

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA A SAÚDE

**Utilização de genossensores eletroquímicos para diagnóstico
de câncer de próstata**

Recife – PE
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEISO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA A SAÚDE

**Utilização de genossensores eletroquímicos para diagnóstico
de câncer de próstata**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada a Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Biologia.

Aluna: Mariana Souza Arruda de Santana
Orientador: Prof^o. Dr. José Luiz de Lima Filho (UFPE)

Recife – PE
2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Santana, Mariana Souza Arruda de

Utilização de genossensores eletroquímicos para o diagnóstico de câncer de próstata/ Mariana Souza Arruda de Santana– Recife: O Autor, 2015.

121 folhas : il., fig., tab.

Orientador: José Luiz de Lima Filho

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Biologia Aplicada à Saúde, 2015.

Inclui referências e anexo

- 1. Próstata- câncer 2. Biossensores 3. Diagnóstico I. Lima Filho, José Luiz de (orientador) II. Título**

616.99463

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-093

Mariana Souza Arruda de Santana

Utilização de genossensores eletroquímicos para diagnóstico de câncer de próstata

Aprovada em 30 de Setembro de 2015, pela comissão examinadora

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: **Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho** – LIKA - UFPE

Prof. Dr^a Maria da Paz Carvalho da Silva LIKA – UFPE (Membro Titular)

Prof. Dr^a. Rosângela Ferreira Frade de Araújo LIKA –UFPE (Membro Titular)

Prof. Dr^a. Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo – UFAL – (Membro titular)

Prof. Dr^a. Marcela Silvestre Outtes Wanderley (Membro Titular)

Dr. Gustavo Alves do Nascimento LIKA-UFPE (Membro Suplente)

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior LIKA-UFPE (Membro Suplente)

Recife – PE
2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre presente em minha vida, me ajudando sempre nesta caminhada a ter seriedade e acreditar nas pessoas.

Agradeço a coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada a Saúde em especial ao Professor Luís Carvalho, que sempre nos inspira a acreditar na ciência e em um mundo melhor, além de nos divertir com suas histórias, e aos Professores deste programa pelo constante apoio.

Ao meu Orientador José Luiz pela oportunidade de trabalhar em um centro de pesquisa de referência e por me incentivar a dar o meu melhor.

Agradeço a Capes pela oportunidade de passar este período de aprendizado com uma bolsa, para que eu pudesse me dedicar integralmente à pesquisa.

Ao grupo de biossensores que sempre se manteve unido e trabalhando em parceria, em especial para não citar nomes e esquecer de alguém, agradeço a todos pelo auxílio que me deram no momento mais especial da minha vida, que foi o nascimento de Alice.

A minha mãe Edilene, por todos os esforços e pela enorme luta para me ofertar tudo de melhor em termos de educação e conforto. Esta tese representa um fruto deste trabalho.

Ao meu marido Célio pela grande vivência que me ajuda a crescer todos os dias, por me apoiar nesse caminho que foge aos olhos materiais da nossa sociedade e por estar sempre ao meu lado mesmo nos momentos em que eu não sou a melhor companhia.

Aos meus inúmeros amigos pelo enorme apoio ao ver meu esforço em procurar a ciência como meio de vida, mesmo sem saber, muitas vezes, corretamente os seus fins. Em especial, as minhas amigas Nathalia Alencar, Marcela Outtes, Elaine Virgínia, Monique Beltrão e Maíra Mafra que me ajudaram na realização deste trabalho e nos momentos de estresse, sempre com uma palavra amiga e com boas risadas.

Aos meus colegas do laboratório e de pós-graduação, técnicos, em especial a Rafael Padilha e a equipe da limpeza que estiveram auxiliando e me acompanhando durante este período.

*“Nos campos da observação, o acaso favorece
apenas as mentes preparadas”.*

(Louis Pasteur)

RESUMO

O câncer de próstata é uma doença que causa 30.720 mortes por ano na população mundial. Isto significa que 1 em cada 6 homens é diagnosticado com câncer de próstata. Os métodos de diagnóstico, atualmente adotados, são altamente invasivos, necessitando de uma melhor forma de diagnóstico. O uso de biossensor é postulada como sendo uma alternativa atrativa para o diagnóstico de várias doenças. Este é um dispositivo de análise que compreende um elemento de reconhecimento biológico, tal como ácidos nucleicos, utilizado diretamente na interface de um transdutor, que converte a informação biológica em um sinal mensurável. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi desenvolver genossensores eletroquímicos para o diagnóstico do câncer de próstata, através do encontro de uma sequência específica para o câncer de próstata utilizando ferramentas de bioinformática, testar a concentração ideal para imobilização de DNA, analisar a menor concentração que o sistema foi capaz de detectar (Detecção Limite) e confirmar os resultados obtidos frente as amostras biológicas (sangue) proveniente do Hospital das Clinicas de Pernambuco (HC/UFPE). Em primeiro lugar, a sequência do marcador de câncer de próstata foi coletada a partir do banco de dados do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia e analisados pelo software CLC Workbench principal. O primeiro biossensor foi composto por três eletrodos impressos: eletrodo de trabalho constituído de ouro; eletrodo de referência constituído de Ag/AgCl e eletrodo auxiliar constituído de carbono. O outro modelo de biossensor foi formado por dois eletrodos impressos, um eletrodo de trabalho constituído por Carbono e um eletrodo de referência constituído de Ag/AgCl. Nos dois biossensores propostos, um sonda de DNA específica para o Câncer de próstata (PCA3 gene) foi imobilizada sob o eletrodo de trabalho e, em seguida, uma sequência alvo foi hibridizada com a sonda imobilizada. Tanto no primeiro quanto no segundo biossensor, os alvos foram os oligonucleotídicos sintéticos e o DNA extraído de amostras de pacientes. Os sinais redox da hibridização, nos dois biossensores, foram analisados pela técnica de voltametria de pulso diferencial. Os resultados mostraram que os biossensores puderam diferenciar a hibridização da não-hibridização. Os dois biossensores propostos apresentaram elevada sensibilidade cujos limites de detecção foram para o primeiro biossensor de 2,28 pg/ μ L (1 nM) e o segundo biossensor de 0.22 pg/ μ L (0.1 nM). Os dados obtidos com os biossensores mostraram viabilidade para o diagnóstico do câncer de próstata, permitindo com isso o desenvolvimento de um sistema pioneiro para detecção portátil do câncer. Após a análise do biossensor, foi proposto um estudo visando entender o papel das sirtuínas no processo da tumorigênese da próstata, pois várias vias de sinalização celular e fatores de transcrição estão envolvidos no controle do metabolismo do câncer. Nós utilizamos PCA3 como controle da expressão do câncer de próstata, bem como, e as sirtuínas 1 e 3 para entender os seus respectivos papéis no câncer. Amostras de sangue foram coletadas e analisadas para verificação da expressão do PCA3, SIRT-1 and SIRT-3. A SIRT-3 apresentou baixa expressão em pacientes com câncer de próstata ($P = 0.027$) mostrando correlação negativa com este câncer. Não foi observado diferença estatística significativa da expressão da SIRT-1 entre os grupos analisados ($P = 0.082$). Mais estudos são necessário para compreender o seu papel e envolvimento na tumorigênese da próstata. A SIRT3 pode ser usado como um biomarcador prognóstico no câncer de próstata, porém, um exame cuidadoso do papel de SIRT3 no metabolismo do câncer ainda é necessário, a fim de desenvolver melhores abordagens terapêuticas.

Palavras-chave: Genossensor. Câncer de próstata. Biossensor Eletroquímico. Sirtuínas

ABSTRACT

Prostate cancer is a disease that causes 30,720 deaths per year worldwide. This means that 1 in 6 men is diagnosed with prostate cancer. The diagnostic methods are highly invasive, requiring a best diagnosis. The use of biosensor is postulated to be an attractive alternative for the diagnosis of various diseases. This is a test device comprising a biological recognition element such as nucleic acids, used directly in the interface of a transducer which converts the biological information in a measurable signal. The aim of this study was to find a specific sequence for prostate cancer using bioinformatics tools, test the optimal concentration for immobilization of DNA, analyze the lowest concentration that the system was able to detect (detection limit) and confirm the results of the front biological samples (blood) from the Hospital das Clinicas de Pernambuco (HC / UFPE). Firstly, the sequence marker of prostate cancer were collected from the database of the National Center for Biotechnology Information and analyzed by the software CLC Main Workbench. These results show the possibility of developing a new portable device, non-invasive, more sensitive and specific than current methods. The first biosensor was composed of three screen-printing electrodes: a working electrode constituted of gold; a reference electrode constituted of Ag/AgCl; and auxiliary electrode constituted of carbon. The other model biosensor was composed of two screen-printing electrodes: a working electrode constituted of carbon and a reference electrode constituted of Ag/AgCl. In both biosensors proposed, a DNA probe specific for prostate cancer (PCA3 gene) was immobilized on the working electrode by electrodeposition and then a target sequence was hybridized with the probe immobilized. Both the first and the second biosensor, the targets were the synthetic oligonucleotide and extracted sample DNA from patients. The results showed that biosensors could differentiate hybridization of non-hybridization. The two biosensors showed high sensitivity which detection limits were in the first biosensor 2,28 pg/ μ L (1 nM) and the second biosensor 0.22 pg/ μ L (0.1 nM). The data obtained with the biosensors showed viability for the diagnosis of prostate cancer, thereby allowing the pioneering development of a new portable detection system for cancer. After examination of the biosensor, a study aimed at understanding the role of sirtuins in prostate tumorigenesis process was proposed, but several pathways cell signaling and transcription factors are involved in the control of cancer metabolism. We used the prostate cancer gene 3 (PCA3) as control of expression of prostate cancer, as well, the role of sirtuins 1 and 3 in prostate cancer. Blood samples were collected and analyzed for the expression of the PCA3, SIRT-1 and SIRT-3. SIRT-3 presented low expression in patients with prostate cancer ($P = 0.027$) showing negative correlation with this cancer. No clear differences were observed in SIRT-1 expression between the analyzed groups ($P = 0.082$). Further studies about the role of SIRT1 in PCa are necessary in order to understand its involvement in tumorigenesis while SIRT3 can be used as a prognostic biomarker in PCa. A careful examination of the role of SIRT3 in prostate cancer metabolism is still necessary in order to develop better therapeutic approaches.

Keywords: Genosensor. Prostate Cancer. Electrochemical Biosensor. Sirtuins

Lista de tabelas

Tabela 1. Sistema de classificação de estadiamento TNM para o câncer de próstata.

Fonte: Adaptado <http://www.cancerstaging.org/> _____ 25

Tabela 2. Sistema de classificação de estadiamento AJCC para o câncer de próstata.

Fonte: Adaptado <http://www.cancerstaging.org/> _____ 25

Lista de figuras

Figura 1. A próstata e sua composição celular. (A) Localização anatômica da próstata na pelve. (B) Representação esquemática das camadas celulares que compõem o epitélio prostático normal (Fonte: Adaptado do (National Cancer Institute))_____16

Figura 2. Alteração do tecido prostático. (A) Próstata normal e (B) Hiperplasia Prostática Benigna. (Fonte: Adaptado NCI (National Cancer Institute))_____17

Figura 3. Representação histológica dos graus de diferenciação das células tumorais prostáticas (graus de Gleason). Fonte:
[http://www.prostatecancerradiotherapy.org.uk/glossary/glossary_pictures/GleasonGrade s.gif](http://www.prostatecancerradiotherapy.org.uk/glossary/glossary_pictures/GleasonGrade%20s.gif))_____24

Figura 4. Representação dos estádios I a IV do câncer de próstata, segundo o sistema AJCC Fonte: adaptado
<http://visualsonline.cancer.gov/searchaction.cfm?q=tumor%20staging%20%20TNM%20prostate%20cancer&sort=datecreated&page=4> _____26

Sumário

1.	Introdução	14
2.	Revisão Bibliográfica.....	17
2.1	A Glândula prostática	17
2.3	Câncer de próstata	19
2.4	Diagnóstico.....	22
2.5	Biossensor e câncer.....	28
2.6	PCA3 e câncer de próstata	31
3.	Referências Bibliográficas	35
4.	Objetivos	41
4.1	Objetivo Geral	42
4.2	Objetivos Específicos.....	42
CAPÍTULO I - PCA3 genosensor blood based assay, as a useful tool to detect prostate cancer		45
1.	Introduction	46
2.	Material and Methods.....	48
2.1	Reagents and materials.....	48
2.2	Analysis in silico of the molecular biomarker for prostate cancer.....	48
2.3	PCA3 oligonucleotides.....	49
2.4	Population study	49
2.5	Apparatus	50
2.6	Preparation of polymer-modified screen-printed electrodes.....	50
2.7	Probe DNA immobilization	51
2.8	DNA hybridization	51
2.9	Electrochemical Analysis	52
2.10	Statistical Analysis	52
3.	Results and Discussion.....	52
3.1	PCA3 gene	52
3.2	Pyrrole electropolymerization.....	53
3.3	Analysis of the probe immobilization	55
3.4	Optimization of the hybridization process.....	56
3.5	Selectivity Study and prostate cancer detection	57
3.6	Performance of electrochemical DNA biosensor using real samples	58

References.....	61
CAPÍTULO II- Electrochemical DNA biosensor for Prostate Cancer detection based on an interpenetrating polymer network	72
1. Introduction	74
2. Materials and Methods	75
2.1 Reagents and materials.....	76
2.2 Analysis in silico of the molecular biomarker for prostate cancer.....	76
2.3 PCA3 oligonucleotides.....	76
2.4 Population study	76
2.5 Apparatus	77
2.6 Preparation of polymer films and electrode modifications	77
2.7 DNA Probe immobilization	77
2.8 DNA hybridization	78
2.9 Electrochemical Analysis	78
2.10 Statistical Analysis	78
3. Results and Discussion.....	79
3.1 PVAG-PANi polymer-modified screen-printed electrodes.....	79
3.2 Analysis of the probe immobilization.....	80
3.3 Hybridization process.....	80
3.4 Performance of electrochemical DNA biosensor using real sample	81
4. Conclusions	83
Acknowledgements	83
References.....	83
FIGURE EXPLANATIONS	87
CAPÍTULO III- Could SIRT-1 and SIRT-3 be novel prognostic biomarkers for Prostate Cancer?.....	97
2. Material and Methods.....	101
3. Results and Discussion.....	101
Acknowledgments.....	103
Reference.....	104
1. Considerações Finais.....	109
ANEXO.....	109

INTRODUÇÃO

1.0 Introdução

O câncer de próstata (CaP) é um dos cânceres mais frequentes em homens sendo a segunda causa de morte por câncer no mundo. A incidência de CaP tem aumentado nos últimos anos, e muitos estudos epidemiológicos têm apontado para várias possíveis causas. Além da influência hormonal, a idade é o fator de risco mais importante: 95% dos CaPs diagnosticados ocorrem na faixa etária 57-88 anos. Outro fator importante é a identidade étnica: homens africanos, por exemplo, são mais propensos a desenvolver CaP. Fatores ambientais, como dieta, também têm evidenciado aumentar a sua incidência (HOANG et al., 2013). A variação geográfica é um fator interessante, pois, em comparação com os EUA e a Europa Ocidental, a incidência e mortalidade por câncer de próstata são muito menores no Sudeste e Leste da Ásia apoiando um efeito ambiental (SUTCLIFFE; COLDITZ, 2013).

A incidência deste câncer pode ser influenciada por eventos localizados dentro micro-ambiente do tecido ao longo do tempo podendo influenciar a carcinogênese prostática. Como o sistema imune influencia na modulação da inflamação sistêmica, a disfunção imune pode promover a carcinogênese da próstata (DE ANGULO et al., 2013).

Os métodos diagnósticos frequentemente utilizados na detecção de CaP são a dosagem do Antígeno Prostático Específico (PSA) e o exame de toque retal. Apesar de sua ampla utilização, a PSA é um mau indicador da doença ,pois, entre 65% a 70% dos homens que apresentam um aumento no PSA entre 4 e 10 ng / ml terá um resultado negativo na biópsia. O PSA elevado requer repetidas biópsias, que podem ser associados com significativa morbidade, incluindo sepse, sangramento e hospitalização (TRUONG; YANG; JARRARD, 2013a).

Outro grande desafio com a triagem atual é a baixa sensibilidade para a detecção do câncer clinicamente relevante, especialmente a doença de alto grau, que expressa paradoxalmente baixos níveis de PSA. Portanto, o desenvolvimento de uma ferramenta de rastreamento mais preciso para CaP, especialmente para o câncer biologicamente agressivo, é urgente. Fluidos biológicos com potencial para triagem de CaP, incluem soro

, sêmen, plasma e urina. As células epiteliais do CaP são derramadas em fluidos biológicos, em particular a urina, quando a próstata é sujeita a manipulação física (TRUONG; YANG; JARRARD, 2013a).

Portanto, os biossensores podem constituir alternativas viáveis para o diagnóstico do CaP, pois são dispositivos bioanalíticos incorporados a uma entidade associada com o reconhecimento molecular e integrado com um transdutor físico. Biossensores podem ser classificados como dispositivos *point-of-care* (POC), que pode trazer a capacidade de análise de amostras clínicas em casa ou no consultório médico. A fim de desenvolver tecnologias adequadas para biossensores, marcadores específicos devem ser identificados para assegurar a especificidade dos dispositivos. Biossensores fornecem plataformas avançadas para análise de biomarcadores com as vantagens de ser fácil de usar, com a capacidade de teste para múltiplos analitos de baixo custo, de forma rápida e robusta (TOTHILL, 2009).

De tal modo, o gene PCA3 localizado no cromossomo 9q21-22 está envolvido no controle da sobrevivência de células do câncer da próstata, em parte, modulando a atividade de transcrição dos receptores de andrógenos dos genes alvo. Deste modo, tal gene pode ser utilizado como bioanalito a ser incorporado ao biossensor. O PCA3 é altamente expresso em tecidos de câncer da próstata, porém, também é detectado na urina ou nos sedimentos de urina, obtidas após a massagem prostática ou exame digital retal e sangue. O PCA3 mostrou uma especificidade mais elevada, reduzindo as biópsias de próstata desnecessárias. (PERDONÀ et al., 2013).

Assim, o trabalho proposto visa o desenvolvimento de um novo método de diagnóstico para o câncer de próstata baseado na detecção eletroquímica através dos biossensores, visando um diagnóstico mais preciso e específico, de forma não invasiva, proporcionando uma melhor qualidade de vida para os homens acometidos pela doença, assim como diminuição dos custos para o sistema de saúde.

REVISÃO

2.0 Revisão Bibliográfica

2.1 A Glândula prostática

A próstata é uma glândula exócrina do sistema reprodutor masculino, localizada anteriormente ao reto e inferiormente à bexiga, circundando parte da uretra (Figura 1A). Ela produz e secreta o líquido prostático, um líquido de pH alcalino que facilita a locomoção dos espermatozóides e que, ao se juntar com a secreção das vesículas seminais e com os espermatozóides na uretra, forma o sêmen (Jung & Westphalen, 2012; Powers & Marker, 2013).

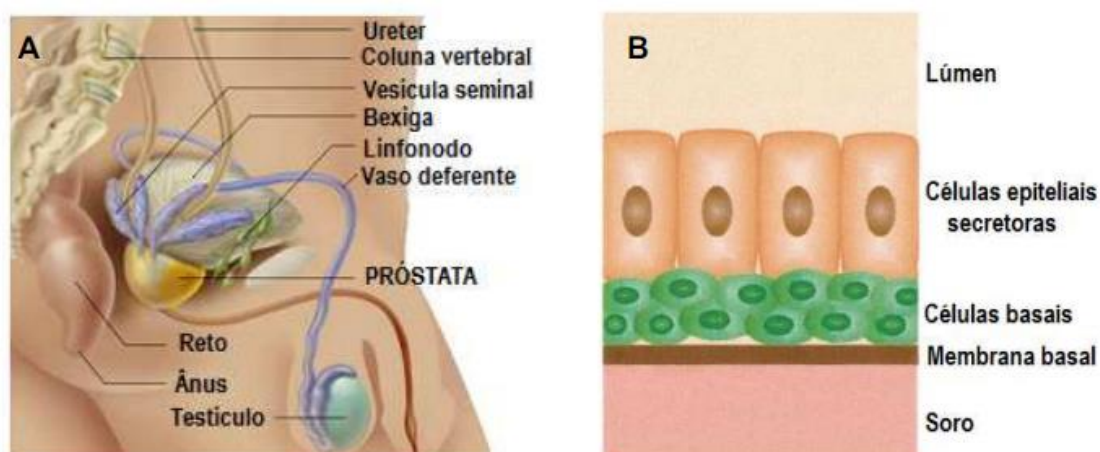


Figura 1. A próstata e sua composição celular. (A) Localização anatômica da próstata na pelve. (B) Representação esquemática das camadas celulares que compõem o epitélio prostático normal (Fonte: Adaptado NCI (National Cancer Institute)).

A glândula prostática nos humanos consiste de ácinos e ductos compostos por uma única camada de células epiteliais secretoras cercadas por uma camada contínua de células basais e uma membrana basal (Figura 1B). Ao redor da glândula há um estroma formado por fibroblastos, músculo liso, nervos e vasos linfáticos. O estroma produz fatores de crescimento importantes para o desenvolvimento da próstata normal como também do câncer de próstata (JUNG; WESTPHALEN, 2012).

Durante o período gestacional, a próstata imatura cresce e se desenvolve. Após o nascimento, a próstata entra num estado de repouso nas crianças que é caracterizada pela

formação dos condutos da próstata, mas com poucas alterações em seu tamanho. Com o início da puberdade, no entanto, a próstata começa a crescer e se desenvolver mais rapidamente quando então, atinge aproximadamente a morfologia e o tamanho adulto (SUTCLIFFE; COLDITZ, 2013).

Em um estudo com homens de 19-29 anos de idade, lesões atróficas e/ou proliferativas foram observadas em mais de 50% dos espécimes da próstata examinados. Estas lesões podem ser precursoras do câncer de próstata ou marcadores de um ambiente que é propício para o desenvolvimento de câncer de próstata (SUTCLIFFE; COLDITZ, 2013).

2.2 Alterações do Tecido Prostático

Uma associação entre hiperplasia prostática benigna (HPB) e câncer de próstata tem sido reconhecida desde os primeiros estudos de autópsia das glândulas da próstata em 1950. Atualmente, é amplamente aceito que, apesar de as duas doenças geralmente coexistirem, HPB não é uma lesão pré-maligna. Esta hipótese baseia-se principalmente nas diferenças histológicas, de localização e os níveis associados de morbidade e mortalidade (ØRSTED; BOJESSEN, 2013).

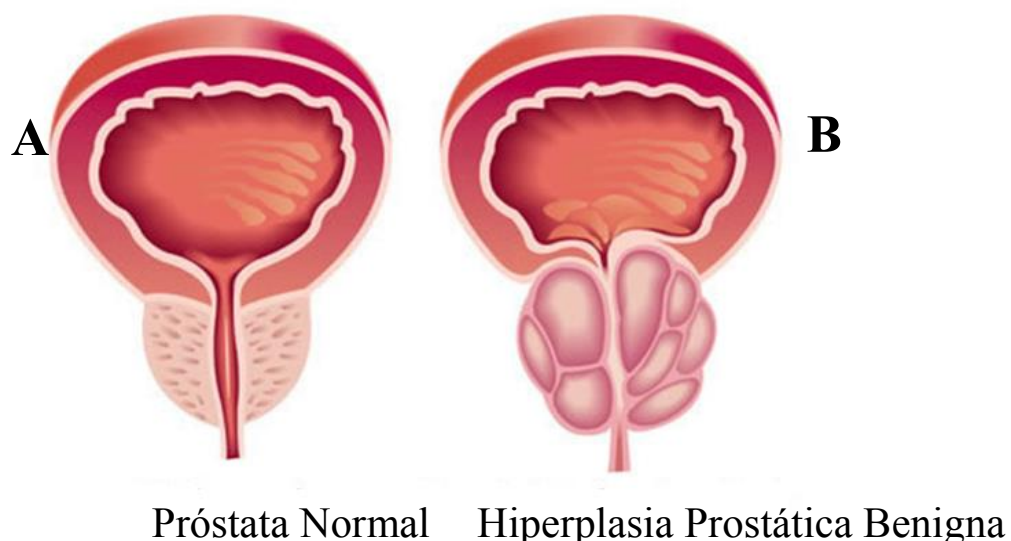


Figura 2: Ateração do tecido prostático. (A) Próstata normal , (B) Hiperplasia Prostática Benigna. (Fonte: Adaptado NCI (National Cancer Institute)).

A HPB é histologicamente definida como nódulos microscópicos ou macroscópicos, com hiperplasia das células do estroma, e, em menor extensão, das células epiteliais (mais frequentemente localizadas na zona de transição da próstata) (Fig.2). Embora a HPB possa causar morbidade e reduzir a qualidade de vida, não se caracteriza por ser uma doença letal. Apesar de sua prevalência, a exata etiologia da HPB é desconhecida. Da mesma forma, a etiologia do câncer da próstata não está totalmente elucidada. Esta doença é um adenocarcinoma que surge principalmente a partir de células epiteliais na zona periférica da próstata, só uma pequena parte se desenvolve a partir de células epiteliais na zona de transição (ØRSTED; BOJESSEN, 2013).

