MARCELO MEDINA DE SOUZA

**PREPARAÇÃO DE NANOBIOSSISTEMAS PARA
DETECÇÃO DO MICRORNA TUMORAL miR-21**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Gláucia Maria Machado Santelli

Versão corrigida

SÃO PAULO

2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Medina de Souza, Marcelo

Preparação de nanobiosistemas para detecção de
microRNA tumoral miR-21 / Marcelo Medina de Souza;
orientador Glaucia Maria Machado Santelli. -- São
Paulo, 2019.
100 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. AuNP. 2. bioconjugação. 3. microRNA. 4. miR-
21. 5. detecção de câncer. I. Maria Machado Santelli,
Glaucia, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marcelo Medina de Souza

Título da Dissertação/Tese: Preparação de nanobiosistemas para detecção de microRNA tumoral miR-21

Orientador: Glaucia Maria Machado Santelli

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

(   ) Aprovado(a)   (   ) Reprovado(a)

Examinador(a):   Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a):   Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a):   Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **719/15** referente ao projeto intitulado: “*Deteção de microRNA circulante in vitro utilizando nanopartículas de ouro com a técnica Surface Enhanced Raman Spectroscopy*” sob a responsabilidade de **Marcelo Medicina de Souza**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº466 de 2012.

São Paulo, 24 de fevereiro de 2015.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

*À minha esposa Midilane Medina.
Aos meus pais, José e Aurora.
Aos meus irmãos, Marcos e Ivan.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a professora Dra. Glaucia Maria Machado-Santelli pela orientação, confiança, pelas oportunidades e por todo apoio nos momentos fáceis e difíceis.

Agradeço a Dra. Natália Cerize por me aceitar no Instituto de Pesquisas Tecnológicas, contribuir com sua experiência no desenvolvimento do meu trabalho e me introduzir no mundo da inovação.

Agradeço ao professor Dr. Emer Suavinho por, gentilmente, ceder o seu laboratório para realização experimentos de espectroscopia de fluorescência.

Agradeço ao professor Dr. Henrique Toma e ao Dr. Marcelo Nakamura ceder o laboratório e pelo auxílio com os experimento de espectroscopia Raman.

Agradeço a todos os amigos do Laboratório BioCeM pela amizade e companhia durante todos esses anos.

Agradeço a Dra. Midilane Medina por toda ajuda, compreensão e carinho.

Agradeço a FAPESP e a FIPT pelo apoio financeiro

É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.

— *Theodore Roosevelt*

SOUZA, MM. **Preparação de nanobiossistemas para detecção de microRNA tumoral miR-21**. 2019. 103 f. Tese (Doutorado em: Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

RESUMO

Nessa tese foi desenvolvido um método para obtenção de sondas de DNA baseadas em nanopartículas de ouro, aqui denominadas nanobiossistemas, que utiliza baixas concentrações de cloreto de sódio e DNA e reduzido tempo de reação. Essas sondas foram utilizadas em ensaios de detecção do microRNA tumoral miR-21 maduro por meio de espectroscopia Raman e espectroscopia e microscopia de fluorescência. As AuNPs foram sintetizadas pelo processo de redução do citrato e apresentaram tamanho médio de 17 nm e ressonância de plasmon de superfície (SPR) em ~ 524 nm, verificados por microscopia eletrônica de transmissão e espectroscopia UV-Visível, respectivamente. Os nanobiossistemas foram preparados em 2 etapas, que consistem na estabilização da suspensão de AuNPs com dATP e PEG-SH e posterior substituição do dATP por oligonucleotídeos modificados com um grupo tiol e um fluoróforo Cy5 nas porções 5' e 3', respectivamente. Os nanobiossistemas foram caracterizados por espectroscopia UV-Visível, espalhamento de luz dinâmico, potencial Zeta e microscopia eletrônica de transmissão. Após as modificações, ambos os nanobiossistemas apresentaram um deslocamento na banda RPSL para ~ 530 nm e uma banda em 260 nm, que é característica dos oligonucleotídeos, e tamanho hidrodinâmico de 38 nm. O potencial Zeta passou de -21 mV para aproximadamente -38 mV para os nanobiossistemas. Esses resultados mostram que o método aqui desenvolvido foi útil para funcionalizar a superfície das AuNPs com oligonucleotídeos de modo simples e rápido. Para avaliar a capacidade de detecção miR-21 foi testado a hibridização do miR-21 proveniente de 3 fontes: sintético, obtido comercialmente, extraído de vesículas extracelular e intracelular em células das linhagens celular tumoral MCF-7 e epitelial de mama MCF-10A. Para a linhagem MCF-7, as detecções por espectroscopia de fluorescência apresentaram um limite de detecção de 0,18 nM e limite de quantificação de 0,55 nM, para o miR-21 sintético. Enquanto a espectroscopia Raman apresentou um limite de detecção de 6,7 nM e limite de quantificação de 20,4 nM. Ambos nanobiossistemas apresentaram boa especificidade, pois foram capazes de distinguir entre sequência de miR-21 com apenas uma base alterada. Para os testes de detecção com miR-21 proveniente de vesículas extracelular, o limite de detecção foi de 214 ng/ μ L de miR-21 e limite de quantificação 651 ng/ μ L e limite de detecção 0,74 ng de miR-21 e limite de quantificação 2,24 ng/ μ L, para a espectroscopia Raman e de fluorescência, respectivamente. Esses resultados mostraram que a espectroscopia por fluorescência foi mais sensível para detecção do miR-21, quando comparado ao Raman. Foram realizados também testes de detecção

intracelular em células MCF-7 e MCF-10A utilizando imagens de fluorescência. Os resultados mostraram que o nanobiosistema baseado em fluorescência é sensível à diferença de expressão entre células tumorais e células normais, como foi verificado por meio da RT-qPCR.

Palavras-chave: AuNPs, bioconjugação, microRNAs, miR-21, detecção de câncer.

SOUZA, MM. **Preparation of nanobiosystems for detection of miR-21 tumor microRNA** 2019. 103 p. Ph. D. these (Cell and Tissue Biology) (em inglês) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019

ABSTRACT

In this thesis were developed a method to obtained AuNPs-based DNA probes, named nanobiosystem, which use low concentrations of NaCl and DNA and reduced reaction time. These probes were used to detect the mature tumoral microRNA miR21. The AuNPs were synthesized by the process of reducing citrate and presented an average size of 17 nm and SPR band of 524 nm. The nanobiosystem were prepared in two steps, which consists in the stabilization of the suspension of AuNPs with dATP and PEG-SH and later replacement of dATP by oligonucleotides modified with a thiol group and a fluorophore Cy5 in the portions 5' e 3', respectively. The Nanobiosystems were characterized by UV-Vis spectroscopy, dynamic light scattering, Zeta potential, and transmission electron microscopy. Both bionanosystems presented a shift in SPR band to 530 nm and a new band at 260 nm, which is characteristic of oligonucleotides, and hydrodynamic size of 38 nm. Zeta potential increased from -21 mV to -38 mV for the AuNPs and nanobiosistemas, respectively. These results show that the method developed here was useful for functionalizing the surface of AuNPs with oligonucleotides in a simple and fast way. To study the ability of nanobiosystems to detect miR-21, we tested a hybridization of miR-21 from 3 sources: synthetic, commercially obtained, extracted from extracellular and intracellular vesicles in MCF-7 and MCF-10A cells. Fluorescence spectroscopy detections had a detection limit of 0.18 nM and a quantitation limit of 0.55 nM for synthetic miR-21. While Raman spectroscopy showed a detection limit of 6.7 nM and quantitation limit of 20.4 nM. Both nanobiosystems showed good specificity because they were able to distinguish between miR-21 sequence with only one altered base. For detection tests with miR-21 from extracellular vesicles, the detection limit was 214 ng/ μ L of miR-21 and the quantitation limit of 651 ng/ μ L and detection limit 0.74 ng/ μ L of miR-21 and quantitation limit 2,24 ng/ μ L for Raman and fluorescence spectroscopy, respectively. These results showed that fluorescence spectroscopy was more sensitive for miR-21 detection when compared to Raman. Intracellular detection tests were also performed on MCF-7 and MCF-10A cells using fluorescence image. The results showed that the fluorescence-based nanobiosystem is sensitive to the difference in expression between tumor cells and normal cells, as verified by RT-qPCR.

Keywords: AuNPs, bioconjugation, microRNAs, miR-21, cancer detection

Capítulo 1

Introdução

Tumores são o resultado de alterações genéticas graduais em células normais que quando diagnosticadas em um estado inicial oferece um melhor prognóstico em comparação com diagnóstico tardio. Por este motivo, uma quantidade considerável de recursos tem sido investida no desenvolvimento de técnicas de detecção de tumores em seus estágios iniciais e existe o interesse no desenvolvimento de métodos dedicados à identificação de biomarcadores tumorais que permitam a detecção do câncer de maneira precoce, sensível e específica [1,2].

Pesquisas recentes mostram que o diagnóstico deste tipo pode ser realizado a partir da detecção de microRNAs (miRNAs) circulantes [3]. Isso porque alguns miRNAs são caracterizados por serem superexpressos ou regulados preferencialmente em certos tipos de cânceres. Esta especificidade em conjunto com a notável estabilidade de vários tipos de amostras, incluindo tecidos fixados, plasma e outros fluídos, fazem dos miRNAs biomarcadores úteis, com robustez e reprodutibilidade para o diagnóstico do câncer [4]. Particularmente, o microRNA-21 (miR-21) atua em diversos tumores sólidos derivados de células epiteliais. Para o caso específico do câncer de mama, ele está associado com a regulação de genes supressores tumorais, os quais impedem a ativação de vias apoptóticas.

Atualmente o desafio é desenvolver ferramentas inovadoras que unam sensibilidade e especificidade para detecção do miRNA canceroso em uma dada célula, tecido ou amostras derivadas destes materiais biológicos. Em geral, a quantificação da expressão de miRNAs tem sido baseada nas técnicas *Northern Blotting*, *microarrays*, PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) e *deep sequence*. Estas plataformas de análise quantitativas apresentam um bom limite de detecção, na faixa de nano e femtomolar, e uma boa reprodutibilidade. Contudo, algumas características dos miRNAs (comprimento curto, similaridade de sequências entre as famílias, grande número de isoformas e polimorfismos) dificultam os processos de amplificação e identificação e têm desafiado o desenvolvimento e a implementação clínica destas técnicas.

Um método de detecção quantitativo de biomoléculas para o diagnóstico de doenças como Parkinson [5], Alzheimer [6] e câncer [7] que vem ganhando destaque

nos últimos anos é a técnica espectroscopia Raman de superfície melhorada (SERS, do inglês *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*). O método tem se mostrado capaz de cumprir as exigências necessárias à uma boa técnica de detecção, pois além de permitir a utilização de diferentes tipos de substratos que intensificam o sinal Raman e favorecem a sensibilidade de detecção a partir de uma pequena quantidade de material, também permite a utilização de amostras aquosas, com pouca ou nenhuma preparação prévia, que possibilita a detecção a partir de amostras coletadas do sangue, urina ou saliva, tornando-a bem pouco invasiva, e com limite de detecção que pode chegar a poucos femtomolares [8]. Uma grande vantagem do efeito SERS é a possibilidade de intensificar o sinal Raman da molécula alvo por meio do acoplamento das excitações moleculares com a ressonância de plasmons localizados em nanopartículas metálicas (normalmente ouro ou prata).

