido à um sonicador por 30 minutos em etanol. Na sequência, com o eletrodo limpo, montou-se a célula eletroquímica contendo 1 mL de 0,1 M de H_2SO_4 para avaliar os perfis dos picos de oxidação e redução dados pela técnica de voltametria cíclica já descrita em 3.2. Em todas as etapas, realizaram-se lavagens com água deionizada.

3.3.2 Imobilização das sequências aptaméricas na superfície dos eletrodos de trabalho de ouro

Após o procedimento na etapa anterior, o eletrodo foi submetido a uma solução de 1 μM das sequências dos aptâmeros de PSA, fPSA e HK2 diluídos em tampão PBS por um período de *overnight* com cerca de 18 horas à 4°C. Em seguida, adicionou-se o eletrodo a uma solução de 3 mM de MCH durante 30 minutos para que os espaços não ocupados entre as sequências aptaméricas sejam preenchidos, como mostra a Figura 6.

Figura 6: Esquematização da modificação da superfície do eletrodo de ouro e funcionamento dos aptasensores; imobilização das sequências aptaméricas tioladas na superfície do eletrodo de ouro e ordenadas com auxílio do 6-mercapto-hexanol. Logo, pode-se aplicar as culturas de células prostáticas, que se aderem ao fundo para então liberar as proteínas biomarcadoras (Autoria própria).

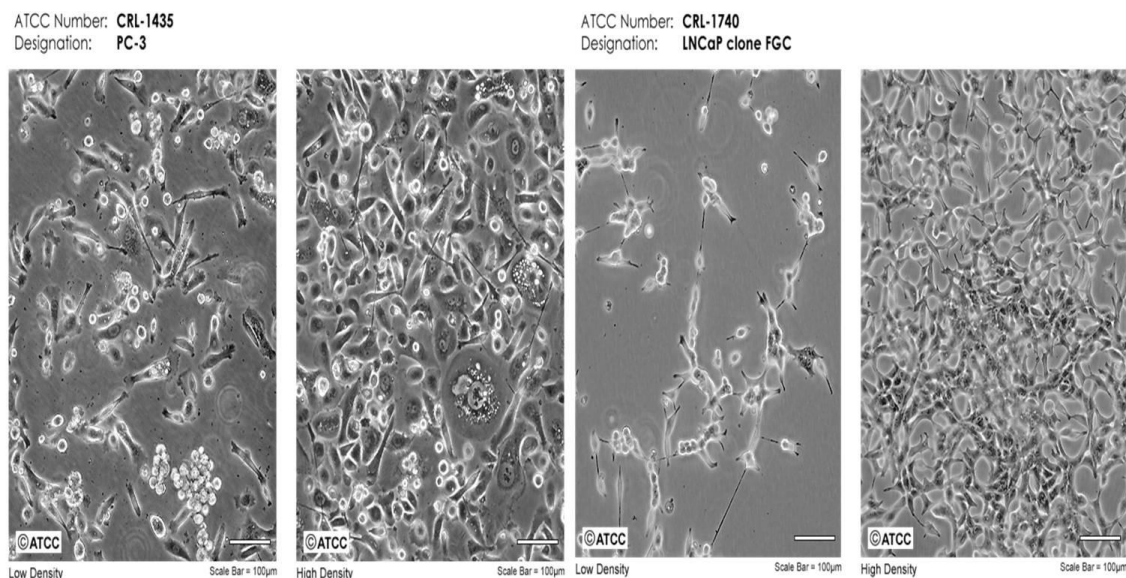


Em todas as etapas, realizaram-se lavagens com 10 mM de tampão PBS de maneira cuidadosa para evitar danos às camadas formadas no eletrodo de trabalho. Com este devidamente limpo, tratado e modificado, é possível submetê-lo às proteínas biomarcadoras ora injetadas manualmente ora monitoradas durante a atividade das linhagens de células prostáticas pela técnica de voltametria de onda quadrada.

3.3.3 Cultivo de células prostáticas

As linhagens de células prostáticas utilizadas neste trabalho foram cedidas pelo Laboratório de Matriz Extracelular (LabMEC) sob responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Flávia Karina Delella do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências (UNESP-Botucatu). Para o monitoramento dos biomarcadores liberados pelas células prostáticas cancerígenas, utilizaram-se as linhagens PC-3 (ATCC® CRL-1435™) cujo fenótipo apresenta alto potencial metastático e pela sua independência à andrógenos, e uma linhagem com menor potencial metastático e dependente de andrógeno (LNCaP; ATCC® CRL1740™), como ilustra a Figura 7 em baixa e alta densidade de população.

Figura 7: Microscopia Eletrônica de Varredura das culturas de células cancerígenas da próstata PC-3 e LNCaP. Imagens de caracterização retirada do site da empresa ©ATCC.



As células foram cultivadas em frascos de 75 cm³ em meio de cultura celular RPMI-1640 (1x, com L-glutamina; VWR) suplementado com soro fetal bovino (FBS), L-glutamina e penicilina/estreptomicina foram adquiridos da Gibco®, (Waltham, MA) tripsina-EDTA 0,25% (Gibco®, Waltham, MA), Estreptomicina (10 mg) e Penicilina (10,000 U). As células foram cultivadas até atingirem ao menos 90% de confluência e logo após foram tripsinizadas por meio da Tripsina-EDTA. A viabilidade celular foi avaliada através da metodologia da câmara de Neubauer. Aproximadamente 10⁵ células foram utilizadas em todos os experimentos através da adição de 1 mL de solução contendo-as dentro do recipiente de medida eletroquímica em contato com o eletrodo de ouro modificado com as sequências aptaméricas tioladas.

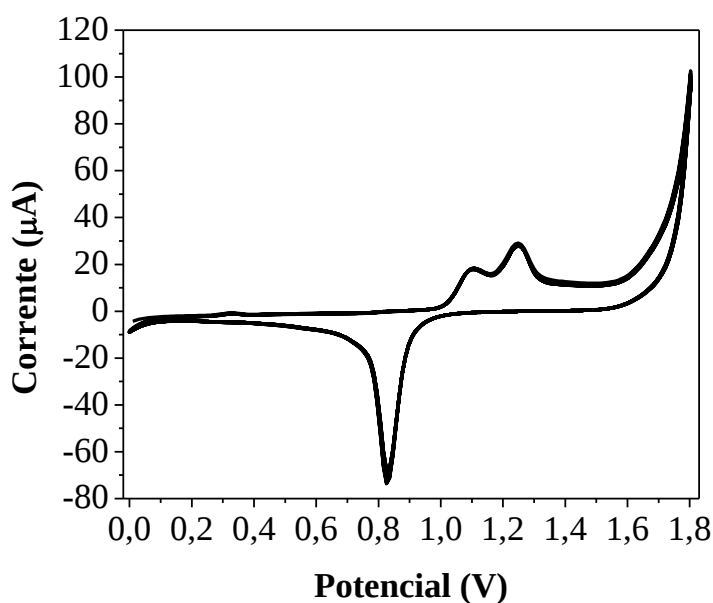
4. Resultados e discussões

4.1 Caracterização

4.1.1 Caracterização eletroquímica do eletrodo de ouro

O primeiro passo deste projeto consistiu em realizar a limpeza da superfície eletroquímica para garantir homogeneidade da superfície. A Figura 8 apresenta uma varredura típica do eletrodo.

Figura 8: VC obtida através do tratamento eletroquímico com 0,1 mol/L de H_2SO_4 durante 25 ciclos com velocidade de varredura de 50 mV/s.

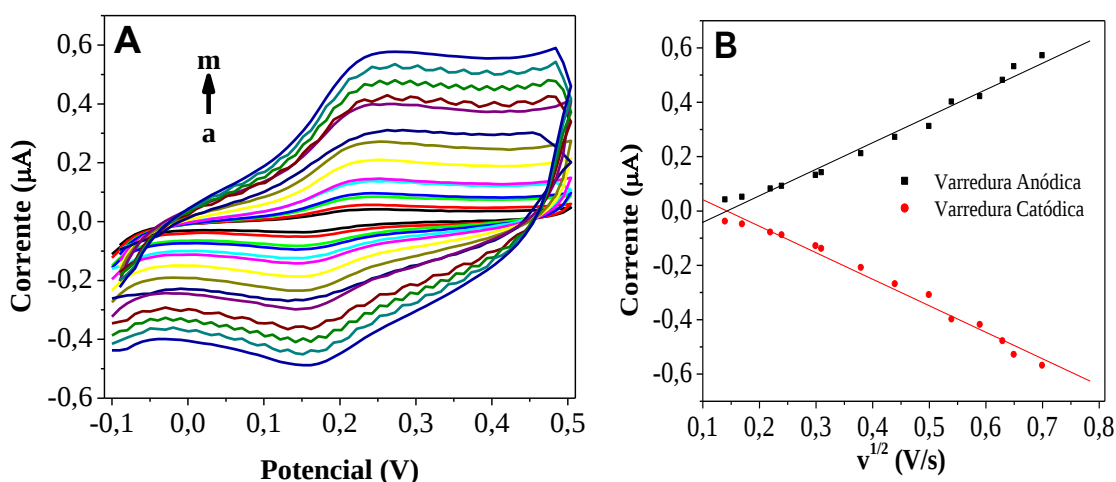


Podemos notar que há a presença de dois processos de oxidação durante a varredura positiva no intervalo de potencial entre 1,10 V e 1,25V enquanto que na varredura negativa foi observado um pico de redução no potencial em torno de 0,82 V. Tais definições dos picos são referentes à formação de uma camada de óxidos de ouro cuja distribuição das valências é relativa às intensidades de corrente positiva na ordem entre 18 µA e 28 µA, ao passo que se obteve 72 µA de intensidade corrente negativa. À medida que o número de ciclos aumenta, a intensidade dos picos de oxidação e redução também aumentam, com um leve deslocamento para potenciais menores. Segundo Burk

e Nugent (1997), “os átomos da superfície do eletrodo de ouro são mais ativos do que os presentes na rede policristalina como um todo e a ausência de vizinhos de metal similares de um lado significa que eles não possuem parte da energia de estabilização da rede de seus equivalentes em volume e, portanto, tendem a oxidar em um potencial menor” e isto contribui igualmente com a intensidade do pico de redução gerado na varredura negativa.