Embora seja amplamente aceito que o câncer de próstata é precedido por neoplasia intraepitelial prostática (NIP), não está claro se a NIP deriva diretamente do tecido prostático normal ou se origina das células epiteliais displásicas. A NIP é melhor caracterizada como uma transformação neoplásica da mucosa do epitélio secretor, ductos prostáticos e ácinos. Este processo está confinado dentro do epitélio e, portanto, é denominado intra-epitelial. A NIP tem sido reconhecida como uma lesão pré-maligna bem definida antes do desenvolvimento do câncer de próstata por 5-10 anos de antecedência, em média. O mecanismo de ação da NIP apresenta semelhanças histológicas com o câncer de próstata, e o volume e extensão da NIP correlaciona-se positivamente com o escore de Gleason, fornecendo evidências convincentes de que o NIP é um precursor imediato do câncer de próstata (MONTIRONI et al., 2007), (CHORNOKUR et al., 2013).

Apesar de suas diferenças, HPB e o câncer de próstata compartilham algumas características importantes, incluindo o crescimento hormônio-dependente e resposta à terapia anti-andrógeno. Além disso, estudos têm indicado que a inflamação crônica, a perturbação metabólica, e a variação genética são fatores de risco comuns para ambas as doenças, e grandes estudos epidemiológicos têm relatado uma associação positiva entre as duas condições (ØRSTED; BOJESSEN, 2013).

2.3 Câncer de próstata

O câncer da próstata (CaP) é a segunda causa de morte por neoplasias no Brasil. A taxa de mortalidade bruta vem apresentando acentuado ritmo de crescimento, passando

de 3,73/100.000 homens em 1979 para 62,54/100.000 homens em 2012, o que representa uma variação percentual relativa de 1.576,7% (INCA, 2012).

Em 2012, foi estimado a ocorrência de 60.180 casos novos, precedido apenas pelo câncer de pele não-melanoma. Esses valores corresponderam a um risco de 62 casos novos a cada 100 mil homens. Nas regiões Sudeste (78/100 mil) e Nordeste (43/100 mil), o câncer da próstata é o mais incidente entre os homens. Sem considerar os tumores da pele não melanoma, é o mais frequente nas regiões Centro-Oeste (75/100 mil), Sul (68/100 mil) e Norte (30/100 mil) (INCA, 2012).

Os primórdios da descrição do câncer de próstata remontam aproximadamente 200 anos (Lytton, 2001). O primeiro caso de câncer de próstata confirmado por estudo histológico foi descrito em 1853 por Adams, em Londres, no *Royal Medical and Chirurgical Society of London* e considerado uma doença muito rara.

A patogênese do câncer de próstata reflete ambos os componentes hereditários e ambientais. Aproximadamente 20% de todos os cânceres humanos em adultos resultam de estados inflamatórios crônicos e / ou inflamação crônica, que são acionados por agentes infecciosos ou exposição a outros fatores ambientais, ou uma combinação destes. Há também uma evidência emergente de que a inflamação é crucial para a etiologia do câncer da próstata. Esta prova decorre de estudos epidemiológicos, histopatológicos e moleculares (DAL MORO; ZATTONI, 2013; DE MARZO et al., 2007; HOYT et al., 2013).

Tal como em outros tipos de câncer, o câncer de próstata se desenvolve através da acumulação de alterações somáticas e epigenéticas, o que resulta na inativação de genes supressores de tumor e genes guarda, e a ativação de oncogenes. Existe também evidência de uma instabilidade genética subjacente que pode facilitar a progressão do tumor, essas mutações são introduzidas por uma combinação de fatores hereditários e ambientais. Embora estas alterações genéticas e epigenéticas sejam cruciais para o nosso entendimento de "como" o câncer de próstata surge, outra questão-chave restante é "por que" câncer de próstata tem alta incidência (XU et al., 2013).

Os fatores de risco mais consistentes para o desenvolvimento do câncer de próstata são a idade avançada, história familiar e raça – a dieta é considerada um fator de risco

emergente. A variação geográfica na incidência de câncer de próstata é um fator interessante, pois, em comparação com os EUA e a Europa Ocidental, a incidência e mortalidade por câncer de próstata são muito menores no Sudeste e Leste da Ásia apoiando um efeito ambiental (SUTCLIFFE; COLDITZ, 2013).

Aproximadamente 62% dos casos de câncer da próstata diagnosticados no mundo acometem homens com 65 anos ou mais. Com o crescimento da expectativa de vida mundial, é esperado que o número de casos novos aumente cerca de 60% até o ano de 2015. O câncer da próstata é aproximadamente 1,6 vezes mais comum em homens negros do que em homens brancos. Os americanos, jamaicanos e caribenhos com descendência africana apresentam as mais altas taxas de incidência desse câncer do mundo, o que pode ser atribuído, em parte, à susceptibilidade genética (cerca de 5% a 10%). Todavia, é possível que essa diferença seja explicada pela heterogeneidade do acesso, bem como pelos diferentes estilos de vida (INCA, 2012).

Outro fator importante na etiologia desse tipo de câncer é a dieta. Dietas com base em gordura animal, carne vermelha, embutidos e cálcio têm sido associadas ao aumento no risco de desenvolver câncer da próstata. Além disso, também contribui como fator de risco a obesidade, em especial para aquelas neoplasias de comportamento mais agressivo. Em contrapartida, dietas ricas em vegetais, vitaminas D e E, licopeno e Ômega-3 aparecem como fatores protetores (INCA, 2012).

A associação entre a síndrome metabólica, câncer de próstata e HPB (Hiperplasia Prostática Benigna) iniciou quando observaram-se que homens diabéticos obesos apresentavam glândulas prostáticas maiores do que os homens sem estas desordens. Como a obesidade e diabetes tipo 2 são dois aspectos bem estabelecidos da síndrome metabólica, foi levantado a hipótese de que a HPB e câncer de próstata seriam os aspectos clínicos desta síndrome. O aumento do nível de insulina, leva a um aumento do crescimento do tumor de próstata. Por consequência, a hipótese de insulina foi formulada, indicando que um aumento do nível de insulina é uma característica comum subjacente que promove a hiperplasia prostática benigna e o câncer de próstata. O mecanismo de promoção de tumor de próstata e a síndrome metabólica envolve estilo de vida, dieta inadequada e baixo nível de atividade física, o que gera resistência à insulina (HAMMARSTEN; PEEKER, 2011).

Um aumento anormal da lipogênese, acoplado diretamente com o metabolismo da glicose e glutamina, é observado nas fases iniciais da doença, significativamente associada com a progressão do tumor, pior prognóstico e menor sobrevida. Como referido acima, as células cancerosas usam grandes quantidades de glicose para fins energéticos e biossintéticos, resultando numa elevada taxa de produção e secreção de lactato, que conduz para a acidificação do microambiente do tumor (ZADRA; PHOTOPoulos; LODA, 2013).

O CaP geralmente exibe um aumento da captação e oxidação de ácidos graxos, como palmitato, e aumento da atividade das enzimas peroxissomais, β -oxidação dos ácidos graxos de cadeia ramificada, incluindo a proteína D-bifuncional (DBP) e o α -methylacyl-CoA-racemase (AMACR) (BH; MG; ROBINET, 2013).

Outro processo biossintético importante que é altamente regulada em CaP é a via do mevalonato, o que facilita a acumulação de colesterol. Um grande número de estudos epidemiológicos têm sido realizados para abordar a associação entre os níveis de colesterol e CaP, relatando que os homens com hipercolesterolemia estão em maior risco para CaP agressivo. Curiosamente, níveis aumentados de colesterol foram identificados em CaP com metástase óssea, juntamente com o aumento da expressão de enzimas envolvidas na esteroidogênese (ZADRA; PHOTOPoulos; LODA, 2013).

Células de CaP respondem à androgênios, através da ação de seus receptores os quais são nucleares e envolvidos no controle da proliferação de células de CaP em todas as fases da doença, incluindo a fase tardia, e doença resistente a castração. Como resultado, a terapia para CaP avançados envolve quase sempre a privação de andrógenos, resultando na redução de suas concentrações plasmáticas e consequentemente, a diminuição do CaP (HOANG et al., 2013).

2.4 Diagnóstico

Para tratar pacientes com CaP com sucesso, é importante detectar a doença, numa fase inicial, bem como monitorar seu progresso com precisão. Atualmente existem disponíveis para diagnóstico, técnicas que incluem biópsias de próstata, Exame Digital Retal (EDR), Ultra-Sonografia Transretal, e ensaio de Antígeno Prostático Específico (PSA). EDR e Ultra-Sonografia Transretal (TRUS). Apesar destas técnicas serem

amplamente adotadas pela prática médica, são muito limitados em sua capacidade de diagnosticar CaP, além de não possuírem a capacidade de distinção entre HBP e CaP (YOU et al., 2010).

O PSA é uma glicoproteína de 34 KDa pertencente à família das calicreínas. Ele é secretado no fluido prostático, e sua função é degradar 8 proteínas de alto peso molecular, que são sintetizadas na vesícula seminal, a fim de inibir a coagulação do sêmen. Seus níveis séricos estão aumentados na tumorigênese da próstata, uma vez que com a perda normal da arquitetura da glândula, o PSA passa a ter acesso à circulação periférica. O teste do PSA falha tanto em sensibilidade quanto em especificidade para detectar com precisão a presença de câncer da próstata. O PSA é um marcador específico da próstata, e não um marcador do câncer de próstata (NOGUEIRA; CORRADI; EASTHAM, 2010).

Níveis elevados de PSA no sangue pode ser acionado por condições não cancerosas tais como a hiperplasia prostática benigna e prostatite. Nenhum dos limiares de PSA atualmente utilizados são consistentes em identificar pacientes com câncer de próstata e excluir pacientes sem câncer. A incidência de câncer de próstata em pacientes com níveis de PSA abaixo do nível aceitável (4,0 ng / ml) é semelhante à incidência de câncer de próstata em pacientes com níveis de PSA de 4,0-10,0 ng / mL, o que leva alguns especialistas a afirmar que não deve ser utilizado como um marcador do CaP. O PSA não é um sistema de diagnóstico, ele ajuda a avaliar o risco de câncer de próstata e deve ser usado em conjunto com outras variáveis para decidir quando uma biópsia da próstata seria apropriada. Por isso, o rastreio de PSA é uma ferramenta útil para a detecção do câncer da próstata, mas não é perfeita (NOGUEIRA; CORRADI; EASTHAM, 2010); (ROOBOL; CARLSSON, 2013).

A triagem com o (PSA) na população através do exame de sangue, não foi definitivamente comprovado por reduzir a mortalidade por câncer de próstata. Além disso, a PSA é notoriamente conhecida por suas altas taxas de falsos positivos aproximando-se de 75-80%, levando a efeitos colaterais relacionados biópsia desnecessárias, como sangramento e infecções, em homens saudáveis (CHORNOKUR et al., 2013).

Em um grande estudo prospectivo, multicêntrico, PSA, quando utilizado em combinação com Exame Digital Retal (DRE) melhora a taxa de detecção do câncer, em

comparação com qualquer um dos testes usados sozinhos. Além disso, homens com câncer recém diagnosticado encontrados inicialmente por DRE também eram mais propensos a abrigar doença com características agressivas (GLASS; CARY; COOPERBERG, 2013).

O Diagnóstico por imagem convencional é obtido por meio da ultra-sonografia transretal (TRUS). Cerca de 70% -75% dos cânceres se originam na porção posterior da glândula e, em até dois terços dos casos, aparecem como zonas hipoecóicas em TRUS. TRUS permite a avaliação estrutural da glândula, portanto, a doença localmente avançada pode aparecer como um abaulamento da cápsula prostática. Devido à limitada sensibilidade e especificidade do diagnóstico por ultra-som (ambos cerca de 50%), outras técnicas, como Doppler colorido e técnica com contraste pode melhorar a acurácia diagnóstica do exame (GLASS; CARY; COOPERBERG, 2013).

A análise histopatológica do tecido da próstata pode identificar definitivamente o câncer na maioria dos casos. Este método é o mais utilizado como prognóstico de CaP e resulta em uma classificação chamada escore de Gleason, que é baseado na arquitetura do tecido do câncer observado no microscópio (YOU et al., 2010).

Com este sistema, os patologistas designam para o câncer de próstata (obtido por biópsia ou por remoção da próstata inteira) um número entre 1 e 5 com base na aparência microscópica do padrão da estrutura das células cancerígenas, em que 1 é o menos maligno e 5, o mais maligno. A maioria dos cânceres terá mais de um padrão de células e, portanto, os patologistas determinam um número entre 1 e 5 para o padrão predominante de células de câncer na biópsia (ou o espécime cirúrgico) e um segundo número entre 1 e 5 para o seu padrão secundário. Esses dois números (que podem ser os mesmos) são então somados, resultando o que se conhece como a pontuação de Gleason. Cânceres com pontuações 2, 3 ou 4 são considerados de baixo grau; com 5, 6 ou 7, de grau intermediário; e com 8, 9 ou 10, de alto grau (Fig.3) . (Rous, 2010).

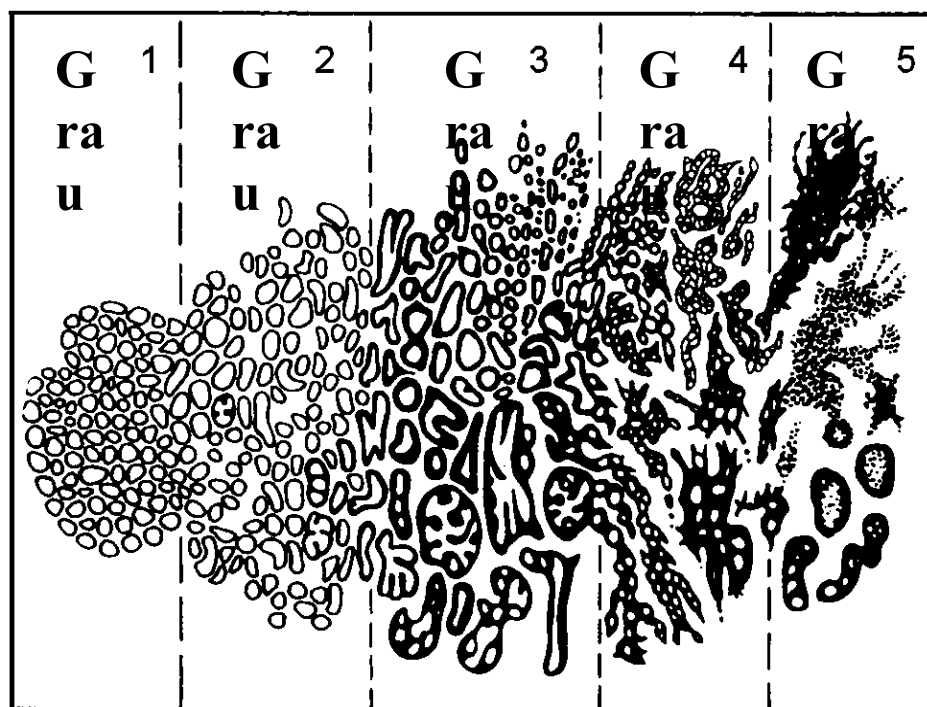


Figura 3: Representação histológica dos graus de diferenciação das células tumorais prostáticas (graus de Gleason). Fonte: http://www.prostatecancerradiotherapy.org.uk/glossary/glossary_pictures/GleasonGrades.gif.

A extensão do câncer no momento do diagnóstico é um fator chave utilizado para definir o melhor tratamento. Sistemas de estadiamento codificam a extensão do câncer para proporcionar aos médicos e pacientes meios para verificar o prognóstico e tratamento do indivíduo, comparar grupos de pacientes em ensaios clínicos e garantir o recebimento do tratamento padrão em todo o mundo. O sistema de estadiamento mais utilizado entre os clínicos é o sistema TNM mantida pela American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Tabela 1 e 2) e a União Internacional de Controle do Câncer (UICC) (EDGE; COMPTON, 2010).

A classificação TNM (Fig. 4) descreve a extensão do tumor primário (T), a presença ou ausência de acometimento linfonodal locorregional (N) e a presença ou ausência de metástases (M). A correta classificação do estágio do CaP antes da cirurgia tem implicações terapêuticas e prognósticas. Especificamente, a detecção de extensão extracapsular e de invasão de vesículas seminais tem grande importância, pois permite a diferenciação entre os estádios T2 e T3 (BARONI et al., 2009).

Tabela 1. Sistema de estadiamento TNM para o câncer de próstata. Fonte: Adaptado <http://www.cancerstaging.org/>

T - Tumor primário	
TX	Tumor não avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
T1	Tumor não diagnosticado clinicamente, não palpável ou visível por exame de imagem
T1a	Achado incidental ocupando $\leq 5\%$ do tecido ressecado
T1b	Achado incidental ocupando $> 5\%$ do tecido ressecado
T1c	Achado por biópsia realizada devido à elevação do PSA
T2	Tumor confinado à próstata
T2a	Ocupa a metade ou menos de um dos lobos
T2b	Ocupa mais da metade de um dos lobos
T2c	Comprometimento de ambos os lobos
T3	Tumor que se estende através da cápsula prostática
T3a	Extensão extracapsular (uni ou bilateral)
T3b	Invasão da vesícula seminal
T4	Tumor fixo ou invadindo estruturas pélvicas (colo vesical, esfíncter externo, reto parede pélvica, ou músculos elevadores do ânus).
N – Linfonodos Regionais	
Nx	Linfonodos regionais não avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Presença de metástase em linfonodos regionais
M – Metástase a distância	
Mx	Metástase a distância não avaliada
M0	Ausência de metástase a distância
M1	Presença de metástase a distância
M1a	Em linfonodo(s) regional (ais)
M1b	Osso (s)
M1c	Outras localizações

Tabela 2: Sistema de estadiamento AJCC para o câncer de próstata. Fonte: Adaptado <http://www.cancerstaging.org/>

AJCC – American Joint Committee on Cancer				
Estádio I	T1a	N0	M0	Baixo Gleason (2-4)
Estádio II	T1a	N0	M0	Intermediário ou alto Gleason (5-10)
	T1b, T1c	N0	M0	Qualquer Gleason (2-10)
	T1, T2	N0	M0	Qualquer Gleason (2-10)
	T3	N0	M0	Qualquer Gleason (2-10)
Estádio III	T3	N0	M0	Qualquer Gleason (2-10)
Estádio IV	T4	N0	M0	Qualquer Gleason (2-10)
	Qualquer T	N1	M0	Qualquer Gleason (2-10)
	Qualquer T	Qualquer N	M1	Qualquer Gleason (2-10)

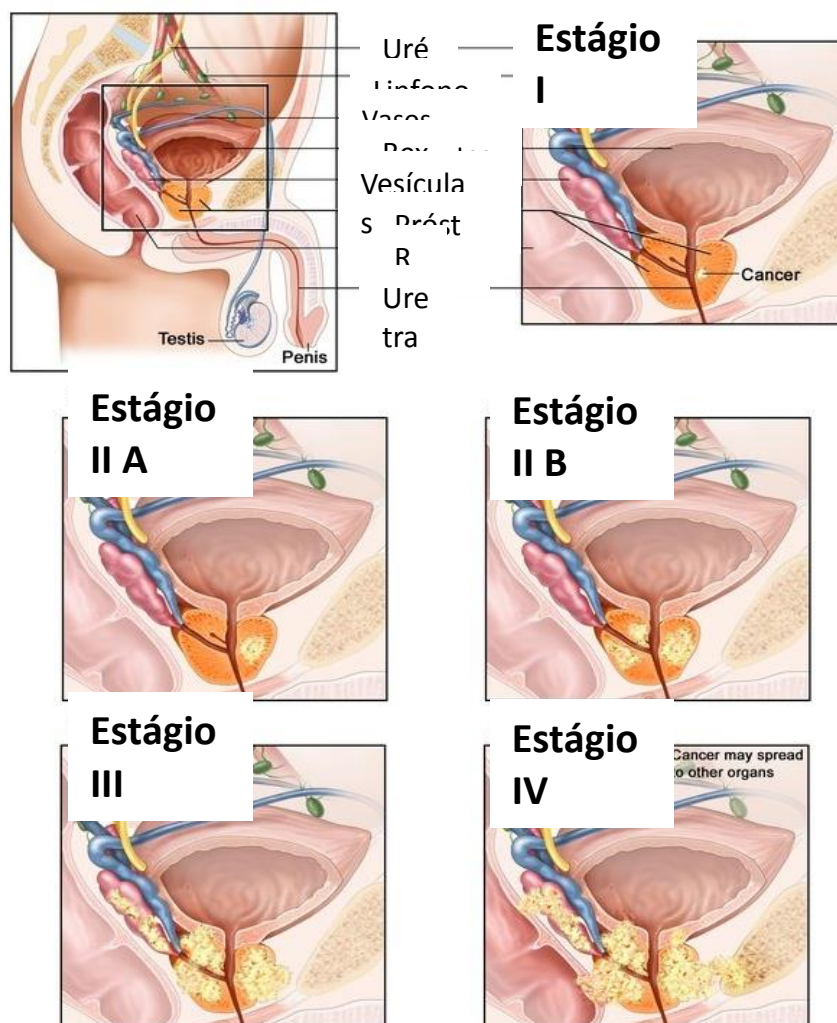


Figura 4: Representação dos estádios I a IV do câncer de próstata, segundo o sistema AJCC Fonte: adaptado <http://visualsonline.cancer.gov/searchaction.cfm?q=tumor%20staging%20%20TNM%20prostate%20cancer&sort=datecreated&page=4>

O rastreio do câncer de próstata é importante para identificar os homens com cânceres potencialmente fatais durante uma fase assintomática da progressão da doença. A adoção de um limiar baixo de PSA, por outro lado, iria aumentar a taxa de detecção do câncer (sensibilidade e otimização), mas também levaria a um aumento do número de biópsias negativas (desnecessárias) e o risco de diagnóstico (e potencialmente o tratamento) de tumores indolentes. Estudos têm demonstrado que o pós-biópsia tem levado a complicações infecciosas e as taxas de internação hospitalar têm aumentado nos últimos anos, o que sugere que as biópsias devem ser realizadas com cautela (ROOBOL; CARLSSON, 2013).

Diante do exposto, biomarcadores que possam identificar ou prever clinicamente o avanço do câncer em pacientes com CaP são importantes na gestão da doença. No futuro, é provável que as análises de genômica e proteômica fiquem integradas com a avaliação de risco para a agressividade do tumor. Novos biomarcadores específicos para o câncer que apresentem especificidade e sensibilidade podem ser úteis para determinar o benefício de tal rastreio nestes pacientes. No entanto, são necessários estudos clínicos prospectivos para validar a utilidade clínica dos marcadores individuais e painéis de genes (GLASS; CARY; COOPERBERG, 2013).

2.5 Biossensor e câncer

A promoção da saúde, em um sistema público, envolve o diagnóstico, tratamento e prevenção de qualquer doença em seres humanos. Este tipo de serviço tem sido constantemente aprimorado através da tecnologia *point-of-care* (POC), que contribuem para um melhor diagnóstico. Esta tecnologia assume que todos os exames podem ser feitos no local de atendimento ao paciente, oferecendo o potencial para diagnósticos mais rápidos e baratos em todas as configurações, permitindo o aumento de exames em populações tradicionalmente carentes (JUSTINO; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2013).

O diagnóstico é o processo de tradução dos dados recolhidos através de exame clínico por meio da observação de sinais e sintomas apresentados pelo paciente. O diagnóstico precoce e rápido do câncer é extremamente importante, não só para a sobrevivência do paciente, mas também para um prognóstico bem sucedido e redução de tempo e custos no serviço de saúde. O encontro de biomarcadores clínicos é crucial para a detecção precoce desta doença, bem como para o design de terapias individuais, e para identificação de processos subjacentes envolvidos na doença (LI; LI; YANG, 2012).

Um biomarcador é a substância química ou biológica produzida pelo tumor ou pelo organismo em resposta à presença do tumor podendo ser encontrados no sangue, urina ou tecidos. Estes, normalmente são produzidos diretamente pelo tecido embrionário ou tecido tumoral. De acordo com o National Institutes of Health, um biomarcador é uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, patogênicos, ou respostas farmacêuticas para uma intervenção

terapêutica. Biomarcadores indicam alterações na expressão de uma proteína que está correlacionada com o risco ou a progressão de uma doença ou ainda à resposta ao tratamento, e que pode ser medido em tecidos ou no sangue. Como resultado, os biomarcadores podem ser células específicas, moléculas ou genes, produtos de genes, enzimas ou hormônios (LI; LI; YANG, 2012).

Os tumores são caracterizados por: divisão celular ilimitada, invasão de tecidos adjacentes e metástases para órgãos distantes; resistência à sinalização anticrescimento; crescimento auto-suficiente; evasão de apoptose (morte celular programada); e manutenção da angiogênese. É importante compreender a complexidade e alguns dos elementos básicos da biologia do câncer no desenvolvimento de biossensores para testes diagnósticos de câncer.

O câncer é uma doença genética causada por mudanças ou a modificação de sequências de DNA de genes-chave (RASOOLY; JACOBSON, 2006). As fases iniciais do desenvolvimento do câncer têm o potencial máximo para a intervenção terapêutica. Portanto, a detecção pré-maligna ou tumores malignos pré-metastáticos quando ainda estão confinados no interior de órgão (s) é crítico para permitir o tratamento eficaz e melhorar a taxa de sobrevivência (ARYA; BHANSALI, 2011).

A associação de diagnósticos médicos, terapêutica, tratamento e acompanhamento com a nanotecnologia levou à implantação do conceito da nanomedicina na ciência. A nanomedicina está relacionada a uma área interdisciplinar e ampla da ciência, que inclui a biologia molecular, química, medicina, matemática, engenharia e ciências da computação, que enfrentam vários desafios analíticos (JUSTINO; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2013). Uma vez que uma plataforma mais sensível e rápida é necessária para alcançar o diagnóstico mais veloz e detectar os marcadores cancerígenos durante os estágios iniciais da doença, os biossensores podem ser utilizados para fornecer meios que permita alcançar estes objetivos.