Outro fenômeno que também pode ser empregado em técnicas de detecção de miRNAs é a fluorescência. Ensaios de detecção que utilizam a fluorescência incluem a espectroscopia de fluorescência, microscopia (geração de imagens *in vitro* e *in vivo*) e citometria de fluxo [9]. Entre as vantagens da fluorescência estão a facilidade de reconhecimento e a quantificação do sinal fluorescente, além da disponibilização comercial de vários tipos de moléculas (sondas) fluorescentes.

Um tipo de sonda fluorescente que ganhou destaque na biologia molecular são as sondas fluorescentes que utilizam o fenômeno *Förster* ou transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET, do inglês *fluorescence resonance energy transfer*). Sondas do tipo FRET melhoram a relação sinal/ruído e são ativáveis, ou seja, podem ser projetadas para ativar ou desativar a emissão da fluorescência em determinadas condições, como na presença do alvo a ser detectado [10]. Com o intuito de se otimizar o processo de extinção da fluorescência, sondas FRET podem ser associadas com nanopartículas de ouro (AuNPs), que possuem alta eficiência na recepção da energia transferida do fluoróforo excitado [11].

1.1 Justificativa

Nos últimos anos, a compreensão de que miRNAs desempenham papéis importantes no desenvolvimento do câncer tem estimulado a pesquisa e o desenvolvimento de novos dispositivos que utilizam miRNAs como biomarcadores para o diagnóstico da doença e algumas moléculas que estão sendo testadas como biomarcadores em ensaios clínicos têm apresentado resultados promissores [12].

Entre esses miRNAs, o miR-21 é bastante adequado para ser utilizado como biomarcador para o câncer, pois estudos *in vitro* já mostraram que ele é encontrado *up-regulado* em diversos tipos de cânceres, incluindo cérebro, cervix, pulmão, fígado, próstata, pâncreas, cólon e mama [13]. Já foi mostrado também que o nível da sua expressão aumenta com o aumento da fase do tumor, o que evidenciou o seu importante papel tanto na invasão quanto na migração do câncer, tornando-o adequado para detecção nos estágios inicial e tardio [14, 15].

Assim, existe grande interesse no desenvolvimento de técnicas de detecção de miRNAs intra e extracelular, e conquistas significativas têm sido alcançadas. Um exemplo é o desenvolvimento de sondas de DNA fluorescentes à base de AuNPs. Essas sondas atraem cada vez mais atenção e é um tema atual na área biomédica e há um grande interesse no seu uso para detecção e terapia anticâncer. No entanto, o desenvolvimento de sondas que possuam baixa relação sinal/ruído e alta sensibilidade continua sendo um desafio.

Um avanço no processo do desenvolvimento de sondas foi realizado quando fitas simples de DNA foram conjugadas na superfície de AuNPs [16]. No processo de detecção as sondas baseadas em DNA são projetadas para hibridizar com um ácido nucleico alvo e emitir um sinal fluorescente. Ao associar essas sondas com AuNPs é observada uma melhora na relação sinal/ruído. Essa melhora é explicada pelo fenômeno FRET, que ocorre na superfície das AuNPs [17]. Nesse processo, o FRET extingue o sinal das sondas não reagidas, impedindo que elas interfiram na detecção como falso-positivo [10]. Isso permite observar a reação de hibridização em tempo real diretamente

em solução, sem a necessidade de procedimentos de lavagem. Desse modo, os ensaios de detecção de miRNAs podem ser realizados de modo rápido e simples.

Várias estratégias de conjugação de DNA em AuNPs têm sido utilizadas, sendo que mais comum utiliza o aumento gradual da concentração de cloreto de sódio (NaCl) na suspensão de AuNPs. Como as AuNPs se agregam irreversivelmente em altas concentrações de NaCl, o incremento da concentração deve ser realizado de maneira muito lenta e todo o processo pode levar 48 horas [18].

Com o intuito de reduzir o tempo de reação, novos métodos, tais como o envelhecimento de sais e o método do baixo pH, têm sido desenvolvidos. Sendo que o método do baixo pH trouxe grande avanço, pois reduziu o tempo da conjugação para 3 min [19]. No entanto, a efetividade desse método é baixa, porque muitas fitas de DNA se ligam de forma inespecífica e isso diminui a reatividade do DNA para aplicações posteriores. Além disso, esse método tem preferência por fitas de DNA que possuem uma sequência adicional poliA [20]. O uso de moléculas que adsorvem fracamente sobre as AuNPs e que podem ser substituídas por moléculas de DNA foi realizado com sucesso, mas o método exige alta concentração de DNA e isso aumenta o custo da reação [21].

Essas sondas de detecção, podem ser utilizadas em diferentes técnicas de detecção. Por exemplo, a literatura mostra a possibilidade de aplicação da técnica *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* (SERS) para a detecção quantitativa de miRNAs e sugere que esta técnica pode ser utilizada como um método alternativo para a identificação de marcadores tumorais [8,22–28].

1.2 Objetivos

O objetivo geral dessa pesquisa consistiu no desenvolvimento de um método de preparação de sondas baseadas em AuNPs conjugadas com DNA que utiliza baixa concentração de NaCl e de DNA. Essas sondas foram preparadas a partir da modificação de nanopartículas de ouro esféricas com oligonucleotídeos e foram utilizadas para investigar a detecção do microRNA miR-21 intracelular e isolados de vesículas extracelular

liberada no meio de cultura das linhagens celular tumoral MCF-7 e epitelial de mama MCF-10A. Foram realizados estudos de sensibilidade, seletividade e relação sinal/ruído utilizando as microscopia e espectroscopia por fluorescência e a espectroscopia Raman. Os objetivos específicos compreenderam as seguintes etapas de estudo:

1. Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro

Realização da síntese de nanopartículas de ouro, utilizando o método do citrato e sua caracterização utilizando diferentes técnicas.

2. Preparação dos nanobiossistemas

Desenvolver sondas utilizando as nanopartículas como substratos. Para isso, a superfície das AuNPs foi funcionalizada em duas etapas: a primeira visando evitar a aglomeração e a visando a modificação da superfície com as biomoléculas de interesse para obtenção das sondas. Caracterização das sondas utilizando diferentes técnicas.

3. Ensaios de detecção

Realização de testes de detecção por intermédio das técnicas de fluorescência e espectroscopia Raman. As técnicas foram avaliadas quanto a sensibilidade e seletividade.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2.1 Ácidos Ribonucleicos

Ácidos ribonucleicos (RNAs) são moléculas poliméricas formadas a partir da união de diferentes bases de mononucleotídeos, as quais formam diferentes tipos de RNAs. Os RNAs mais bem conhecidos são os: RNA mensageiro (mRNA), o único RNA codificante que contém a sequência de códons que são traduzidos em resíduos de aminoácidos para a síntese de proteínas, RNA ribossomal (rRNA), que faz parte dos ribossomos, RNA transportador (tRNA), que é responsável por carregar o anticódon e o resíduo de aminoácido para a síntese de proteínas.

Além desses RNAs, outros RNAs que não codificam proteínas são conhecidos como RNAs não-codificante (ncRNAs). Geralmente, os ncRNAs são classificados como curtos (com $\sim 20 - 30$ nucleotídeos), pequenos (até 200 nucleotídeos) e longos (> 200 nucleotídeos). Os ncRNAs curtos incluem microRNAs, *short interferences RNAs* (siRNAs), RNAs que interagem com PIWI (P-element-induced wimpy testis - piRNA) [29].

De acordo com a análise do transcriptoma, apenas 1,5% da quantidade total de RNAs em células eucarióticas codificam proteínas, enquanto outros transcritos são ncRNAs e, em sua maioria, cumprem funções reguladoras em processos moleculares [30]. Dentre os ncRNAs, o papel funcional dos miRNAs, na fisiologia celular e em condições patológicas tem sido amplamente estudado. Em quase todas as doenças o padrão de expressão do miRNA mostrou-se diferente nos tecidos e extracelularmente, contribuindo para a patogênese da doença [31].

2.1.1 Micro-RNAS

Os miRNAs são RNAs não-codificantes que possuem aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento. Estima-se que 30% do genoma humano é constituído por miRNAs [32], logo é de se esperar que a investigação sobre o seu papel mostre que eles estejam envolvidos em muitos processos celulares, incluindo o desenvolvimento, a proliferação, a apoptose, o metabolismo lipídico e a diferenciação celular [33–36]. De

fato, os miRNAs atuam na regulação da expressão gênica ligando-se ao mRNA alvo estimulando a degradação do mRNA ou inibindo temporariamente a sua tradução.

Quase 97% do genoma humano é composto de DNA não codificante (introns), que varia de uma espécie para outra. Numerosos genes nessas regiões não codificadoras de proteínas codificam microRNAs, responsáveis pelo silenciamento gênico mediado por RNA [37]. Os miRNAs exibem diferenças em relação a sua posição no gene e biogênese, sendo classificados em miRNAs intergênicos e intragênicos [38]. Uma porcentagem significativa de miRNAs é intergênica, isto é, localizada dentro de regiões intrônicas ou exônicas de genes codificadores (genes hospedeiros), que geralmente está funcionalmente relacionado aos genes hospedeiros que desempenham papéis antagônicos ou sinérgicos [39]. A Figura 2.1 resume as principais vias de biogênese e ação dos microRNAs.

Cerca de metade de todos os miRNAs atualmente identificados são intragênicos e processados principalmente a partir de íntrons e por poucos éxons de genes codificadores de proteínas. Enquanto os demais são intergênicos, transcritos independentemente de um gene hospedeiro e regulados por seus próprios promotores [40,41].

Na via canônica, a biogênese dos miRNAs começa com a síntese de um longo transcrito primário, denominado pri-miRNA (110 pb), e com o processamento pós ou co-transcricional [42]. Os pri-miRNAs são transcritos pelas RNAs polimerase II ou III e possuem uma estrutura secundária em forma *hairpin* (“grampo de cabelo”) [43]. No núcleo, o pri-miRNA é processado em pré-miRNA. O complexo microprocessador, composto pela *Drosha* e *DiGeorge Syndrome Critical Region 8* (DGCR8) que reconhece e cliva as extremidades de pequenas estruturas de RNA em forma de *hairpin* do pri-miRNA para produzir o miRNA precursor (pré-miRNA) (70 pb) [44]. Após o processamento nuclear, cada pré-miRNA é exportado para o citoplasma por meio de Exportin5/RanGTP [45]. O pré-miRNA é reconhecido pela enzima *dicer*, que cliva a região do loop, resultando em uma molécula de dupla fita de RNA (dsRNA; 22 pb). Finalmente, proteínas da família

argonauta (AGO) se ligam as cadeias 5p ou 3p do duplex de miRNA maduro para formar um complexo de silenciamento induzido por miRNA (RISC) [46]. O complexo RISC pode gerar o miRNA maduro quando se liga a fita 5p, também denominado miR-5p, que atua na regulação de um mRNA alvo [47].

Figura 2.1 Biogêneses de MicroRNA. Degradação, Acumulação, e reciclagem. A Figura ilustra as diferentes vias para gerar miRNAs funcionais.

Fonte: O'Brien et al. [48]

A outra fita, miR* ou miR-3p, é degradada ou pode formar outro complexo RISC para regulação de outro mRNA alvo [49]. A atuação final do RISC esta sujeita ao pareamento com o mRNA alvo. Caso o pareamento entre o miRNA e a região 3' UTR do mRNA seja perfeito, ocorre a clivagem do mRNA e o sua posterior condução para os p-bodies (do inglês, mRNA processing bodies) para a sua degradação [50]. Com pareamento parcial ocorre a inibição da tradução, o principal mecanismo de ação dos miRNAs em mamíferos [51]. Na maioria dos casos, o miRISC se liga aos mRNAs alvo para induzir a inibição da tradução, provavelmente interferindo no complexo eIF4F ou perturbando a função da cauda poli-A [52]. As vias de biogênese canônicas e não canônicas do miRNA estão resumidas na Figura 2.1, juntamente com o mecanismo de ação.