Com eletrodo devidamente limpo, o próximo passo foi realizar a investigação cinética da superfície em diferentes velocidades de varredura de 0,02 V/s até 0,5 V/s usando a probe redox ferroceno. Para tanto, aplicou-se um intervalo de potencial entre -0,1 e 0,5 V a fim de registrar os picos de oxidação e redução do ferroceno, em torno de 0,3V e 0,1V, respectivamente e ilustrados pela Figura 9. Logo após obter os voltamogramas cíclicos com as respectivas velocidades de varredura, obteve-se a correlação entre as intensidades dos picos de corrente com a raiz quadrada de cada velocidade varredura.

Figura 9: (A) VC da superfície de ouro em diferentes velocidades de varredura (a-m: 0,02, 0,03, 0,05, 0,06, 0,09, 0,1, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,50V/s. (B) Relação do pico de intensidade de corrente em função da raiz quadrada do potencial da velocidade de varredura. As medidas foram feitas em 10mM PBS (pH 7,4) utilizando a probe redox ferroceno.



Como ilustra a Figura 9A, à medida que as velocidades de varredura aumentam, a intensidade do pico acompanha este comportamento; de maneira que a velocidade está

intimamente ligada com a rapidez da troca de cargas entre a superfície do eletrodo de ouro e a probe redox ferroceno. Para melhor observar esta relação, fez-se o uso da extração da raiz quadrada da velocidade de varredura na Figura 9B para observar que as variações possuem perfil linear e em módulo, pois obtivemos valores iguais tanto para a varredura anódica quanto catódica, um indicativo de que a superfície tratada possui perfil homogêneo e com eletroatividade satisfatória para que se possa realizar a modificação com as sequências aptaméricas tioladas.

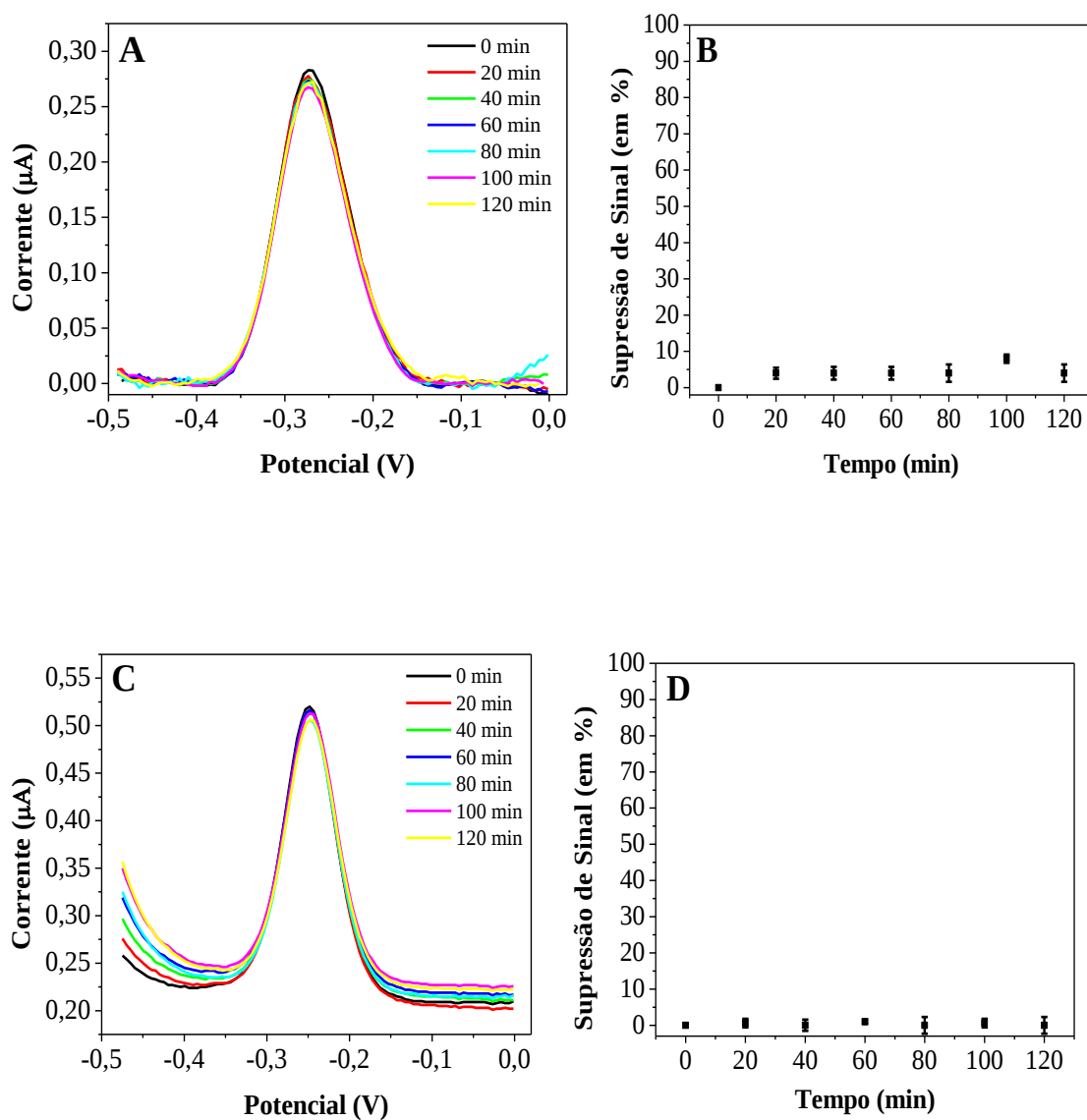
4.1.2 Caracterização eletroquímica dos biossensores aptaméricos fPSA, PSA e HK2 por voltametria de onda quadrada em função do tempo

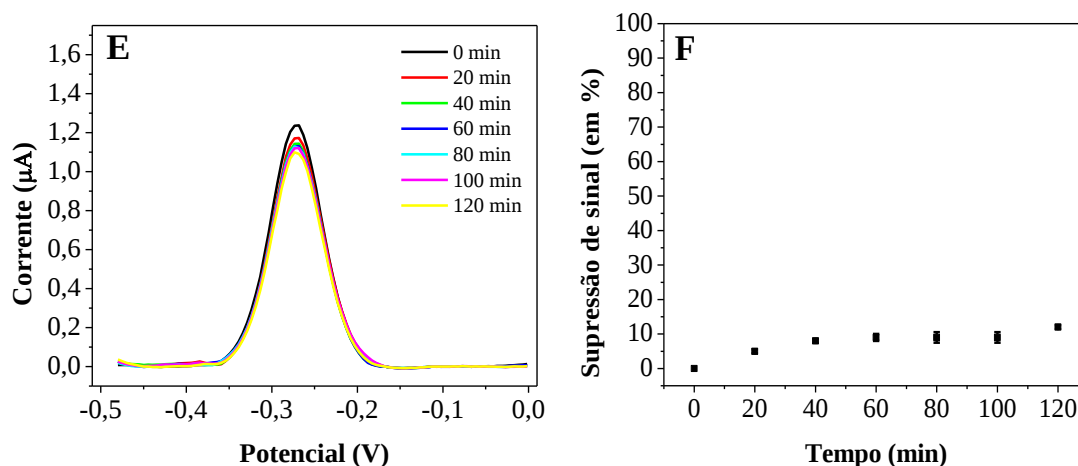
4.1.2.1 Tampão PBS (pH 7,4)

O procedimento de imobilização das sequências aptaméricas na superfície do eletrodo de ouro é ilustrado na Figura 5 e já descrito no item 3.3.2. Foi possível modificar a superfície pela devida marcação feita na terminação 5' com grupamentos tiol (-SH) pois estes possuem forte afinidade por espécies químicas do ouro. Ainda que o período incubação promova a formação de camadas auto-organizadas, a distribuição das imobilizações ao longo da superfície não ocorre em sua totalidade e utiliza-se 6-mercaptop-hexanol (MCH) para preencher os espaços entre as sequências aptaméricas com a finalidade de ordena-las. Isto também previne a adsorção de proteínas indesejadas devido à presença de grupos OH⁻ nas ramificações das cadeias carbônicas presentes no MCH, evitando assim uma queda no sinal eletroquímico e a adsorção de proteínas indesejadas (WIADERLDEWICZ; RUIZ-CARRILLO, 1987).

A Figura 10 mostra os picos gerados pela técnica de voltametria de onda quadrada no intervalo de -0,5 até 0 V, para o monitoramento da estabilidade dos três biossensores aptaméricos, PSA, fPSA e HK2 medidos durante 2 horas com período de 20 minutos em 10 mM de tampão PBS com pH 7,4. Assim, é possível obter a curva de calibração dos biossensores levando em conta a preservação estrutural das proteínas biomarcadoras e determinar o limite de detecção nos experimentos futuros.

Figura 10: VOQ resultantes da estabilidade ao longo do tempo em 10 mM de tampão PBS dos aptasensores **(A,B)** PSA, **(C,D)** fPSA e **(E,F)** HK2, com amplitude 40 mV, frequência de 60 Hz e com intervalo entre as medidas de 20 minutos durante 2 horas e as respectivas porcentagens de supressão de sinal.