Um biossensor no sentido tradicional do termo é definido como: um dispositivo bioanalítico incorporando um material biológico ou um biomimetizante (tecido, microrganismo, organelas, receptores celulares, enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos, etc.) intimamente associado ou integrado dentro de um transdutor físico ou um

microsistema de transdução, que podem ser ópticos, eletroquímicos, termométricos, piezoelétricos ou magnéticos. O objetivo usual de um biossensor é produzir sinais eletrônicos digitais discretos ou contínuos, que são proporcionais a uma única substância ou a um grupo relacionado de substâncias (SOPER et al., 2006); (DHANEKAR; JAIN, 2013).

Para o desenvolvimento de um biossensor existem questões fundamentais a serem priorizadas tais como: o design de uma interface na qual a substância a ser analisada possa interagir seletivamente com a superfície de biossensoriamento, a realização da transdução eficiente do evento de bioreconhecimento, aumento na seletividade, especificidade, melhoria do tempo de resposta do biossensor, e por fim, a biocompatibilidade do biossensor desenvolvido com as matrizes biológicas, de modo que eles possam ser utilizados em amostras biológicas complexas, ou até mesmo “*in vivo*”(YANG et al., 2010).

Alcançar uma alta sensibilidade e seletividade requer um mecanismo de transdução sensível e/ou um transdutor que possa fornecer uma alta relação sinal-ruído (MULCHANDANI; MYUNG, 2011). Almejando o aperfeiçoamento de transdutores, muitas vezes são utilizados nanomateriais e compósitos que sejam capazes de facilitar essas interações promovendo um melhoramento do sinal gerado. Dentre essas substâncias estão os alótropos de carbono (Nanotubos de carbono, grafeno entre outros) (SHAO et al., 2010), os polímeros (GRACIA; MECERREYES, 2013; VARMA, 2012) as nanopartículas de metais, e também os óxidos de metais (LIU; FAN; HUANG, 2011).

Um clássico conjunto utilizado na modificação de transdutores são os polímeros. Existem vários tipos de polímeros os quais são consagrados e estudados na literatura, dentre eles podemos citar: Polianilina, Polipirrol, Poli-L-Lisina, Cloreto de Polivinila (PVC), Acetato de Polivinila (PVA), poli-3,4-etilenodioxitiofeno (PEDOT), Poliacetileno, entre outros (ATES, 2013).

As vantagens da utilização destes polímeros na modificação dos transdutores advêm de características como aumento da condutividade, aumento da estabilidade e sensibilidade do biossensor e também melhoramento da imobilização do elemento de reconhecimento biológico a matriz transdutora, por serem capazes de formar complexos

com biomoléculas de cargas opostas como nucleotídeos e proteínas, através de interações eletrostáticas fortes (LIU; FAN; HUANG, 2011).

A nanotecnologia tem ajudado no desenvolvimento de biossensores mais sensíveis, variando os materiais acoplados ao dispositivo em dimensões nanométricas. As propriedades de um material nanoestruturado são bastante diferentes, em comparação com o que o originou, pois a redução do tamanho de partículas provoca uma enorme mudança em suas propriedades, tornando-o adequado para diversas aplicações. A ciência dos materiais nanoestruturados não só abriu o caminho para tecnologias futuras, mas também convidou inúmeros desafios para a comunidade científica (D’ORAZIO, 2011).

A utilidade de biossensor esta intimamente dependente de viabilidade do biomarcador (s) para a produção de diagnósticos de alta confiança. Em particular, um biomarcador deve não só sinalizar a presença de um tumor ou câncer, mas também deve prever o estágio da tumorigênese (RAPP; GRUHL; LÄNGE, 2010).

Um dos principais desafios na detecção do câncer é a falta de sensibilidade. A análise eletroquímica é um dos métodos mais sensíveis para a detecção de substâncias inorgânicas, orgânicas e mesmo biológicas. A aplicação da eletroquímica é provavelmente a maneira mais promissora de resolver alguns dos problemas relativos às medições de sensibilidade, velocidade, seletividade e econômica. Portanto, esta alternativa tornou-se atraente para ajudar no diagnóstico rápido e seguro, proporcionando uma melhor intervenção e reduzindo o tempo dos exames, beneficiando a redução do estresse do paciente (RUSLING et al., 2010).

2.6 PCA3 e câncer de próstata

A desregulação da expressão gênica é crítica para a carcinogênese e metástase. Nas últimas décadas, a investigação científica foi principalmente focada em genes codificadores de proteínas. Nos últimos anos, contudo, tem sido bem documentado que a porção não-codificante de proteína de genoma humano é também fundamental para a biologia do câncer. Pelo menos 90% do genoma humano não é transcrito, e os genes que codificam proteínas, representam menos de 2% das sequências do genoma. Assim, uma grande quantidade de RNAs não-codificantes de proteínas (ncRNAs) são transcritos a

partir do genoma, tais como pequenos RNAs de interferência (siRNAs), os microRNAs (miRNAs), RNAs PIWI-interativas (piRNAs) e RNAs longos não-codificadores (lncRNAs). Recentemente, pequenos RNAs reguladores, como siRNA e miRNA, têm sido extensivamente investigados e os mecanismos moleculares subjacentes têm sido bem documentados (QIU et al., 2013).

Alguns lncRNAs são altamente conservadas e têm padrões de expressão de tipos celulares específicos. Além disso, um certo número de lncRNAs estão desreguladas em cânceres humanos, e a sua expressão aberrante está associada a metástases ou ao prognóstico. Dada a grande escala de lncRNAs desregulados, é possível que eles não sejam produtos secundários do câncer, e sim, que estejam envolvidos no processo carcinogênico e na metástase. Os lncRNAs estão envolvidos na regulação epigenética, regulação da transcrição, processamento de pequenos RNAs, e outras funções reguladoras (FERREIRA et al., 2012; QIU et al., 2013).

Bussemakers e colaboradores (1999) identificaram a superexpressão de lncRNA DD3 (*differential display clone 3*), mais tarde chamado de câncer de próstata antígeno 3 (PCA3) em tecidos de câncer de próstata, por meio de análise de exibição diferencial apresentando expressão especificamente no câncer de próstata. (FILELLA et al., 2013).

O gene PCA3 localiza-se no cromossoma 9q21-22 e consiste de quatro exons. Os transcritos mais comuns contém os exons 1, 3, 4a e 4b. Dados recentes sugerem que o PCA3 está envolvido no controle da sobrevivência de células do câncer da próstata, em parte, modulando a atividade de transcrição dos receptores de andrógenos dos genes alvo (PERDONÀ et al., 2013).

PCA3 é altamente expresso em tecidos de câncer da próstata e em vez de existir apenas em tecidos de câncer, o PCA3 pode ser detectado na urina ou os sedimentos de urina, obtidas após a massagem prostática ou exame digital retal. O PCA3 mostrou uma especificidade mais elevada, reduzindo a necessidade de biópsias de próstata. Um estudo com 751 voluntários mostrou que o PCA3 como teste de triagem apresentou melhor desempenho e identificação de doença grave, em comparação com o PSA. Os autores sugeriram que o PCA3 pode ser útil não só para a detecção de câncer de próstata, pois apresentam sensibilidade e especificidade superiores aos do PSA, mas também pode ter um papel potencial na escolha do tratamento mais adequado para cada paciente. (LISS et al., 2011).

Uma elevação no nível do PCA3 pode estar associada a um câncer mais agressivo com o aumento da desdiferenciação celular podendo facilitar o derramamento em ductos prostáticos durante o EDR. Volumes tumorais mais elevados, podem proporcionar uma maior superfície de adesão aos ductos prostáticos. Por outro lado, os tumores sólidos tornam-se mais agressivos e perdem a sua diferenciação e lúmen glandular, o que pode dificultar o derramamento de células para a urina (AUGUSTIN et al., 2013).

O foco do diagnóstico molecular está se movendo rapidamente de tecidos para fluidos corporais, e particularmente para o sangue. A detecção de biomarcadores com significado de diagnóstico e prognóstico em fluidos corporais pode, em um futuro próximo fornecer valiosas informações clínicas, evitando procedimentos invasivos desnecessários. Os atuais progressos permitem uma extração fiável, separação de células tumorais circulantes (CTC) no sangue e de ácidos nucleicos derivadas de tumor e proteínas no plasma, urina, expectoração e fezes. A invasão tumoral reforçada durante o processo metastático, secreção activa de proteínas de tumores altamente vascularizados, ou a libertação passiva de materiais de degradação celular em áreas de necrose poderiam resultar em ácido nucleico específico de tumores ou do material de proteína na corrente sanguínea ou noutros fluidos biológicos (FIORENTINO; CAPIZZI; LODA, 2010).

O CaP é relativamente mal vascularizada, com pouco ou nenhum áreas de necrose. Portanto, a presença de células tumorais ou material derivado de tumor no sangue de pacientes com CaP, provavelmente reflete uma maior capacidade de invasão tumoral. Mutações específicas, instabilidade, alterações epigenéticas e genômicas, detecção de proteínas aberrantes, exploração de assinaturas do transcriptoma de tumor, e os perfis de expressão de microRNA podem representar todos os biomarcadores valiosos que podem ser encontrados nos fluidos corporais de doentes com câncer (FIORENTINO; CAPIZZI; LODA, 2010).

O câncer de próstata é uma doença muito heterogênea, muitos pacientes são diagnosticados numa fase inicial e não precisam de tratamento ou são curados com a prostatectomia radical. Outros pacientes apresentam doença avançada ou recorrente, apesar do tratamento inicial curativo e, eventualmente, sucumbem devido ao câncer de próstata metastático resistente à castração. A heterogeneidade molecular da castração-resistente do câncer de próstata, bem como a dificuldade em adquirir tecido tumoral de pacientes que realizaram prostatectomia radiacal, torna a identificação e validação de ensaios baseados na busca de biomarcadores no sangue ou urina, tornam-se cruciais para

individualização do tratamento do CaP. Tais testes são reprodutíveis, menos invasivo e de fácil implementação na prática clínica. Apesar da dosagem do PSA ter sido amplamente estudado no contexto do tratamento do câncer de próstata, ele não é um parâmetro fiável.

Diante do exposto, o desenvolvimento de dispositivos que permita o diagnóstico precoce do CaP, torna-se necessário, tanto pela melhoria na qualidade de vida do paciente, como na redução dos custos pelos cofres públicos.

Arruda, M.S. Utilização de genossensores eletroquímicos para diagnóstico de câncer de próstata

REFERÊNCIAS

3. Referências Bibliográficas

ARJOMANDI, J.; HOLZE, R. A spectroelectrochemical study of conducting pyrrole-N-methylpyrrole copolymers in nonaqueous solution. **Journal of Solid State Electrochemistry**, 10 maio 2013.

ARYA, S. K.; BHANSALI, S. Lung cancer and its early detection using biomarker-based biosensors. **Chemical reviews**, v. 111, n. 11, p. 6783–809, 9 nov. 2011.

ATES, M. A review study of (bio)sensor systems based on conducting polymers. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 4, p. 1853–1859, jan. 2013.

ATES, M.; SARAC, A. S. Conducting polymer coated carbon surfaces and biosensor applications. **Progress in Organic Coatings**, v. 66, n. 4, p. 337–358, dez. 2009.

AUGUSTIN, H. et al. Relationship between prostate cancer gene 3 (PCA3) and characteristics of tumor aggressiveness. **The Prostate**, v. 73, n. 2, p. 203–10, jan. 2013.

BAROCAS, D. A et al. Association between race and follow-up diagnostic care after a positive prostate cancer screening test in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian cancer screening trial. **Cancer**, p. 1–7, 4 abr. 2013.

BARONI, R. H. et al. Ressonância magnética da próstata : uma visão geral para o radiologista *
Magnetic resonance imaging of the prostate : an overview for radiologists. v. 42, n. 3, p. 185–192, 2009.

BH, L.; MG, T.; ROBINET, P. Words of Wisdom. v. 63, p. 1128–1129, 2013.

BUSSEMAKERS, M. J. G. et al. DD3 :: A New Prostate-specific Gene , Highly Overexpressed in Prostate Cancer DD3 : A New Prostate-specific Gene , Highly Overexpressed in Prostate Cancer 1. p. 5975–5979, 1999.

CAPOLUONGO, E. et al. PCA3 score of 20 could improve prostate cancer detection: Results obtained on 734 Italian individuals. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 429, p. 46–50, 15 fev. 2014.

CARAMORI, S. S.; FERNANDES, K. F.; CARVALHO-JÚNIOR, L. B. Synthesis and Characterization of Polyvinyl Glutaraldehyde Composite Disc : a Probable Matrix for Protein Immobilization. p. 46–52, [s.d.].

CHORNOKUR, G. et al. High grade prostate intraepithelial neoplasia (PIN) is a PSA-independent risk factor for prostate cancer in African American men: Results from a pilot study. **Cancer letters**, v. 331, n. 2, p. 154–7, 1 maio 2013.

D’ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry - 2011 update. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 412, n. 19-20, p. 1749–61, 18 set. 2011.

DAL MORO, F.; ZATTONI, F. Inflammation and prostate cancer. **Urologic oncology**, p. 1, 10 abr. 2013.

DE ANGULO, A. et al. Age-related alterations in T-lymphocytes modulate key pathways in prostate tumorigenesis. **The Prostate**, v. 73, n. 8, p. 855–64, jun. 2013.

DE AZEVEDO, W. .; DE SOUZA, J. .; DE MELO, J. . Semi-interpenetrating polymer networks based on polyaniline and polyvinyl alcohol–glutaraldehyde. **Synthetic Metals**, v. 100, n. 3, p. 241–248, abr. 1999.

DE MARZO, A. M. et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature reviews. Cancer**, v. 7, n. 4, p. 256–69, abr. 2007.

DHANEKAR, S.; JAIN, S. Porous silicon biosensor: current status. **Biosensors & bioelectronics**, v. 41, p. 54–64, 15 mar. 2013.

DING, C. et al. Rolling circle amplification combined with nanoparticle aggregates for highly sensitive identification of DNA and cancer cells. **Biosensors & bioelectronics**, v. 42, p. 486–91, 15 abr. 2013.

DU, M.; YANG, T.; JIAO, K. Rapid DNA electrochemical biosensing platform for label-free potentiometric detection of DNA hybridization. **Talanta**, v. 81, n. 3, p. 1022–7, 15 maio 2010.

EDGE, S. B.; COMPTON, C. C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. **Annals of surgical oncology**, v. 17, n. 6, p. 1471–4, jun. 2010.

FERREIRA, L. B. et al. PCA3 noncoding RNA is involved in the control of prostate-cancer cell survival and modulates androgen receptor signaling. **BMC cancer**, v. 12, n. 1, p. 507, jan. 2012.

FILELLA, X. et al. PCA3 in the detection and management of early prostate cancer. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, 16 mar. 2013.

FIORENTINO, M.; CAPIZZI, E.; LODA, M. Blood and tissue biomarkers in prostate cancer: state of the art. **The Urologic clinics of North America**, v. 37, n. 1, p. 131–41, Table of Contents, fev. 2010.

GLASS, A. S.; CARY, K. C.; COOPERBERG, M. R. Risk-Based Prostate Cancer Screening: Who and How? **Current urology reports**, 27 mar. 2013.

GOODE, R. R. et al. Use of PCA3 in detecting prostate cancer in initial and repeat prostate biopsy patients. **The Prostate**, v. 73, n. 1, p. 48–53, jan. 2013.

GRACIA, R.; MECERREYES, D. Polymers with redox properties: materials for batteries, biosensors and more. **Polymer Chemistry**, v. 4, n. 7, p. 2206, 2013.

GUMUSTAS, M.; OZKAN, S. The role of and the place of method validation in drug analysis using electroanalytical techniques. **Open Anal. Chem. J**, p. 1–21, 2011.

HAMMARSTEN, J.; PEEKER, R. Urological aspects of the metabolic syndrome. **Nature reviews. Urology**, v. 8, n. 9, p. 483–94, set. 2011.

HOANG, J.-J. et al. Lipids, LXRs and prostate cancer: Are HDACs a new link? **Biochemical pharmacology**, 23 abr. 2013.

HOYT, M. A et al. Inflammatory biomarkers and emotional approach coping in men with prostate cancer. **Brain, behavior, and immunity**, 26 abr. 2013.

JUNG, A. J.; WESTPHALEN, A. C. Imaging prostate cancer. **Radiologic clinics of North America**, v. 50, n. 6, p. 1043–59, nov. 2012.

JUSTINO, C. I. L.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DUARTE, A. C. Advances in point-of-care technologies with biosensors based on carbon nanotubes. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 45, p. 24–36, fev. 2013.

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

LI, J.; LI, S.; YANG, C. F. Electrochemical Biosensors for Cancer Biomarker Detection. **Electroanalysis**, v. 24, n. 12, p. 2213–2229, 19 dez. 2012.

LI, M. et al. Preparation and Characterization of PPy Doped With Different Anionic Surfactants. p. 1–5, 2013.

LISS, M. A et al. PCA3 molecular urine assay for prostate cancer: association with pathologic features and impact of collection protocols. **World journal of urology**, v. 29, n. 5, p. 683–8, out. 2011.

LIU, X.; FAN, Q.; HUANG, W. DNA biosensors based on water-soluble conjugated polymers. **Biosensors & bioelectronics**, v. 26, n. 5, p. 2154–64, 15 jan. 2011.

MONTIRONI, R. et al. Mechanisms of disease: high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and other proposed preneoplastic lesions in the prostate. **Nature clinical practice. Urology**, v. 4, n. 6, p. 321–32, jun. 2007.

MULCHANDANI, A.; MYUNG, N. V. Conducting polymer nanowires-based label-free biosensors. **Current opinion in biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 502–8, ago. 2011.

NASCIMENTO, G. A et al. Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymeric film on screen-printed electrode. **Biosensors & bioelectronics**, v. 38, n. 1, p. 61–6, 2012.

NOGUEIRA, L.; CORRADI, R.; EASTHAM, J. A. Other biomarkers for detecting prostate cancer. **BJU international**, v. 105, n. 2, p. 166–9, jan. 2010.

ØRSTED, D. D.; BOJESSEN, S. E. The link between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. **Nature reviews. Urology**, v. 10, n. 1, p. 49–54, jan. 2013.

PERDONÀ, S. et al. Prostate health index (phi) and prostate cancer antigen 3 (PCA3) significantly improve diagnostic accuracy in patients undergoing prostate biopsy. **The Prostate**, v. 73, n. 3, p. 227–35, 15 fev. 2013.

PERUMAL, V.; HASHIM, U. ScienceDirect Advances in biosensors : Principle , architecture and. **Journal of Economics, Finance and Administrative Science**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2013.

POWERS, G. L.; MARKER, P. C. Recent advances in prostate development and links to prostatic diseases. **Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine**, v. 5, n. 2, p. 243–56, [s.d.].

QIU, M.-T. et al. Long noncoding RNA: an emerging paradigm of cancer research. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 34, n. 2, p. 613–20, abr. 2013.

RAPP, B. E.; GRUHL, F. J.; LÄNGE, K. Biosensors with label-free detection designed for diagnostic applications. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 398, n. 6, p. 2403–12, nov. 2010.

RASOOLY, A.; JACOBSON, J. Development of biosensors for cancer clinical testing. **Biosensors & bioelectronics**, v. 21, n. 10, p. 1851–8, 15 abr. 2006.

ROOBOL, M. J.; CARLSSON, S. V. Risk stratification in prostate cancer screening. **Nature reviews. Urology**, v. 10, n. 1, p. 38–48, jan. 2013.

RUSLING, J. F. et al. Measurement of biomarker proteins for point-of-care early detection and monitoring of cancer. **The Analyst**, v. 135, n. 10, p. 2496–511, out. 2010.

SHAO, Y. et al. Graphene Based Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review. **Electroanalysis**, v. 22, n. 10, p. 1027–1036, 30 maio 2010.

SINGH, S.; SAIKIA, J. P.; BURAGOHAIN, A. K. A novel reusable PANi-PVA-Amylase film: Activity and analysis. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 106, p. 46–50, 1 jun. 2013.

SOPER, S. A. et al. Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics. **Biosensors & bioelectronics**, v. 21, n. 10, p. 1932–42, 15 abr. 2006.

SOUZA, E. et al. Label-free electrochemical detection of the specific oligonucleotide sequence of dengue virus type 1 on pencil graphite electrodes. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 6, p. 5616–29, jan. 2011.

SUTCLIFFE, S.; COLDITZ, G. A. Prostate cancer: is it time to expand the research focus to early-life exposures? **Nature reviews. Cancer**, v. 13, n. 3, p. 208–518, mar. 2013.

TAO, Z. et al. PCA3 gene expression in prostate cancer tissue in a Chinese population: quantification by real-time FQ-RT-PCR based on exon 3 of PCA3. **Experimental and molecular pathology**, v. 89, n. 1, p. 58–62, ago. 2010.

TOTHILL, I. E. Biosensors for cancer markers diagnosis. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 20, n. 1, p. 55–62, fev. 2009.

TRUONG, M.; YANG, B.; JARRARD, D. F. Toward the detection of prostate cancer in urine: a critical analysis. **The Journal of urology**, v. 189, n. 2, p. 422–9, fev. 2013a.

TRUONG, M.; YANG, B.; JARRARD, D. F. Toward the detection of prostate cancer in urine: a critical analysis. **The Journal of urology**, v. 189, n. 2, p. 422–9, fev. 2013b.

VARMA, M. M. Polymer thin film structures for ultra-low cost biosensing. **Optik - International Journal for Light and Electron Optics**, v. 123, n. 15, p. 1400–1403, ago. 2012.

XU, X. et al. Identification of somatic mutations in human prostate cancer by RNA-Seq. **Gene**, v. 519, n. 2, p. 343–347, 19 fev. 2013.

YANG, J.; WANG, X.; SHI, H. An electrochemical DNA biosensor for highly sensitive detection of phosphinothricin acetyltransferase gene sequence based on polyaniline-(mesoporous nanozirconia)/poly-tyrosine film. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 162, n. 1, p. 178–183, fev. 2012.

YANG, T. et al. Synergistic membrane of ZrO₂/self-doped polyaniline nanofibres fabricated by controllable electrodeposition for DNA hybridization detection. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 656, n. 1-2, p. 140–146, jun. 2011.

YANG, W. et al. Carbon nanomaterials in biosensors: should you use nanotubes or graphene? **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 49, n. 12, p. 2114–38, 15 mar. 2010.

YOU, J. et al. Innovative biomarkers for prostate cancer early diagnosis and progression. **Critical reviews in ...**, 2010.

ZADRA, G.; PHOTOPOULOS, C.; LODA, M. The fat side of prostate cancer. **Biochimica et biophysica acta**, 2 abr. 2013.

OBJETIVOS

4. Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Desenvolver genossensores eletroquímicos para o diagnóstico do câncer de próstata, favorecendo sua detecção precoce, bem como seu rastreamento.

4.2 Objetivos Específicos

- Identificar uma sonda específica para o câncer de próstata para o desenvolvimento de biossensor, através de ferramentas de bioinformática;
- Desenvolver um sistema de imobilização de ácidos nucleicos diretamente na superfície dos eletrodos modificada por polímeros;
- Realizar testes de hibridização entre as sondas e o DNA alvo;
- Realizar análises eletroquímicas para detecção da hibridização dos ácidos nucleicos;
- Avaliar a estabilidade do biossensor frente aos principais parâmetros físico-químicos.
- Realizar estudo com amostras clínicas para certificação do sistema frente aos métodos utilizados atualmente.
- Avaliar a expressão das SIRT-1, SIRT-3 e PCA3 nas amostras de sangue dos pacientes do Hospital das Clínicas.

Arruda, M.S. Utilização de genossensores eletroquímicos para diagnóstico de câncer de próstata

PUBLICAÇÕES

CAPÍTULO I

CAPÍTULO I - PCA3 genosensor blood based assay, as a useful tool to detect prostate cancer

Enviado à revista Sensors and Actuators B

PCA3 genosensor blood based assay, as a useful tool to detect prostate cancer

Mariana Arruda^{1,*}, Deborah Zanforlin^{1,†}, Maria Souto-Maior^{1,†}, Gustavo Nascimento^{1,†}, Danielly Campos-Ferreira^{1,†}, Natália Oliveira^{1,†}, Monique Beltrão^{1,†}, Salvador Lima^{3,†} and José Lima-Filho^{1,2,†}

¹ Keizo Asami Laboratory of Immunopathology - LIKA/ UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CEP 506070-901, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil;
E-mails: mariana.s.arruda@gmail.com; deborahzanforlin@gmail.com; mariameliaborba@gmail.com; galvesn23@gmail.com; daniellylsantos@gmail.com; nataliacybelle89@gmail.com; ferraz.monique@gmail.com; joseluiz60@gmail.com.

² Department of Biochemistry / Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego 1235, CEP 506070-901, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil;
E-mail: joseluiz60@gmail.com.

³ Department of Surgery / Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CEP 506070-901, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil;
E-mail: salvadorvilarcorreia@me.com.

[†] These authors contributed equally to this work.

^{*} Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: mariana.s.arruda@gmail.com; Tel.: +55-81-30313710 (ext. 123); Fax: +1-111-111-112.