Em 2008, dois grupos independentes demonstraram que os miRNAs estão presentes em níveis detectáveis no soro e no plasma humano [53, 54]. Esses grupos também verificaram que estes miRNAs circulantes são muito estáveis e podem suportar vários ciclos de congelamento e descongelamento, longos períodos de armazenamento, condições de pH extremas, e apresentam resistência a digestão RNase.

Desde então existe o interesse em utilizar estas moléculas como biomarcadores para o diagnóstico de diversas doenças. Em um estudo pioneiro, que examinou a participação dos miRNAs no câncer, CALIN et al. [55] mapearam 186 genes de miRNA e compararam seus loci cromossômicos para áreas comumente deletadas ou amplificadas em tumores humanos p53+. Este trabalho demonstrou que 52% dos miRNAs mapeados estão localizados em regiões genômicas associadas ao câncer e evidenciou o potencial envolvimento dos miRNAs em diversos tipos de tumores. Isso levou à classificação dos miRNAs como: miRNAs supressores de tumor; que são frequentemente regulados negativamente no câncer e como miRNAs oncogênicos; que são frequentemente regulados positivamente no câncer.

Além desta nova classificação, Hanahan e Weinberg [56] revelaram o seu envolvimento em algumas características do câncer, uma delas é a desregulação da expressão dos miRNAs. Essa desregulação faz com que as células cancerosas sejam

autossuficientes em sinais de crescimento, na evasão de supressores de crescimento, resistentes a apoptose, obtenham potencial replicativo ilimitado, em induzir a angiogênese e ativar a invasão e metástase.

2.1.2 micro-RNAs e Câncer

O papel dos miRNAs no câncer está bem estabelecido e várias vias reguladas por diferentes miRNAs têm sido descritas, inclusive os mRNAs alvo. O câncer é um processo de várias etapas, no qual as células normais passam por alterações genéticas que progridem através de uma série de estados pré-malignos (iniciação) e invasivo (progressão), podendo se espalhar por todo o corpo (metástase). A desregulação dos genes envolvidos na proliferação, diferenciação e/ou apoptose celular está associada à iniciação e progressão do câncer [57]. Os genes ligados ao desenvolvimento do câncer são caracterizados como oncogenes e supressores de tumores. Recentemente, a definição de oncogenes e supressores de tumores foi expandida a partir dos genes clássicos de codificação de proteínas para incluir miRNAs [58]. Os miRNAs desempenham um papel vital na regulação de várias vias metabólicas e celulares, principalmente aquelas que controlam a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular [30].

Inclusive, já é conhecido que o mesmo miRNA pode atuar como supressor tumoral e oncomir, dependendo do tipo de tumor e localização. Por exemplo, o miR-125b que, em câncer hematológico atua como oncomir, em tumores sólidos é um supressor tumoral. Outro exemplo é o miR-155 que atua como supressor tumoral em linhagens de melanoma, câncer gástrico e ovariano, enquanto atua como oncomir em malignidades hematológicas e em tumores sólidos. Curiosamente, o miR155 ainda atua de maneira oposta na leucemia mieloide aguda, dependendo do genótipo. O miR-155 ainda se mostrou pró-apoptótico e pró-diferenciação no FLT3-tipo selvagem, mas não no FLT3 com mutação ITD [59].

O papel dos miRNAs não se restringe a sua atuação sobre as células tumorais, eles também regulam o microambiente tumoral. Por exemplo, os miRNAs atuam no pro-

cesso de transformação de fibroblastos normais em fibroblastos associados ao câncer, estimulação de angiogênese e remodelamento de matriz extracelular [60]. Um ponto muito importante na biologia dos miRNAs, é a sua presença na circulação sanguínea, que tem mostrado que os miRNAs não atuam apenas na célula onde foi sintetizado, mas também pode atuar como reguladores autócrinos, parácrinos ou endócrinos para modular as atividades celulares [61].

Com isso, os miRNAs extracelulares podem ser usados como biomarcadores tumorais. Existem duas populações de miRNAs extracelulares em fluídos biológicos. Uma pode ser encontrada em vesículas como exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos. Já a segunda está associada a proteínas, especialmente a AGO2 [62–64]. Os miRNAs de promoção tumoral podem ser liberados circulação sanguínea pelas células efectoras imunitárias que existem no microambiente do tumor [65]. No ambiente tumoral, microvesículas derivadas de tumor atuam como fornecedores, entregando informação genética e proteínas para as células receptoras. Por exemplo, as células tumorais de glioblastoma liberam exossomos contendo mRNA, miRNAs e proteínas angiogênicas, que são internalizados pelas células receptoras, tais como células endoteliais, microvasculares e cerebrais, muitas vezes resultando em um aumento da proliferação como uma consequência desses sinais [66].

Padrões de expressão dos miRNAs são exclusivos para alguns tecidos e se diferenciam entre miRNAs de células cancerosas e de tecidos normais [64,67]. Alguns miRNAs são superexpressos ou regulados preferencialmente em certos tipos de câncer. Esta especificidade em conjunto com a notável estabilidade de vários tipos de amostras, incluindo tecidos fixados, plasma e outros fluídos, fazem dos miRNAs biomarcadores úteis com robustez e reprodutibilidade no diagnóstico de câncer [68]. Sendo que a avaliação dos vários níveis de expressão de miRNA, também conhecidos como assinaturas de miRNAs, pode prever com bastante precisão o prognóstico em vários tipos de cânceres [69–74].

Um miRNA que tem sua expressão aumentada em vários tipos de tumores é o miR-21. No câncer de mama o miR-21 está associado com a supressão dos genes

supressores tumorais (*Tropomyosin 1* [68], *programmed cell death* [69], *phosphatase, tensin homolog deleted on chromosom* [75]) e evidências sugerem que ele pode realçar o seu fenótipo maligno reprimindo a expressão de múltiplos genes supressores tumorais ao mesmo tempo. Já foi demonstrado também que a inibição do miR-21 pode resultar na restauração da expressão de muitos genes supressores de tumores ao mesmo tempo. Esse envolvimento do miR-21 com o câncer o torna útil no diagnóstico da doença e o desenvolvimento de técnicas de detecção tem sido objeto de diversas pesquisas.

2.2 Técnicas de Detecção de miRNAs

Analizando o papel crucial que os miRNAs desempenham na regulação de genes e na função biológica, a detecção específica e sensível de miRNAs está se tornando cada vez mais importante. No entanto, algumas características como, o comprimento curto da sequência, a grande variabilidade no número de cópias por célula e a alta similaridade da sequência entre famílias de miRNAs expressos dificulta os processos analíticos [76]. Nas últimas décadas, esforços expressivos foram investidos para desenvolver novos métodos de detecção [77]. As técnicas atuais de detecção de miRNA podem ser divididas entre métodos tradicionais e métodos de novas tecnologias.

Os métodos tradicionais incluem *Northern Blotting* [78], análise de microarranjos [79] e reação quantitativa em cadeia da polimerase (qPCR) [80]. Nos métodos tradicionais, o *Northern Blotting* é considerado o padrão ouro, porém é pouco sensível, demorado e requer uma grande quantidade de amostras de RNA. A técnica baseada em microarrays tem a vantagem de alta capacidade de analisar mais de uma amostras por vez, mas sua aplicação é restringida pela baixa sensibilidade e um longo tempo de hibridização.

A técnica qPCR, incluindo a reação em cadeia da polimerase quantitativa por transcriptase reversa (RT-qPCR) e a RT-qPCR com revestimento de poli (A), são as técnicas de análise de miRNA mais utilizadas, ambas com a vantagem de alta sensibilidade e especificidade. Essas técnicas são complexas e requerem habilidades especiais

de laboratório. Além disso, falsos positivos podem ser gerados durante o processo de amplificação. Vem ganhando espaço também a utilização da espectroscopia Raman na sua variação SERS. O método combina as vantagens da sensibilidade no fornecimento de espectros vibracionais de moléculas fornecida pelo Raman, com a amplificação de sinal fornecida pela adsorção destas moléculas em substratos metálicos. Logo, ele possui especificidade química, alta sensibilidade e seletividade superficial. Um panorama sobre essas técnicas de detecção será dado a seguir e um resumo de suas principais características pode ser visto na Tabela [2.1](#).

Tabela 2.1 Resumo das características das principais técnicas de detecção utilizadas para detecção de miRNAs.

Aplicação	Vantagens	Limitações	LD*
Microarray			
Alto rendimento dos perfis de miRNA; Expressão diferencial de miRNAs	Alto rendimento; Análise rápida; Baixo custo	Não quantitativa; Baixa sensibilidade; Baixa especificidade	nM-pM
Northern blot			
Detecção não quantitativa da expressão de miRNAs; Validação da assinatura de miRNAs; marcado com micorarray	Semi-quantitativa; Boa especificidade;	Baixa sensibilidade; Baixa velocidade de análise	nM-pM
RT-PCR			
Validação da assinatura de miRNA dos microarrays; pode ser usada em diagnósticos clínicos	Simple e conveniente; Maior sensibilidade; Relativa especificidade; Quantitativa usando Taqman	Alto custo por miRNA; Análise lenta	fM-aM

*LD (Limite de Detecção)

Fonte: WANG [81] e JOHNSON [82].

2.2.1 *Northern Blotting*

A técnica *Northern blotting* tem sido o método considerado como padrão-ouro desde o início dos estudos do miRNA e pode ser utilizada para a detecção de miRNAs maduros e também de seus precursores. O princípio básico é o seguinte: a amostra de RNA é digerida por uma endonuclease de restrição, separada por eletroforese em gel de agarose, desnaturada e transferida para um filme de nitrocelulose ou membrana de *nylon* de acordo com sua posição no gel e fixada seguida de reação com o isótopo ou outras sondas fluorescente [83]. Após a lavagem para retirada das sondas que não reagiram, os miRNAs podem ser detectados por radiografia ou por fluorescência. Sendo que o tamanho molecular e a abundância relativa de miRNAs podem ser detectados por *Northern Blotting*.

No entanto, a técnica é semiquantitativa, possui baixa reprodutibilidade, longo tempo de reação e baixa sensibilidade e seletividade. Para aumentar a sensibilidade e a especificidade sondas oligonucleotídicas modificadas com ácido nucleico bloqueado (LNA) e sondas mediada por 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) para as membranas de nylon foram relatadas, respectivamente. Sendo que o uso do EDC proporcionou um aumento na sensibilidade que alcançou 25-50 vezes [84]. Além disso, sondas oligonucleotídicas marcadas com (digoxina) DIG contendo LNA e EDC para marcação do RNA com a membrana de nylon foram usadas na detecção de miRNA com alta sensibilidade para quantidades de RNA tão baixas quanto 0,05 fmol [85].