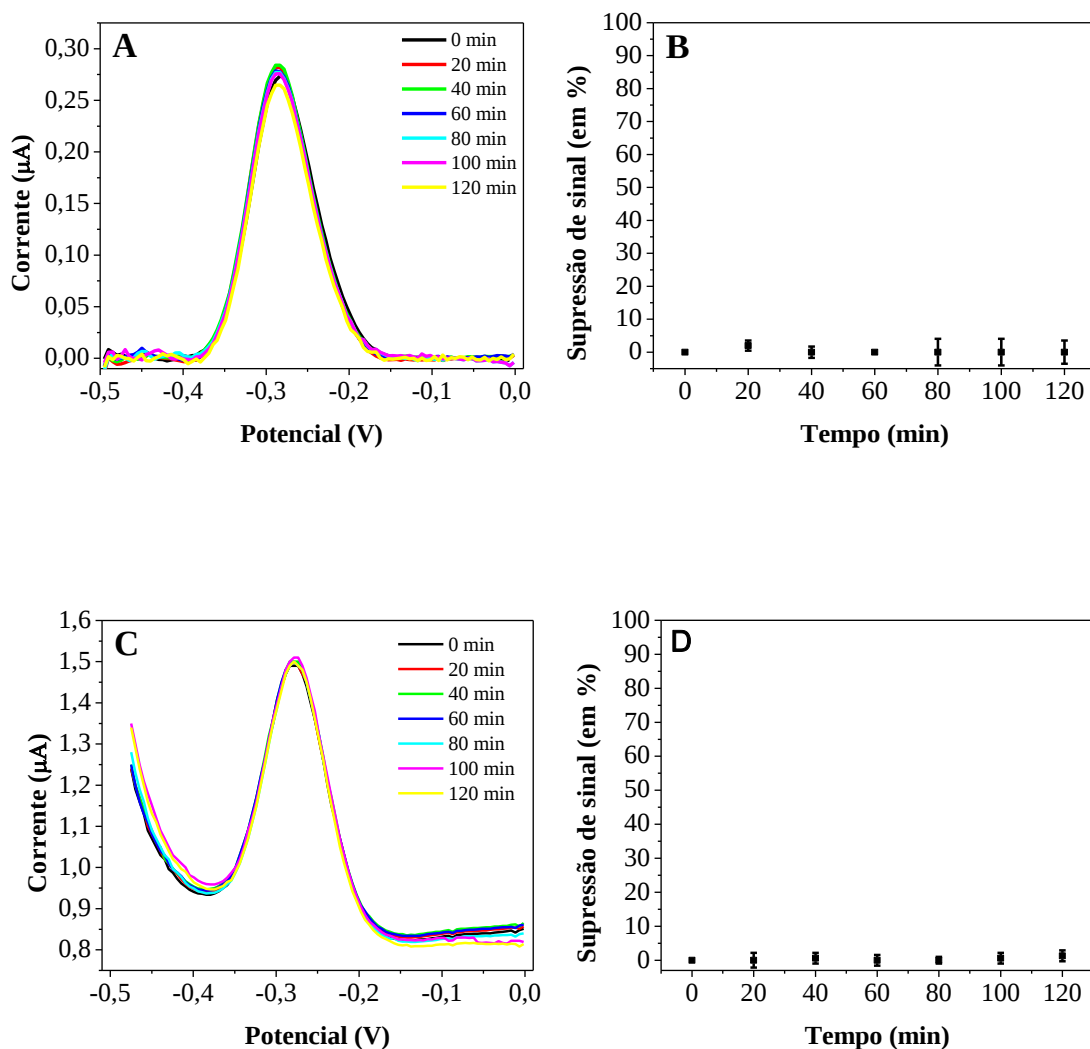
Os voltamogramas de onda quadrada demonstraram um perfil gaussiano bem definido para todos os três aptasensores. Nota-se que há baixa variação na intensidade de corrente em todos os casos. Para a sequência aptamérica PSA (A,B), o picos possuem valores por volta de $0,27 \mu\text{A}$ com variação em torno de 5% a 10% ao passo que fPSA (B,C) obteve $0,51 \mu\text{A}$ com variação entre 2% e 4% enquanto que HK2 teve um sinal de $2,8 \mu\text{A}$ com variação também em torno de 10% a 12%. Estas margens em porcentagem estão de acordo com outros desempenhos em trabalhos já realizados pelo nosso grupo de pesquisa e na literatura (CRULHAS et al., 2017b; KARPIK et al., 2017; LIU et al., 2010, 2015). Para fPSA, houve uma ligeira queda destas porcentagens. Logo, os biosensores aptaméricos se mostraram estáveis e reproduzíveis ao longo das duas horas de exposição ao tampão PBS, cujas respectivas porcentagens das supressões de sinais que indicam baixo decaimento de pico.

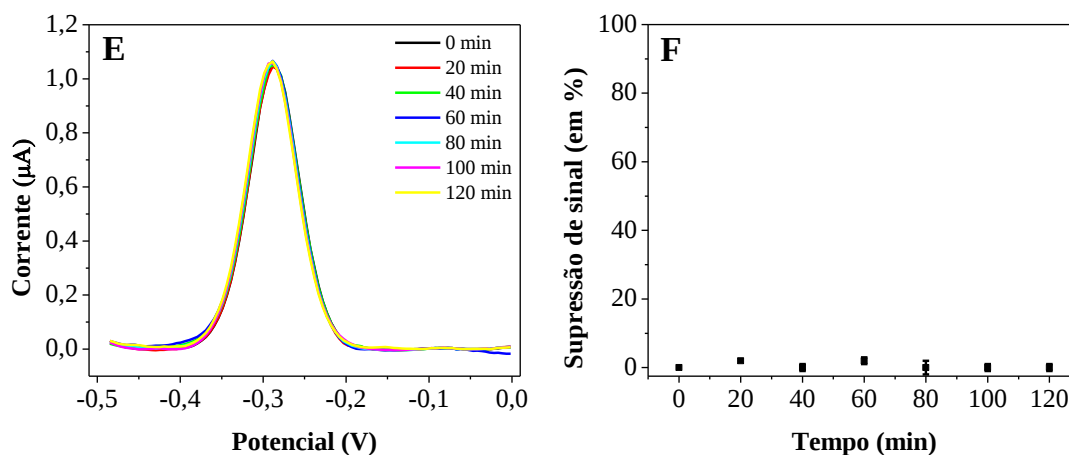
4.1.2.2 Meio de cultura RPMI-1640®

O comportamento da estabilidade dos três aptasensores expostos ao meio de cultura RPMI-1640® é mostrado na Figura 11. As sequências aptaméricas imobilizadas produziram valores de intensidade de corrente diversos. Para PSA, obteve-se sinal em torno de $0,27 \mu\text{A}$ enquanto que fPSA forneceu valores próximos de $1,54 \mu\text{A}$ e HK2, $1,15 \mu\text{A}$. Estes perfis voltamétricos são semelhantes àqueles coletados durante a

avaliação de estabilidade em meio PBS. Ainda assim, é possível observar que as variações nos decaimentos dos picos gerados oscilam entre 3% e 5% para os três aptasensores, ou seja, oscilações mais baixas quando comparadas a exposição no meio anterior (10-12%).

Figura 11: VOQ resultantes da estabilidade ao longo do tempo em meio de cultura RPMI-1640® dos aptasensores (A,B) PSA, (C,D) fPSA e (E,F) HK2 entre -0,5V e 0,0V, com amplitude 40 mV, frequência de 60 Hz e com intervalo entre as medidas de 20 minutos durante 2 horas e as respectivas porcentagens de supressão de sinal.





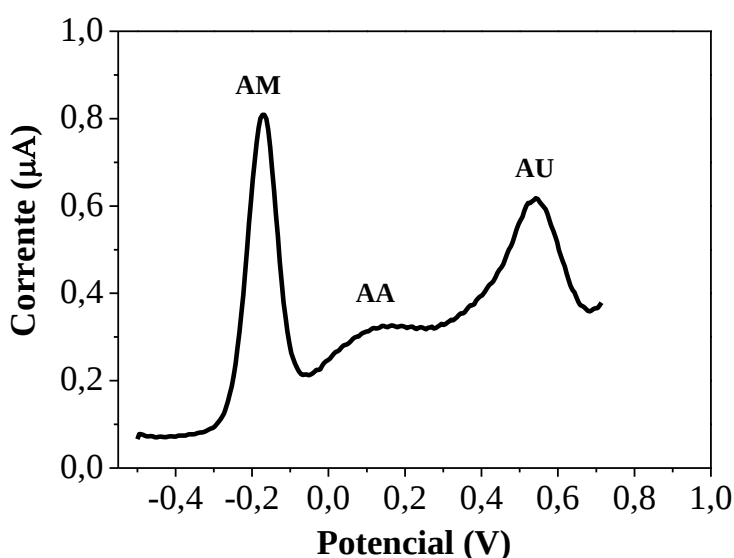
Este fenômeno ocorre devido ao meio de cultura RPMI-1640 possuir menores concentrações de cátions como sódio e potássio, presentes em soluções de PBS. A ausência destes sais evitam fracas interações de complexação com a estrutura dos aptâmeros e ligeiras alterações nas transferências de carga entre a superfície do eletrodo e o azul de metileno marcado nas extremidades 3'. Por consequência, isto pode alterar os níveis de sensibilidade dos biossensores, além de ocasionar à menor variação da supressão de sinal durante as duas horas de monitoramento de suas respectivas estabilidades (HIANIK et al., 2007). Logo, os três aptasensores demonstraram ser aptos à submissão tanto em meio PBS quanto em meio de cultura RPMI-1640 e não sofreram qualquer mudança significativa no comportamento na ausência de proteínas biomarcadoras afins.

4.1.2.3 Interferentes

A avaliação da presença de outras biomoléculas que também são transportadas pelo sistema circulatório é importante devido ao fato de que podem provocar falso-positivos ao interagirem com os biossensores aptaméricos. Apesar do processo de síntese dos aptâmeros realizados pela técnica de SELEX garantir a alta especificidade e sensibilidade, foi necessário avaliar se o comportamento eletroquímico dos compostos interferentes possui janelas diferentes de oxirredução ao compará-los com o azul de metileno. Ou seja, monitorar a atividade do aptasensor em um intervalo de potencial que englobe as intensidades de corrente elétrica do azul de metileno e compostos

interferentes como ácido úrico e ácido ascórbico. As respostas aos processos de oxirredução foram analisados através da técnica VOQ ilustradas na Figura 12.

Figura 12: VOQ da análise de compostos interferentes com sinal de amplitude em 40 mV e frequência de 60 Hz no intervalo entre -0.50 a 0.7 V versus Ag/AgCl. Os compostos utilizados foram ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (AU) com concentração de 100 nM.