1. Introduction

Prostate cancer (CaP) is the second leading cause of cancer death in men. Age is one of the greatest factors associated with increased risk of prostate cancer development. Epidemiological studies suggest that men in their fifties experience a progressively heightened risk of being diagnosed with prostate cancer with each subsequent year of life until the age of 85[1]. Other factors for prostate cancer are ethnic factors and a positive family history. In addition, a number of variable modifiable or behavioral factors have been found to be associated with prostate cancer risk. The heterogeneity in prostate cancer

mortality across countries indicates that behavioral conduct factors play an important role [2,3].

Current predominant tools for CaP detection are serum PSA and digital rectal examination. Despite its widespread use, PSA is a poor predictor of disease. Approximately 65% to 70% men presenting increased PSA (4-10 ng/mL) will have a negative biopsy result. In order for PSA to be an effective factor, repeat biopsies are often necessary, which can be associated with significantly high morbidity, including sepsis, bleeding and hospitalization [4]. Prostate serum, semen, plasma and urine are biological fluids with potential for CaP screening especially when epithelial cells are shed into biological fluids, particularly when the prostate is subjected to physical manipulation[4,5].

These concerns have led to the search for new biomarkers for prostate cancer that have greater specificity to better identify patients that may benefit from prostate biopsy. PCA3 is a gene discovered in 1999 that is expressed 70–100 times more in prostate cancer cells than in normal prostate tissue[6]. Others have shown an even greater differential in benign prostatic hypertrophy tissue with PCA3 expression 140 times greater in cancer cells, which is uncharacteristic of PSA. The levels of the expression of the PCA3 mRNA can be measured with an assay of a urine sample obtained after an attentive digital rectal exam (DRE) and peripheral blood [7].

An alternative method for detecting nucleic acids are biosensors as a bioanalytical device incorporating a molecular recognition entity associated with or integrated with a physicochemical transducer. Biosensors attend the demand for point-of-care devices (POC) which can bring the capability of analyzing clinical samples in the home or during surgery. In order to develop appropriate biosensor technologies, specific markers need to

be identified to ensure specificity of devices. Biosensors provide advanced platforms for biomarker analysis with the advantages of being easy to use, inexpensive, rapid and robust as well as offering multi-analyte testing capability [8,9]. Among the various types of biosensors, electrochemical presents the possibility of achieving all these aspects [10].

In the development of electrochemical biosensors, the use of conductive polymer films has allowed obtaining increasingly sensitive devices[11]. These conductive polymers retains the characteristics of conventional organic polymers, but acquire electronic properties of metals[12]. Among these, poly pyrrole is a widely used conductive polymer in the development of electrochemical DNA biosensors[13].

This work aims to develop a nucleic acid biosensor to detect prostate cancer in urine and blood in the early stages of disease, as well as differentiate between cancer and benign prostatic hyperplasia.

2. Material and Methods

2.1 Reagents and materials

Only high purity reagents were used. Methylene blue (MB), Pyrrole was purchased from SAFC®. UltraPure™ DNase/RNase-Free distilled water was purchased from Invitrogen (USA). All ssDNA oligonucleotides were synthesised by Integrated DNA Technologies (USA). Screen-printed electrodes for electrochemical detection were purchased from The Gwent Group (UK).

2.2 Analysis in silico of the molecular biomarker for prostate cancer

The gene sequence of the chosen biomarker (PCA3) was obtained from the NCBI database (National Center for Biotechnology Information) and UCSC Genome Browser. CLC Combined Workbench and Oligocalc software were used to select DNA probe and complementary sequences for the optimal PCA3 detection.

2.3 PCA3 oligonucleotides

All oligonucleotides were purchased as lyophilized powder, diluted with ultrapure water and stored as a stock solution in a freezer (-20°C). The oligonucleotides were diluted from the stock solution in 0.5 M acetate buffer pH 5 for testing. The following oligonucleotides sequences used in this study were designed using bioinformatics tools.

PCA3 probe:

5'- GGA ATG TTT ATG GGG CAC GTT TGT AAG CCT GGG ATG TGA AGC AAA GGC AGG -3'

PCA3 target:

5' – CCT GCC TTT GCT TCA CAT CCC AGG CTT ACA AAC GTG CCC CAT AAA CAT TCC – 3'

Non-Complementary sequence:

5'- CCT CTCCT CGT GCA AAT TTA ATC TGC ACC ACG TCC TTG AGA AAA AGG ATT TC C A -3'

2.4 Population study

Thirty-two males (over 50 years old) underwent DRE (Digital Rectal Exam), PSA and biopsies from the Federal University Hospital (located in Recife, Pernambuco, Brazil). Study participants were recruited under protocols approved by the institution, and all subjects provided written informed consent. Fourteen CaP, ten BPH and eight control patients composed the population study. Blood samples were collected in Paxgene blood RNA tubes and refrigerated at 4°C until RNA extraction. Total RNA was extracted using the Paxgene blood RNA kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) was generated with Superscript III (Invitrogen). cDNA concentration was measured in Nanodrop 2000.

Reverse transcription was performed with 1 µg of total RNA and Superscript III enzyme (Invitrogen). Real-time PCR was performed on Roche LightCycler 480 sequence detection system, using the following amplification conditions: 5 min, 95 °C; followed by 40 cycles of 15s at 95 °C, 1 min at 60 °C and 20 sec at 72 °C. CT values were determined using the IQ5 software(Bio-Rad).

2.5 Apparatus

A conventional three-electrode system was employed in this work. Gold was used as a working electrode (surface area of approximately 3 mm²), silver/silver chloride (Ag/AgCl) was used as a reference electrode and carbon was used as a counter electrode. The electrochemical analysis was performed with a potentiostat (Autolab PGSTAT) that was equipped with GPES (4.0.007) software. All hybridization experiments were carried out in a Hybridization Oven/Shaker (Amersham Pharmacia Biotech).

2.6 Preparation of polymer-modified screen-printed electrodes

The polymer pyrrole was used to allow for immobilization of the DNA probe to the working electrode. The pyrrole solution was tested at different concentrations (0.05 M e 0.1M), and different doping agents: SDS(sodium dodecyl sulfate), ammonium perchlorate and magnesium perchlorate at concentrations: 0.01 M, 0.05 M and 0.1 M with each doping agent, the solution was prepared in acetonitrile (50%) and phosphate-buffered (50%) 0.1M pH 7. For preparation of the polypyrrole film, the pyrrole solution was electropolymerized on the working electrode by cyclic voltammetry scanning from -0.3 to 0.8 V for 10 cycles with a scan rate of 100 mVs⁻¹. The electrode was rinsed with ultra pure water in the absence of RNase and DNase, and then dried at 30°C.

2.7 Probe DNA immobilization

The PCA3 probe in an acetate buffer solution (0.5 M, pH 5) was immobilized by adsorption on a gold electrode surface that was modified with a polymer layer. The probe concentrations tested were (0.1µM; 0.25µM; 0.50µM; 1µM; 2µM and 4.5µM) and immobilization time was 30 min. Then, the unbound oligonucleotides were removed from the working electrode by washing with Tris-HCl buffer (20 mM, pH 7.0).

2.8 DNA hybridization

In the hybridization process, PCA3 target were tested at concentrations: 1.0 nM; 5.0 nM; 20 nM; 50 nM; 0.1µM; 0.25µM; 0.50µM; 1µM were added onto the working electrode with the immobilized PCA3 probe. The electrode was incubated at 70°C for 10 min with a stir speed of 300 rpm to link the complementary sequences. This temperature was the best for annealing sequences based on the company's descriptions. A Tris-HCl buffer (20 mM, pH 7.0) was used to wash the electrode and remove the non-hybridized sequences. The same procedure was applied for the interaction of the PCA3 probe with a non-complementary sequence. For the hybridization of the patient cDNA with PCA3 probe

on the modified working electrode, the cDNA was denatured by heating in a water bath (95 °C) for 5 min and was immediately chilled in ice to obtain denatured ss-DNA. Then, it was added to the modified working electrode surface. The formation of hybridization between the cDNA and PCA3 probe was also performed at 70 °C for 10 min at a stirring speed of 300 rpm. To remove residual unhybridized DNA further washing was performed with Tris-HCl buffer (20mM, pH 7.0).

2.9 Electrochemical Analysis

For the electrochemical signal analysis, the differential pulse voltammetry (DPV) method was used for the measurement system of the current signals. After the immobilization and hybridization process, 500 µM Methylene Blue (MB) solution in Tris-HCl buffer (20 mM, pH 7.0) was accumulated on the modified working electrode for 5 min, then was washed with Tris-HCl buffer. The DPV measurement was performed in the Tris-HCl buffer for the MB electrochemical reduction under the following conditions: a potential sweep between -0.9 and 0 V, modulation amplitude of 50 mV and scan rate of 50 mV s⁻¹.

2.10 Statistical Analysis

Experimental data were analyzed using Statistica 8.0 (StatSoft Inc.) and GraphPad Prism 5.0 software, by parametric tests. In order to evaluate statistical differences among the samples, ANOVA was performed and a level of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results and Discussion

3.1 PCA3 gene

The probe chosen for immobilization on the electrode surface was built by bioinformatics analysis, and is composed of 51 bp because the bioinformatics analysis showed that this was the minimum number of specific bases for cancer detection avoiding cross-reactivity with other genes. The probe is located in exon 4 of the PCA3 gene within chromosome 9q21-22 which consists of four exons. The most common transcript contains exons 1, 3, 4a, and 4b and the exon 4 is the coding region. The product of a PCA3 mRNA contains a high density of stop codons which is understood as a noncoding RNA, whose biological function is not completely known. Recent data suggest that PCA3 is involved in the control of prostate cancer cell survival, in part by modulating the transcriptional activity of androgen receptor target genes[14]. Thus, the PCA3 represents a biomarker potential for prostate cancer detection.

3.2 Pyrrole electropolymerization

In this work, the polymer was used for the immobilization of the PCA3 probe on the working electrode. The best pyrrole concentration tested was 0.05M with the dopant anion as SDS at a concentration of 0.01M. This anion has the ability to dope and disperse the polymer favoring a more uniformly thin film because the stability of the matrix is one of the important parameters for the immobilization of the biocomponents. The stability of the matrix depends upon the size of anion. The size of anion is of three types: smaller (e.g. nitrate), medium (e.g. p-toluene sulfonic acid) and large (e.g. polyvinyl sulfonic acid). Generally, large sized anions are not able to leave the polymer matrix which give the matrix its compact form and are responsible in providing stability to the polymer matrix. It has been reported that the polymer film synthesized with polyelectrolyte gives good operational stability in the polymer matrix with increased growth rate and higher

compactness [15,16]. Because of these factors, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) was chosen as dopant anion and because the hydrophobic part of the surfactant molecules may adsorb on the produced conducting polymer[17].

The electropolymerization of pyrrole was performed electrochemically by a cyclic voltammetry method of demonstrating that the polymer film has the characteristics of a reaction (ECE), or a sequence of steps where an electron transfer event(E) is followed by a chemical reaction(C) and a subsequent transfer of electrons(E) (Fig 1).

Cyclic voltammetry is an essential method for the characterization of the electrochemical properties of conducting polymers. Although the shape of cyclic voltammograms (CVs) has long been a subject of discussion is accepted that the shape and position of CVs can reflect properties of polymer structure. In the case of pyrrole, typical voltammograms of PPy electro synthesized under mild conditions show an oxidation wave with a steep onset, followed by a broad plateau and, on the reverse scan, a negatively shifted, weaker reduction wave. The shapes may vary, depending on supporting electrolytes, solvents and other conditions[18].

Treatment of the pyrrole solution under cyclic voltammetry shows the formation of the polymer film in (Fig. 2). Morphology comparison of the gold electrode (Fig. 2A) with the prepared PPy film (Fig. 2B) at 110x shows significant differences. In (Fig. 2D) greater compaction presented by the pyrrole film can be seen when compared to the gold electrode without modification (Fig. 2C), possibly due to the size of the dopant anion and because the polymeric synthesis was performed in aprotic solvent that has low nucleophilicity, supporting an electrophilic attack of pyrrole monomer [17]. At 5000x, significant alteration in surface area for DNA binding (Fig. 2F) can be seen compared to the electrode without polymer film (Fig. 2E). Therefore, the film can present a large

surface area. As is well known, properties of a broad range of materials and performance of different devices depend strongly on their surface characteristics. The binding of PCA3 probe with the polymeric film is possibly made by electron magnetic resonance of polypyrrole polymer that when positively charged attacks the oxygen content of the nucleic acid phosphate group (Fig. 3).

Studies of polymer films prepared by electrochemical polymerization show that their surface morphology is also greatly affected by other factors like dopant anion, applied current density, electrode configuration and solvent. Films obtained in acetonitrile have smoother surface, while the films obtained in aqueous media are more rugged. Numerous investigators have attempted to understand the mechanism of charge transport in these conducting polymers[19].

The performance of the biosensor was investigated by differential pulse voltammetry with the redox indicator methylene blue (MB). It is widely known that MB has an affinity to DNA, and several authors have demonstrated two possible mechanisms of interaction. These links can occur by an electrostatic interaction with the negatively charged phosphate groups or by an interaction between the guanine bases, which are mainly in ssDNA. In this work, the binding of MB occurred by an interaction between the guanine bases in ssDNA (probe) because the phosphate groups were linked to the polymer layer on the PPy- gold surface [20].

3.3 Analysis of the probe immobilization

The immobilization of a biological element on the electrode is the first step to be considered in the development of a biosensor. Determination of the optimal probe concentration is crucial to ensure a high performance of DNA biosensors, and reduce any interference in the electrochemical response of the system[21]. The probe immobilization efficiency was evaluated with different concentrations and was observed that the best result (for the MB electrochemical reduction) was obtained with the probe concentration of 0,5 μ M because it provided the highest current peaks and had better reproducibility, with an immobilization time of 30 min. The other concentrations showed lower current signals due to a low amount of immobilized probe on the working electrode (0.25 μ M) or due to steric hindrance caused by excess oligonucleotide (1 to 4.5 μ M). Thus, the probe concentration of 0.5 μ M was chosen for the interaction with complementary sequences (Fig. 4).

3.4 Optimization of the hybridization process

The biosensor recognition array was applied in experiments on the hybridization reaction between the PCA3 probe and the PCA3 target cDNA fragment. In this study, the hybridization was performed with differential potential voltammetry (DPV) on the MB electrochemical reduction. The goal of this experiment was to determine the optimal hybridization conditions for the probe and target on the modified PPy-gold electrode while minimizing the non-specific interaction. In this regard, the hybridization was performed with different concentrations of the complementary target sequence. In Fig 5a, it can be observed that the current signal increased with the increasing target concentration and then it stabilized at 50 nM. At these concentrations, it was observed that the highest current signal was 0.65 μ A, with a coefficient of determination of 99,8% (Fig. 5A).

The linear regression obtained from the electrochemical signal regarding the different concentrations of the PCA3 target is shown in (Fig. 5A). The calibration curve ($y = 0.0086x + 0.205$) is linear between 1 nM and 50 nM with a correlation coefficient of 0.998. A detection limit of 2,2 pg/ μ L could be estimated by equation $3\sigma/a$, where σ is the standard deviation of the intercept and a is the slope of the linear regression [22]. The relative standard deviation (RSD) was 0.056% over three independent probe-modified electrodes that were measured at 50 nM of the PCA3 target, which indicated a remarkable reproducibility of the detection method.

The DPV test for the MB electrochemical reduction of 0.5 μ M PCA3 probe immobilized on modified PPy-gold electrode before hybridization and after hybridization show this current signal in the hybridization decreased when compared to the current signal with the PCA3 probe immobilized about 68% (Fig. 5B). MB had a strong affinity for the free guanine in the ssDNA. Thus, this difference occurred due to a weak interaction between the dsDNA and MB compared with the ssDNA and MB, which resulted in the decreased intercalation of MB within the dsDNA [20,23].

The bare modified PPy-gold electrode did not present an electrochemical signal (Fig. 5B), which indicated the absence of guanine on the working electrode. According to the analyzed data, the decrease of the current peak represented a positive diagnosis for a prostate cancer.

3.5 Selectivity Study and prostate cancer detection

The highest MB reduction signal was observed with PCA3 probe immobilized on modified-gold electrode surface (0.96 μ A). Experiments with non-complementary

oligonucleotides were performed to evaluate the selectivity of electrochemical nucleic acid biosensor. The interaction between this non-complementary oligonucleotides and probe did not lead to a significant decrease in the signal (0.06 μ A) due to the absence of the entire hybridization. So, the current peak of hybridized with a non-complementary sequence showed values similar to that observed following PCA3 probe. The selectivity demonstrates that the sequenced PCA3 probe could form a double helix with the complementary oligonucleotides, causing a significant decrease of 68% in the current peak (Fig. 6).

These results confirm that the electrochemical detection present in this study successfully distinguished complementary sequences from non-complementary sequences, using the annealing temperature to perform the hybridization. The selectivity of the biosensor was also examined in a sample containing both complementary and non-complementary sequences in similar proportions. The mixture showed a current peak similar to immobilized after hybridization with a complementary sequence. This demonstrates that the presence of non-complementary samples did not interfere in the specificity of the biosensor. These results are important for the construction of the device, because the system can be better controlled by regulating temperature than by other means such as the application of a potential [23].

3.6 Performance of electrochemical DNA biosensor using real samples

To validate a possible clinical application, the proposed biosensor was analyzed using 1nM of cDNA samples from patients from CaP, BPH, and control (CG) groups. In this

assay, we used the cDNA directly on the modified electrode with the immobilized probe. (Fig. 7) shows a DPV response of the biosensor to positive sample of CaP, BPH (non-complementary sample) and CG (non-complementary sample). It is possible to observe that in the presence of a CaP positive sample that current peaks were decreased, which confirmed the occurrence of hybridization in the proposed detection system. The difference between CG and CaP currents peaks was $0.58\mu\text{A}$ with statistical difference $p<0.001$, proving the hybridization process.

The ANOVA analysis showed significant differences between CaP, BHP and CG with a $p<0.001$. The limit of detection of the proposed biosensor was 2.2 ng/ml , presenting a better sensitivity than PSA (gold standard assay) that range is from 4 ng/ml to 10 ng/ml . Thus, our biosensor is specific to prostate cancer avoiding false positives that happen in PSA results when BPH should be the correct diagnosis. This data demonstrated that the electrochemical DNA biosensor is able to detect the PCA3 presence and that the non-complementary sample did not interfere with the specificity of the biosensor. Similar results were found by [24,25], where through studies, we confirmed the efficiency of PCA3 as a better predictor of prostate cancer and that [26] proved its sensitivity and specificity.

The PCA3 mRNA expression was analyzed on RNA extracted from blood of BPH, PCa and Control Group to validate the results of the proposed biosensor (Fig. 8). There was no difference in the expression of PCA3 RNA between Control Group and BPH, considering this; we decided to include the results from both groups in the non-malignant control. Blood samples containing, in average, 120 ng/ml total cells, presented, in average, PCA3 up regulation of 40-fold in comparison with PCA3 RNA expression in non-malignant controls. The proposed biosensor presents lower expression compared to

RT-PCR (PCA3 up regulation of 2-fold), because a smaller amount of total blood cells (2.2 ng/ml) was added to the system due to its higher sensitivity.

4. Conclusions

In this work, a new electrochemical nucleic acids biosensor was demonstrated for the detection of prostate cancer, demonstrating high specificity and sensitivity providing a convenient, rapid and non-invasive electroanalytical method for detection of prostate cancer compared to conventional methods which have low specificity. In the proposed detection model, the nucleic acids biosensor is able to detect hybridization, therefore, it is possible to identify samples positive for prostate cancer. The decrease of the electrochemical signal between the immobilized probe on the modified PPy-gold electrode after the hybridization process is shown by the reduction of MB and this signal decrease is associated with prostate cancer.

Accordingly this work shows that in the near future, the electrochemical genosensor for the detection of prostate cancer can be used as an alternative to current diagnostic methods considering it has a lower detection limit than conventional methods and favors early tracking and detection of the disease.

Acknowledgments

The authors are grateful for the financial support that was received from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (National Council for Scientific and Technological Development), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel), Laboratório de Imunopatologia KeizoAsami-LIKA(Keizo Asami Immunopathology Laboratory), and Hospital das Clínicas-HC-UFPE (Federal University Hospital Clinics of Pernambuco). The authors no have conflicts of interest.

References

- [1] A. De Angulo, R. Faris, D. Cavazos, C. Jolly, B. Daniel, L. Degraffenried, Age-related alterations in T-lymphocytes modulate key pathways in prostate tumorigenesis., *Prostate*. 73 (2013) 855–64. doi:10.1002/pros.22631.
- [2] D. a Barocas, R. Grubb, A. Black, D.F. Penson, J.H. Fowke, G. Andriole, et al., Association between race and follow-up diagnostic care after a positive prostate cancer screening test in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian cancer screening trial., *Cancer*. (2013) 1–7. doi:10.1002/cncr.28042.
- [3] M.F. Leitzmann, S. Rohrmann, Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates., *Clin. Epidemiol.* 4 (2012) 1–11. doi:10.2147/CLEP.S16747.
- [4] M. Truong, B. Yang, D.F. Jarrard, Toward the detection of prostate cancer in urine: a critical analysis., *J. Urol.* 189 (2013) 422–9. doi:10.1016/j.juro.2012.04.143.
- [5] S. De Luca, R. Passera, C. Fiori, E. Bollito, S. Cappia, R. Mario Scarpa, et al., Prostate health index and prostate cancer gene 3 score but not percent-free Prostate Specific Antigen have a predictive role in differentiating histological prostatitis from PCa and other nonneoplastic lesions (BPH and HG-PIN) at repeat biopsy, *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* (2015) 1–7. doi:10.1016/j.urolonc.2015.05.032.
- [6] M.J.G. Bussemakers, A. Van Bokhoven, G.W. Verhaegh, F.P. Smit, H.F.M. Karthaus, J.A. Schalken, et al., DD3 :: A New Prostate-specific Gene , Highly Overexpressed in Prostate Cancer DD3 : A New Prostate-specific Gene , Highly Overexpressed in Prostate Cancer 1, (1999) 5975–5979.
- [7] R.R. Goode, S.J. Marshall, M. Duff, E. Chevli, K.K. Chevli, Use of PCA3 in detecting prostate cancer in initial and repeat prostate biopsy patients., *Prostate*. 73 (2013) 48–53. doi:10.1002/pros.22538.
- [8] C.I.L. Justino, T. a. P. Rocha-Santos, A.C. Duarte, Advances in point-of-care technologies with biosensors based on carbon nanotubes, *TrAC Trends Anal. Chem.* 45 (2013) 24–36. doi:10.1016/j.trac.2012.12.012.

- [9] I.E. Tothill, Biosensors for cancer markers diagnosis., *Semin. Cell Dev. Biol.* 20 (2009) 55–62. doi:10.1016/j.semcdb.2009.01.015.
- [10] J.P. Tosar, K. Keel, J. Laíz, Two independent label-free detection methods in one electrochemical DNA sensor., *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 3036–42. doi:10.1016/j.bios.2009.03.016.
- [11] J.E.N. Dolatabadi, O. Mashinchian, B. Ayoubi, A.A. Jamali, A. Mobed, D. Losic, et al., Optical and electrochemical DNA nanobiosensors, *TrAC Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 459–472. doi:10.1016/j.trac.2010.11.010.
- [12] H. Peng, L. Zhang, C. Soeller, J. Travas-Sejdic, Conducting polymers for electrochemical DNA sensing, *Biomaterials.* 30 (2009) 2132–2148. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.12.065.
- [13] H.C. Budnikov, G.A. Evtugyn, A. V Porfireva, Electrochemical DNA sensors based on electropolymerized materials, *Talanta.* 102 (2012) 137–155. doi:10.1016/j.talanta.2012.07.027.
- [14] X. Filella, L. Foj, M. Milà, J.M. Augé, R. Molina, W. Jiménez, PCA3 in the detection and management of early prostate cancer., *Tumour Biol.* (2013). doi:10.1007/s13277-013-0739-6.
- [15] M. Ates, a. S. Sarac, Conducting polymer coated carbon surfaces and biosensor applications, *Prog. Org. Coatings.* 66 (2009) 337–358. doi:10.1016/j.porgcoat.2009.08.014.
- [16] M. Ates, A review study of (bio)sensor systems based on conducting polymers, *Mater. Sci. Eng. C.* 33 (2013) 1853–1859. doi:10.1016/j.msec.2013.01.035.
- [17] M. Li, W. Li, J. Liu, J. Yao, Preparation and Characterization of PPy Doped With Different Anionic Surfactants, (2013) 1–5. doi:10.1002/pen.
- [18] M. Zhou, J. Heinze, Electropolymerization of pyrrole and electrochemical study

- of polypyrrole: 1. Evidence for structural diversity of polypyrrole, *Electrochim. Acta.* 44 (1999) 1733–1748. doi:10.1016/S0013-4686(98)00293-X.
- [19] J. Arjomandi, R. Holze, A spectroelectrochemical study of conducting pyrrole-N-methylpyrrole copolymers in nonaqueous solution, *J. Solid State Electrochem.* (2013). doi:10.1007/s10008-013-2114-3.
- [20] G. a Nascimento, E.V.M. Souza, D.S. Campos-Ferreira, M.S. Arruda, C.H.M. Castelletti, M.S.O. Wanderley, et al., Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymeric film on screen-printed electrode., *Biosens. Bioelectron.* 38 (2012) 61–6. doi:10.1016/j.bios.2012.04.052.
- [21] N. Oliveira, E. Souza, D. Ferreira, D. Zanforlin, W. Bezerra, M. Borba, et al., A Sensitive and Selective Label-Free Electrochemical DNA Biosensor for the Detection of Specific Dengue Virus Serotype 3 Sequences, *Sensors.* 15 (2015) 15562–15577. doi:10.3390/s150715562.
- [22] M. Gumustas, S. Ozkan, The role of and the place of method validation in drug analysis using electroanalytical techniques, *Open Anal. Chem. J.* (2011) 1–21. <http://benthamscience.com/open/toacj/articles/V005/1TOACJ.pdf> (accessed June 9, 2013).
- [23] E. Souza, G. Nascimento, N. Santana, D. Ferreira, M. Lima, E. Natividade, et al., Label-free electrochemical detection of the specific oligonucleotide sequence of dengue virus type 1 on pencil graphite electrodes., *Sensors (Basel).* 11 (2011) 5616–29. doi:10.3390/s110605616.
- [24] E. Capoluongo, C.F. Zambon, D. Basso, S. Boccia, S. Rocchetti, E. Leoncini, et al., PCA3 score of 20 could improve prostate cancer detection: Results obtained on 734 Italian individuals., *Clin. Chim. Acta.* 429 (2014) 46–50. doi:10.1016/j.cca.2013.10.022.
- [25] D.S. Campos-Ferreira, G. a Nascimento, E.V.M. Souza, M. a Souto-Maior, M.S. Arruda, D.M.L. Zanforlin, et al., Electrochemical DNA biosensor for human papillomavirus 16 detection in real samples., *Anal. Chim. Acta.* 804 (2013) 258–63. doi:10.1016/j.aca.2013.10.038.