2.2.2 *Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa*

A qPCR em tempo real tornou-se uma técnica de biologia molecular de rotina e confiável para detectar a expressão do miRNA devido à sua alta sensibilidade e alta especificidade de sequência [86]. A qPCR em tempo real pode ser considerada como um único padrão-ouro entre as técnicas de detecção de miRNA. Em tais métodos, o miRNA alvo é primeiramente convertido em cDNA por transcrição reversa. Posteriormente, a PCR foi realizada para a detecção por fluorescência em tempo real. A síntese de cDNA

por transcrição reversa geralmente pode usar *primers* em forma de “grampo de cabelo” ou “*stem loop*” [87], de adaptador poli(T) [88] ou *primers* específico do gene (GSP) que inclui uma sequência de cauda [89]. Dois métodos fluorescentes são usados para monitorar a qPCR, método da sonda TaqMan [80] e método de corante fluorescente SYBR Green [89]. SYBR Green é um corante fluorescente intercalante de DNA dupla fita que ao se ligar ao DNA alvo aumenta o sinal fluorescente em 800 a 1000 vezes. No entanto, o SYBR Green pode reconhecer produtos inespecíficos, como dímeros de *primers*, o que reduz a precisão da quantificação da qPCR para produtos de amplificação específicos. Por isso, a análise da curva de dissociação é usada para monitorar a homogeneidade do produto qPCR. O valor de T_m do dsDNA depende de seu comprimento e composição de base, enquanto o número de pontos de inflexão na curva de fusão indica o número de produtos de PCR, incluindo os dímeros de *primers*. Portanto, a curva de dissociação aceitável deve ter apenas um ponto de inflexão, enquanto vários pontos de inflexão indicam a presença de produtos não específicos.

As sondas TaqMan são sondas oligonucleotídicas marcadas com um grupo repórter na extremidade 5' e um grupo de extinção fluorescente na extremidade 3', cujos locais de ligação estão entre os dois *primers*. Nesse método, a formação de dímeros de *primers* não produzirão sinal fluorescente. Assim, esse método possui uma especificidade e reprodutibilidade mais alta que o SYBR Green. O método qPCR em tempo real é altamente sensível, mas a geração de falso-positivo por produtos inespecíficos dificulta o desenho dos *primers* e limitam seu uso.

A quantificação exata do qPCR em tempo real depende da interconexão de várias etapas, e cada etapa precisa ser otimizada. Para obter resultados significativos e repetíveis, vários parâmetros como extração de RNA, controle de integridade do RNA, síntese de cDNA, desenho do primer, detecção de amplicons e normalização de dados devem ser levados em consideração [90]. Mohammadi-Yeganeh et al. [80] desenvolveram um qPCR em tempo real novo e econômico para a detecção de miRNAs que pode ser realizado em duas etapas. O primeiro passo utiliza *primers stemloop* para realizar uma transcriptase reversa dos miRNAs. O segundo passo é amplificar os produtos da

transcriptase reversa usando a qPCR em tempo real TaqMan. Essa estrutura stemloop pode ser usada não apenas para detectar miRNAs que não são encontrados por *microarray*, mas também para detectar outros ncRNA, como piRNA e siRNAs. Esse método combinou a simulação por computador com o bioensaio pela primeira vez, permitindo a triagem de alto rendimento de uma ampla variedade de miRNAs.

Gan et al. [86] fizeram uma comparação entre as técnicas *Northern Blotting* e qPCR em tempo real. As principais vantagens do qPCR em tempo real em comparação com o *Northern Blotting* são maior sensibilidade e especificidade, além de uma faixa mais ampla de quantificação. Seus principais problemas são a variabilidade do *template* de RNA, o design experimental inadequado, a análise inconsistente dos dados e a normalização inadequada dos dados.

2.2.3 Microarray

O *microarray* é o método mais utilizado para a detecção rápida e de alto rendimento de miRNAs [79]. Para este método, o RNA da amostra é produzido por transcrição reversa usando uma sonda marcada, e esses fluoróforos ou cDNAs marcados com biotina são detectados usando oligonucleotídeos imobilizados em fase sólida com a mesma sequência que o miRNA alvo. A amostra de cDNA marcada é carregada em cada poço, seguida por uma série de etapas de lavagem para remover os cDNAs livres. Se o cDNA hibridizado for biotinilado, o fluoróforo marcado com estreptavidina pode ser marcado. Já se o cDNA foi marcado com o fluoróforo, a intensidade da fluorescência de cada poço pode ser medida diretamente. A intensidade de fluorescência de cada poço pode ser usada para determinar o nível de expressão de miRNAs. Embora o *microarray* possa analisar milhares de amostras por dia, ele possui um alto custo [91]. A técnica enfrenta desafios em relação ao curto tamanho das fitas dos miRNAs, o baixo número de cópias de miRNA e a semelhança entre as sequências de diferentes miRNAs que prejudicam a especificidade. Também existe a necessidade de desenvolver novos

métodos estatísticos adaptativos para calibrar eficientemente os erros de medição para normalização. A quantidade de dados gerados em ensaios de *microarray* precisa de novos métodos estatísticos para calibrar eficientemente os erros de medição para a normalização e detecção de miRNAs expressos diferencialmente [92].

2.2.4 *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*

A técnica SERS combina as vantagens da sensibilidade no fornecimento de espectros vibracionais de moléculas fornecida pelo efeito Raman, com a amplificação de sinal fornecida pela adsorção destas moléculas em substratos metálicos. Logo, ele possui especificidade química, alta sensibilidade e seletividade superficial. O substrato metálico mais utilizado nessa abordagem são nanopartículas de ouro. Isso porque elas possuem vantagens, como estabilidade a longo prazo, boa biocompatibilidade, distribuição de tamanho facilmente controlável e de alta homogeneidade. Além disso, AuNPs possuem propriedades óticas capazes de amplificar a eficiência na dispersão do sinal Raman das espécies adsorvidas, permitindo a determinação espectroscópica das espécies mesmo em condições de baixa concentração. Ensaios SERS baseados em AuNPs têm sido amplamente aplicados para determinação de espécies químicas e biológicas, tais como pequenas moléculas, proteínas, bactérias, células e ácidos nucleicos [93] e já foram verificados aumentos na intensidade do sinal emitido pelo Raman por DNA tiolados [94], em proteínas Imunoglobulina G 238 e em marcadores bacterianos [95] adsorvidos sobre a superfície de AuNPs.

Encontra-se em investigação atualmente a modificação da superfície de AuNPs com moléculas de DNA. Esta conjugação gera um material com superfície densa e altamente orientada, com ácidos nucleicos ligados covalentemente ao substrato [16]. Estas AuNPs conjugadas com DNA podem ser utilizadas como sonda para detecção de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) por meio de hibridização específica entre as fitas conjugadas nas AuNPs e uma fita alvo e como resultado é obtida uma melhora sensibilidade. A utilização deste tipo de abordagem já permitiu a detecção de miRNAs com limite variando na faixa 10 e 20 fM [96, 97]. Uma outra possibilidade deste tipo

de abordagem é a formação de gold nanobeacons. Estes compostos são sinalizadores moleculares formados por uma fita simples de DNA, que possui formato de grampo, onde a sequência do *loop* é utilizada como sonda de captura e as extremidades 3' e 5' ficam próximas. De modo que uma extremidade transporta um fluóforo e a outra um inibidor de fluorescência. Nessa abordagem as próprias AuNPs funcionam como um inibidor da fluorescência. Sendo que o sinal fluorescente será observado apenas quando as extremidades estiverem suficientemente distantes. A separação das extremidades é obtida quando um oligonucleotídeo alvo hibridiza com o *loop* e força uma mudança conformacional e o distanciando entre o fluoróforo e a superfície das AuNPs. Assim, é possível detectar a presença dos oligonucleotídeos alvo.

2.3 Nanopartículas de Ouro

Nanopartículas são partículas coloidais sólidas com tamanho variando 1 a 100 nm. Muitas dessas nanopartículas são usadas em aplicações biomédicas porque oferecem muitas vantagens em comparação com partículas maiores, como aumento da razão superfície/volume e propriedades magnéticas [98]. Nos últimos anos, diferentes estudos têm sido realizados para avaliar o potencial das nanopartículas para serem usadas em biossensores, bioimagem, liberação de fármacos, terapia por hipertermia e terapia fotodinâmica [99–104]. Paralelamente tem se buscado otimizar as propriedades das nanopartículas controlando os processos de síntese e funcionalização da superfície.

Particularmente, AuNPs esféricas possuem atributos úteis, como propriedades optoeletrônicas relacionadas ao tamanho e forma, grandes proporções superfície-volume e excelente biocompatibilidade [105–107]. Essas propriedades as tornam importante na bionanotecnologia. Entre as propriedades físicas importantes das AuNPs estão a ressonância plasmônica de superfície (SPR) e a capacidade de extinguir a fluorescência.

Ainda, AuNPs esféricas em solução exibem diferentes tipos de cores (por exemplo, marrom, laranja, vermelho e roxo) à medida que o tamanho do núcleo aumenta de 1

a 100 nm. Em geral, o espectro de absorção das AuNPs exibe uma banda de absorção relativa ao tamanho entre 500 e 550 nm [108]. Essa banda é resultado da oscilação coletiva dos elétrons de condução devido à excitação ressonante pelos fótons incidentes (Figuras 2.2 e 2.3), e é chamada de "banda plasmônica de superfície" [109]

Figura 2.2 Coloide de AuNPs de diferentes tamanhos. Essa coloração pode ser relacionada com as características das nanopartículas, tais como tamanho, forma e estabilidade do coloide.

A ressonância plasmônica de superfície é um fenômeno que é influenciado não apenas pelo tamanho, mas também pela forma, solvente, ligante da superfície, carga do núcleo, temperatura e a proximidade de outras nanopartículas [110]. A agregação de nanopartículas resulta em um deslocamento significativo da frequência de SPR para o vermelho, ampliando a superfície da banda plasmônica e alterando a cor da solução de vermelho para azul devido ao acoplamento entre partículas [111] (Figura 2.3).

AuNPs são partículas versáteis que podem ser úteis para uma variedade de aplicações biomédicas. Em diagnóstico, o evento de ligação entre analitos e AuNPs pode alterar suas propriedades físico-químicas, como a banda SPR e comportamento redox, levando a sinais detectáveis de diferentes formas [112]. Além disso, a facilidade da funcionalização da superfície de AuNPs fornece uma plataforma versátil para sua associação com oligonucleotídeos, anticorpos e proteínas. Os bioconjugados dos AuNPs

Figura 2.3 Espectro de absorção óptica das nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato. A banda de absorção em 524 nm é devido à ressonância plasmônica de superfície. O insert, esquema da oscilação plasmônica de uma esfera, mostrando o deslocamento da nuvem de carga eletrônica de condução em relação ao núcleo.

também se tornaram candidatos promissores no desenho de novos biomateriais para a investigação de sistemas biológicos. AuNPs também funcionam como excelentes “quenchers” para fluoróforos proximais através da via de desativação, com base na boa sobreposição entre o espectro de emissão de fluoróforos excitados e a banda plasmônica de superfície das AuNPs [113].

Devido as propriedades químicas e físicas únicas AuNPs são usadas atualmente no desenvolvimento de tecnologias de sensores e biossensores, com o objetivo de se obter metodologias e dispositivos com melhores sensibilidade, especificidade e rapidez na detecção de moléculas ou agentes biológicos alvo, bem como sua multiplexação, miniaturização e redução de custos [114]. Além das propriedade típicas, as AuNPs possuem características que as tornam excelentes candidatas para o uso em diagnóstico, como fácil obtenção pela síntese química, com boa distribuição de tamanho, estabilidade por longo tempo, fácil funcionalização da superfície e boa biocompatibilidade, tem

resultado no seu uso bem sucedido para funcionalização de superfície para utilização em vários nano e biossensores [115].

Esse fenômeno de transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET) é observado até mesmo na presença de AuNPs de 1 nm devido as taxas de decaimento radioativo e não-radioativo de moléculas fluorescentes serem afetadas distintamente pelas nanopartículas. As AuNPs também podem atuar como receptores de elétrons para extinguir a emissão de fluorescência de fluoróforos no processo de transferência de elétrons fotoinduzida (PET). Esse processo é modulado e pode ser utilizado na fabricação de sensores.