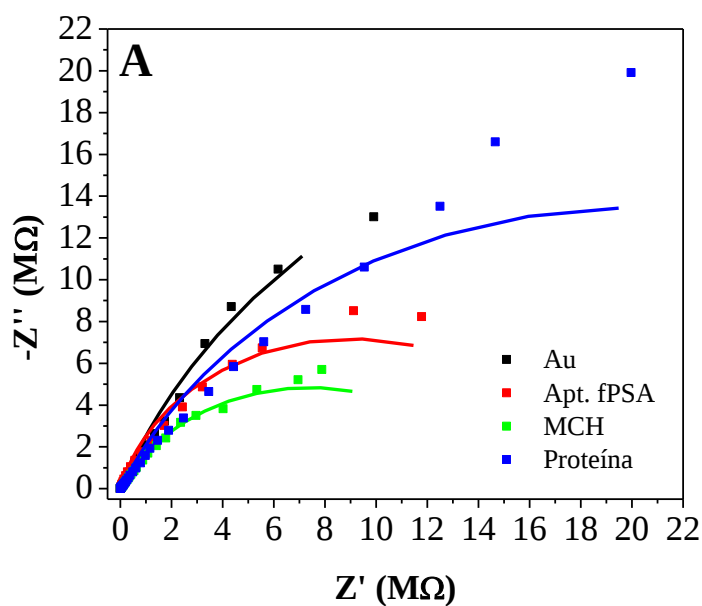


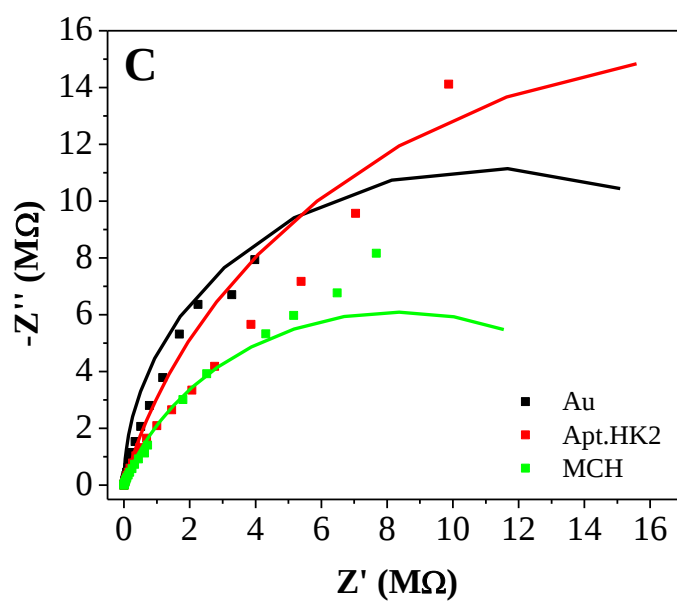
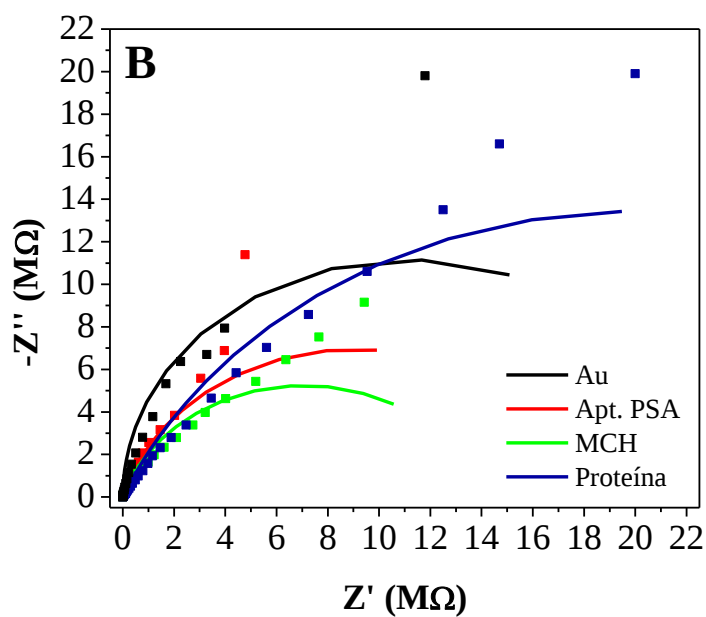
O voltamograma acima mostra a presença dos picos de oxidação dos compostos estudados: o azul de metileno obteve oxidação em torno de -0,25 V, o ácido ascórbico em 0,15 V, o ácido úrico em torno de 0,6 V. As respectivas correntes elétricas geradas em resposta a varredura do intervalo de potencial mostraram maior intensidade para o azul de metileno em comparação com os compostos interferentes. A diferença dos potenciais mostrar que não há sobreposição dos sinais, logo sendo possível a detecção dos biomarcadores mesma na presença desses interferentes.

4.1.3 Caracterização dos aptasensores e detecção de proteína biomarcadora por espectroscopia eletroquímica de impedância

A técnica de espectroscopia eletroquímica de impedância foi realizada para se medir a resistência de transferência de cargas presentes na superfície, que depende da atividade de oxirredução entre a probe redox e a superfície do eletrodo. A Figura 13 apresenta os diagramas de Nyquist, composto por dois planos, um real (Z') e outro imaginário ($-Z''$). A existência do plano complexo permite a formação de um gráfico com formato de semicírculo, cujo intervalo de frequências maiores e menores permite investigar um controle cinético e difusional, e o aparecimento de uma reta subsequente.

Figura 13: Gráfico Nyquist a cada modificação realizada na superfície do eletrodo de trabalho de ouro realizada com a probe redox ferroceno (0,3V) no intervalo de frequência 1 mHz até 100 KHz, com perturbação de amplitude 5 mV para os aptâmeros de (A)fPSA, (B) PSA e (C) HK2.





Nota-se que a superfície do eletrodo de trabalho de ouro sem nenhuma modificação obteve diâmetro de semicírculo considerável referente à resistência de transferência de carga. A partir da incubação dos aptâmeros nos casos de fPSA e PSA, na Figura 10A e 10B respectivamente, tal preenchimento reduziu os diâmetros dos semicírculos e consequentemente a resistência (ordem de $M\Omega$).

Isto ocorre devido a presença da probe redox azul de metileno na extremidade 3' dos aptâmeros, cuja proximidade da superfície do eletrodo de ouro permite melhor facilidade na transferência de carga. Ao utilizar o MCH para preencher os espaços vazios entre os aptâmeros e ordena-los, as ramificações contendo grupos OH^- , espécie eletroativa suficiente para permitir que a resistência também diminua. Porém, ao adicionar a proteína biomarcadora para ambos os casos, o diâmetro do semicírculo obteve maior valor dentre as modificações realizadas bem como o aumento da resistência de transferência de carga devido à interação aptâmero-proteína, o que também torna a aplicação desta técnica como meio alternativo de diagnóstico. No caso do aptâmero de HK2, o diâmetro referente a esta modificação em relação à superfície de ouro aumentou e por consequência, sua resistência. Este caso é particular para este aptâmero, pois acreditamos que dentre os três tipos utilizados neste trabalho, este que possui menor número de pares de base (20) interage e se liga à superfície de ouro com melhor eficiência do que nos outros dois casos cujos números de pares de base são próximos (35 e 32 para PSA e fPSA, respectivamente). Um dos indicativos deste fenômeno está na escala de resistência dos experimentos. Enquanto que para PSA e fPSA obtivemos, tanto para o eixo Z' quanto para o eixo $-Z''$, valores entre 0 e 22 $\text{M}\Omega$ ao passo que para HK2, esta escala ocorreu entre 0 e 16 $\text{M}\Omega$. Outro indicativo são os desempenhos durante a exposição em tampão PBS (seção 4.1.2.1) e RPMI-1640 (seção 4.1.2.2). O aptâmero para HK2 obteve melhor sinal dentre as sequências, fato igualmente atribuído ao menor número de pares de base presente nesta sequência o que leva a maior proximidade com a superfície do eletrodo de ouro e a probe redox azul de metileno.

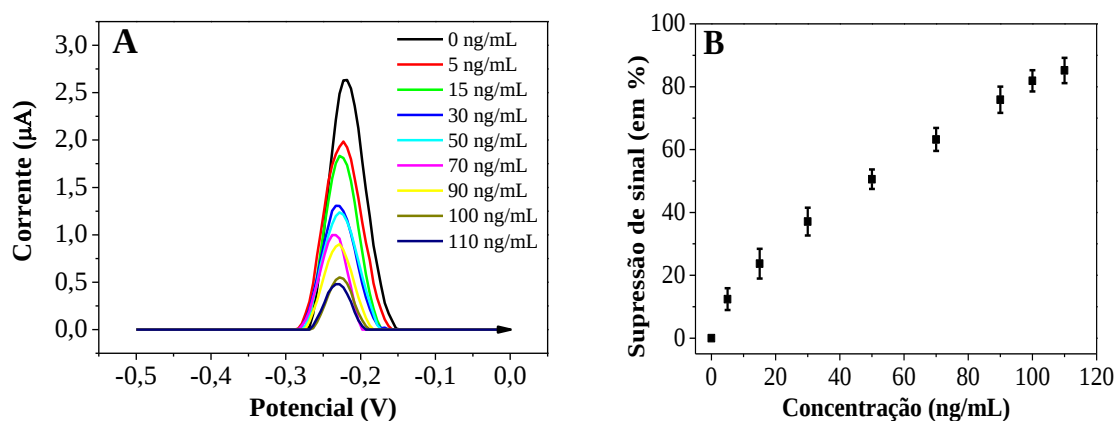
Ainda assim, quando a superfície é preenchida com o MCH, o diâmetro de semicírculo torna a cair pela melhor ordenação das sequências aptaméricas e presença dos grupos OH^- e, logo, menor valor de resistência na transferência de carga. Para a HK2, não foi possível realizar a detecção da proteína biomarcadora devido à falta de compatibilidade da proteína adquirida comercialmente com a sequência aptamérica em questão. Os valores das resistências experimentais apresentaram-se na ordem de $\text{M}\Omega$, devido à área da superfície ($0,028 \text{ cm}^2$) ser inversamente proporcional à resistência, de acordo com a segunda Lei de Ohm. Os processamentos de dados bem como as linhas teóricas de cada etapa de modificação foram feitos a partir do software NOVA 1.9 usando a função de modelagem para o perfil de semicírculo eletroquímico.

4.2 Aplicação dos biossensores aptaméricos

4.2.1 Curva de calibração dos biossensores fPSA e PSA

A curva de calibração foi realizada com a exposição dos biossensores fPSA e PSA em meio PBS ao administrar alíquotas do antígeno prostático específico de concentração conhecida, levando em conta os valores coletados na estabilização de background. Ambos os biossensores foram monitorados a cada 20 minutos pela técnica de voltametria de onda quadrada com intuito de monitorar e avaliar a interação entre as sequências aptaméricas marcadas com a probe redox azul de metileno e a proteína biomarcadora, até observar a saturação do sistema. Como elucidado na seção 1.3.1, foi possível observar o modelo de “*signal-off*” (XIAO et al., 2005b), no qual há perda de sinal. Tal comportamento se deve ao afastamento da probe redox azul de metileno da superfície do eletrodo, devido a mudança de conformação das sequências aptaméricas e isto leva à dificuldade de transferência de cargas entre as estruturas e provoca a diminuição da intensidade do sinal, devidamente convertidas em porcentagem (SS), como ilustra a Figura 14.

Figura 14: (A) VOQ resultantes da curva de calibração de fPSA ao longo do tempo durante a exposição dos aptasensores obtidos no intervalo entre -0,5V e 0 V, com amplitude 40 mV, frequência de 60 Hz e com intervalo entre as medidas de 20 minutos e as respectivas porcentagens de supressão de sinal (B).