- [26] C.G. Ramos, R. Valdevenito, I. Vergara, P. Anabalon, C. Sanchez, J. Fulla, PCA3 sensitivity and specificity for prostate cancer detection in patients with abnormal PSA and/or suspicious digital rectal examination. First Latin American experience., *Urol. Oncol.* 31 (2013) 1522–6. doi:10.1016/j.urolonc.2012.05.002.

Figure captions

Fig 1: Electropolymerization of pyrrole by cyclic voltammetry scanning from -0.3 to 0.8V for 10 cycles with a scan rate of 100mVs^{-1} .

Fig 2: SEM micrographs. (a) gold electrode, increased 110X; (b) modified PPy-gold electrode, increased 110X; (c) gold electrode, increased 1000X; (d) modified PPy-gold

electrode, increased 1000X; (e) gold electrode, increased 5000X; (f) modified PPy-gold electrode, increased 5000X.

Fig 3: Schematic representation of the binding of DNA on polypyrrole film.

Fig 4: Histogram of the effect of PCA3 probe concentration on the MB electrochemical reduction during the immobilization process. The differential pulse voltammetry method was used to analyze the current signals in the following conditions: initial potential -0.9 V, end potential 0 V, modulation amplitude 50 mV and scan rate 20 mV^{s-1}. All plotted results were the averages of triplicates that were performed at different PCA3 probe concentrations.

Fig 5: Optimization of hybridization process (A) The effect of the PCA3 target concentration on the MB electrochemical reduction during hybridization. The differential pulse voltammetry method was used to analyze the current signals in the following conditions: initial potential -0.9 V, end potential 0 V, modulation amplitude 50 mV and scan rate 20 mV^{s-1}. The black line represents the linear regression at a concentration range of 1 – 50 nM. (B) The differential pulse voltammograms for the MB electrochemical reduction of (a) 0.5µM PCA3 probe immobilized on modified PPy-gold electrode before hybridization; (b) 0.5µM PCA3 probe immobilized on modified PLL-gold electrode after hybridization; (c) bare modified PPy-gold electrode.

Fig 6: The differential pulse voltammograms for the MB electrochemical reduction of (a) 0.5µM PCA3 probe immobilized on modified PPy-gold electrode before hybridization (b) 0.5 µM PCA3 probe immobilized on modified PPy-gold electrode after hybridization with 50nM non-complementary sequences; (c) 0.5µM PCA3 probe immobilized on modified PPy-gold electrode after hybridization with a mixed sample (complementary and non-complementary sequences); (d) 0.5µM PCA3 probe immobilized on modified PPy-gold electrode after hybridization with 50 nM PCA3 target sequence; (e) bare modified PPy-gold electrode.

Fig 7: Histogram representing the differential pulse voltammograms for the MB electrochemical reduction of patients with Prostate Cancer (CaP); Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) and Control Group (CG) with p<0.001by ANOVA.

Fig 8: PCA3 mRNA expression in Prostate Cancer, BPH and Control Group gene expression in human blood samples indicated by quantitative PCR.

Figures

Figure 1

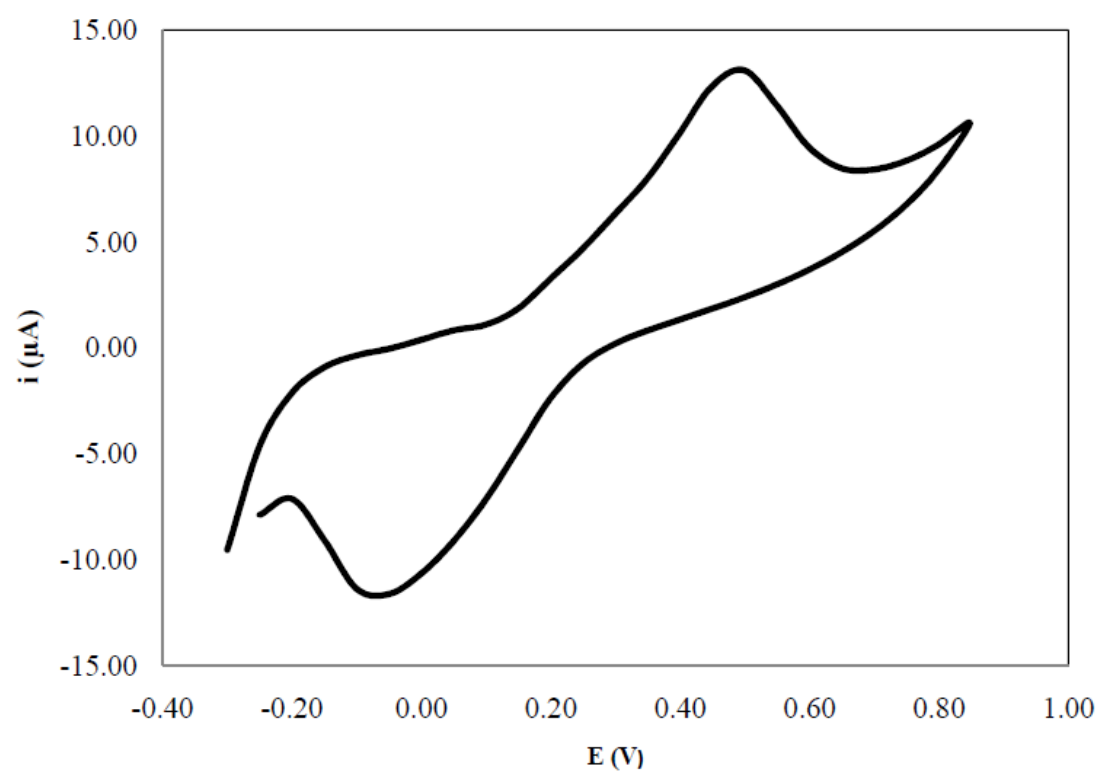


Figure 2

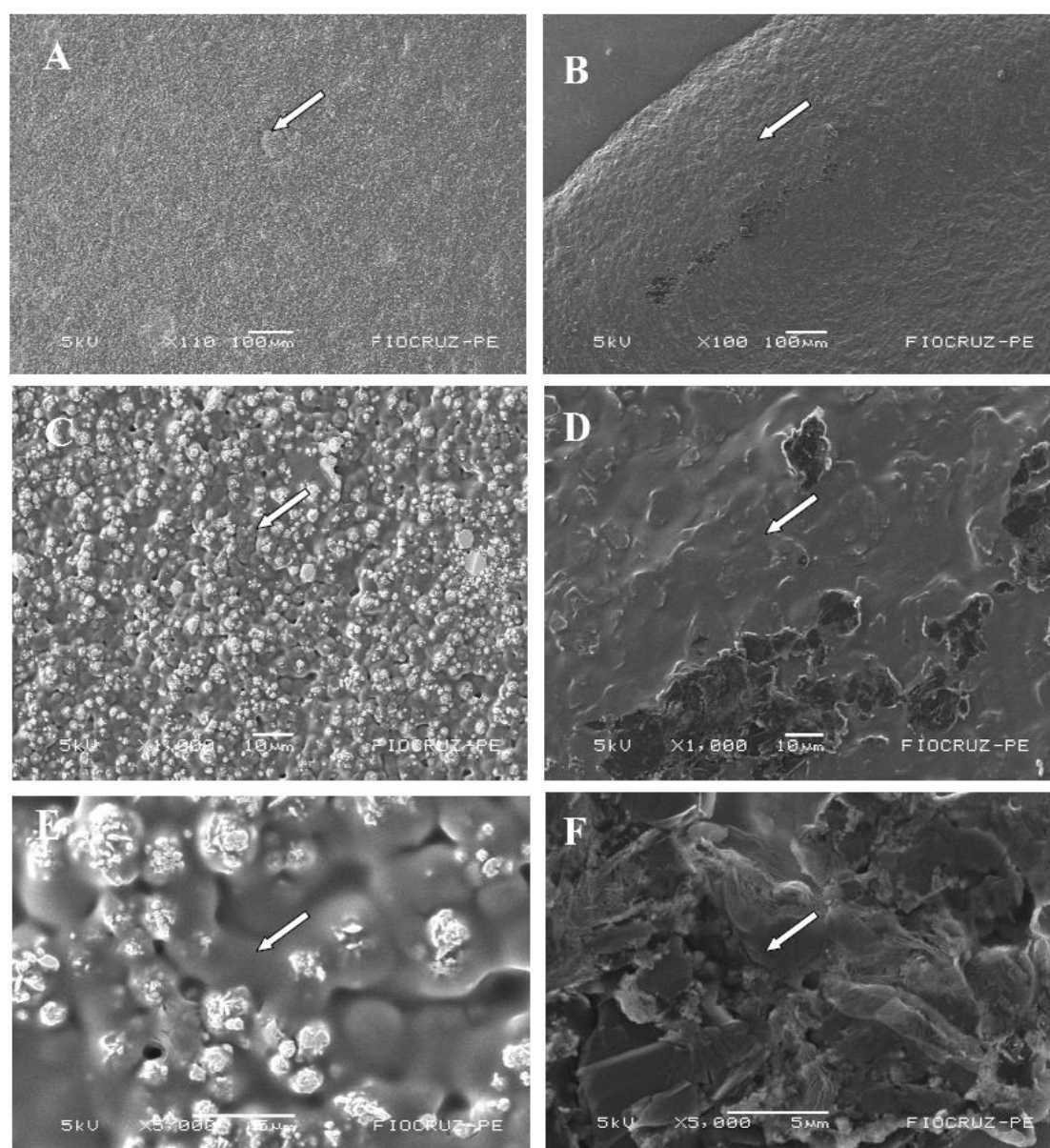


Figure 3

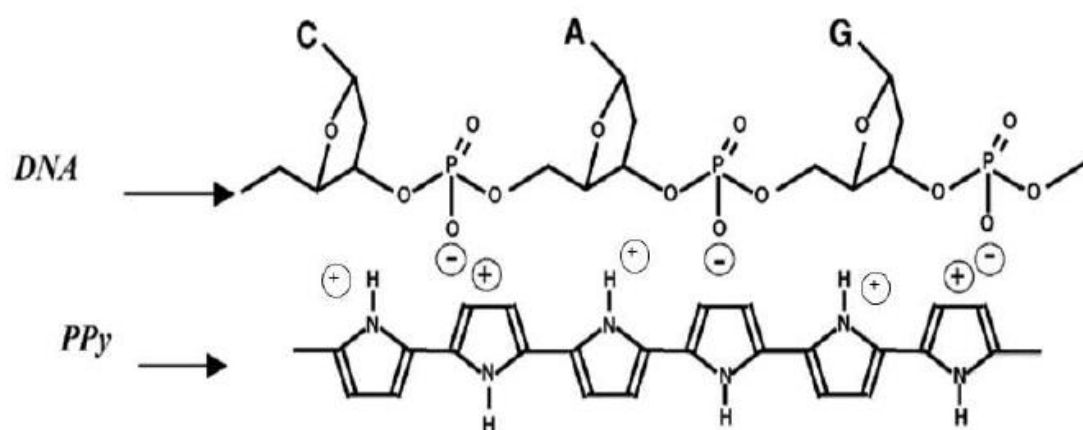


Figure 4

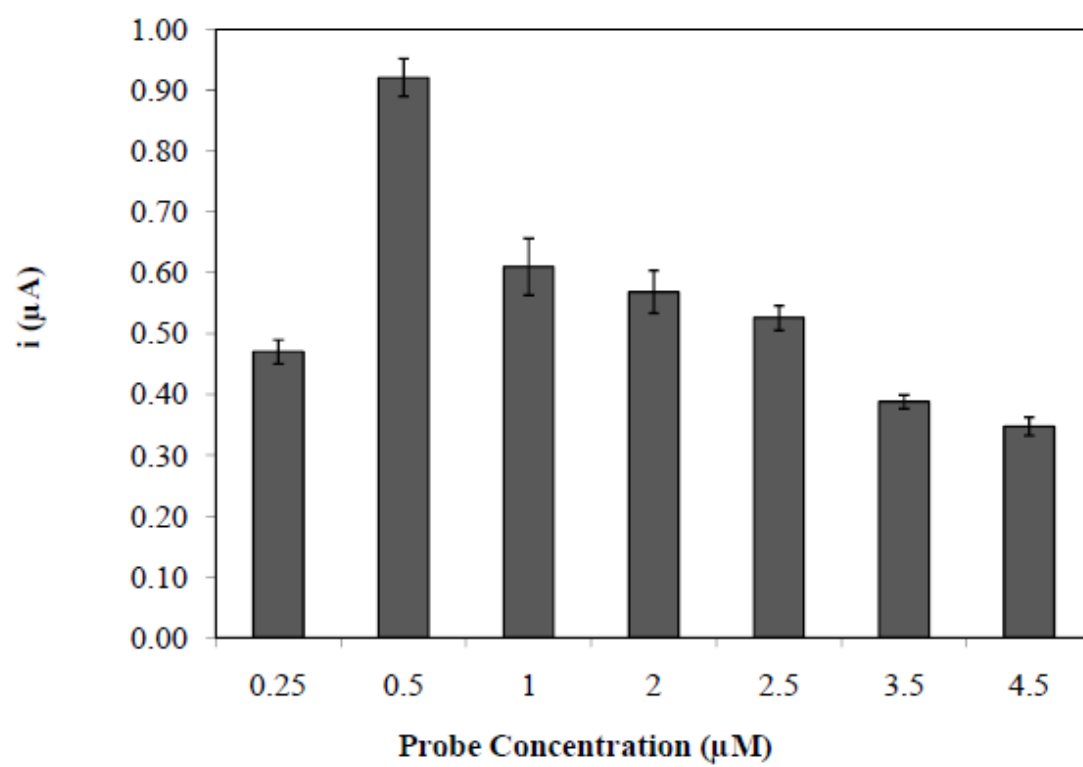


Figure 5

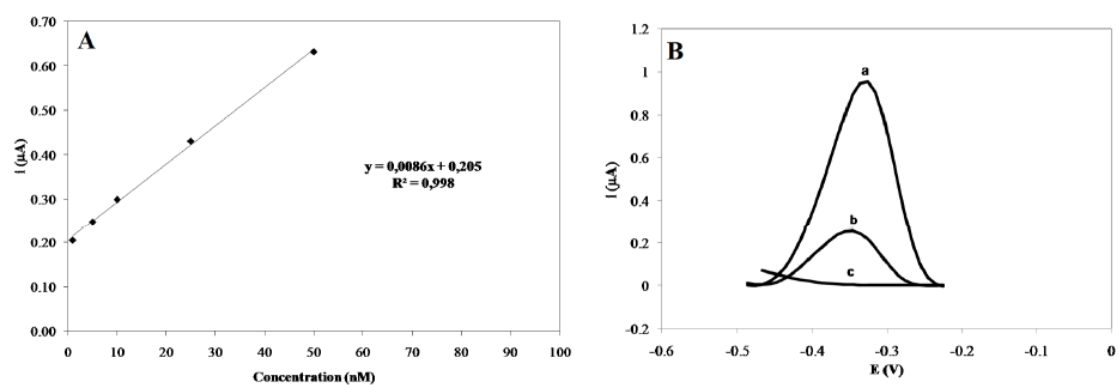


Figure 6

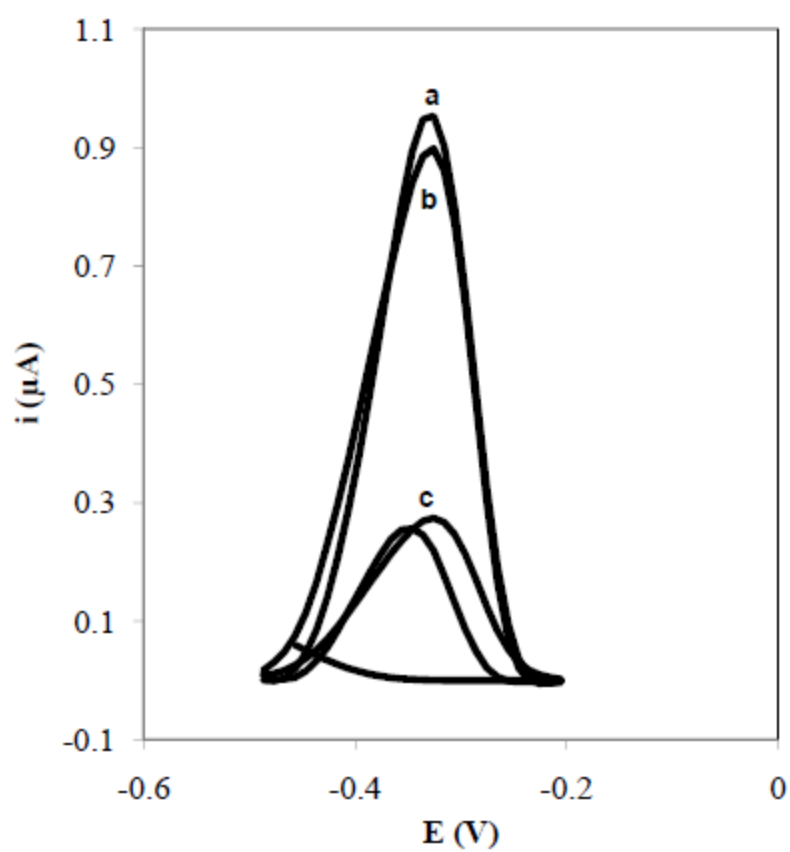


Figure 7

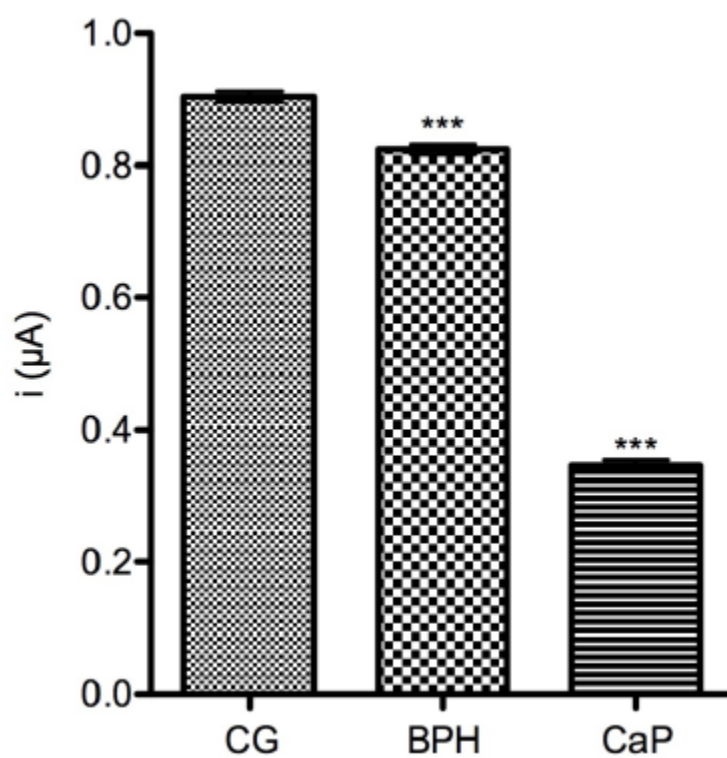
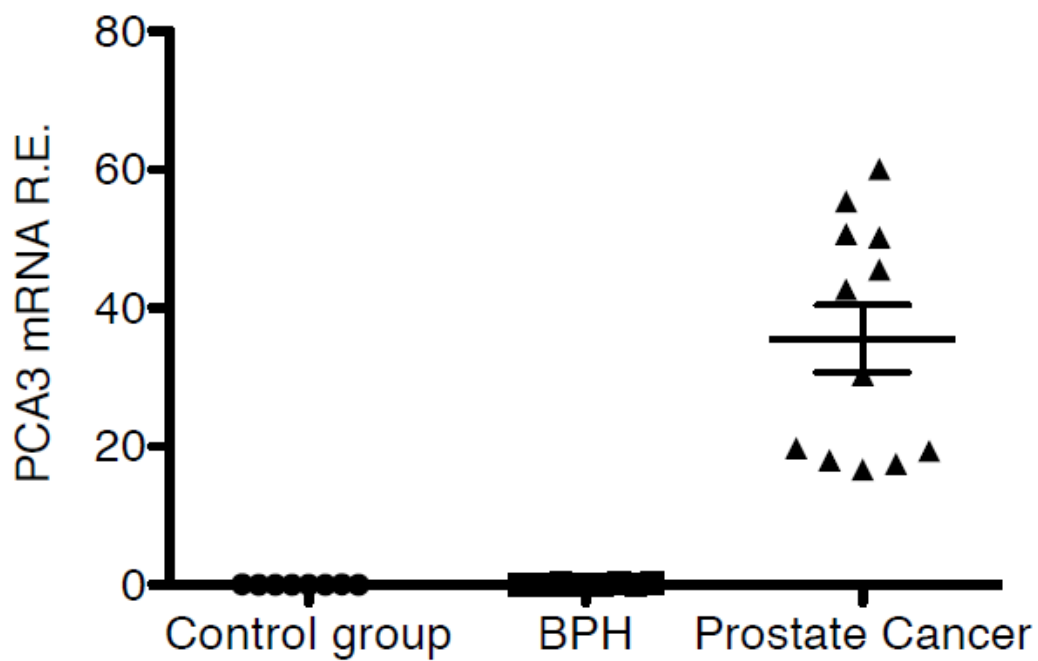


Figure 8



CAPÍTULO II

CAPÍTULO II- Electrochemical DNA biosensor for Prostate Cancer detection based on an interpenetrating polymer network

A ser submetido a revista biosensors and bioelectronics

Fator de impacto: 5.437

Electrochemical DNA biosensor for Prostate Cancer detection based on an interpenetrating polymer network

Arruda, M.S.^{a,*}, Zanforlin, D.M.L.^a, Souto-Maior, M.A.^a, Nascimento, G.A.^a, Campos-Ferreira, D.^a, Gomes-Filho, S.L.R.^a, Oliveira, N.C.L.^a, Beltrão, M.^a, Lima, S.V.C.^b, Carvalho Jr, L.B.^{a,c}, Lima-Filho, J.L.^{a,c}

^a Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/ UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CEP 506070-901, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil.

^b Departamento de Cirurgia /Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CEP 506070-901, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil.

^c Departamento de Bioquímica / Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CEP 506070-901, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil.

***Corresponding author:** Mariana Arruda e-mail: mariana.s.arruda@gmail.com.

Telephone: +55 8199549724 or +558130313710

Abstract

The prostate-specific antigen(PSA) is the most widely used biomarker for prostate cancer(PCa) detection, however has been unreliable and does not allow for the differentiation between PCa and benign prostate hyperplasia(BPH). In this study, the utility of a prostate cancer gene 3(PCA3) biosensor platforms was evaluated using an Interpenetrating Polymer Network(IPN). The IPN was synthesized with polyvinyl alcohol–glutaraldehyde/polyaniline(PVA/PANi) and deposited on the working electrode surface. The PCA3 probe was immobilized on the modified working electrode surface. Guanine electrochemical oxidation was used as a parameter to evaluate the occurrence of hybridization between the probe and its target. Measurements were made using differential pulse voltammetry(DPV). The specific PCa probe presented a current peak 93% higher than the hybrid. The limit of detection of the system was 0.1nM. The performance of the biosensor was also tested with combined BHP and PCa positive

patients as well as a control group. A decrease of the electrochemical current signal was observed in PCa positive patients with a statistically significant result ($p < 0.001$) showing that the device is able to differentiate patients with PCa and BHP. Taken together, these results suggest that the proposed biosensor can be used to detect alterations in prostate through blood tests.

Keywords: Electrochemical biosensor; Prostate Cancer; PCA3 gene, Screen-printed electrode.

1. Introduction

Prostate cancer has a high incidence and represents the second leading cause of cancer deaths among men after lung cancer. Early diagnosis is therefore essential, especially in view of the slow natural progression of the disease and its potential curability in the initial hormone-dependent phase [1,2].

Conventional diagnostic techniques for prostate cancer are serum prostate-specific antigen (PSA), digital rectal examination and transrectal ultrasound-guided (TRUS) biopsy. The PSA test however can provide false positive or negative information, is not reliable, and does not allow the differentiation of benign prostate hyperplasia (BPH) and PCa [3,4].