Devido as essas possibilidades, diversos estudos estão focados no desenvolvimento de métodos para sintetizar AuNPs com modificações químicas em sua superfície, com o intuito de controlar sua forma e tamanho, e aumentar a sua afinidade com as moléculas biológicas [116].

Em 1951, Turkevich et al. [117] desenvolveram um método químico para a obtenção de AuNPs. Nesse método, o tetracloroaurato de hidrogênio (HAuCl_4) é tratado com ácido cítrico em água em ebulição. Nesse processo, o citrato atua como agente redutor e estabilizador (Figura 2.4 a). Posteriormente, foi verificado que alterações na razão entre o HAuCl_4 e o citrato permitem controlar o tamanho de partícula [118]. Esse protocolo tem sido amplamente empregado para preparar soluções de AuNPs esféricas moderadamente estáveis com diâmetros de 10 a 20 nm, embora AuNPs maiores (por exemplo, 100 nm) também possam ser preparados. Essas AuNPs estabilizadas com citrato podem sofrer agregação irreversível durante o processo de funcionalização com ligantes de tiolato, presentes em algumas biomoléculas. Várias estratégias foram desenvolvidas para superar esse problema, sendo que a principal é o uso de surfactantes incluindo o surfactante aniônico *Tween 20*. Esses surfactantes são utilizados antes da modificação para evitar a agregação (Figura 2.4 B) [119]. No entanto, a exigência de alta diluição dificulta a produção em larga escala.

Figura 2.4 Esquema representativo ilustrando os diferentes métodos para síntese de nanopartículas de ouro.

2.3.1 Funcionalização de nanopartículas de ouro

As estratégias de conjugação de biomoléculas em AuNPs dependem de múltiplos fatores, como tamanho, química da superfície e forma, além do tipo de ligantes e grupos funcionais presentes nas biomoléculas [120]. Nesse processo, as moléculas podem ser ligadas de diferentes formas à superfície das nanopartículas. As interações entre as moléculas e as AuNPs podem ser de natureza física ou química, e as ligações podem ser covalente e não-covalente. A ligação não-covalente possui várias desvantagens; que inclui a necessidade de uma alta concentração da molécula de interesse, ligação com orientação aleatória sobre a superfície das AuNPs e, devido à sua atração eletrostática, pode ser perturbada por mudanças no pH. Além disso, como a ligação é fraca, pode ocorrer a substituição por outras moléculas que possuam maior afinidade pelas AuNPs [121]. Por outro lado, por ser uma ligação mais estável, a ligação covalente permite ter um melhor controle da ligação das biomoléculas na superfície das partículas, permitindo até mesmo o controle da orientação da ligação [122]. Apesar disso, o tipo de molécula biológica e a aplicação final do conjugado nanopartículas-moléculas são cruciais na avaliação da estratégia de conjugação.

Um dos problemas associados a conjugação de biomoléculas na superfície de AuNPs é a possibilidade de agregação das partículas. Embora AuNPs recobertas com citrato possam permanecer estáveis por longo período, uma porcentagem pode agregar. Essa agregação pode ser evitada por meio do uso de ligantes poliméricos. Isso porque as cadeias poliméricas longas são capazes de evitar a agregação por meio do impedimento estérico [123]. Adicionalmente, os polímeros também atuam como agentes controladores do tamanho, forma e organização das nanopartículas.

AuNPs podem ser funcionalizadas com diferentes tipos de oligonucleotídeos, tais como em DNA, anticorpos e enzimas. A primeira bioconjugação foi reportada por Mirkin et al. [18]. Eles utilizaram a forte afinidade dos grupos tióis ou dissulfeto, presentes no DNA, com superfície das AuNPs. Nesse processo as moléculas de DNA formam ligações quase-covalentes com a superfície das AuNPs. Porém, para evitar a repulsão eletrostática entre as AuNP e os oligonucleotídeo é necessário o uso de um sal. Contudo, esse sal leva ao aumento no pH e, conseqüentemente, agregação das AuNPs. Desse modo, para manter a estabilidade das AuNPs, o sal é adicionado lentamente, levando a um longo tempo de reação, geralmente entre 24 e 48 horas. Devido ao longo tempo de reação, esse método ficou conhecido como envelhecimento do sal (*salting aging*) e se tornou um padrão na conjugação DNA na superfície de AuNPs.

A fim de reduzir o tempo necessário para a conjugação, outros métodos foram desenvolvidos [20]. Nesses métodos, o uso de condições ácidas, adição de surfactantes e agitação mecânica tem permitido reduzir o tempo necessário para conjugação para apenas 3 minuto. A estabilização por depleção de polímero em solução concentrada também foi testada como um novo mecanismo para evitar a agregação de AuNPs [124]. Outras estratégias, usam DNA modificados com espaçadores na sequência de base para minimizar a repulsão eletrostática [125].

Tais esforços de pesquisa não apenas avançaram a tecnologia, mas também permitiram entendimento fundamental sobre as propriedades coloidais da conjugação [20]. Moléculas de surfactantes são geralmente usadas para evitar a agregação das AuNPs durante a adição de sal [126]. Surfactantes de diferentes tamanhos moleculares, carga e

hidrofobicidade têm sido testados. Geralmente a adição de surfactante está associada a proteção das AuNPs por meio da estabilidade estérica. O método de pH ácido (pH = 3) fornece uma substancial aceleração na conjugação (em torno de 3 min). Entretanto, este método funciona bem apenas para moléculas modificadas com espaçador polinucleotídeo - poli-A [19]. O uso desses espaçadores tem sido sistematicamente estudado. Nesse processo, durante o desenho do oligonucleotídeo, além da sua sequência de bases natural, uma porção adicional com uma sequência e número de bases a escolha do pesquisador é inserida para interpor entre a superfície da AuNP com as bases dos oligonucleotídeos com o intuito de reduzir o efeito estérico. Além dos espaçadores polinucleotídicos, existem os espaçadores poliméricos [127]. Espaçadores poliméricos, tais como o polietilenoglicol (PEG), são efetivos para evitar o efeito estérico, e ainda promovem um aumento na quantidade de DNA conjugado [126]. Além dos surfactantes, alguns polímeros e moléculas menores também foram utilizados para evitar a agregação de AuNP. Por exemplo, a substituição de citrato por dipotássio bis (sulfonato-fenil) fenilfosfina di-hidratado foi realizada por Alivisatos et al. [128]. Eles obtiveram AuNPs de 5 nm estáveis em uma solução de NaCl (0,15 M) e $MgCl_2$ (1 mM). No entanto, partículas com 10 nm de diâmetro se tornam instáveis quando a concentração de NaCl é superior a 0,15 M. A combinação de polímeros modificados com grupos tióis com *Tween 20* foi muito efetiva em proteger AuNPs em alta concentração de NaCl (800 mM). Essa combinação permitiu que uma baixa concentração de polímero fosse suficiente a proteção estérica em AuNP com 13 nm. Além disso, a conjugação com o DNA foi realizada em 90 min [21].

Recentemente, um método que utiliza somente o congelamento das AuNPs em suspensão aquosa foi utilizado para conjugar DNA tiolado. O conjugado gerado é de alta qualidade, funcionando com diferentes sequências de DNA e em partículas com diâmetro entre 5 e 100 nm. O grande avanço nessa abordagem foi evitar a agregação irreversível que as AuNPs sofrem em temperaturas negativas [129].

Diversos métodos têm sido desenvolvidos nas últimas décadas e o processo de

funcionalização de AuNPs com biomoléculas alcançou grandes avanços. Entretanto, ainda há certas limitações nos processos existentes que ainda precisam ser contornadas, como o longo tempo para conjugação, o uso de reagentes caros, o baixo rendimento final e inativação dos oligonucleotídeos.

Capítulo 5

Considerações Finais

O uso da nanotecnologia já ganhou espaço na área biomédica, sendo que já existem produtos comercializados que utilizam nanomateriais. Muitos cientistas têm buscado aplicações de nanomateriais, incluído nanopartículas de ouro, no campo de medicina diagnóstica. O intuito é implementar novos procedimentos ou melhorar os procedimentos existentes, utilizando as características físico-químicas únicas das nanopartículas de ouro.

Neste trabalho foi desenvolvido um nanobiossistemas baseado em AuNPs capaz de detectar o microRNA tumoral miR-21. O ponto crucial no uso das AuNPs está relacionado a sua estabilidade, que pode ser facilmente perturbada, levando à agregação irreversível e, consequente, inutilização. Aqui foi utilizado mononucleotídeos de dATP e polietilenoglicol como agentes estabilizantes. O uso desses dois agentes foi capaz de estabilizar as AuNPs, mesmos em alta concentração iônica induzida por NaCl. Enquanto o PEG-SH se ligou a superfície das AuNPs de maneira forte, o dATP adsorveu fracamente e pôde ser removido da superfície por meio de calor. Essa característica facilitou a funcionalização e permitiu substituir os dATPs por moléculas de DNA projetadas para hibridizar com microRNA miR-21.

A caracterização das nanopartículas por UV-vis mostrou a banda SPR bem definida em torno de 524 nm e após as modificações o nanobiossistemas apresentou um pequeno deslocamento para 530 nm, que é indicativo da funcionalização. A análise de microscopia eletrônica mostrou uma morfologia esférica e sem agregados no nanobiossistemas, ressaltando sua estabilidade. Com isso, foi construído um nanobiossistemas capaz de detectar o miR-21 maduro. A análise do nanobiossistema por espectroscopia de fluorescência mostrou boa seletividade, sendo capaz de distinguir entre a sequência do miR-21 maduro com apenas uma base nucleotídica alterada. Foi utilizado um miR-21 sintético para testar a seletividade e sensibilidade. A partir destes testes mostrou-se que o nanobiossistemas foi capaz de distinguir o miR-21 maduro com uma e três bases alteradas. O limite de detecção calculado foi de 0,18 nM e o limite de quantificação calculado foi de 0,55 nM, com resposta linear entre 3,0 nM a 100,0 nM.

Em seguida, foi testada a capacidade de detecção de miR-21 isolado de vesículas

extracelulares de células MCF-7. O limite de detecção calculado foi de $0,74 \text{ ng}/\mu\text{L}$ e o limite de quantificação calculado foi de $2,24 \text{ ng}/\mu\text{L}$, com resposta linear entre 10 a $150 \text{ ng}/\mu\text{L}$. O LOD alcançado é semelhante ou maior do que aqueles relatados para outras abordagens que utilizam *molecular beacons* para a detecção de miRNAs. No entanto, a metodologia relatada aqui é realizada em uma única etapa de incubação (uma vez que o nanobiossistemas estiver pronto) e utiliza uma concentração muito baixa de ácido nucleico alvo e sem qualquer estratégia de amplificação. Alternativamente a detecção por fluorescência, foi realizado experimentos para detecção do miR-21 pela técnica de espectroscopia Raman.

Semelhante ao nanobiossistemas fluorescente, o nanobiosistema Raman também apresentou boa estabilidade após as modificações necessárias sobre as AuNPs, como evidenciado pelas análises de UV-Vis, DLS, MET e potencial Zeta. O reconhecimento do microRNA alvo também foi obtido, entretanto, a sensibilidade foi mais baixa quando comparada com a àquela apresentada pelo nanobiossistemas fluorescente. Esse resultado foge do observado na literatura, pois a espectroscopia SERS é relatada como sendo muito sensível na detecção de diferentes analitos. Esse resultado pode estar relacionado com o substrato utilizado, que não foi capaz amplificar o sinal Raman. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram nessa abordagem foram $6,7 \text{ nM}$ e $20,4 \text{ nM}$, respectivamente, com resposta linear no intervalo entre 40 e 80 nM para o miR-21 sintético e $214 \text{ ng}/\mu\text{L}$ e $651 \text{ ng}/\mu\text{L}$, com resposta linear no intervalo entre 100 e $500 \text{ ng}/\mu\text{L}$ para miR-21 isolado de vesículas extracelular. Assim, esse nanobiossistemas se mostrou menos adequado para uso em detecção em comparação com ao nanobiossistemas fluorescente.