As medidas realizadas foram realizadas entre o intervalo de -0,5 V a 0 V e foi possível observar em -0,25 V as diminuições dos picos de intensidade a medida que as alíquotas foram administradas, cujas concentrações partiram de 0 ng/mL, com valor por volta de 2,7 μ A, até 110 ng/mL cujo valor final aparece com 0,7 μ A. O cálculo da variação da corrente foi realizado pela diferença entre as intensidades dos picos de corrente, dado por $\Delta I = I_{pa} - I_{pd}$, onde I_{pa} é o pico antes da presença de proteína e I_{pd} o pico depois dos biossensores interagirem com a mesma. Assim, através da aplicação do método de regressão linear, pode-se obter a equação que possibilita correlacionar as porcentagens de supressão de sinal com a concentração da proteína em questão. A equação obtida para fPSA foi $SS = 12,686 x + 13,235$ ($R^2 = 0.999$) enquanto que para PSA, foram utilizados os mesmo parâmetros já previamente estudados pelo nosso grupo de pesquisa em trabalhos anteriores e assim temos a equação $SS = 0,61 + 1,9 x$ ($R^2 = 0.989$) (CRULHAS et al., 2017a). Dadas as diferenças entre as intensidades, foi possível obter o limite de detecção dos biossensores. Ou seja, a menor quantidade que um analito necessita para gerar uma resposta no dispositivo e cujo valor de concentração para fPSA é 2,9 ng/mL e PSA com 1,1 ng/mL, ambos obtidos pelo cálculo ao utilizar o desvio padrão do y-intercepto ($LD = 3\delta/\text{inclinação da reta}$).

A curva de calibração para a sequência aptamérica HK2 não foi possível ser realizada devido à baixa compatibilidade da proteína adquirida comercialmente. Tal compatibilidade foi identificada após algumas tentativas sem sucesso de realizar a determinação das quantidades de concentração e suas respectivas supressões de sinais. A confirmação foi feita através de uma análise de eletroforese (dados não mostrados) na qual o ponto isoelétrico da proteína biomarcadora encontrava-se cerca de uma unidade de pH abaixo (pH 6,4) do valor encontrado na homeostase sanguínea (pH 7,4). Ao possuir tal ponto isoelétrico e estar diluído em tampão PBS (pH 7,4), a proteína encontrou-se carregada negativamente, como igualmente as sequências aptaméricas para HK2. Por possuírem cargas iguais, a adsorção da proteína ficou inviabilizada, apesar das propriedades de alta especificidade e seletividade ofertadas pelos aptâmeros. Desta feita, os dados de supressão de sinal da proteína permaneceram em porcentagem e correlacionados de forma qualitativa.

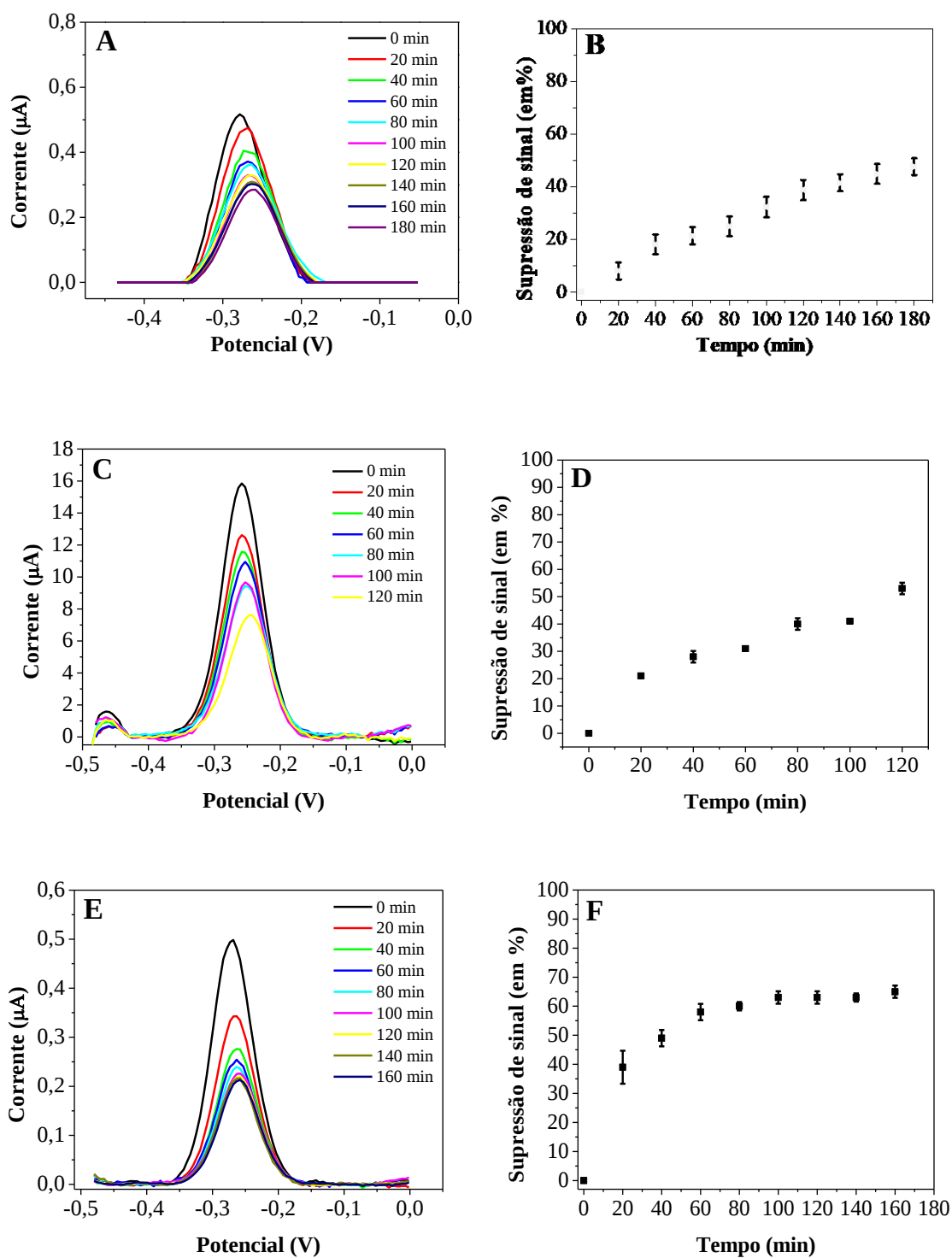
4.2.2 Monitoramento da liberação das proteínas biomarcadoras pela linhagem celular PC-3

Nesta parte do trabalho, a exposição dos três biossensores aptaméricos para PSA, fPSA e HK2 as linhagens de células cancerígenas PC-3 foi realizado durante duas horas com medidas adquiridas com intervalo de 20 minutos entre as medidas. Os biossensores eletroquímicos de PSA, fPSA e HK2 foram submetidos a técnica de voltametria de onda quadrada em um intervalo de potencial entre -0,5V e 0 V até a observação da saturação do sistema, ilustrados na Figura 15. Observou-se novamente supressões as intensidades de corrente por volta de -0,25V, para todos os casos.

A avaliação do monitoramento da atividade celular em função do tempo pode ser convertida em termos de concentração devido da realização da curva de calibração dos dispositivos. A cada aquisição, os voltamogramas de onda quadrada mostram uma redução na intensidade do sinal de corrente elétrica. Isto se deve à interação entre as proteínas biomarcadoras liberadas pela cultura de células PC-3 e as sequências aptaméricas: as proteínas se adsorvem e provocam alterações em sua conformação, o que gera maior dificuldade na transferência de cargas entre o azul de metileno e a superfície do eletrodo.

Os resultados referentes ao biossensor para o monitoramento do PSA durante a atividade celular obteve supressão em torno de 45%, para fPSA temos 55% ao passo que HK2 obteve 65% ao final do experimento, porcentagens estas que correspondem a concentrações de 23 ng/mL para PSA e 6 ng/mL para fPSA. Estes valores de concentração corroboram com os dados obtidos através da técnica de espectroscopia eletroquímica de impedância na qual se avaliou um aumento na resistência do sistema na medida em que cada modificação foi feita sobre a superfície que permitiu a interação entre o biossensores e as proteínas biomarcadoras.

Figura 15: VOQ resultantes da estabilidade ao longo do tempo durante a exposição dos aptasensores (A,B) PSA, (C,D) fPSA e (E,F) HK2 na linhagem celular PC-3, obtidos no intervalo entre -0,5V e 0,0V, com amplitude 40 mV, frequência de 60 Hz e com intervalo entre as medidas de 20 minutos durante 2 horas e as respectivas porcentagens de supressão de sinal.