In men with an elevated PSA level, definitive diagnosis of prostate cancer requires invasive histological sampling obtained during biopsy or surgery. However, standard sextant biopsy obtained using TRUS has a lower sensitivity and specificity for delineating the malignant foci with considerable false negative rates up to 40% (even with whole mount histopathology,) high false-positive rates due to prostatitis, and risk of hemorrhage, hyperplastic nodules, and post-treatment sequel, meanwhile causing an increased number of unnecessary random prostate biopsies which can miss significant disease and index lesions [5–8].

The prostate cancer gene 3 (PCA3) is a new predictor for prostate cancer and is predicted to improve cancer classification and diagnosis facilitating better decision-making and patient counseling [9,10]. In 1999, Bussemakers et al. described PCA3,

formerly called DD3, for the first time. PCA3 fits a non-coding messenger RNA (mRNA) which is highly over expressed in prostate cancer tissue and blood. Additionally, PCA3 appears attractive as an indicator to possibly evaluate or predict PCa aggressiveness[10,11].

Molecular methods have attracted attention due to their diverse applications, including the identification of molecular diseases and the detection of viruses, bacteria and parasites. Specifically, methods based on DNA hybridization provide a fast and inexpensive diagnosis via miniaturized analytical devices[12–14].

In this context, electrochemical DNA biosensors which rely on hybridization events have become powerful tools for detecting cancer due to their inherent advantages such as high sensitivity, selectivity, simplicity and low cost, converting hybridization into a measurable signal[15,16].

Electrochemical DNA biosensors can undergo changes in their signal transduction platforms to improve sensitivity. The synergistic effect of the two nanomaterials could enhance dramatically the sensitivity for the DNA hybridization recognition[17]. Those materials and membranes are significant factors for further improving the stability, reproducibility, and sensitivity of the biosensor[18]. Because of their inherent charge transport properties and biocompatibility, Interpenetrating Polymer Networks (IPNs) have an advantage in biosensor applications[19].

The IPNs are unique types of polymer alloys consisting of two or more cross-linked polymers with no covalent bonds or grafts between them. These intimate mixtures of cross-linked polymers are held together by permanent entanglements, i.e., they are polymeric catenates, are produced by homocross-linking of two or more polymer systems. [19–21].

The present work aims to develop an electrochemical DNA biosensor using an IPN to detect prostatic alteration in blood as well as differentiate between cancer and benign prostatic hyperplasia.

2. Materials and Methods

2.1 Reagents and materials

Only high purity reagents were used in this study. Polyvinyl Alcohol (PVA) (Vetec Química Fina, Brazil); Glutaraldehyde solution (Sigma-Aldrich, Brazil); UltraPure™ DNase/RNase-Free distilled water was purchased from Invitrogen (USA). All oligonucleotides were synthesized by Integrated DNA Technologies (USA).

2.2 Analysis in silico of the molecular biomarker for prostate cancer

The PCA3 gene sequence was obtained from the NCBI database (National Center for Biotechnology Information, USA) and the UCSC Genome Browser. CLC Combined Workbench (USA) and Oligocalc software were used to select the DNA probe and complementary sequences for optimal PCA3 detection.

2.3 PCA3 oligonucleotides

The oligonucleotides were diluted from the stock solution in 0.5 M acetate buffer (pH 5) for all experiments. The following three oligonucleotide sequences were used in this study:

PCA3 probe: 5'- GGA ATG TTT ATG GGG CAC GTT TGT AAG CCT GGG ATG TGA AGC AAA GGC AGG -3'

PCA3 target: 5' – CCT GCC TTT GCT TCA CAT CCC AGG CTT ACA AAC GTG CCC CAT AAA CAT TCC – 3'

Non-Complementary sequence: 5'- CCT CTCCT CGT GCA AAT TTA ATC TGC ACC ACG TCC TTG AGA AAA AGG ATT TC C A -3'

2.4 Population study

Thirty-two males (over 50 years old) that underwent Digital Rectal Exam (DRE), PSA and biopsy from the Federal University Hospital (located in Recife, Pernambuco, Brazil) were used in this study. Study participants were recruited under protocols approved by the institution, and all subjects provided written informed consent. The study population was composed of fourteen PCa, ten BPH and eight control patients. Blood samples were collected in Paxgene blood RNA tube and refrigerated at 4°C until RNA extraction. Total

RNA was extracted using the Paxgene blood RNA kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) was generated with Superscript III (Invitrogen). cDNA concentration was measured in Nanodrop 2000.

2.5 Apparatus

Homemade screen-printed electrodes were employed in this work, based on a three-electrode system. Carbon was used as a working electrode (surface area of approximately 5 mm²), silver/silver chloride (Ag/AgCl) was used as a reference electrode and carbon was used as a counter electrode. The electrochemical analysis was carried out with a potentiostat/galvanostat (Autolab PGSTAT) that was set with GPES software (ver.4.0.007). All hybridization experiments were carried out in a Hybridization Oven/Shaker (Amersham Pharmacia Biotech, USA).

2.6 Preparation of polymer films and electrode modifications

Polyvinyl alcohol (PVA) (200 mg) was dissolved in distilled water (10 mL) by heating at 65 °C in 25% (v/v) of Glutaraldehyde (GLUT) (1.5 mL) stirred vigorously for 50 min. In another tube 0.44 mol L⁻¹ aniline (Merck, Germany) was prepared in 2.0 mol L⁻¹ HCl and treated with 0.61 mol L⁻¹ ammonium persulphate (Carlo Erba, Italy) for 30 min to form PANi. Aliquots of PVA with glutaraldehyde (PVAG) were withdrawn (50 µL) and introduced into tubes containing PANi and 3.0 mol L⁻¹ HCl (120 µL) to form networks of PVA cross-linked with glutaraldehyde (PVAG) and PANi. The screen-printed electrodes were rinsed with ultra pure water, then PVAG-PANi was added to the working electrode and dried at 30 °C.

2.7 DNA Probe immobilization

The probe concentrations that were used ranged from 0.1µM to 2µM. The PCA3 probe was immobilized on the modified working electrode surface for 30 minutes. Then, the unbound oligonucleotides were removed from the working electrode by washing with Tris-HCl buffer (20mM, pH 7.0).

2.8 DNA hybridization

For the hybridization process, a solution containing the PCA3 target in acetate buffer (0.5 M, pH 5) at concentrations: 0.1nM; 1nM; 5nM; 10nM; 25nM and 50nM and then were added onto the working electrode with the immobilized PCA3 probe. The electrode was incubated at 70°C (specific annealing temperature, according to manufacturer's protocol) for 10 min with a stirring speed of 300 rpm to bind the complementary sequences. The electrode was washed with Tris-HCL buffer (20mM, pH 7.0) to remove the non-hybridized sequences. The same procedure was applied for the interaction of the PCA3 probe with a non-complementary sequence.

For the hybridization, the cDNA was denatured by heating in a water bath (95 °C) for 5 min and was immediately chilled in ice to obtain denatured ss-DNA, and following this was added to the modified working electrode surface. The formation of the hybrid between the cDNA and PCA3 probe was also performed at 70 °C for 10 min at a stirring speed of 300 rpm. The electrode was washed with Tris-HCL buffer (20mM, pH 7.0) to remove the non-hybridized sequences.

2.9 Electrochemical Analysis

For electrochemical signal analysis, the differential pulse voltammetry (DPV) method was used for measurement of the current signals after each immobilization and hybridization process. The DPV measurement was performed in the Acetate buffer (pH 5) under the following conditions: a potential sweep between 0.2 and 1.2 V, modulation amplitude of 50 mV and scan rate of 50 mVs⁻¹.

2.10 Statistical Analysis

Experimental data was analyzed using parametric tests on Statistica 8.0 (StatSoft Inc.) and GraphPadPrism 5.0 software. ANOVA was carried out to evaluate statistical differences among the samples. A level of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results and Discussion

3.1 PVAG-PANi polymer-modified screen-printed electrodes

The schematical representation of the fabrication procedure of nucleic acid biosensor is shown in Fig 1. The IPN was built onto a carbon working electrode surface and employed as the platform for the probe immobilization.

The PVA, glutaraldehyde and PANI (PVAG-PANi) were chosen to form IPNs due to the fact that this bond can improve the processability of conducting polymer, exhibiting charge transport properties, biocompatibility and also increases the surface area for binding with nucleic acid[19,22–24].

In Fig 1, PVA and GLUT are processed to form a basis for the polymer network, the PVA will donate the hydroxyl groups because PVA is a polyvalent alcohol whose hydroxyl groups are all secondary, which may facilitate binding to DNA. Glutaraldehyde has been largely used to immobilize biomolecules to solid supports for use in enzyme reactors, affinity chromatography, immunochemical research, as well as in a cross-linking agent for DNA biosensors[25,26].

PVA and GLUT are easily esterified and undergo many other reactions that are known for low-molecular weight alcohols. PVA is also a biocompatible polymer that allows casting from water or organic solvents and can form films, sheets and fibers with excellent mechanical properties[22,23].

PANI deserves special mention because of its versatility and potential. PANI is not only unique in its molecular structure and doping mechanisms but also has unique optical, electrical, and magnetic properties, which have been used in several applications. A highly conductive emeraldine salt form of PANI is controlled by two completely different processes: protonic acid doping and oxidative doping. PANI nanofibers have shown applications in the field of chemical and biosensors, actuators, microelectronics, biomedical sciences, tissue engineering, solar cells, and supercapacitors, etc [24].

The chemical bonds between the polymer matrix were made by a hemiacetal connections between PVA and glutaraldehyde allowing two alternative connections to the DNA probe: a phosphoamide bond formed between the carbonyl group of the phosphate with

an amine grouping PANi or a phosphoacetal bond formed by the hydroxyl of the hemiacetal with an alcoholic hydroxyl DNA phosphate, both covalently, allowing a greater stability to the screen-printed electrodes [23,25].

The reaction of PVA, glutaraldehyde and PANI forms a interpenetrating polymer network(Fig. 2), where the mechanic properties of this system is controlled by the degree of cross-linking of the network[21,27]. The Figure 2 (A) and (B) represent the carbon electrode (bare electrode) with a magnification of 1000X and 5000X, respectively, and the image (C) and (D) represent IPN-modified carbon electrode a magnification 1000X and 5000X respectively showing formation of the polymer network.

When comparing Figure 2B and 2C and increased surface area is seen, thus favoring binding of DNA. The IPN is used for forming polymeric gels in several important areas such as drug delivery systems, chromatography techniques, sensor construction and molecular recognition[20]. IPN used as a support for binding to DNA has not been thoroughly explored, but this work could promote their use as biosensor for DNA immobilization.

3.2 Analysis of the probe immobilization

In this study, the probe used was covalently bound to the carbon surface, which provided a better spatial orientation and higher stability [28].The best PCA3 probe immobilization process on the modified-electrode was obtained with the probe concentration of 1.5 μ M because it provided the highest current peaks and had better reproducibility (Fig. 3).The 0.1 - 1 μ M concentrations showed lower current signal due to a low amount of immobilized probe on the working electrode modified-surface and the decrease in peak of 2 μ M may be due to steric hindrance caused by excess oligonucleotide in the higher concentrations. Thus, the probe concentration of 1.5 μ M was chosen for the interaction with complementary sequences[29–31].

3.3 Hybridization process

Detection of target DNA was monitored by means of DPV responses to electrochemical oxidation of guanine on the probe modified-electrode in the absence and presence of a target. Fig.4 show the DPV voltammograms for the guanine oxidation of (a)modified IPN-carbon electrode, (b)1.5 μ M PCA3 probe immobilized on modified IPN-carbon electrode before hybridization and (c) probe-modified electrode after hybridization with a synthetic complementary target.

In this work, the IPN showed a higher current signal compared to the immobilized probe (12.44 μ A and 7.41 μ A respectively) because IPN exhibits high conductivity, when DNA is immobilized, electron capture within its structure.

In Fig. 4 the hybridization of DNA showed a reduction in the electrochemical signal compared to ssDNA because in a guanine oxidation process when a potential of 0.8-1.0 V is applied in the 3' region of the DNA, the base oxidizes releasing 2 electrons during oxidation. When the double-stranded DNA is formed, the oxidizable regions of guanine are now involved in the formation of hydrogen bonds, which decreases the electrochemical oxidation of guanine signals, allowing differentiation between the single strands and double DNA on the electrode surface[32–34]. These results are evidence that the PCA3 probe has good specificity with target, as similarly found by Guo et al. 2013[12,35].

The linear regression obtained from the electrochemical signal with respect to the different concentrations of the PCA3 target is shown in Fig. 5. The calibration curve ($y = 0.149x + 1.700$) is linear between 0.1 nM and 50nM with a correlation coefficient of 0.993. A detection limit of 0.1nM could be estimated by equation $3\sigma/a$, where σ is the standard deviation of the intercept and a is the slope of the linear regression[36–38]. The relative standard deviation (RSD) was 0.034% over three independent probe-modified electrodes that were measured at 50nM on the PCA3 target, which indicated a remarkable reproducibility of the detection method.

3.4 Performance of electrochemical DNA biosensor using real sample

The proposed biosensor was evaluated with 1nM of cDNA samples from patients with PCa, BPH, and the control group (CG), in order to verify its efficiency. The choice of cDNA used was due to the PCA3 gene being mRNA a fragile and easily degradable molecule, for the biosensor study was required its transformation for added stability. In this assay, we used the cDNA directly on the modified electrode with the immobilized probe.

The Fig. 6(a) shows the differential pulse voltammograms for the guanine electrochemical oxidation of (a) Polymer IPN-carbon electrode (b) PCA3 probe immobilized on modified IPN-carbon electrode before hybridization; (c) PCA3 probe immobilized on modified IPN-carbon electrode after hybridization with Control Group (CG); (d) PCA3 probe immobilized on modified IPN-carbon electrode after hybridization with BPH patients and (e) PCA3 probe immobilized on modified IPN-carbon electrode after hybridization with PCa patients. The current peak of CG, BPH and PCa were 5.98, 5.75 and 0.21 μ A respectively. It is possible to observe that in the presence of PCa positive samples that the current peaks were decreased, which confirmed the occurrence of hybridization in the proposed detection system, and its selectivity, showing that the proposed biosensor is able to differentiate patients with BPH and PCa, making it a viable alternative compared to the methods traditionally used where the patient undergoes several steps to achieve a complete diagnosis[39–41].

The Fig. 6(b) a histogram representing the DPV voltammograms for the guanine electrochemical oxidation of patients with Prostate Cancer (PCa); Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) and Control Group (CG). The difference between currents peaks the CG and PCa was 5.77 μ A and BPH and PCa 7.54 μ A. The electrochemical signals among PCa, BHP and CG samples showed significant differences after hybridization with PCA3 probe, confirmed statistically by ANOVA analysis ($p < 0.01$). This data demonstrated that this electrochemical DNA biosensor is able to detect PCa in blood samples, the presence of non-complementary sample did not interfere in the selectivity of the biosensor, which confirms that this method will not provide false-positive results. Studies obtained by Capoluongo et al., 2014 also stated that using PCA3 as a marker of PCa is a more efficient, sensitive, and specific method to diagnose prostate cancer, which was also demonstrated

in the present research. The presented biosensor may become an alternative front to the methods used today due to its speed, specificity and portability.

4. Conclusions

The prostate cancer biosensor utilizing IPN-modified electrodes is able to identify the difference between PCa, BPH and acontrol group, providing a possible fast electro-analytical method for cancer diagnosis. The system detection limit was 0.1nM, showing higher sensitivity when compared to traditional methods.

DNA sensor technologies, while promising, still need to bridge the gap between experimental status and the harder reality of clinical and or diagnostic applications. Nevertheless, it is envisioned that these new technologies will lead to the development of simple and inexpensive tools which can be used at point-of-care sites. With these results, it is possible to develop a new portable detection system for prostate cancer, as well as to contribute to an effective differential diagnosis in earlier stages of prostate cancer.

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support that was received from the National Council of Scientific Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES), Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA) and the Hospital of Clinics– Federal University of Pernambuco (Hospital das Clínicas HC-UFPE).

References

- [1] V. Casadio, D. Calistri, S. Salvi, R. Gunelli, E. Carretta, D. Amadori, et al., Urine cell-free DNA integrity as a marker for early prostate cancer diagnosis: a pilot study., *Biomed Res. Int.* 2013 (2013) 270457. doi:10.1155/2013/270457.
- [2] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, *Cancer Statistics, 2015*, *CA Cancer J Clin.* 65 (2015) 5–29. doi:10.3322/caac.21254.

- [3] J. You, P. Cozzi, B. Walsh, M. Willcox, J. Kearsley, P. Russell, et al., Innovative biomarkers for prostate cancer early diagnosis and progression., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 73 (2010) 10–22. doi:10.1016/j.critrevonc.2009.02.007.
- [4] M.J. Roobol, S. V Carlsson, Risk stratification in prostate cancer screening., *Nat. Rev. Urol.* 10 (2013) 38–48. doi:10.1038/nrurol.2012.225.
- [5] H. Aydın, V. Kızılgöz, B.O. Tekin, Overview of current multiparametric magnetic resonance imaging approach in the diagnosis and staging of prostate cancer, *Kaohsiung J. Med. Sci.* (2015) 1–12. doi:10.1016/j.kjms.2015.01.002.
- [6] X. Filella, L. Foj, M. Milà, J.M. Augé, R. Molina, W. Jiménez, PCA3 in the detection and management of early prostate cancer., *Tumour Biol.* (2013). doi:10.1007/s13277-013-0739-6.
- [7] M. Truong, B. Yang, D.F. Jarrard, Toward the detection of prostate cancer in urine: a critical analysis., *J. Urol.* 189 (2013) 422–9. doi:10.1016/j.juro.2012.04.143.
- [8] B.M. Arneth, Clinical Significance of Measuring Prostate-Specific Antigen, *Lab. Med.* 40 (2009) 487–491. doi:10.1309/LMEGGGLZ2EDWRXUK.
- [9] B. Djavan, A. Kazzazi, L. Dulabon, M. Margreiter, A. Farr, M.J. Handl, et al., Diagnostic Strategies for Prostate Cancer, *Eur. Urol. Suppl.* 10 (2011) e26–e37. doi:10.1016/j.eursup.2011.03.010.
- [10] E. Capoluongo, C.F. Zambon, D. Basso, S. Boccia, S. Rocchetti, E. Leoncini, et al., PCA3 score of 20 could improve prostate cancer detection: Results obtained on 734 Italian individuals., *Clin. Chim. Acta.* 429 (2014) 46–50. doi:10.1016/j.cca.2013.10.022.
- [11] H. Augustin, K. Mayrhofer, K. Pummer, S. Mannweiler, Relationship between prostate cancer gene 3 (PCA3) and characteristics of tumor aggressiveness., *Prostate.* 73 (2013) 203–10. doi:10.1002/pros.22558.
- [12] Y. Guo, J. Chen, G. Chen, A label-free electrochemical biosensor for detection of HIV related gene based on interaction between DNA and protein, *Sensors Actuators, B Chem.* 184 (2013) 113–117. doi:10.1016/j.snb.2013.04.046.
- [13] H.-P. Peng, Y. Hu, P. Liu, Y.-N. Deng, P. Wang, W. Chen, et al., Label-free electrochemical DNA biosensor for rapid detection of multidrug resistance gene based on Au nanoparticles/toluidine blue–graphene oxide nanocomposites, *Sensors Actuators B Chem.* 207 (2015) 269–276. doi:10.1016/j.snb.2014.10.059.
- [14] S.B. Gayathri, P. Kamaraj, Development of Electrochemical DNA Biosensors-A Review, 4 (2015). doi:10.7598/cst2015.977.
- [15] M. Ates, A review study of (bio)sensor systems based on conducting polymers, *Mater. Sci. Eng. C.* 33 (2013) 1853–1859. doi:10.1016/j.msec.2013.01.035.

- [16] V. Perumal, U. Hashim, ScienceDirect Advances in biosensors : Principle , architecture and, J. Econ. Financ. Adm. Sci. 12 (2013) 1–15. doi:10.1016/j.jab.2013.02.001.
- [17] M. Du, T. Yang, K. Jiao, Rapid DNA electrochemical biosensing platform for label-free potentiometric detection of DNA hybridization., Talanta. 81 (2010) 1022–7. doi:10.1016/j.talanta.2010.01.053.
- [18] T. Yang, Y. Feng, W. Zhang, S. Ma, K. Jiao, Synergistic membrane of ZrO₂/self-doped polyaniline nanofibres fabricated by controllable electrodeposition for DNA hybridization detection, J. Electroanal. Chem. 656 (2011) 140–146. doi:10.1016/j.jelechem.2010.12.013.
- [19] Y. Lu, Y. Li, J. Pan, P. Wei, N. Liu, B. Wu, et al., Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/poly(styrenesulfonate)-poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic acid) interpenetrating polymer networks for improving optrode-neural tissue interface in optogenetics., Biomaterials. 33 (2012) 378–94. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.09.083.
- [20] K. Kaniewska, M. Karbarz, Z. Stojek, Electrochemical attachment of thermo- and pH sensitive interpenetrating-polymers-network hydrogel to conducting surface, Electrochim. Acta. (2015). doi:10.1016/j.electacta.2015.02.196.
- [21] W.. de Azevedo, J.. de Souza, J.. de Melo, Semi-interpenetrating polymer networks based on polyaniline and polyvinyl alcohol–glutaraldehyde, Synth. Met. 100 (1999) 241–248. doi:10.1016/S0379-6779(98)01481-7.
- [22] K. Oster, J. Parker, Polyvinyl-alcohol-based magnetic beads for rapid and efficient separation of specific or unspecific nucleic acid sequences, 225 (2001) 145–150.
- [23] Q. Yu, Y. Song, X. Shi, C. Xu, Y. Bin, Preparation and properties of chitosan derivative/poly(vinyl alcohol) blend film crosslinked with glutaraldehyde, Carbohydr. Polym. 84 (2011) 465–470. doi:10.1016/j.carbpol.2010.12.006.
- [24] R. Borah, S. Banerjee, A. Kumar, Surface functionalization effects on structural, conformational, and optical properties of polyaniline nanofibers, Synth. Met. 197 (2014) 225–232. doi:10.1016/j.synthmet.2014.08.018.
- [25] Q. Wang, B. Zhang, X. Lin, W. Weng, Hybridization biosensor based on the covalent immobilization of probe DNA on chitosan–multiwalled carbon nanotubes nanocomposite by using glutaraldehyde as an arm linker, Sensors Actuators B Chem. 156 (2011) 599–605. doi:10.1016/j.snb.2011.02.004.
- [26] R.. and R.K. Adami, Metabolic Stability of Glutaraldehyde Cross-Linked Peptide, 88 (1999).
- [27] S.S. Caramori, K.F. Fernandes, L.B. Carvalho-júnior, Synthesis and Characterization of Polyvinyl Glutaraldehyde Composite Disc : a Probable Matrix for Protein Immobilization, (n.d.) 46–52.

- [28] C. Ding, N. Wang, J. Zhang, Z. Wang, Rolling circle amplification combined with nanoparticle aggregates for highly sensitive identification of DNA and cancer cells., *Biosens. Bioelectron.* 42 (2013) 486–91. doi:10.1016/j.bios.2012.10.015.
- [29] F. Xu, A.M. Pellino, W. Knoll, Electrostatic repulsion and steric hindrance effects of surface probe density on deoxyribonucleic acid (DNA)/peptide nucleic acid (PNA) hybridization, *Thin Solid Films.* 516 (2008) 8634–8639. doi:10.1016/j.tsf.2008.06.067.
- [30] J.-H. Jiang, Y. Li, J. Wang, K.-L. Paul Sung, Polypyrrole/oligonucleotide nanocomposite film: steric effect on DNA hybridization, *Proc. Inst. Mech. Eng. Part N J. Nanoeng. Nanosyst.* 224 (2011) 151–162. doi:10.1177/1740349911413956.
- [31] K. Zhang, Q. Yang, X. Zhu, K. Wang, A general strategy based on luminescent oxygen channeling for the detection of adenosine in serum using the steric hindrance effect of thrombin, *Sensors Actuators B Chem.* 200 (2014) 19–24. doi:10.1016/j.snb.2014.04.037.
- [32] K.J. Odenthal, J.J. Gooding, An introduction to electrochemical DNA biosensors, *Analyst.* 132 (2007) 603–610. doi:10.1039/B701816A.
- [33] J. Labuda, A.M.O. Brett, G. Evtugyn, M. Fojta, M. Mascini, M. Ozsoz, et al., Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 82 (2010) 1161–1187. doi:10.1351/PAC-REP-09-08-16.
- [34] E. Paleček, M. Fojta, M. Tomschik, J. Wang, Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage, *Biosens. Bioelectron.* 13 (1998) 621–628. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0956-5663(98)00017-7.
- [35] E. Souza, G. Nascimento, N. Santana, D. Ferreira, M. Lima, E. Natividade, et al., Label-free electrochemical detection of the specific oligonucleotide sequence of dengue virus type 1 on pencil graphite electrodes., *Sensors (Basel).* 11 (2011) 5616–29. doi:10.3390/s110605616.
- [36] M. Gumustas, S. Ozkan, The role of and the place of method validation in drug analysis using electroanalytical techniques, *Open Anal. Chem. J.* (2011) 1–21. <http://benthamscience.com/open/toacj/articles/V005/1TOACJ.pdf> (accessed June 9, 2013).
- [37] G. a Nascimento, E.V.M. Souza, D.S. Campos-Ferreira, M.S. Arruda, C.H.M. Castelletti, M.S.O. Wanderley, et al., Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymeric film on screen-printed electrode., *Biosens. Bioelectron.* 38 (2012) 61–6. doi:10.1016/j.bios.2012.04.052.
- [38] D.S. Campos-Ferreira, G. a Nascimento, E.V.M. Souza, M. a Souto-Maior, M.S. Arruda, D.M.L. Zanforlin, et al., Electrochemical DNA biosensor for human

- papillomavirus 16 detection in real samples., *Anal. Chim. Acta.* 804 (2013) 258–63. doi:10.1016/j.aca.2013.10.038.
- [39] D.D. Ørsted, S.E. Bojesen, The link between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer., *Nat. Rev. Urol.* 10 (2013) 49–54. doi:10.1038/nrurol.2012.192.
- [40] C.G. Ramos, R. Valdevenito, I. Vergara, P. Anabalon, C. Sanchez, J. Fulla, PCA3 sensitivity and specificity for prostate cancer detection in patients with abnormal PSA and/or suspicious digital rectal examination. First Latin American experience., *Urol. Oncol.* 31 (2013) 1522–6. doi:10.1016/j.urolonc.2012.05.002.
- [41] A. Ochiai, K. Okihara, K. Kamoi, T. Oikawa, T. Shimazui, S.-I. Murayama, et al., Clinical utility of the prostate cancer gene 3 (PCA3) urine assay in Japanese men undergoing prostate biopsy., *BJU Int.* 111 (2013) 928–33. doi:10.1111/j.1464-410X.2012.11683.x.