Finalmente, o nanobiossistemas fluorescente foi utilizado para detecção *in vitro* nas células MCF-7. Por microscopia confocal foi possível observar a presença de fluorescência após o período de incubação e foi notável a diferença entre as células MCF-7 e MCF-10, já que as células MCF-7 são conhecidas por expressarem o miR-21 em relação as células MCF-10. Essa diferença foi analisada de maneira semi-quantitativa por meio da quantificação da intensidade fluorescente. Desse modo, conclui-se que nesse trabalho

o desenvolvimento de dois nanobiossistemas para detecção do microRNA tumoral miR-21 proveniente de vesículas extracelulares: o primeiro baseado tanto por fluorescência e o segundo na espectroscopia Raman. Ainda, o nanobiossistemas fluorescente foi capaz de detectar o miR-21 in vitro em células MCF-7, mostrando que esse nanobiossistemas pode ter dupla função, detectar por imagem direto na célula ou após o isolamento dos micro-RNAs.

Referências*

- [1] Rhea JM, Molinaro RJ. Cancer biomarkers: surviving the journey from bench to bedside. *MLO: medical laboratory observer*. 2011;43(3):10–2.
- [2] Chatterjee SK, Zetter BR. Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future. 2005;.
- [3] Hanash SM, Baik CS, Kallioniemi O. Emerging molecular biomarkers-blood-based strategies to detect and monitor cancer. *Nature reviews Clinical oncology*. 2011;8(3):142.
- [4] Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *nature*. 2005;435(7043):834.
- [5] Lee D, Choe YJ, Lee M, Jeong DH, Paik SR. Protein-Based SERS technology monitoring the chemical reactivity on an α -synuclein-mediated two-dimensional array of gold nanoparticles. *Langmuir*. 2011;27(21):12782–12787.
- [6] Chou IH, Beier HT, Wang M, Jing N, Kameoka J, Côté GL. Nanofluidic channel based biosensor using surface enhanced raman spectroscopy (SERS). In: *Ultra-sensitive and Single-Molecule Detection Technologies II*. vol. 6444. International Society for Optics and Photonics; 2007. p. 64440P.
- [7] Vendrell M, Maiti KK, Dhaliwal K, Chang YT. Surface-enhanced Raman scattering in cancer detection and imaging. *Trends in biotechnology*. 2013;31(4):249–257.
- [8] Catuogno S, Esposito CL, Quintavalle C, Cerchia L, Condorelli G, De Franciscis V. Recent advance in biosensors for microRNAs detection in cancer. *Cancers*. 2011;3(2):1877–1898.
- [9] Sieroń A, Sieroń-Stołtny K, Kawczyk-Krupka A, Latos W, Kwiatek S, Straszak D, et al. The role of fluorescence diagnosis in clinical practice. *OncoTargets and therapy*. 2013;6:977.
- [10] Hussain SA, Dey D, Chakraborty S, Saha J, Roy AD, Chakraborty S, et al. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) sensor. *arXiv preprint arXiv:14086559*. 2014;.
- [11] Chen G, Song F, Xiong X, Peng X. Fluorescent nanosensors based on fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2013;52(33):11228–11245.
- [12] Holzmeister P, Acuna GP, Grohmann D, Tinnefeld P. Breaking the concentration limit of optical single-molecule detection. *Chemical Society Reviews*. 2014;43(4):1014–1028.

* De acordo com: internacional Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Referências*

- [1] Rhea JM, Molinaro RJ. Cancer biomarkers: surviving the journey from bench to bedside. *MLO: medical laboratory observer*. 2011;43(3):10–2.
- [2] Chatterjee SK, Zetter BR. Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future. *Future Oncol*. 2005;.
- [3] Hanash SM, Baik CS, Kallioniemi O. Emerging molecular biomarkers-blood-based strategies to detect and monitor cancer. *Nature reviews Clinical oncology*. 2011;8(3):142.
- [4] Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *nature*. 2005;435(7043):834.
- [5] Lee D, Choe YJ, Lee M, Jeong DH, Paik SR. Protein-Based SERS technology monitoring the chemical reactivity on an α -synuclein-mediated two-dimensional array of gold nanoparticles. *Langmuir*. 2011;27(21):12782–12787.
- [6] Chou IH, Beier HT, Wang M, Jing N, Kameoka J, Côté GL. Nanofluidic channel based biosensor using surface enhanced raman spectroscopy (SERS). In: *Ultra-sensitive and Single-Molecule Detection Technologies II*. vol. 6444. International Society for Optics and Photonics; 2007. p. 64440P.
- [7] Vendrell M, Maiti KK, Dhaliwal K, Chang YT. Surface-enhanced Raman scattering in cancer detection and imaging. *Trends in biotechnology*. 2013;31(4):249–257.
- [8] Catuogno S, Esposito CL, Quintavalle C, Cerchia L, Condorelli G, De Franciscis V. Recent advance in biosensors for microRNAs detection in cancer. *Cancers*. 2011;3(2):1877–1898.
- [9] Sieroń A, Sieroń-Stołtny K, Kawczyk-Krupka A, Latos W, Kwiatek S, Straszak D, et al. The role of fluorescence diagnosis in clinical practice. *OncoTargets and therapy*. 2013;6:977.
- [10] Hussain SA, Dey D, Chakraborty S, Saha J, Roy AD, Chakraborty S, et al. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) sensor. *arXiv preprint arXiv:14086559*. 2014;.
- [11] Chen G, Song F, Xiong X, Peng X. Fluorescent nanosensors based on fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2013;52(33):11228–11245.
- [12] Holzmeister P, Acuna GP, Grohmann D, Tinnefeld P. Breaking the concentration limit of optical single-molecule detection. *Chemical Society Reviews*. 2014;43(4):1014–1028.

* De acordo com: internacional Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

- [13] Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids-the mix of hormones and biomarkers. *Nature reviews Clinical oncology*. 2011;8(8):467.
- [14] Cho TJ, Hackley VA. Assessing the chemical and colloidal stability of functionalized gold nanoparticles. *NIST Special Publication*. 2018;1200:26.
- [15] Feng YH, Tsao CJ. Emerging role of microRNA-21 in cancer. *Biomedical reports*. 2016;5(4):395–402.
- [16] Cutler JL, Auyeung E, Mirkin CA. Spherical nucleic acids. *Journal of the American Chemical Society*. 2012;134(3):1376–1391.
- [17] Ray PC, Darbha GK, Ray A, Walker J, Hardy W. Gold nanoparticle based FRET for DNA detection. *Plasmonics*. 2007;2(4):173–183.
- [18] Mirkin CA, Letsinger RL, Mucic RC, Storhoff JJ. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*. 1996;382(6592):607.
- [19] Huang Z, Liu B, Liu J. Parallel polyadenine duplex formation at low pH facilitates DNA conjugation onto gold nanoparticles. *Langmuir*. 2016;32(45):11986–11992.
- [20] Liu B, Liu J. Methods for preparing DNA-functionalized gold nanoparticles, a key reagent of bioanalytical chemistry. *Analytical Methods*. 2017;9(18):2633–2643.
- [21] Li J, Zhu B, Yao X, Zhang Y, Zhu Z, Tu S, et al. Synergetic approach for simple and rapid conjugation of gold nanoparticles with oligonucleotides. *ACS applied materials & interfaces*. 2014;6(19):16800–16807.
- [22] Abell JL, Garren JM, Driskell JD, Tripp RA, Zhao Y. Label-free detection of micro-RNA hybridization using surface-enhanced Raman spectroscopy and least-squares analysis. *Journal of the American Chemical Society*. 2012;134(31):12889–12892.
- [23] Driskell JD, Primera-Pedrozo OM, Dluhy RA, Zhao Y, Tripp RA. Quantitative surface-enhanced Raman spectroscopy based analysis of microRNA mixtures. *Applied spectroscopy*. 2009;63(10):1107–1114.
- [24] Driskell J, Seto A, Jones L, Jokela S, Dluhy R, Zhao YP, et al. Rapid microRNA (miRNA) detection and classification via surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). *Biosensors and Bioelectronics*. 2008;24(4):917–922.
- [25] Carmichael J, Hayashi C, Huang X, Liu L, Lu Y, Krasnoslobodtsev A, et al. Label-free characterization of exosome via surface enhanced Raman spectroscopy for the early detection of pancreatic cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2019;16:88–96.
- [26] Yarbakht M, Nikkhah M, Moshaii A, Weber K, Matthäus C, Cialla-May D, et al. Simultaneous isolation and detection of single breast cancer cells using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Talanta*. 2018;186:44–52.

- [27] Vargas-Obieta E, Martínez-Espinosa JC, Martínez-Zerega BE, Jave-Suárez LF, Aguilar-Lemarroy A, González-Solís JL. Breast cancer detection based on serum sample surface enhanced Raman spectroscopy. *Lasers in medical science*. 2016;31(7):1317–1324.
- [28] Lee JU, Kim WH, Lee HS, Park KH, Sim SJ. Quantitative and Specific Detection of Exosomal miRNAs for Accurate Diagnosis of Breast Cancer Using a Surface-Enhanced Raman Scattering Sensor Based on Plasmonic Head-Flocked Gold Nanopillars. *Small*. 2019;15(17):1804968.
- [29] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136(4):642–655.
- [30] Burenina O, Oretskaya T, Kubareva E. Non-coding RNAs as transcriptional regulators in eukaryotes. *Acta Naturae*. 2017;9(4 (34)).
- [31] Trzybulska D, Vergadi E, Tsatsanis C. miRNA and other non-coding RNAs as promising diagnostic markers. *Ejifcc*. 2018;29(3):221.
- [32] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *cell*. 2005;120(1):15–20.
- [33] Brennecke J, Cohen SM. Towards a complete description of the microRNA complement of animal genomes. *Genome biology*. 2003;4(9):228.
- [34] Dostie J, Mourelatos Z, Yang M, Sharma A, Dreyfuss G. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *Rna*. 2003;9(2):180–186.
- [35] Ioshikhes I, Roy S, Sen CK. Algorithms for mapping of mRNA targets for microRNA. *DNA and cell biology*. 2007;26(4):265–272.
- [36] Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA. The Drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Current Biology*. 2003;13(9):790–795.
- [37] Lin SL, Miller JD, Ying SY. Intronic microRNA (miRNA). *BioMed Research International*. 2006;2006.
- [38] Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *science*. 2001;294(5543):862–864.
- [39] Galatenko VV, Galatenko AV, Samatov TR, Turchinovich AA, Shkurnikov MY, Makarova JA, et al. Comprehensive network of miRNA-induced intergenic interactions and a biological role of its core in cancer. *Scientific reports*. 2018;8(1):2418.
- [40] França GS, Vibranovski MD, Galante PA. Host gene constraints and genomic context impact the expression and evolution of human microRNAs. *Nature communications*. 2016;7:11438.
- [41] Hinske LC, Franca GS, Torres HA, Ohara DT, Lopes-Ramos CM, Heyn J, et al. miRIAD-integrating microRNA inter-and intragenic data. *Database*. 2014;2014.