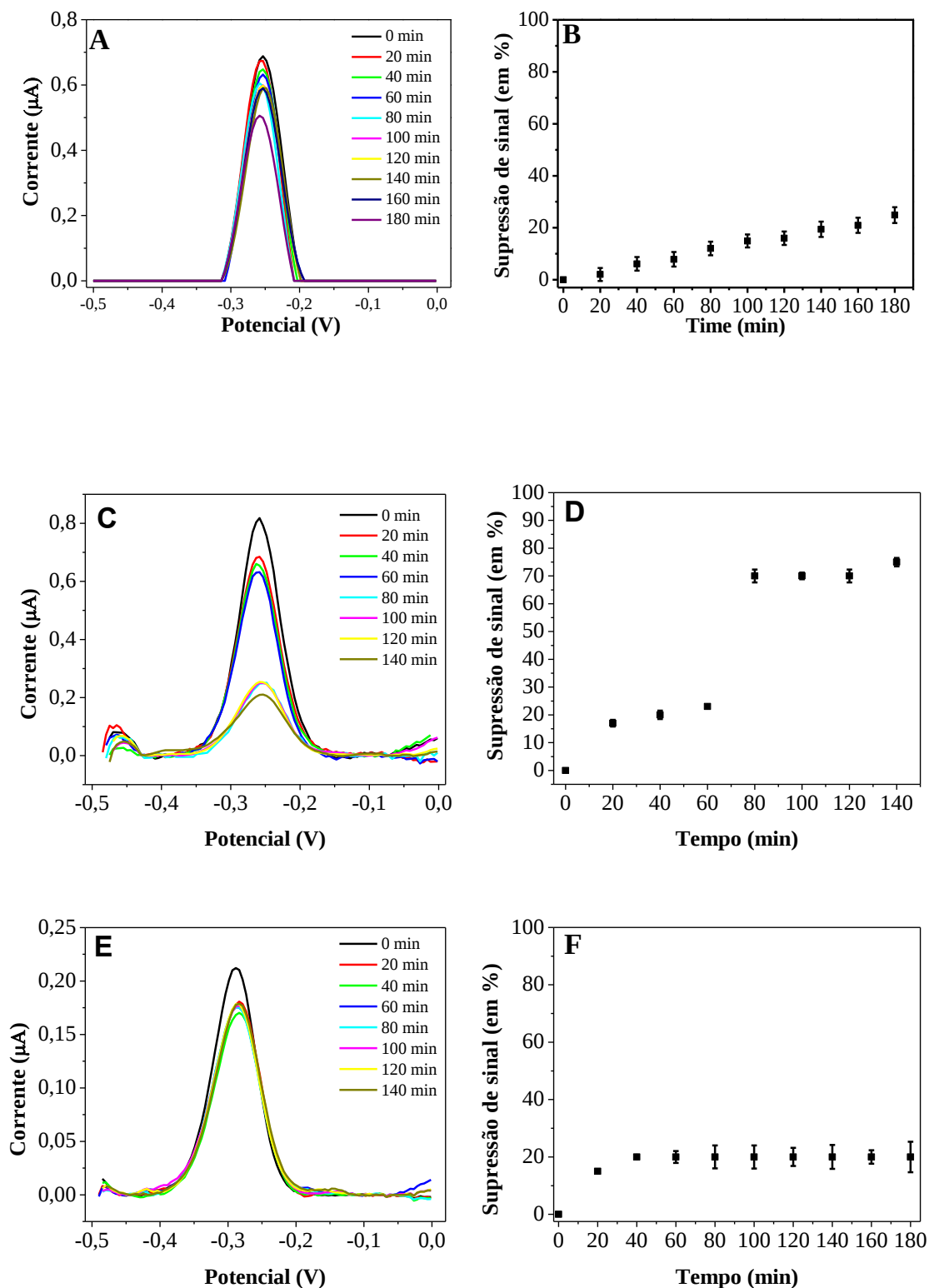
Os valores obtidos no final do experimento para PSA se mostram próximos com aqueles obtidos por Yang et al.(2015) ao utilizarem técnicas de eletroquimiluminescência (ECL) para monitoramento da mesma linhagem celular do tipo PC-3. As medidas foram coletadas baseadas na utilização de anticorpos para a determinação dos valores em termos de concentração e obtidos ao final do experimento foram a cerca de 40 ng/mL, e com limite de detecção próximo ao obtido neste trabalho (PSA: 2,9 ng/mL).

Dada a impossibilidade da realização da curva de calibração para o aptasensor para HK2, os valores seguem expressos em termos de porcentagem e obteve-se uma saturação ao final do experimento. Isto mostra um indicativo, apesar do caráter desta análise permanecer qualitativo, de que este tipo de linhagem celular pode ser considerada mais agressiva em relação à linhagem celular LNCaP, cujo valor para este biomarcador obteve 65% de supressão de sinal ao final do experimento e pode ser fator preponderante na diferenciação da agressividade. Ao levar em conta as classificações feitas na seção 1.1 sobre os níveis de agressividade do câncer de próstata (médio e alto risco) em função das concentrações séricas em triagens do antígeno prostático específico, nossos resultados corroboram ao detectar altos valores de saturação (23 ng/mL) para este tipo celular de maior perfil metastático.

4.2.3 Monitoramento da liberação das proteínas biomarcadoras pela linhagem celular LNCaP

Nesta etapa do trabalho na qual foram feitas as exposições dos três biossensores aptaméricos para PSA, fPSA e HK2 às linhagens de células cancerígenas LNCaP e realizado com o mesmo padrão da etapa anterior, durante duas horas com medidas adquiridas com intervalo de 20 minutos entre as medidas at. Os biossensores eletroquímicos de PSA, fPSA e HK2 foram submetidos a técnica de voltametria de onda quadrada em um intervalo de potencial entre -0,5V e 0 V até a observação da saturação do sistema, como mostra a Figura 16. Observou-se mais uma vez supressões de sinais cujas intensidades de corrente ocorreram por volta de -0,25V, para todos os casos.

Figura 16: VOQ resultantes da estabilidade ao longo do tempo durante a exposição dos aptasensores (A,B) PSA, (C,D) fPSA e (E,F) HK2 na linhagem celular LNCaP, obtidos no intervalo entre -0,5V e 0,0V, com amplitude 40 mV, frequência de 60 Hz e com intervalo entre as medidas de 20 minutos durante 2 horas e as respectivas porcentagens de supressão de sinal.



Os resultados do monitoramento da atividade celular em função do tempo foram novamente convertidos em termos de concentração através das equações calculadas via regressão linear pela realização da curva de calibração dos aptasensores PSA e fPSA. A cada intervalo de tempo de aquisição, os voltamogramas de onda quadrada mostraram novamente uma redução na intensidade do sinal de corrente elétrica. Como discutido no item anterior, isto se deve ao mesmo mecanismo de interação entre as proteínas biomarcadoras liberadas pela cultura de células LNCaP e as sequências aptaméricas.

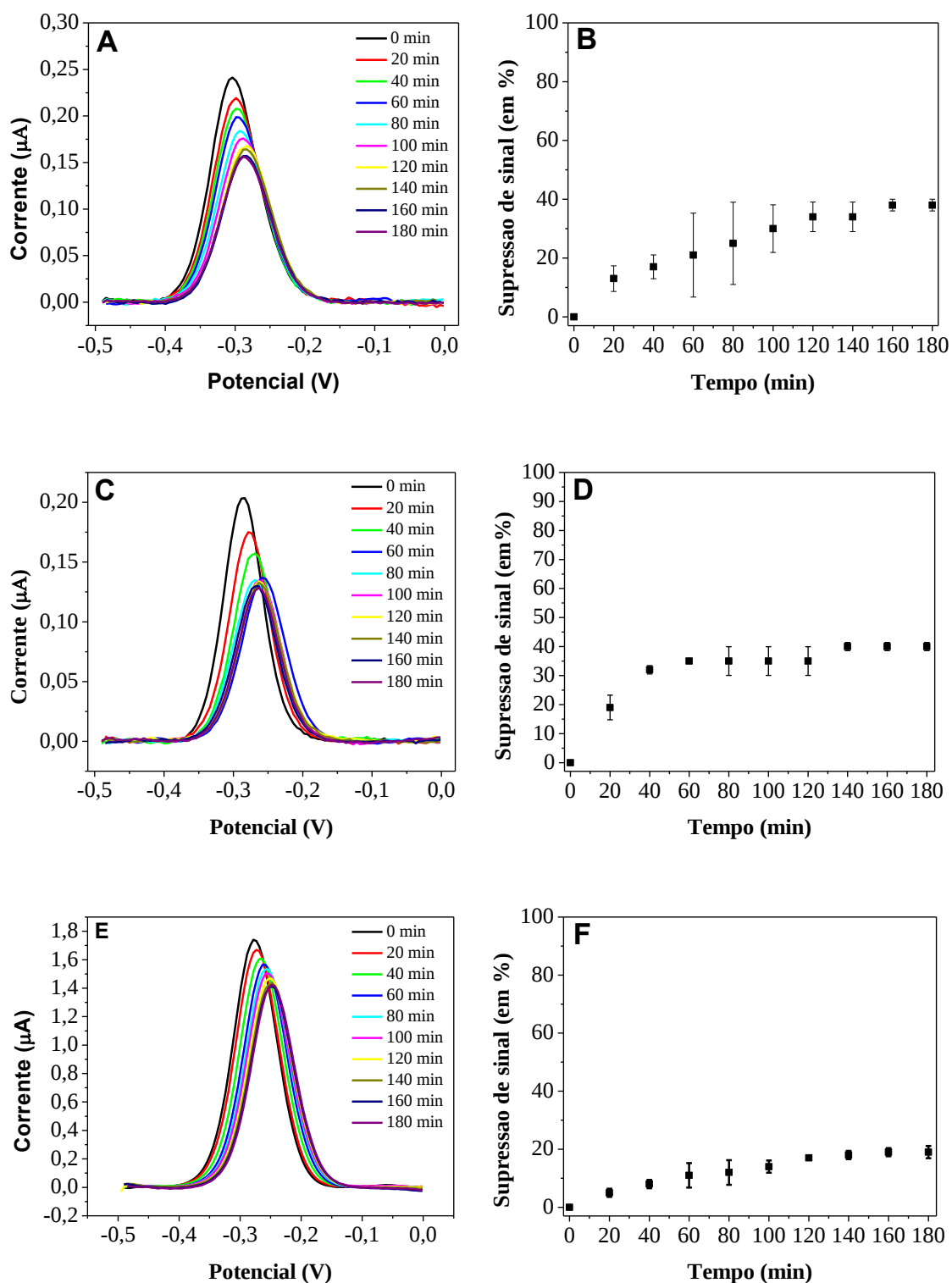
Os padrões dos resultados referentes ao biossensor para o monitoramento do PSA durante a atividade celular foram similares àqueles obtidos na exposição da linhagem PC-3, porém com intensidades de sinais inferiores. No caso do biossensor para detecção do PSA, as supressões de sinais ao final do experimento antigiram valores em torno de 25%, enquanto que para fPSA temos 75% ao passo que HK2 obteve-se apenas 20%. Estas porcentagens correspondem a concentrações de 12 ng/mL para PSA e 7,8 ng/mL para fPSA. Logo, a concentração de fPSA apresentou um ligeiro aumento em relação a linhagem de PC-3. Estes valores de concentrações para os respectivos aptasensores mostram de fato que este tipo de linhagem celular cancerígena possui menor agressividade quando comparada a linhagem de PC-3 ao atingir os mínimos valores de concentrações que são considerados para câncer de próstata de baixo risco catalogados em triagens feitas com PSA explanadas na seção 1.1. Além disso, as concentrações obtidas durante o monitoramento da atividade celular em nosso estudo corroborou com outros valores encontrados na literatura em que se utilizou de plataformas eletroquímicas para a determinação de quantidades de biomarcadores liberados por este tipo de linhagem celular (LIU, 2008).

Quanto à performance do aptasensor para HK2, foi possível observar que os valores expressos em termos de porcentagem de supressão de sinal obtiveram saturação ao final do experimento em torno de 20%. Isto indica em termos qualitativos que este tipo de linhagem celular libera quantidades menores de proteínas quando comparado o desempenho entre as linhagens cancerígenas utilizadas e que este biomarcador merece maior atenção pela distinção encontrada no monitoramento.