FIGURE EXPLANATIONS

Fig. 1. Schematic drawing of the stepwise nucleic acid biosensor fabrication process sequences.

Fig. 2. SEM micrographs. Carbon electrode, increased (a) 1000X, (b) 5000X; modified IPN-carbon electrode, increased (c) 1000X and (d) 5000X .

Fig. 3. Histogram of the PCA3 probe concentration effect sites of guanine oxidation during the immobilization process. The differential pulse voltammetry method was used to analyze the current signals in the following conditions: initial potential 0.2 V, end potential 1.2 V, modulation amplitude 50 mV and scan rate 50 mV^s⁻¹. All results plotted were the averages of triplicates that were performed at different PCA3 probe concentrations.

Fig. 4. The differential pulse voltammograms (DPV) for the oxidation guanine of (a) Polymer IPN on modified IPN-carbon electrode (b) 1.5 μM PCA3 probe immobilized on modified IPN-carbon electrode before hybridization and (c) probe-modified electrode after hybridization with synthetic complementary target.

Fig. 5. The effect of the PCA3 target concentration on the guanine oxidation during hybridization. The differential pulse voltammetry method was used to analyze the current signals in the following conditions: initial potential 0.2 V, end potential 1.2 V, modulation amplitude 50 mV and scan rate 50 mV^s⁻¹. All results plotted were the averages of experiments that were performed at different concentrations of the PCA3 target. The black line represents the linear regression at a concentration range of 0.1 – 50 nM.

Fig 6. (A) The differential pulse voltammograms for the guanine electrochemical oxidation of (a) Polymer IPN-carbon electrode (b) PCA3 probe immobilized on modified IPN-carbon electrode before hybridization; (c) PCA3 probe immobilized on modified IPN-carbon electrode after hybridization with Control Group (CG); (d) PCA3 probe immobilized on modified IPN-carbon electrode after hybridization with BPH patients and (e) PCA3 probe immobilized on modified IPN-carbon electrode after hybridization with PCa patients. (B) Histogram representing the differential pulse voltammograms for the guanine electrochemical oxidation of patients with Prostate Cancer (PCa); Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) and Control Group (CG).

FIGURES

Figure 1

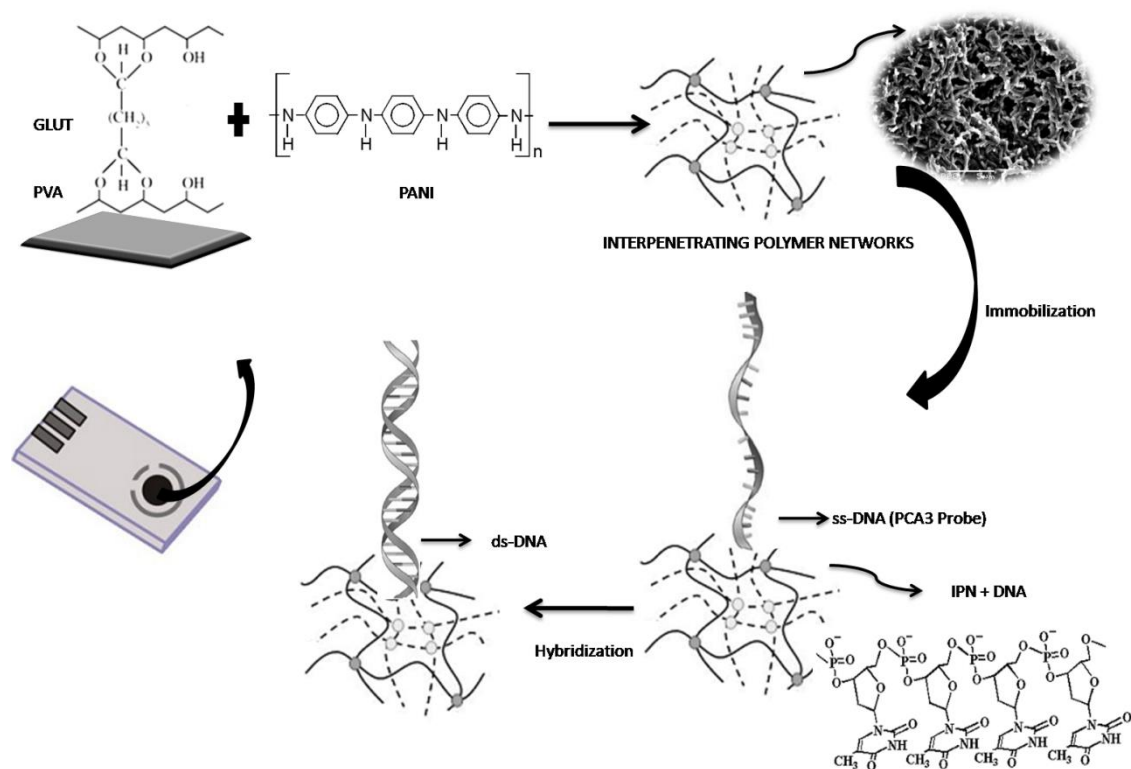


Figure 2

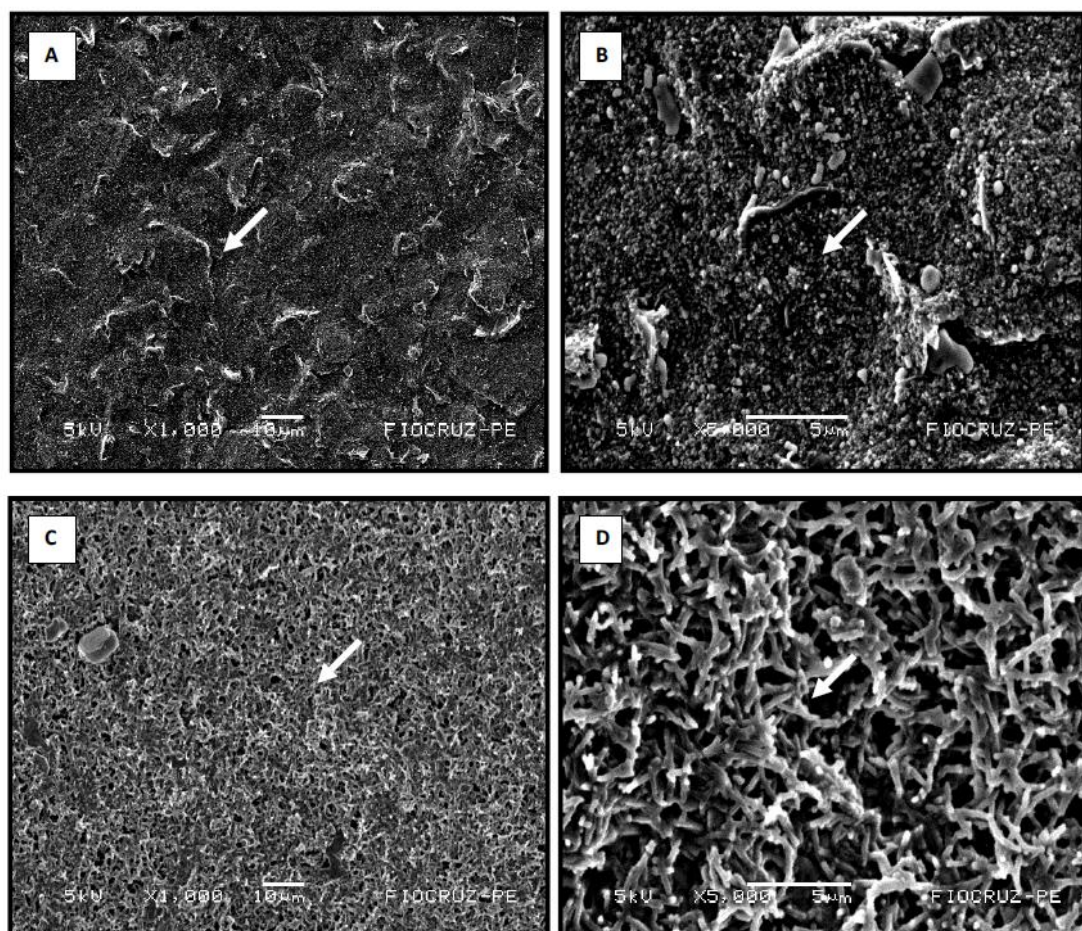


Figure 3

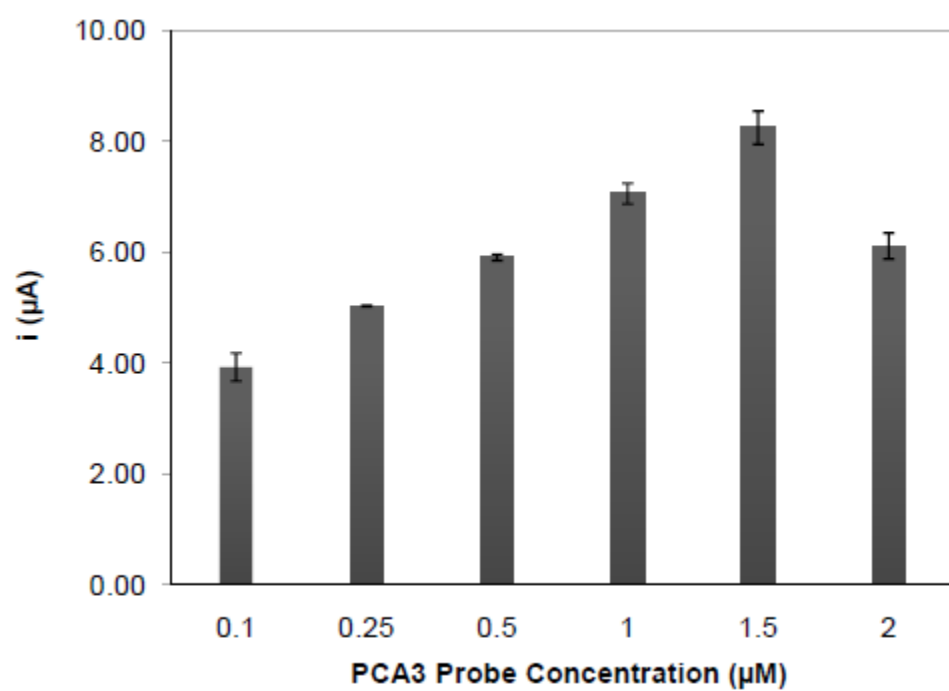


Figure 4

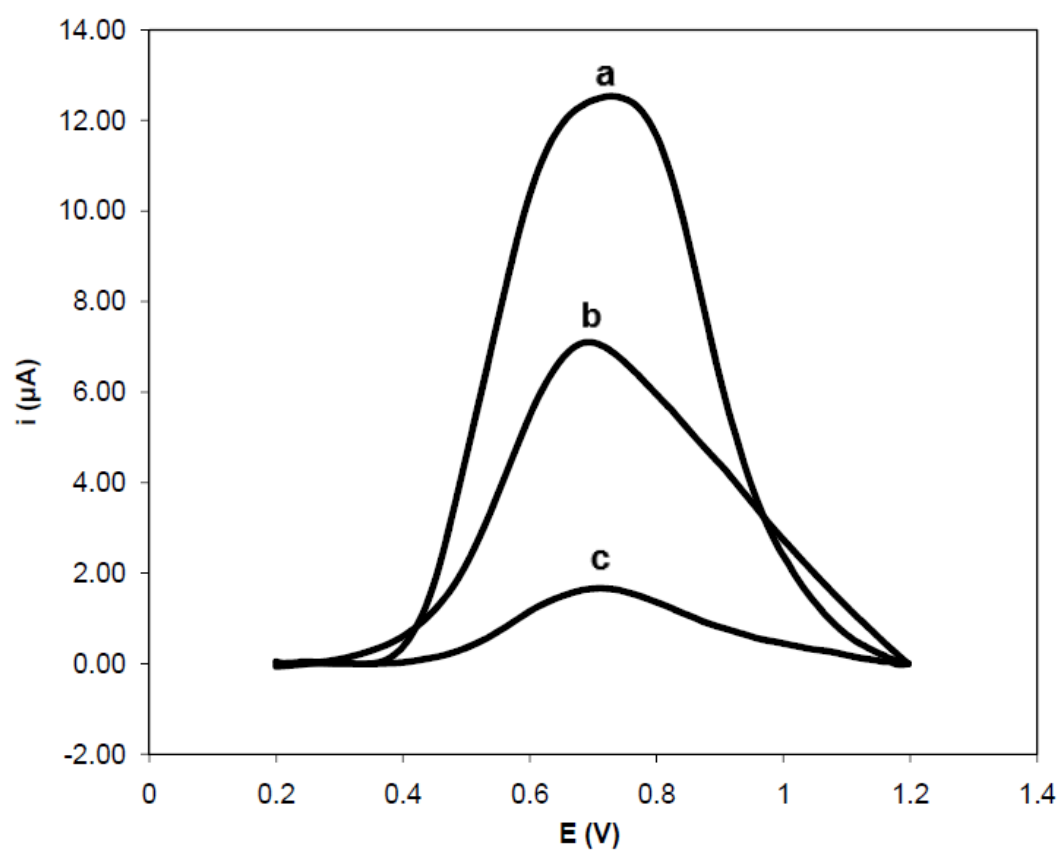


Figure 5

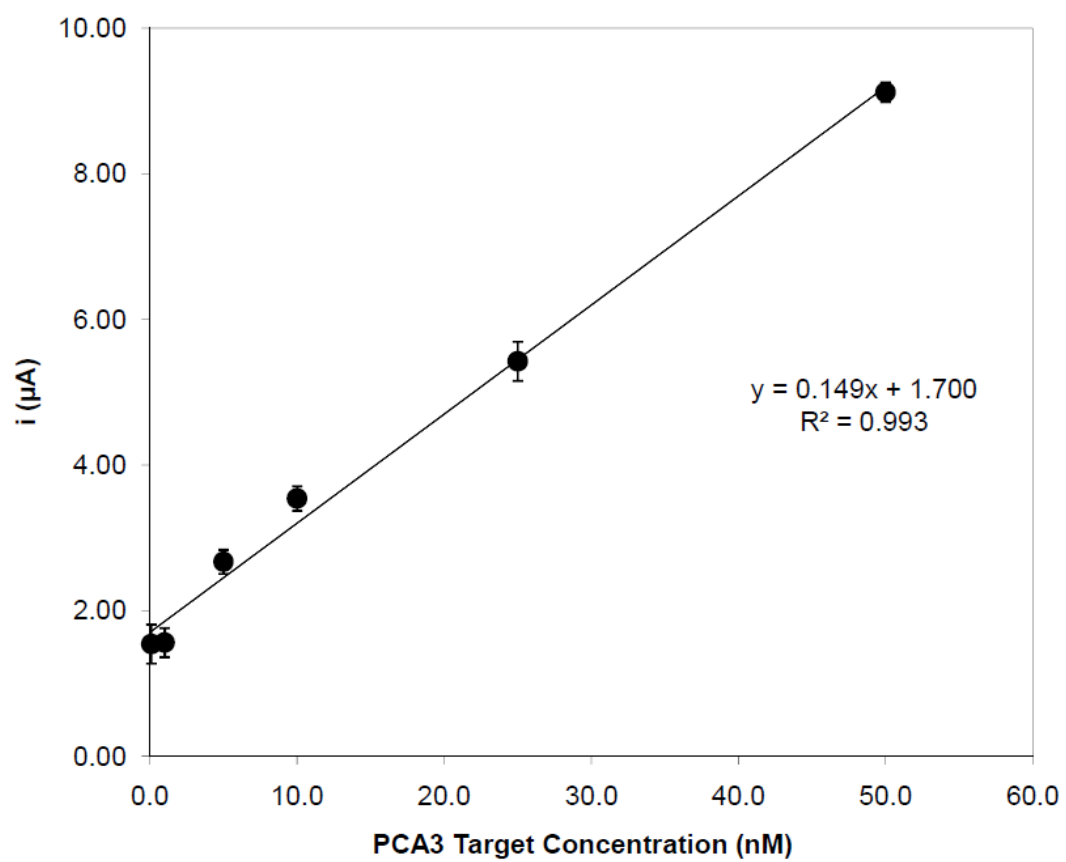
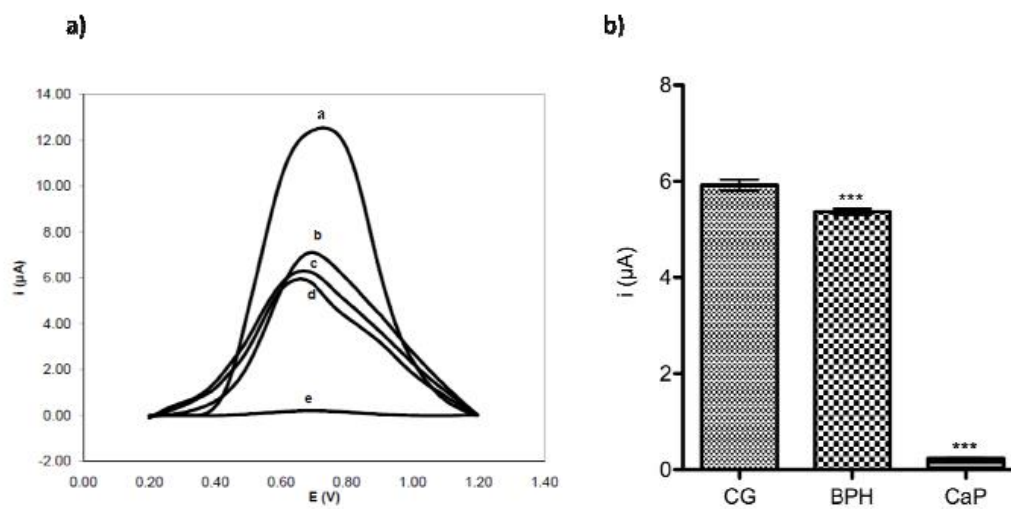


Figure 6



CAPÍTULO III

CAPÍTULO III- Could SIRT-1 and SIRT-3 be novel prognostic biomarkers for Prostate Cancer?

Could SIRT-1 and SIRT-3 be novel prognostic biomarkers for Prostate Cancer?

Arruda, M.S.^{a,*}, Beltrão, M.^a, Lima, S.V.C.^b, Lima-Filho, J.L.^{a,c}

^a Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA/ UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CEP 506070-901, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil.

^b Department of Surgery / Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CEP 506070-901, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil.

^c Department of Biochemistry / Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CEP 506070-901, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding author: Mariana Arruda e-mail: mariana.s.arruda@gmail.com.

Telephone: +55 8199549724 or +558130313710

Abstract

Prostate cancer (PCa) is the major age-related malignancy that which affects man's health. The chance of developing this cancer increases significantly as men grow older. The prostate-specific antigen (PSA) is the most widely used biomarker for prostate cancer (PCa) detection, however, it has been noted as unreliable and does not allow the differentiation between PCa and the benign prostate hyperplasia (BPH). In this study, we used the prostate cancer gene 3 (PCA3) as control of expression of prostate cancer, as well, the role of sirtuins 1 and 3 in prostate cancer. Thirty-two males (over 50 years old) were observed in this study and all underwent Digital Rectal Exam (DRE), PSA and biopsy. The study population was composed of fourteen PCa, ten BPH and eight control patients. Blood samples were collected and analyzed for the expression of the PCA3, SIRT-1 and SIRT-3. SIRT-3 presented low expression in patients with prostate cancer ($P = 0.027$) showing negative correlation with this cancer. No clear differences were observed in SIRT-1 expression between the analyzed groups ($P = 0.082$). Further studies about the role of SIRT1 in PCa are necessary in order to understand its involvement in tumorigenesis while SIRT3 can be used as a prognostic biomarker in PCa. A careful examination of the role of SIRT3 in prostate cancer metabolism is still necessary in order to develop better therapeutic approaches.

Keywords: Sirtuins; SIRT1; SIRT3; Prostate cancer and Biomarker

1. Introduction

Prostate cancer (PCa) is among the most common cancers worldwide and a leading cause of cancer death for men in the developed world. Benign Prostate Hyperplasia (BPH) is also common, affecting approximately 70% of men over the age of 70. These diseases already represent significant challenges for healthcare systems in most parts of the world, and problems are likely to increase in the future with expected demographic changes leading to greater elderly populations in many countries. Improvements to risk prediction and prognostication models could help us to meet these challenges[1, 2].

Conventional diagnostic techniques for prostate cancer are serum prostate-specific antigen (PSA), digital rectal examination and transrectal ultrasound-guided (TRUS) biopsy. The PSA test however can provide false positive or negative information, is not reliable, and does not allow the differentiation of benign prostate hyperplasia (BPH) and PCa[3]. Therefore, the development of new diagnostic tools with lower cost and greater sensitivity than currently used methods is required.

The prostate cancer gene 3 (PCA3) is a predictor for prostate cancer and is predicted to improve cancer classification and diagnosis facilitating better decision-making and patient counseling[4]. In 1999, Bussemakers et al. described PCA3, formerly called DD3, for the first time. PCA3 fits a non-coding messenger RNA (mRNA) which is highly over-expressed in prostate cancer tissue and blood. Additionally, PCA3 appears attractive as an indicator to possibly evaluate or predict PCa aggressiveness[5, 6]

Several signaling pathways and transcription factors have been identified to regulate the rewiring of central metabolic pathways during tumorigenesis, such as activation of Phosphoinositide 3-kinase (PI3K), stabilization of HIF-1, increased expression of MYC, suppression of the metabolic sensor AMPK and loss or mutation of the p53 tumor suppressor[7]. Importantly, new insight into the regulation of metabolic reprogramming in cancer cells has implicated the mammalian homologs of the yeast protein, the silent information regulator 2 (SIRT), known as sirtuins as key molecular determinants in controlling cancer metabolism[8].

Importantly, metabolic reprogramming, a crucial feature of neoplastic transformation, may also result from the aberrant function of sirtuins. While some sirtuins may promote cancer metabolism by working in conjunction with HIF and MYC, others inhibit distinct aspects of the metabolic alterations that are observed in tumor cells[9].

All mammalian sirtuins contain a conserved catalytic domain including a large and structurally homologous Rossmann-fold domain for NAD⁺ binding, and a more structurally diverse, smaller, zinc-binding domain[9]. However, their N- and C-termini differ in sequence and length, which might explain their different subcellular localization, targets and functions[10]. SIRT1 and SIRT2 are found in the cytoplasm and in the nucleus, SIRT3-5 are mitochondrial sirtuins while SIRT6 and SIRT7 are mainly found in the nucleus[8, 11].

An increased expression of SIRT-1 protein in cancer tissues, cancer cell lines, as well as murine tumors, leads to the assumption that SIRT-1 is a tumor promoter. It has been shown that SIRT-1 is over expressed in mouse and human prostate cancers, human primary colon cancer, and acute myeloid leukemia. Over expression of SIRT1 is also reported in the cutaneous human squamous cell and basal cell carcinoma[12]. The first evidence of Sirt1 as a tumor promoter came from experiments showing that Sirt1 physically interacts with and attenuates p53 and mediates functions through deacetylation of p53 at its C-terminal Lys382 residue[13].

Nowadays, many studies are focused on SIRT1 and much less is known about other Sirtuin members. The SIRT3 protein is located in the mitochondria, which functions as a vital deacetylase in mitochondria. Acetylation is widely acknowledged as an important regulatory mechanism in mitochondria, which controls activation or inactivation[14].

The role of SIRT3 in tumorigenesis is controversial[8]. In the current study, we investigated the expression of SIRT-1 and SIRT3 in PCa for the first time. We used RT-PCR to investigate the expression of these genes in prostate cancer and its impact on patients' survival.

2. Material and Methods

Thirty-two males (over 50 years old) that underwent Digital Rectal Exam (DRE), PSA and biopsy from the Federal University Hospital (located in Recife, Pernambuco, Brazil) were used in this study. Study participants were recruited under protocols approved by the institution, and all subjects provided informed written consent. The study population was composed of fourteen PCa, ten BPH and eight control patients. Blood samples were collected in Paxgene blood RNA tube and refrigerated at 4°C until RNA extraction. Total RNA was extracted using the Paxgene blood RNA kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and measured in Nanodrop 2000. The expression level of PCA3 was adopted as control to PCa.