- [42] Schanen BC, Li X. Transcriptional regulation of mammalian miRNA genes. *Genomics*. 2011;97(1):1–6.
- [43] Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(5):376.
- [44] Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *cell*. 2006;125(5):887–901.
- [45] Bohnsack MT, Czaplinski K, GÖRLICH D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna*. 2004;10(2):185–191.
- [46] Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(2):126.
- [47] Krützfeldt J, Poy MN, Stoffel M. Strategies to determine the biological function of microRNAs. *Nature genetics*. 2006;38(6s):S14.
- [48] O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in endocrinology*. 2018;9:402.
- [49] Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*. 2005;123(4):621–629.
- [50] Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes & development*. 2003;17(1):49–63.
- [51] Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Molecular cell*. 2002;9(6):1327–1333.
- [52] Gebauer F, Hentze MW. Molecular mechanisms of translational control. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2004;5(10):827.
- [53] Hsu SD, Chu CH, Tsou AP, Chen SJ, Chen HC, Hsu PWC, et al. miRNAmap 2.0: genomic maps of microRNAs in metazoan genomes. *Nucleic acids research*. 2007;36(suppl_1):D165–D169.
- [54] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(30):10513–10518.
- [55] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(9):2999–3004.
- [56] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*. 2011;144(5):646–674.
- [57] Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *American journal of cancer research*. 2017;7(5):1016.

- [58] Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends in molecular medicine*. 2006;12(12):580–587.
- [59] Svoronos AA, Engelman DM, Slack FJ. OncomiR or tumor suppressor? The duplicity of microRNAs in cancer. *Cancer research*. 2016;76(13):3666–3670.
- [60] Rupaimoole R, Calin GA, Lopez-Berestein G, Sood AK. miRNA deregulation in cancer cells and the tumor microenvironment. *Cancer discovery*. 2016;6(3):235–246.
- [61] Iftikhar H, Carney GE. Evidence and potential in vivo functions for biofluid miRNAs: From expression profiling to functional testing: Potential roles of extracellular miRNAs as indicators of physiological change and as agents of intercellular information exchange. *Bioessays*. 2016;38(4):367–378.
- [62] Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvald JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*. 2007;9(6):654.
- [63] Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PloS one*. 2008;3(11):e3694.
- [64] Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(12):5003–5008.
- [65] Okada H, Kohanbash G, Lotze MT. MicroRNAs in immune regulation-opportunities for cancer immunotherapy. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2010;42(8):1256–1261.
- [66] Skog J, Würdinger T, Van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Curry Jr WT, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology*. 2008;10(12):1470.
- [67] Diehl P, Fricke A, Sander L, Stamm J, Bassler N, Htun N, et al. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovascular research*. 2012;93(4):633–644.
- [68] Dvinge H, Git A, Gräf S, Salmon-Divon M, Curtis C, Sottoriva A, et al. The shaping and functional consequences of the microRNA landscape in breast cancer. *Nature*. 2013;497(7449):378.
- [69] Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(2):1026–1033.
- [70] Allen-Rhoades W, Yustein JT. Detection of plasma MicroRNA signature in osteosarcoma patients. In: *MicroRNA and Cancer*. Springer; 2018. p. 113–118.

- [71] Chang YY, Lai LC, Tsai MH, Chuang EY. Deep sequencing reveals a MicroRNA expression signature in triple-negative breast cancer. In: *MicroRNA and Cancer*. Springer; 2018. p. 99–111.
- [72] Bell A, Bell D, Chakravarti N, Ma J, Henton N, Prieto VG. Detection of a MicroRNA molecular signature of ultraviolet radiation in the superficial regions of melanocytic nevi on sun-exposed skin. *Modern Pathology*. 2018;31(11):1744–1755.
- [73] Yoshimura A, Sawada K, Nakamura K, Kinose Y, Nakatsuka E, Kobayashi M, et al. Exosomal miR-99a-5p is elevated in sera of ovarian cancer patients and promotes cancer cell invasion by increasing fibronectin and vitronectin expression in neighboring peritoneal mesothelial cells. *BMC cancer*. 2018;18(1):1–13.
- [74] Yu C, Xing F, Zhang J, Xu J, Li Y. A combination of mRNA expression profile and miRNA expression profile identifies detection biomarkers in different tumor stages of laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(21):7296–7304.
- [75] Huang GL, Zhang XH, Guo GL, Huang KT, Yang KY, Shen X, et al. Clinical significance of miR-21 expression in breast cancer: SYBR-Green I-based real-time RT-PCR study of invasive ductal carcinoma. *Oncology reports*. 2009;21(3):673–679.
- [76] Huang Y, Zou Q, Wang SP, Tang SM, Zhang GZ, Shen XJ. The discovery approaches and detection methods of microRNAs. *Molecular biology reports*. 2011;38(6):4125–4135.
- [77] de Planell-Saguer M, Rodicio MC. Detection methods for microRNAs in clinic practice. *Clinical biochemistry*. 2013;46(10-11):869–878.
- [78] Várallyay É, Burgyán J, Havelda Z. MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. *Nature protocols*. 2008;3(2):190.
- [79] Li W, Ruan K. MicroRNA detection by microarray. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2009;394(4):1117–1124.
- [80] Mohammadi-Yeganeh S, Paryan M, Samiee SM, Soleimani M, Arefian E, Azadmash K, et al. Development of a robust, low cost stem-loop real-time quantification PCR technique for miRNA expression analysis. *Molecular biology reports*. 2013;40(5):3665–3674.
- [81] Wang Z, Yang B. *MicroRNA expression detection methods*. Springer; 2009.
- [82] Johnson BN, Mutharasan R. Biosensor-based microRNA detection: techniques, design, performance, and challenges. *Analyst*. 2014;139(7):1576–1588.
- [83] Quesne JL, Jones J, Warren J, Dawson SJ, Ali HR, Bardwell H, et al. Biological and prognostic associations of miR-205 and let-7b in breast cancer revealed by in situ hybridization analysis of micro-RNA expression in arrays of archival tumour tissue. *The Journal of pathology*. 2012;227(3):306–314.
- [84] Válóczy A, Hornyik C, Varga N, Burgyán J, Kauppinen S, Havelda Z. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic acids research*. 2004;32(22):e175–e175.

- [85] Schwarzkopf M, Pierce NA. Multiplexed miRNA northern blots via hybridization chain reaction. *Nucleic acids research*. 2016;44(15):e129–e129.
- [86] Gan YB, Zhou ZJ, An LJ, Bao SJ, Forde BG. A comparison between northern blotting and quantitative real-time PCR as a means of detecting the nutritional regulation of genes expressed in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Agricultural Sciences in China*. 2011;10(3):335–342.
- [87] Czimmerer Z, Hulvely J, Simandi Z, Varallyay E, Havelda Z, Szabo E, et al. A versatile method to design stem-loop primer-based quantitative PCR assays for detecting small regulatory RNA molecules. *PLoS One*. 2013;8(1):e55168.
- [88] Niu Y, Zhang L, Qiu H, Wu Y, Wang Z, Zai Y, et al. An improved method for detecting circulating microRNAs with S-Poly (T) Plus real-time PCR. *Scientific reports*. 2015;5:15100.
- [89] Raymond CK, Roberts BS, Garrett-Engle P, Lim LP, Johnson JM. Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs. *Rna*. 2005;11(11):1737–1744.
- [90] Benes V, Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods*. 2010;50(4):244–249.
- [91] Cissell KA, Deo SK. Trends in microRNA detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2009;394(4):1109–1116.
- [92] Wang B, Xi Y. Challenges for microRNA microarray data analysis. *Microarrays*. 2013;2(2):34–50.
- [93] Wang Y, Yan B, Chen L. SERS tags: novel optical nanoprobe for bioanalysis. *Chemical reviews*. 2012;113(3):1391–1428.
- [94] Lindberg HK, Falck GCM, Suhonen S, Vippola M, Vanhala E, Catalán J, et al. Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells in vitro. *Toxicology letters*. 2009;186(3):166–173.
- [95] Cheng HW, Luo WQ, Wen GL, Huan SY, Shen GL, Yu RQ. Surface-enhanced Raman scattering based detection of bacterial biomarker and potential surface reaction species. *Analyst*. 2010;135(11):2993–3001.
- [96] Fang S, Lee HJ, Wark AW, Corn RM. Attomole microarray detection of microRNAs by nanoparticle-amplified SPR imaging measurements of surface polyadenylation reactions. *Journal of the American Chemical Society*. 2006;128(43):14044–14046.
- [97] Cao YC, Jin R, Mirkin CA. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science*. 2002;297(5586):1536–1540.
- [98] Ramos AP, Cruz MA, Tovani CB, Ciancaglini P. Biomedical applications of nanotechnology. *Biophysical reviews*. 2017;9(2):79–89.
- [99] Khan H, Sakharkar M, Nayak A, Kishore U, Khan A. Nanoparticles for biomedical applications: An overview. In: *Nanobiomaterials*. Elsevier; 2018. p. 357–384.

- [100] Rajendran P, Kaufmann S, Vörös J, Zenobi-Wong M, Demkó L. Femtomolar oligonucleotide detection by a one-step gold nanoparticle-based assay. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015;135:193–200.
- [101] Govindaraju S, Rengaraj A, Arivazhagan R, Huh YS, Yun K. Curcumin-conjugated gold clusters for bioimaging and anticancer applications. *Bioconjugate chemistry*. 2018;29(2):363–370.
- [102] Ghalandari B, Asadollahi K, Shakerizadeh A, Komeili A, Riazi G, Kamrava SK, et al. Microtubule network as a potential candidate for targeting by gold nanoparticle-assisted photothermal therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2019;192:131–140.
- [103] Samadian H, Hosseini-Nami S, Kamrava SK, Ghaznavi H, Shakeri-Zadeh A. Folate-conjugated gold nanoparticle as a new nanoplatform for targeted cancer therapy. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2016;142(11):2217–2229.
- [104] Thambiraj S, Hema S, Shankaran DR. An overview on applications of gold nanoparticle for early diagnosis and targeted drug delivery to prostate cancer. *Recent patents on nanotechnology*. 2018;12(2):110–131.
- [105] Sau TK, Rogach AL, Jäckel F, Klar TA, Feldmann J. Properties and applications of colloidal nonspherical noble metal nanoparticles. *Advanced Materials*. 2010;22(16):1805–1825.
- [106] Hu M, Chen J, Li ZY, Au L, Hartland GV, Li X, et al. Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. *Chemical Society Reviews*. 2006;35(11):1084–1094.
- [107] Khlebtsov N, Dykman L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. *Chemical Society Reviews*. 2011;40(3):1647–1671.
- [108] Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Molecular cell*. 2002;9(6):1327–1333.
- [109] Mie G. A contribution to the optics of turbid media, especially colloidal metallic suspensions. *Ann Phys*. 1908;25(4):377–445.
- [110] Toderas F, Baia M, Maniu D, Astilean S. Tuning the plasmon resonances of gold nanoparticles by controlling their size and shape. *Journal of optoelectronics and advanced materials*. 2008;10(9):2282–2284.
- [111] Su KH, Wei QH, Zhang X, Mock J, Smith DR, Schultz S. Interparticle coupling effects on plasmon resonances of nanogold particles. *Nano letters*. 2003;3(8):1087–1090.
- [112] Malekzad H, Zangabad PS, Mirshekari H, Karimi M, Hamblin MR. Noble metal nanoparticles in biosensors: recent studies and applications. *Nanotechnology reviews*. 2017;6(3):301–329.