4.2.3 Monitoramento da liberação das proteínas biomarcadoras pela linhagem celular PNT-2

Por fim, esta etapa do trabalho foi realizada as exposições dos três aptasensores para PSA, fPSA e HK2 às linhagens de células PNT-2, grupo escolhido como controle. Tal padrão manteve-se o mesmo das etapas anteriores, durante duas horas com medidas adquiridas com intervalo de 20 minutos entre as medidas. Os aptasensores eletroquímicos de PSA, fPSA e HK2 foram submetidos a técnica de voltametria de onda quadrada em um intervalo de potencial entre -0,5V e 0 V até a observação da saturação do sistema, como mostra a Figura 17. Observou-se mais uma vez supressões de sinais cujas intensidades de corrente ocorreram por volta de -0,25V, para todos os casos.

Figura 17: VOQ resultantes da estabilidade ao longo do tempo durante a exposição dos aptasensores (A,B) PSA, (C,D) fPSA e (E,F) HK2 na linhagem celular PNT-2, obtidos no intervalo entre -0,5V e 0,0V, com amplitude 40 mV, frequência de 60 Hz e com intervalo entre as medidas de 20 minutos durante 2 horas e as respectivas porcentagens de supressão de sinal.



O monitoramento da atividade celular em função do tempo foi convertido em termos de concentração através das equações calculadas via regressão linear pela realização da curva de calibração dos aptasensores PSA e fPSA. A cada intervalo de tempo de aquisição, os voltamogramas de onda quadrada mostraram mais uma vez uma redução na intensidade do sinal de corrente elétrica. Como discutido em todos os itens anteriores referentes à exposição, isto ocorre devido interação entre as proteínas biomarcadoras liberadas pela cultura de células PNT-2 e as sequências aptaméricas.

As curvas referentes aos resultados da exposição dos aptasensores para o monitoramento do PSA durante a atividade celular de PNT-2 se mostraram de fato com supressões de sinais inferiores às linhagens de células cancerígenas PC-3 e LNCaP àqueles obtidos na exposição da linhagem PC-3, com algumas notáveis oscilações nas intensidades de sinais no intervalos de tempo de 60 minutos a 120 minutos, com a ressalva de baixas oscilações no final do experimento em todos os casos. No caso do aptasensor para detecção do PSA no grupo controle, as supressões de sinais ao final do experimento antigiram valores em torno de 38% a 40%, mesmo resultado para fPSA ao passo que HK2 obteve-se apenas 19%. Estas porcentagens correspondem a concentrações de 1,95 ng/mL para PSA e 2,11 ng/mL para fPSA. Ou seja, as concentrações de PSA e fPSA apresentaram valores para PNT-2 bastante inferiores em relação as linhagens de PC-3 e LNCaP, sendo estes menores que a classificação de risco explanada na seção 1.1. Ou seja, tais valores de concentrações obtidos nesta linhagem para os respectivos aptasensores mostram então a boa capacidade dos dois sensores aptaméricos em monitorar e a capacidade de diferenciar culturas celulares prostáticas, ora cancerígenas e ora sadias, mas somente quando as curvas de calibração foram possíveis de serem obtidas (exceção HK2) para que as porcentagens pudessem ser devidamente convertidas na variável de concentração. No caso do aptâmetro para HK2, as diferenças entre os sinais se mostraram notáveis, ainda que de forma qualitativa, entre este tipo celular PNT-2 e PC-3, porém obtiveram a mesma porcentagem de supressão de sinal quando comparada com LNCaP. Isto pode representar a real importância de monitorar HK2 e não somente o PSA e suas subformas, majoritariamente mais investigadas em processos de triagens. Ainda que este trabalho não obteve êxito em quantificar as concentrações liberadas por todas as linhagens celulares prostáticas, e em relação ao fato das supressões entre LNCaP e PNT-2 se

mostrarem em níveis próximos a proteína HK2 e seu monitoramento se mostrou um real instrumento de diferenciação entre as linhagens cancerígenas.

5. Conclusão

O desenvolvimento de biossensores a base de aptâmeros para monitoramento de proteínas biomarcadoras do câncer de próstata, PSA, fPSA e HK2 se mostraram viáveis. Logo, os três aptasensores se mostraram estáveis quando expostos em diferentes ambientes eletroquímicos (PBS e meio de cultura RPMI-1640) ao longo do tempo. Quando postas em contato com as proteínas biomarcadoras do câncer de próstata, sejam elas administradas em alíquotas para a determinação da curva de calibração ou no monitoramento da atividade celular, obtiveram supressões de sinais significativas devido à mudança de conformação das sequências, ao provocar maior dificuldade na transferência de cargas entre a superfície e o azul de metileno. Para PSA e fPSA, os limites de detecção obtidos foram de 1,1 ng/mL e 2,9 ng/mL, respectivamente. Isto permitiu quem se determinasse ao final de cada experimento as concentrações de saturação cujos valores foram de:

- PC-3: [PSA]: 23 ng/mL; [fPSA]: 6 ng/mL e 65% de supressão para HK2.
- LNCaP: [PSA]: 12 ng/mL; [fPSA]: 7,8 ng/mL e 20% de supressão para HK2.
- PNT-2: [PSA]: 1,95 ng/mL; [fPSA]: 2,11 ng/mL e 19% de supressão para HK2.

Tais resultados corroboraram com a literatura quanto às concentrações das classificações de risco citadas na seção 1.1, bem como ficou evidente a capacidade de diferenciação entre a agressividade que cada tipo de linhagem celular cancerígena apresenta concomitante com os níveis considerados basais obtidos pelo monitoramento da linhagem PNT-2, nosso grupo controle em questão. Por sua vez, HK2 pode vir a ser um fator preponderante na diferenciação se levado em conta os valores das supressões obtidas, ao realizar uma curva de calibração e correlaciona-la com o parâmetro de agressividade e potencial metastático, dada as expressões desta proteína biomarcadora nas linhagens celulares PC-3 e LNCaP, apesar desta última obter níveis próximos ao do grupo controle.

6. Referências Bibliográficas

ABELOFF, M. D. et al. **Abeloff's Clinical Oncology**. [s.l: s.n.].

AHMAD, K. M. et al. Probing the limits of aptamer affinity with a microfluidic SELEX platform. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, 2011.

ATKINSON, A. J. et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 69, n. 3, p. 89–95, 2001.

BAKER, B. R. et al. An Electronic , Aptamer-Based Small-Molecule Sensor for the Rapid , Label-Free Detection of Cocaine in Adulterated Samples and Biological Fluids. n. Figure 3, p. 3138–3139, 2006.

BALLARD-BARBASH, R. et al. Physical activity, biomarkers, and disease outcomes in cancer survivors: A systematic review. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 104, n. 11, p. 815–840, 2012.

BECKER, C. et al. Discrimination of men with prostate cancer from those with benign disease by measurements of human glandular kallikrein 2 (HK2) in serum. **Journal of Urology**, v. 163, n. 1, p. 311–316, 2000.

BORGONÑO, C. A.; DIAMANDIS, E. P. The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 11, p. 876–890, 2004.

BREWSTER, M. A.; HULKA, B. S.; LAVY, T. L. Biomarkers of pesticide exposure. **Reviews of environmental contamination and toxicology**, 1992.

BURKE, L. D.; NUGENT, P. F. The Electrochemistry of Gold: I The Redox Behaviour of the Metal in. **Gold Bulletin**, v. 30, n. i, p. 43–53, 1997.

CATALONA, W. J. et al. 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. **Journal of Urology**, v. 197, n. 2, p. S200–S207, 2017.

CHO, E. J.; LEE, J.-W.; ELLINGTON, A. D. Applications of Aptamers as Sensors. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 241–264, 2009.

CLARK, L. C. **Monitor_and_Control_of_Blood_and_Tissue_Oxygen.7.pdf** Transactions - American Society for Artificial Internal Organs, 1956.

CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, 1962.

CRULHAS, B. P. et al. Electrochemical aptamer-based biosensor developed to monitor PSA and VEGF released by prostate cancer cells. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 29, p. 6771–6780, 2017a.

CRULHAS, B. P. et al. A Novel Superoxide Anion Biosensor for Monitoring Reactive

Species of Oxygen Released by Cancer Cells. **Electroanalysis**, v. 29, n. 5, p. 1252–1257, 2017b.

D’ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry - 2011 update. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 19–20, p. 1749–1761, 2011.

DARSON, M. F. et al. Human glandular kallikrein 2 (hK2) expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: A novel prostate cancer marker. **Urology**, v. 49, n. 6, p. 857–862, 1997.

DING, L. et al. Trends in cell-based electrochemical biosensors. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 30, p. 3160–3170, 2008.

EMAMI, N.; DIAMANDIS, E. P. Utility of kallikrein-related peptidases (KLKs) as cancer biomarkers. **Clinical Chemistry**, v. 54, n. 10, p. 1600–1607, 2008.

FERLAY J. SOERJOMATARAM I. DIKSHIT R., ESER S., AND MORTALITY WORLD WIDE: IARC CANCERBASE, E. M. **Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11**.

FERREIRA, A. K. DA M. B. J. et al. **Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil**. [s.l: s.n.].

GOLD, L. et al. Aptamers and the RNA world, past and present. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 3, 2012.

GRIESHABER, D. et al. Electrochemical biosensors - Sensor principles and architectures. **Sensors**, v. 8, n. 3, p. 1400–1458, 2008.

GUILBAULT, G. G.; MONTALVO, J. G. A Urea-Specific Enzyme Electrode. **Journal of the American Chemical Society**, v. 91, n. 8, p. 2164–2165, 1969.

HAMULA, C. L. A. et al. Selection and analytical applications of aptamers. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 7, p. 681–691, 2006.

HEIDENREICH, A. et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: Screening, diagnosis, and local treatment with curative intent - Update 2013. **European Urology**, v. 65, n. 1, p. 124–137, 2014.

HENTTU, P.; VIHKO, P. Prostate-specific antigen and human glandular kallikrein: Two kallikreins of the human prostate. **Annals of Medicine**, 1994.

HIANIK, T. et al. Influence of ionic strength, pH and aptamer configuration for binding affinity to thrombin. **Bioelectrochemistry**, v. 70, n. 1, p. 127–133, 2007.

JUNG, K. et al. Ratio of free or complexed prostate-specific antigen (PSA) to total PSA: Which ratio improves differentiation between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 55–62, 2000.