Reverse transcription was performed with 1 µg of total RNA and Superscript III enzyme (Invitrogen). PCA3, SIRT1 and SIRT3 primers were designed by using Primer Express 2.0 software (AppliedBiosystems).

Real-time PCR was performed on Roche LightCycler 480 sequence detection system, using the following amplification conditions: 5 min, 95 °C; followed by 40 cycles of 15s at 95 °C, 1 min at 60 °C and 20 sec at 72 °C. CT values were determined using the IQ5 software (Bio-Rad).

Statistical analysis was performed using Graphpad Prism 6.0e Software for Mac OS X (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). ANOVA test was used for comparison between groups. For these tests, a P value of < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results and Discussion

Sirt-1 and Sirt-3 mRNA expression were analyzed in RNA extracted from blood of BPH, PCa and healthy individuals to study the molecules relationship in the prostate tumorigenesis.

The PCA3 is highly expressed in patients with prostate cancer[15, 16], and this study aimed to observe whether the PCA3 is expressed only in cancer patients and the possibility of its use as control of expression of PCa. According to our results, the PCA3

can be used for clinical diagnosis of patients with prostate cancer, with the additional possibility of being able to differentiate between BPH and cancer ($P = 0.001$) (Fig.1a). Similar results were found by Augustin and Alonso[6, 17], where the authors determined if specific gene signatures were able to discriminate patients with PCa and BPH, a cDNA array was set with 14 genes.

In parallel, sirtuins roles in prostate cancer metabolism were studied since these are key molecular determinants in the control of cancer metabolism. Sirtuins family members (SIRT1–7) are highly conserved NAD-dependent deacetylases, which are involved in a variety of cellular functions, including the regulation of oxidative stress, maintaining genomic stability, apoptosis, and protein and fatty acid metabolism [8, 11, 14].

As discussed above, there is strong evidence to support SIRT-1 as a tumor promoter. However, other investigators have presented some data to suggest SIRT-1 can also function as a tumor suppressor [12, 18]. Our experiments aimed to examine this relationship and attempt to understand what the role of SIRT- 1 is in prostate cancer.

The SIRT-1 results demonstrated increased yet discreet expression in patients with prostate cancer and BPH with low expression in control patients and no significant statistical correlation ($P = 0.082$) (Fig.1b).

The seemingly controversial roles of SIRT1 in tumorigenesis suggest that SIRT1 might play a dual role which depends on the temporal and special distribution of different SIRT1 up- and downstream factors in different tissue contexts[12].

Another sirtuin analyzed in our experiments was the SIRT-3 to further explore the role of SIRT3 in both metabolism and tumorigenesis had been the subject of an extensive discussion in the literature [9, 11].

By deacetylating and controlling the activity of its targets, SIRT3 regulates multiple metabolic pathways, some of which could have profound consequences for tumor growth. Indeed, SIRT3 has been found to be a tumor suppressor, mainly by inhibiting mitochondrial ROS production through deacetylation and activation of superoxide dismutase 2 (SOD2), IDH2 and forkhead box O3 (FOXO3a) [8].

In our experiments the SIRT-3 mRNA expression seems to be decreased in cancer patients compared to healthy individuals ($P = 0.027$) (Fig. 1c). Loss of SIRT3 leads to an increase in ROS levels, which via stabilization of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α), drives a metabolic reprogramming towards aerobic glycolysis promoting tumor growth[8].

In this context, it could be possible that SIRT3 could act as an oncogene to promote acetate utilization in cancer cells through activation of acetyl-CoA synthetase2 (ACSS2). Indeed, it has been described that SIRT3 has some tumor promoting roles in specific types of cancer [19, 20]. Overall, despite being described as a tumor suppressor, it is likely that SIRT3 may act as a tumor suppressor or an oncogene, in a tissue and context-specific manner[8]. A careful examination of the role of SIRT3 in each tumor type is necessary in order to understand its involvement in tumorigenesis and to develop better therapeutic approaches [9].

In conclusion, our findings demonstrate that Prostate cancer patients presented low SIRT3 expression, showing a negative correlation with the promotion of cancer and can be used as a prognostic biomarker. Low SIRT3 expression triggers oxidative damage, ROS-mediated signaling and metabolic reprogramming that can work together to lead to PCa carcinogenesis. Further studies are required to disclose the underlying mechanism of SIRT1 in prostate cancer.

Acknowledgments

The authors are grateful for the financial support that was received from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA, and Hospital das Clínicas-HC-UFPE.

Ethical approval

“All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

The authors declare that they have no conflict of interest.

Reference

1. Ørsted DD, Bojesen SE (2013) The link between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Nat Rev Urol* 10:49–54. doi: 10.1038/nrurol.2012.192
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2015) Cancer Statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 65:5–29. doi: 10.3322/caac.21254.
3. Roobol MJ, Carlsson S V (2013) Risk stratification in prostate cancer screening. *Nat Rev Urol* 10:38–48. doi: 10.1038/nrurol.2012.225
4. Djavan B, Kazzazi A, Dulabon L, et al. (2011) Diagnostic Strategies for Prostate Cancer. *Eur Urol Suppl* 10:e26–e37. doi: 10.1016/j.eursup.2011.03.010
5. Capoluongo E, Zambon CF, Basso D, et al. (2014) PCA3 score of 20 could improve prostate cancer detection: Results obtained on 734 Italian individuals. *Clin Chim Acta* 429:46–50. doi: 10.1016/j.cca.2013.10.022
6. Augustin H, Mayrhofer K, Pummer K, Mannweiler S (2013) Relationship between prostate cancer gene 3 (PCA3) and characteristics of tumor aggressiveness. *Prostate* 73:203–10. doi: 10.1002/pros.22558
7. Cairns R a, Harris IS, Mak TW (2011) Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 11:85–95. doi: 10.1038/nrc2981
8. Sebastián C, Mostoslavsky R (2015) The Role of Mammalian Sirtuins in Cancer Metabolism. *Semin Cell Dev Biol*. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.07.008
9. Kleszcz R, Paluszczak J, Baer-Dubowska W (2015) Targeting aberrant cancer metabolism – The role of sirtuins. *Pharmacol Reports* 1–13. doi: 10.1016/j.pharep.2015.03.021
10. Sebastián C, Satterstrom FK, Haigis MC, Mostoslavsky R (2012) From sirtuin biology to human diseases: An update. *J Biol Chem* 287:42444–42452. doi: 10.1074/jbc.R112.402768
11. Morris BJ (2013) Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radic*

Biol Med 56:133–171. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.525

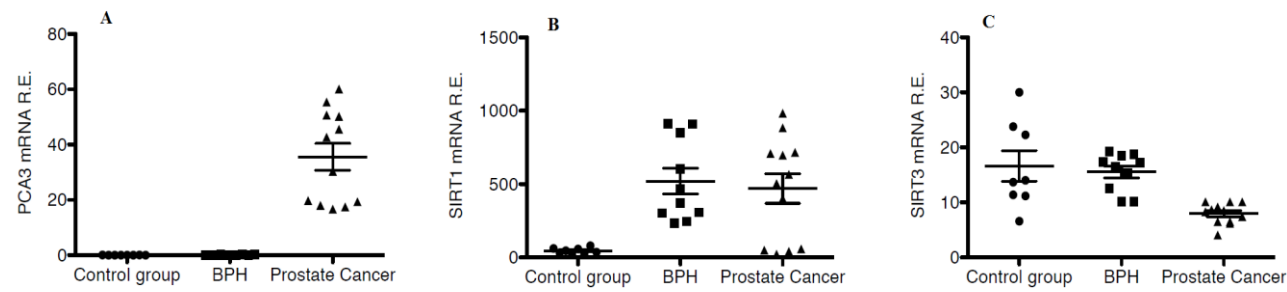
12. Fang Y, Nicholl MB (2011) Sirtuin 1 in malignant transformation: Friend or foe? *Cancer Lett* 306:10–14. doi: 10.1016/j.canlet.2011.02.019
13. Rahman S, Islam R (2011) Mammalian Sirt1: insights on its biological functions. *Cell Commun Signal* 9:11. doi: 10.1186/1478-811X-9-11
14. Yan S-M, Han X, Han P-J, et al. (2014) SIRT3 is a novel prognostic biomarker for esophageal squamous cell carcinoma. *Med Oncol* 134:753–759. doi: 10.3109/00016489.2014.894251
15. Tao Z, Shen M, Zheng Y, et al. (2010) PCA3 gene expression in prostate cancer tissue in a Chinese population: quantification by real-time FQ-RT-PCR based on exon 3 of PCA3. *Exp Mol Pathol* 89:58–62. doi: 10.1016/j.yexmp.2010.01.008
16. Perdonà S, Bruzzese D, Ferro M, et al. (2013) Prostate health index (phi) and prostate cancer antigen 3 (PCA3) significantly improve diagnostic accuracy in patients undergoing prostate biopsy. *Prostate* 73:227–35. doi: 10.1002/pros.22561
17. Alonso V, Neves AF, Marangoni K, et al. (2009) Gene expression profile in the peripheral blood of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Cancer Detect Prev* 32:336–7. doi: 10.1016/j.cdp.2008.10.001
18. Liu Z, Sun LY (2011) Complex roles of Sirtuin 1 in cancer and aging. *Transl Res* 157:273–275. doi: 10.1016/j.trsl.2010.12.011
19. Alhazzazi TY, Kamarajan P, Joo N, et al. (2011) Sirtuin-3 (SIRT3), a novel potential therapeutic target for oral cancer. *Cancer* 117:1670–1678. doi: 10.1002/cncr.25676
20. Ashraf N, Zino S, Macintyre a, et al. (2006) Altered sirtuin expression is associated with node-positive breast cancer. *Br J Cancer* 95:1056–1061. doi: 10.1038/sj.bjc.6603384

FIGURE CAPTIONS

Fig. 1. PCA3, SIRT-1 and SIRT-3 gene expression in human blood samples indicated by quantitative PCR. (a) PCA3 mRNA expression in Prostate Cancer, BPH and Control Group (b) SIRT-1 mRNA expression in Prostate Cancer, BPH and Control Group and (c) SIRT-3 mRNA expression in Prostate Cancer, BPH and Control Group

FIGURE

Figure 1



CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Considerações Finais

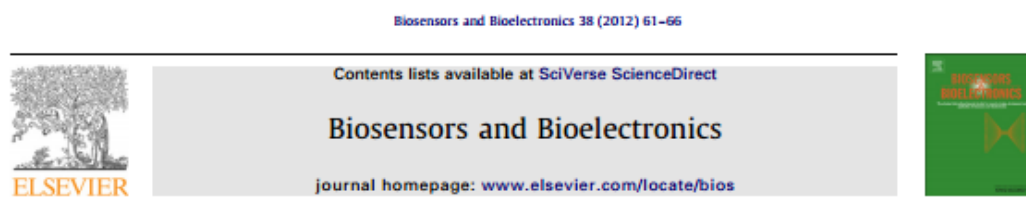
Este trabalho reporta o desenvolvimento de biossensores de DNA eletroquímico para detecção de câncer de próstata. A performance dos biossensores foi analisada usando oligonucleotídeos sintéticos e DNA extraídos de amostras humanas. Os resultados mostraram que esses dispositivos diferenciaram com sucesso as amostras complementares das não-complementares à sonda imobilizada no transdutor, demonstrando a sua especificidade. Além disso, apresentaram elevada sensibilidade, cujos limites de detecção foram 2.28 pg/ μ L (1 nM) e 0.22 pg/ μ L (0.1 nM) para a detecção do câncer de próstata. Os dados obtidos indicam que esses sistemas possuem uma grande viabilidade para ser usado no diagnóstico do câncer, com grandes chances de ser utilizado de forma portátil, permitindo com isso o desenvolvimento de um sistema pioneiro, de fácil execução e interpretação para detecção precoce do câncer de próstata. Além do mais, a mesma metodologia pode ser aplicada para detecção de outros cânceres.

ANEXO – ATIVIDADES RELEVANTES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO

- Artigo Coaboração I
- Artigo Colaboração II
- Artigo Colaboração III
- Artigo Colaboração IV
- Artigo Colaboração V
- Capítulo de Livro Publicado
- Pedido de Patente I
- Pedido de Patente II

Artigo Colaboração I

Nascimento et al., 2012. Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymeric film on screen-printed electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 38, 61-66.



Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymeric film on screen-printed electrode

Gustavo A. Nascimento^{a,*}, Elaine V.M. Souza^a, Danielly S. Campos-Ferreira^a, Mariana S. Arruda^a, Carlos H.M. Castelletti^{a,b}, Marcela S.O. Wanderley^a, Marek H.F. Ekert^a, Danyelly Bruneka^{a,c}, José L. Lima-Filho^{a,c}

^a Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Campus Universitário, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^b Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Av. General San Martin, 1371, Bonf, 50761-000, Recife, PE, Brazil

^c Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Campus Universitário, 50670-901 Recife, PE, Brazil

CAMPOS-FERREIRA, D. S. et al. Electrochemical DNA biosensor for the detection of human papillomavirus E6 gene inserted in recombinant plasmid. **Arabian Journal of Chemistry**, 2014.

Arabian Journal of Chemistry (2014) xxx, xxx–xxx



King Saud University
Arabian Journal of Chemistry
www.ksu.edu.sa
www.sciencedirect.com



ORIGINAL ARTICLE

Electrochemical DNA biosensor for the detection of human papillomavirus E6 gene inserted in recombinant plasmid

Danielly S. Campos-Ferreira ^{a,*}, Elaine V.M. Souza ^a, Gustavo A. Nascimento ^a, Deborah M.L. Zanforlin ^a, Mariana S. Arruda ^a, Monique F.S. Beltrão ^a, Aila L. Melo ^a, Danyelly Bruneska ^{a,b}, José L. Lima-Filho ^{a,b}

CAMPOS-FERREIRA, D. S. et al. Electrochemical DNA biosensor for human papillomavirus 16 detection in real samples. **Analytica chimica acta**, v. 804, p. 258–63, 4 dez. 2013.



Electrochemical DNA biosensor for human papillomavirus 16 detection in real samples



Danielly S. Campos-Ferreira^{a,*}, Gustavo A. Nascimento^a, Elaine V.M. Souza^{a,c},
Maria A. Souto-Maior^a, Mariana S. Arruda^a, Deborah M.L. Zanforlin^a, Marek H.F. Ekert^a,
Danyelly Brunheska^{a,b}, José L. Lima-Filho^{a,b}

^a Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Av. Prof. Moraes s/n, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Av. Professor Moraes Rego s/n, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^c Departamento de Enfermagem, Universidade Federal de Alagoas–UFAL, Campus Arapiraca, Av. Manoel Severino Barbosa, s/n, 57309-005, Bom Sucesso, Arapiraca, AL, Brazil

SOUZA, E. V. M. et al. Electrochemical DNA Biosensor for Sequences Related to the Human Papillomavirus Type 16 using Methylene Blue. **Biosensors Journal**, v. 3, n. 1, p. 3–7, 2014.



Biosensors Journal

Souza et al., Biosens J 2014, 3:1
<http://dx.doi.org/10.4172/2090-4967.1000107>

Research Article

Open Access

Electrochemical DNA Biosensor for Sequences Related to the Human Papillomavirus Type 16 using Methylene Blue

Elaine VM Souza^{1,2*}, Gustavo A Nascimento¹, Nataly Amorim de Santana¹, Danielly S. Campos-Ferreira¹, Juliana de Araújo Bibiano¹, Mariana S Arruda¹, Danyelly Bruneska^{1,2} and José L Lima-Filho^{1,2}

¹ Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), AV. Moraes s/n, 50670-901 Recife, PE, Brazil

² Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco (UFPE), AV. 12 Professor Moraes Rego s/n, 50670-901 Recife, PE, Brazil

³ Nursing Department, Universidade Federal de Alagoas-UFAL, Arapiraca 15 Campus, AV. Manoel Severino Barbosa, s/n, Bom Sucesso-Arapiraca-AL, CEP:57309-005, Brazil

Artigo Colaboração V

OLIVEIRA, N. et al. A Sensitive and Selective Label-Free Electrochemical DNA Biosensor for the Detection of Specific Dengue Virus Serotype 3 Sequences. **Sensors**, v. 15, n. 7, p. 15562–15577, 2015.

Sensors **2015**, *15*, 15562–15577; doi:10.3390/s150715562

OPEN ACCESS

sensors

ISSN 1424-8220

www.mdpi.com/journal/sensors

Article

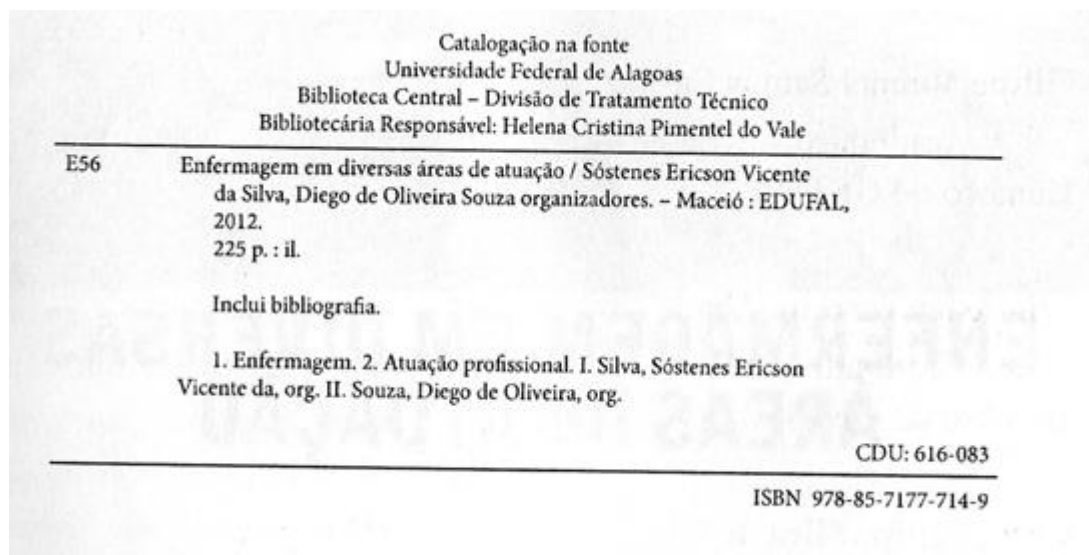
A Sensitive and Selective Label-Free Electrochemical DNA Biosensor for the Detection of Specific Dengue Virus Serotype 3 Sequences

Natália Oliveira ^{1,*}, Elaine Souza ², Danielly Ferreira ¹, Deborah Zanforlin ¹, Wessulla Bezerra ¹, Maria Amélia Borba ¹, Mariana Arruda ¹, Kennya Lopes ³, Gustavo Nascimento ¹, Danyelly Martins ^{1,4}, Marli Cordeiro ⁴ and José Lima-Filho ^{1,4}

Capítulo de Livro

Souza, Elaine V.M., Nascimento, Gustavo A., Campos-Ferreira, Danielly S., Arruda, Mariana S., Lima-Filho, José. Biossensor Específico para Sequência do Vírus da Dengue

Sorotipo 1 In: Enfermagem em Diversas Áreas de Atuação..1 ed.Maceió : EDUFAL, 2012, p. 167181.



3.1 BIOSSENSOR ESPECÍFICO PARA SEQUÊNCIA DO VÍRUS DA DENGUE SOROTIPO 1¹

Elaine Virgínia Martins de Souza
Gustavo Alves do Nascimento
Danielly Santos Campos Ferreira
Mariana Souza de Arruda
José Luiz de Lima Filho

Introdução

A dengue é uma doença que afeta mais de 100 milhões de pessoas no mundo (BRASIL, 2011), e ocorre principalmente em países tropicais, onde as condições são mais favoráveis à proliferação do mosquito transmissor (*Aedes aegypti*). A dengue pode ser causada por quatro sorotipos do vírus, chamados dengue (DENV) -1, -2,

Pedido de Patente I

Biossensor Eletroquímico de Ácido Nucléico. Depositada em 03/06/2011.

Modelo para depósito

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:
O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. **Depositante (71):**

1.1 Nome: José Luiz de Lima Filho
1.2 Qualificação Médico
1.3 CNPJ/CPF: 216382414-49
1.4 Endereço Completo: Av. Professor Moraes Rego S/N, Cidade Universitária,
1.5 CEP: 50761-901 1.6 Telefone: 08121268484 1.7 Fax: 08121268485
1.8 E-mail: joseluiz60@mac.com

☐ continua em folha anexa

2. **Natureza:** ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: INVENÇÃO

3. **Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):**
BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

Inventores (72):

6.1 Nome: Gustavo Alves do Nascimento

6.2 Qualificação: Biólogo 6.3 CPF: 030.061.254-01

6.4 Endereço completo: Rua Guedes Pereira n 100 Ap 502 Casa Amarela Recife-PE

6.5 CEP: 52060-150 6.6 Telefone: (+55) (81) 32657583 / (81) 99685801

6.7 E-Mail: galvesn23@gmail.com

6.1 Nome: Mariana Souza de Arruda

6.2 Qualificação: Bióloga 6.3 CPF: 053.804.204-43

6.4 Endereço completo: Avenida Inácio Monteiro, nº 1012, Cordeiro, Recife-PE

6.5 CEP: 50721-320 6.6 Telefone: (81) 32279321/ (81) 99549724

6.7 E-Mail: mariana.s.arruda@gmail.com

6.1 Nome: Danielly Santos Campos Ferreira

6.2 Qualificação: Biomédica 6.3 CPF: 036.776.764-36

Pedido de Patente II

Plataforma Transdutora Composta de 3,4-Etilenodioxitiofeno Funcionalizado com Ácido Aminobezosulfônico Humano. Depositada em 23/07/2014.

 INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL PROTEÇÃO DO CÉREBRO		< Uso exclusivo do INPI >	
23/07/2014 019140000188 15:12 REPE			
			
BR 10 2014 018116 4			
Espaço reservado para o protocolo		Espaço reservado para a etiqueta	
Espaço reservado para o código QR			
 INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Sistema de Gestão da Qualidade Diretoria de Patentes			
	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Processamento: DIRPA-PQ006	
Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial: O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:			
1. Depositante (71):			
1.1 Nome: José Luiz de Lima Filho			
1.2 Qualificação: Médico			
1.3 CNPJ/CPP: 216382414-49			
1.4 Endereço Completo: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235			
1.5 CEP: 50670-901			
1.6 Telefone: (81) 2126-8080			
1.7 Fax:			
1.8 E-mail: joseluiz60@mac.com			
☐ continua em folha anexa			
2. Natureza: ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de Adição			
3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):			
PLATAFORMA TRANSDUTORA COMPOSTA DE 3,4-ETILENODIOXITIOFENO FUNCIONALIZADO COM ÁCIDO AMINOBENZENOSULFÔNICO			

6. Inventores (72)

6.1 Maria Amélia Carlos Souto Maior Borba

6.2 Qualificação: Estudante

6.3 CPF: 089.615.204-90

6.4 Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária

6.5 CEP: 50670-901

6.6 Telefone: (81) 9821-7535

6.7 Email: mariameliaborba@gmail.com

6.1 Danielly Santos Campos Ferreira

6.2 Qualificação: Biomédica

6.3 CPF: 036.776.764-36

6.4 Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária

6.5 CEP: 50670-901

6.6 Telefone: (81) 8863-1888

6.7 Email: 8771-0112

6.1 Deborah Maria Landim Zanforlin

6.2 Qualificação: Biomédica

6.3 CPF: 066.369.614-30

6.4 Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária

6.5 CEP: 50670-901

6.6 Telefone: (81) 9516-6364

6.7 Email: deborahzanforlin@gmail.com

6.1 Gustavo Alves do Nascimento

6.2 Qualificação: Biólogo

6.3 030.061.254-01CPF:

6.4 Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária

6.5 CEP: 50670-901

6.6 Telefone: (81) 9968-5801

6.7 Email: galvesn@gmail.com

6.1 Natália Cybelle Lima Oliveira

6.2 Qualificação: Bióloga

6.3 CPF: 08292645403

6.4 Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária

6.5 CEP: 50670-901

6.6 Telefone: (81) 9414-7732

6.7 Email: nataliacybelle89@gmail.com

6.1 Mirella Monteiro Silva

6.1 Qualificação: Estudante

6.3 CPF: 093644924-12

6.4 Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária

6.5 CEP: 50670-901

6.6 Telefone: (81) 9900-5740

6.7 Email: mirellamonteiros@gmail.com

6.1 Renato Pessoa e Melo Neto

6.2 Qualificação: Estudante

6.3 CPF: 015.094.064-50

6.4 Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária

6.5 CEP: 50670-901

6.6 Telefone: (81) 8831-6185

6.7 Email: renatopessoaneto@gmail.com

6.1 Sérgio Luiz Rocha Gomes Filho

6.2 Qualificação: Biólogo

6.3 CPF: 048.710.584-25

6.4 Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária

6.5 CEP: 50670-901

6.6 Telefone: (81) 9163-1636

6.7 Email: rochagomesfilho@gmail.com

6.1 Wessulla Suzana Bezerra Ribeiro

6.2 Qualificação: Educadora Física

6.3 CPF: 029.491.634-24

6.4 Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária

6.5 CEP: 50670-901

6.6 Telefone: (81) 8771-0112

6.7 Email: wessullas@yahoo.com.br

6.1 Mariana Souza Arruda de Santana

6.2 Qualificação: Bióloga

6.3 CPF: 053.804.204-43

6.4 Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária

6.5 CEP: 50670-901

6.6 Telefone: (81) 3031-3710

6.7 Email: mariana.s.arruda@gmail.com