- [113] Pons T, Medintz IL, Sapsford KE, Higashiya S, Grimes AF, English DS, et al. On the quenching of semiconductor quantum dot photoluminescence by proximal gold nanoparticles. *Nano letters*. 2007;7(10):3157–3164.
- [114] Elkodous MA, El Sayyad GS, Abdelrahman IY, El Bastawisy HS, Mohamed AE, Mosallam FM, et al. Therapeutic and diagnostic potential of nanomaterials for enhanced biomedical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019;.
- [115] Zhang Y, Wang G, Yang L, Wang F, Liu A. Recent advances in gold nanostructures based biosensing and bioimaging. *Coordination Chemistry Reviews*. 2018;370:1–21.
- [116] Tiwari P, Vig K, Dennis V, Singh S. Functionalized gold nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomaterials*. 2011;1(1):31–63.
- [117] Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*. 1951;11:55–75.
- [118] Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature physical science*. 1973;241(105):20.
- [119] Aslan K, Pérez-Luna VH. Surface modification of colloidal gold by chemisorption of alkanethiols in the presence of a nonionic surfactant. *Langmuir*. 2002;18(16):6059–6065.
- [120] Ma N, Ma C, Li C, Wang T, Tang Y, Wang H, et al. Influence of nanoparticle shape, size, and surface functionalization on cellular uptake. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2013;13(10):6485–6498.
- [121] Kumar S, Aaron J, Sokolov K. Directional conjugation of antibodies to nanoparticles for synthesis of multiplexed optical contrast agents with both delivery and targeting moieties. *Nature protocols*. 2008;3(2):314.
- [122] Ciaurriz P, Fernández F, Tellechea E, Moran JF, Asensio AC. Comparison of four functionalization methods of gold nanoparticles for enhancing the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Beilstein journal of nanotechnology*. 2017;8(1):244–253.
- [123] Muddineti OS, Ghosh B, Biswas S. Current trends in using polymer coated gold nanoparticles for cancer therapy. *International journal of pharmaceutics*. 2015;484(1-2):252–267.
- [124] Kim S, Hyun K, Moon JY, Clasen C, Ahn KH. Depletion stabilization in nanoparticle–polymer suspensions: multi-length-scale analysis of microstructure. *Langmuir*. 2015;31(6):1892–1900.
- [125] Milton JA, Patole S, Yin H, Xiao Q, Brown T, Melvin T. Efficient self-assembly of DNA-functionalized fluorophores and gold nanoparticles with DNA functionalized silicon surfaces: the effect of oligomer spacers. *Nucleic acids research*. 2013;41(7):e80–e80.

- [126] Hurst SJ, Lytton-Jean AK, Mirkin CA. Maximizing DNA loading on a range of gold nanoparticle sizes. *Analytical chemistry*. 2006;78(24):8313–8318.
- [127] Gill R, Göeken K, Subramaniam V. Fast, single-step, and surfactant-free oligonucleotide modification of gold nanoparticles using DNA with a positively charged tail. *Chemical communications*. 2013;49(97):11400–11402.
- [128] Loweth CJ, Caldwell WB, Peng X, Alivisatos AP, Schultz PG. DNA-based assembly of gold nanocrystals. *Angewandte Chemie International Edition*. 1999;38(12):1808–1812.
- [129] Liu B, Liu J. Freezing directed construction of bio/nano interfaces: reagentless conjugation, denser spherical nucleic acids, and better nanoflares. *Journal of the American Chemical Society*. 2017;139(28):9471–9474.
- [130] Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006;110(32):15700–15707.
- [131] Brooks SC, Locke ER, Soule HD. Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *Journal of Biological Chemistry*. 1973;248(17):6251–6253.
- [132] Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Peterson WD, Brenz R, McGrath CM, et al. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer research*. 1990;50(18):6075–6086.
- [133] Bell SE, McCourt MR. SERS enhancement by aggregated Au colloids: effect of particle size. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2009;11(34):7455–7462.
- [134] Oliveira JP, Prado AR, Keijok WJ, Ribeiro MR, Pontes MJ, Nogueira BV, et al. A helpful method for controlled synthesis of monodisperse gold nanoparticles through response surface modeling. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017;.
- [135] Skoog DA, West DM, Holler FJ. *Fundamentos de química analítica*. vol. 2. Reverté; 1997.
- [136] Al-Johani H, Abou-Hamad E, Jedidi A, Widdifield CM, Viger-Gravel J, Sangaru SS, et al. The structure and binding mode of citrate in the stabilization of gold nanoparticles. *Nature chemistry*. 2017;9(9):890.
- [137] Njoki PN, Lim IIS, Mott D, Park HY, Khan B, Mishra S, et al. Size correlation of optical and spectroscopic properties for gold nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2007;111(40):14664–14669.
- [138] Storhoff JJ, Elghanian R, Mirkin CA, Letsinger RL. Sequence-dependent stability of DNA-modified gold nanoparticles. *Langmuir*. 2002;18(17):6666–6670.
- [139] Zhao W, Lin L, Hsing IM. Rapid synthesis of DNA-functionalized gold nanoparticles in salt solution using mononucleotide-mediated conjugation. *Bioconjugate chemistry*. 2009;20(6):1218–1222.

- [140] Campuzano S, Torrente-Rodríguez RM, López-Hernández E, Conzuelo F, Grana-dos R, Sánchez-Puelles JM, et al. Magnetobiosensors based on viral protein p19 for microRNA determination in cancer cells and tissues. *Angewandte Chemie International Edition*. 2014;53(24):6168–6171.
- [141] Li C, Liu Z, Cai S, Wen F, Wu D, Liu Y, et al. An electrochemical microRNA biosensor based on protein p19 combining an acridone derivate as indicator and DNA concatamers for signal amplification. *Electrochemistry Communications*. 2015;60:185–189.
- [142] Vargas E, Torrente-Rodríguez R, Ruiz-Valdepeñas Montiel V, Povedano E, Pedrero M, Montoya J, et al. Magnetic beads-based sensor with tailored sensitivity for rapid and single-step amperometric determination of miRNAs. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(11):2151.
- [143] Torrente-Rodríguez R, Campuzano S, Montiel VRV, Montoya J, Pingarrón J. Sen-sitive electrochemical determination of miRNAs based on a sandwich assay onto magnetic microcarriers and hybridization chain reaction amplification. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016;86:516–521.
- [144] Zhang J, Wu DZ, Cai SX, Chen M, Xia YK, Wu F, et al. An immobilization-free electrochemical impedance biosensor based on duplex-specific nuclease assisted target recycling for amplified detection of microRNA. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016;75:452–457.
- [145] Kilic T, Erdem A, Ozsoz M, Carrara S. microRNA biosensors: opportunities and challenges among conventional and commercially available techniques. *Biosen-sors and Bioelectronics*. 2018;99:525–546.
- [146] Git A, Dvinge H, Salmon-Divon M, Osborne M, Kutter C, Hadfield J, et al. Sys-tematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *Rna*. 2010;16(5):991–1006.
- [147] Yu Y, Chen Z, Shi L, Yang F, Pan J, Zhang B, et al. Ultrasensitive electroche-mical detection of microRNA based on an arched probe mediated isothermal exponential amplification. *Analytical chemistry*. 2014;86(16):8200–8205.
- [148] Boriachek K, Umer M, Islam MN, Gopalan V, Lam AK, Nguyen NT, et al. An amplification-free electrochemical detection of exosomal miRNA-21 in serum samples. *Analyst*. 2018;143(7):1662–1669.
- [149] Zhang H, Hiratani M, Nagaoka K, Kawano R. MicroRNA detection at femto-molar concentrations with isothermal amplification and a biological nanopore. *Nanoscale*. 2017;9(42):16124–16127.
- [150] Borghei YS, Hosseini M. An approach toward miRNA detection via different thermo-responsive aggregation/disaggregation of CdTe quantum dots. *RSC advances*. 2018;8(53):30148–30154.
- [151] Ying N, Sun T, Chen Z, Song G, Qi B, Bu S, et al. Colorimetric detection of mi-croRNA based hybridization chain reaction for signal amplification and enzyme for visualization. *Analytical biochemistry*. 2017;528:7–12.

- [152] Ma C, Liu H, Wu K, Chen M, Zheng L, Wang J. An exonuclease I-based quencher-free fluorescent method using DNA hairpin probes for rapid detection of microRNA. *Sensors*. 2017;17(4):760.
- [153] Chinen AB, Guan CM, Ferrer JR, Barnaby SN, Merkel TJ, Mirkin CA. Nanoparticle probes for the detection of cancer biomarkers, cells, and tissues by fluorescence. *Chemical reviews*. 2015;115(19):10530–10574.
- [154] Seferos DS, Giljohann DA, Hill HD, Prigodich AE, Mirkin CA. Nano-flares: probes for transfection and mRNA detection in living cells. *Journal of the American Chemical Society*. 2007;129(50):15477–15479.
- [155] Keshavarzi M, Sorayayi S, Jafar Rezaei M, Mohammadi M, Ghaderi A, Rostamzadeh A, et al. MicroRNAs-based imaging techniques in cancer diagnosis and therapy. *Journal of cellular biochemistry*. 2017;118(12):4121–4128.
- [156] Yang Y, Huang J, Yang X, Quan K, Wang H, Ying L, et al. Aptazyme–gold nanoparticle sensor for amplified molecular probing in living cells. *Analytical chemistry*. 2016;88(11):5981–5987.
- [157] Yang Y, Huang J, Yang X, Quan K, Xie N, Ou M, et al. Aptamer-based FRET nanoflares for imaging potassium ions in living cells. *Chemical Communications*. 2016;52(76):11386–11389.
- [158] Liu J, Cui M, Zhou H, Yang W. DNzyme based nanomachine for in situ detection of microRNA in living cells. *ACS sensors*. 2017;2(12):1847–1853.
- [159] Yang Y, Zhong S, Wang K, Huang J. Gold nanoparticle based fluorescent oligonucleotide probes for imaging and therapy in living systems. *Analyst*. 2019;144(4):1052–1072.
- [160] Guven B, Dudak FC, Boyaci IH, Tamer U, Ozsoz M. SERS-based direct and sandwich assay methods for mir-21 detection. *Analyst*. 2014;139(5):1141–1147.
- [161] Wang HN, Crawford BM, Fales AM, Bowie ML, Seewaldt VL, Vo-Dinh T. Multiplexed detection of microRNA biomarkers using SERS-based inverse molecular sentinel (iMS) nanoprobe. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2016;120(37):21047–21055.
- [162] Song C, Yang Y, Yang B, Sun Y, Zhao Y, Wang L. An ultrasensitive SERS sensor for simultaneous detection of multiple cancer-related miRNAs. *Nanoscale*. 2016;8(39):17365–17373.
- [163] Wabuyele MB, Vo-Dinh T. Detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA sequence using plasmonics nanoprobe. *Analytical chemistry*. 2005;77(23):7810–7815.
- [164] Wang Z, Zong S, Wang Z, Wu L, Chen P, Yun B, et al. Microfluidic chip based micro RNA detection through the combination of fluorescence and surface enhanced Raman scattering techniques. *Nanotechnology*. 2017;28(10):105501.

- [165] Tian S, Neumann O, McClain MJ, Yang X, Zhou L, Zhang C, et al. Aluminum nanocrystals: A sustainable substrate for quantitative SERS-based DNA detection. *Nano letters*. 2017;17(8):5071–5077.
- [166] Mosier-Boss P. Review of SERS substrates for chemical sensing. *Nanomaterials*. 2017;7(6):142.
- [167] Dutta SB, Shrivastava R, Krishna H, Khan KM, Gupta S, Majumder SK. Nanotrap-Enhanced Raman Spectroscopy: An Efficient Technique for Trace Detection of Bioanalytes. *Analytical chemistry*. 2019;91(5):3555–3560.