JUSTINO, C.; DUARTE, A.; ROCHA-SANTOS, T. Recent Progress in Biosensors for Environmental Monitoring: A Review. **Sensors**, 2017.

KARPIK, A. E. et al. Aptamer-based Biosensor Developed to Monitor MUC1 Released by Prostate Cancer Cells. **Electroanalysis**, v. 29, n. 10, p. 2246–2253, 2017.

KIRSCH, J. et al. Biosensor technology: Recent advances in threat agent detection and medicine. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 22, p. 8733–8768, 2013.

KO, W. et al. A visible light-induced photocatalytic silver enhancement reaction for gravimetric biosensors. **Nanotechnology**, v. 22, n. 40, 2011.

KUZNETSOV, B. A. et al. On applicability of laccase as label in the mediated and mediatorless electroimmunoassay: Effect of distance on the direct electron transfer between laccase and electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 1–2, p. 73–84, 2001.

LEE, K.; POVICH, L. K.; KIM, J. Recent advances in fluorescent and colorimetric conjugated polymer-based biosensors. **Analyst**, v. 135, n. 9, p. 2179–2189, 2010.

LEITZMANN, M. F.; ROHRMANN, S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: Age, location, and behavioral correlates. **Clinical Epidemiology**, v. 4, n. 1, p. 1–11, 2012.

LIANG, K. et al. Interdigitated conductometric immunosensor for determination of interleukin-6 in humans based on dendrimer G4 and colloidal gold modified composite film. **Electroanalysis**, v. 18, n. 15, p. 1505–1510, 2006.

LIN, K. et al. Prostate-Specific Antigen-Based Screening for Prostate Cancer: An Evidence Update for the U.S. Preventive Services Task Force. **Evidence Synthesis**, n. 90, p. 12-05160- EF-1, 2011.

LINTULA, S. et al. Relative concentrations of hK2/PSA mRNA in benign and malignant prostatic tissue. **Prostate**, v. 63, n. 4, p. 324–329, 2005.

LIU, Y. Electrochemical detection of prostate-specific antigen based on gold colloids/alumina derived sol-gel film. **Thin Solid Films**, v. 516, n. 8, p. 1803–1808, 2008.

LIU, Y. et al. Aptamer-based electrochemical biosensor for interferon gamma detection. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 19, p. 8131–8136, 2010.

LIU, Y. et al. Detecting multiple cell-secreted cytokines from the same aptamer-functionalized electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 64, p. 43–50, 2015.

LU, Y.; MADU, C. Prostate cancer biomarkers. **Biomarkers in Toxicology**, p. 771–783, 2014.

LUDERER, A. A. et al. Prostate-Specific Antigen Improves Diagnostic Performance of Prostate-Specific Antigen in Prostate-Specific Antigen. **Urology**, v. 46, n. 2, p. 187–194, 1995.

MAYEUX, R. Biomarkers: Potential Uses and Limitations. **The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 1, n. 2, p. 182–188, 2004.

METTLIN, C. et al. The American Cancer Society National Prostate Cancer Detection Project. Findings on the detection of early prostate cancer in 2425 men. **Cancer**, v. 67, n. 12, p. 2949–58, 1991.

MIKOLAJCZYK, S. D. et al. Ala217 is important for the catalytic function and autoactivation of prostate-specific human kallikrein 2. **European Journal of Biochemistry**, v. 246, n. 2, p. 440–446, 1997.

MOTTET, N. et al. Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. **European Urology**, v. 71, n. 4, p. 618–629, 2017.

MUSOLINO, S. V.; DEFRANCO, J.; SCHLUECK, R. The ALARA principle in the context of a radiological or nuclear emergency. **Health Physics**, v. 94, n. 2, p. 109–111, 2008.

NAIR, V. G.; SHARIFF, M. H. Determination of an optimum cut-off point for %fPSA/tPSA to improve detection of prostate cancer. **Annals of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 4, n. 4, p. A428–A432, 2017.

NAM, D. H. et al. Silaffin peptides as a novel signal enhancer for gravimetric biosensors. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 1, p. 25–31, 2013a.

NAM, R. K. et al. Increasing hospital admission rates for urological complications after transrectal ultrasound guided prostate biopsy. **Journal of Urology**, v. 189, n. 1 SUPPL, p. S12–S18, 2013b.

PALEČEK, E. Oscillographic polarography of highly polymerized Deoxyribonucleic acid. **Nature**, v. 188, n. 4751, p. 656–657, 1960.

PAMPALAKIS, G.; KELLEY, S. O. An electrochemical immunosensor based on antibody-nanowire conjugates. **Analyst**, v. 134, n. 3, p. 447–449, 2009.

PATOLSKY, F.; WEIZMANN, Y.; WILLNER, I. Long-range electrical contacting of redox enzymes by SWCNT connectors. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 43, n. 16, p. 2113–2117, 2004.

PEREIRA CRULHAS, B. Campus de Botucatu " DESENVOLVIMENTOS DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA MONITORAMENTO DO METABOLISMO DE CÉLULAS CANCERÍGENAS ". 2017.

PEREIRA, R. L. et al. Aptamers: novelty tools for cancer biology. **Oncotarget**, v. 9, n. 42, p. 26934–26953, 2018.

POHANKA, M.; REPUBLIC, C. Electrochemical biosensors – principles and applications. **Methods**, v. 6, n. 2, p. 57–64, 2008.

PRASSAS, I. et al. Unleashing the therapeutic potential of human kallikrein-related serine proteases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 3, p. 183–202, 2015.

PRENSNER, J. R. et al. Beyond PSA: The next generation of prostate cancer

biomarkers. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 127, 2012.

PURVIS, D. et al. An ultrasensitive and stable potentiometric immunosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, n. 11, p. 1385–1390, 2003.

RACKUS, D. G.; SHAMSI, M. H.; WHEELER, A. R. Electrochemistry, biosensors and microfluidics: a convergence of fields. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 15, p. 5320–5340, 2015.

RAMANATHAN, M. et al. Gold-coated carbon nanotube electrode arrays: Immunosensors for impedimetric detection of bone biomarkers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 580–588, 2016.

RECKER, F. et al. The importance of human glandular kallikrein and its correlation with different prostate specific antigen serum forms in the detection of prostate carcinoma. **Cancer**, v. 83, n. 12, p. 2540–2547, 1998.

RITTENHOUSE, H. G. et al. Human kallikrein 2 (hK2) and prostate-specific antigen (PSA): Two closely related, but distinct, kallikreins in the prostate. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 35, n. 4, p. 275–368, 1998.

RUFF, P.; PAI, R. B.; STORICI, F. Real-Time PCR-Coupled CE-SELEX for DNA Aptamer Selection. **ISRN Molecular Biology**, v. 2012, p. 1–9, 2012.

SCOTT, E. et al. **Prostate cancer screening in men aged 50 to 69 years (STHLM3): A prospective population-based diagnostic study.** Grönberg H, Adolfsson J, Aly M, Nordström T, Wiklund P, Brandberg Y, Thompson J, Wiklund F, Lindberg J, Clements M, Egevad L, Eklund M. **Lancet OUrologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, 2017.

SHAMAH, S. M.; HEALY, J. M.; CLOAD, S. T. Complex target SELEX. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n. 1, p. 130–138, 2008.

SHANG, Z. et al. Human kallikrein 2 (KLK2) promotes prostate cancer cell growth via function as a modulator to promote the ARA70-enhanced androgen receptor transactivation. **Tumor Biology**, v. 35, n. 3, p. 1881–1890, 2014.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. World Cancer Report 2014. **IARC Nonserial Publication: WHO Press.**, p. 422–431, 2014.

THEVENOT, D. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification To cite this version: Technical report Electrochemical biosensors: recommended definitions and. **Biosensors & Bioelectronics**, 2001.

THEVENOT, D. R. ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS: RECOMMENDED Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification (Technical Report). **Pure Applied Chemistry**, 1999.

TOTHILL, I. E. Biosensors for cancer markers diagnosis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 20, n. 1, p. 55–62, 2009.

- TUERK, C.; GOLD, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. **Science**, v. 249, n. 4968, p. 505–510, 1990.
- VÄISÄNEN, V. et al. Development of sensitive immunoassays for and total human glandular kallikrein 2. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 1607–1617, 2004.
- VAN GILS, M. P. M. Q. et al. **Innovations in serum and urine markers in prostate cancer: Current European research in the P-Mark project** European Urology, 2005.
- VICKERS, A. et al. Reducing unnecessary biopsy during prostate cancer screening using a four-Kallikrein panel: An independent replication. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 15, p. 2493–2498, 2010.
- WALTON, P. W. et al. Gravimetric biosensors based on acoustic waves in thin polymer films. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 8, n. 9–10, p. 401–407, 1993.
- WANG, Y. et al. DNA aptamer evolved by cell-SELEX for recognition of prostate cancer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–10, 2014.
- WIADERLDEWICZ, R.; RUIZ-CARRILLO, A. Nucleic Acids Research. v. 15, n. 19, p. 7831–7848, 1987.
- XIAO, Y. et al. A reagentless signal-on architecture for electronic, aptamer-based sensors via target-induced strand displacement. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 51, p. 17990–17991, 2005a.
- XIAO, Y. et al. Label-free electronic detection of thrombin in blood serum by using an aptamer-based sensor. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 34, p. 5456–5459, 2005b.
- XIAO, Y.; ROWE, A. A.; PLAXCO, K. W. <Electrochemical Detection of Parts-Per-Billion Lead via an Electrode-Bound.pdf>. p. 262–263, 2007.
- YANG, H. et al. Electrogenated chemiluminescence biosensing for the detection of prostate PC-3 cancer cells incorporating antibody as capture probe and ruthenium complex-labelled wheat germ agglutinin as signal probe. **Analytica Chimica Acta**, v. 863, n. 1, p. 1–8, 2015.
- YANG, L.; LI, Y.; ERF, G. F. Interdigitated Array Microelectrode-Based Electrochemical Impedance Immunosensor for Detection of Escherichia coli O157:H7. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 4, p. 1107–1113, 2004.
- ZAYATS, M. et al. Reconstitution of apo-glucose dehydrogenase on pyrroloquinoline quinone-functionalized Au nanoparticles yields an electrically contacted biocatalyst. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 35, p. 12400–12406, 2005.
- ZHU, L. et al. Dual-label immunoassay for simultaneous measurement of prostate-specific antigen (PSA)- α 1-antichymotrypsin complex together with free or total PSA. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 97–103, 2003.

