



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**3D Cell-SELEX: seleção e caracterização *in vitro* de aptâmeros de
RNA ligantes específicos às células tumorais prostáticas**

Aluno (a): Aline Gomes de Souza

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Vivian Alonso Goulart

Co-orientador (a): Dr.^a Karina Marangoni

UBERLÂNDIA - MG
2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

3D Cell-SELEX: seleção e caracterização *in vitro* de aptâmeros de RNA ligantes específicos às células tumorais prostáticas

Aluno (a): Aline Gomes de Souza

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Vivian Alonso Goulart

Co-orientador (a): Dr.^a Karina Marangoni

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Genética
e Bioquímica (Área:
Genética)

UBERLÂNDIA – MG
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S729t
2015 Souza, Aline Gomes de, 1989-
3D cell-selex: seleção e caracterização in vitro de aptâmeros de
RNA ligantes específicos às células tumorais prostáticas / Aline Gomes
de Souza. - 2015.
65 f. : il.

Orientadora: Vivian Alonso Goulart.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. Câncer - Próstata - Teses. 3. Sequência de
nucleotídeos - Teses. 4. Cultura de células - Técnica - Teses. I.
Goulart, Vivian Alonso. II. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

3D Cell-SELEX: seleção e caracterização *in vitro* de aptâmeros de RNA ligantes específicos às células tumorais prostáticas

ALUNA: Aline Gomes de Souza

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof.^a Dr.^a Vivian Alonso Goulart (Orientadora)

Examinadores:

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

Prof. Dr. João Bosco Pesquero

Data da Defesa: 31 /07/2015

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas.

Prof.^a Dr.^a Vivian Alonso Goulart

*Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de
água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.*

(Madre Teresa de Calcutá)

Agradecimentos

“.... Hoje é inviável pronunciar meu nome sem identificar nele muitos outros nomes...”

Em primeiro lugar agradeço a Deus que sempre esteve comigo, sabendo dos meus medos, fortalecendo meus sonhos, vigiando meus passos. E por me cercar de pessoas tão queridas e fundamentais em minha vida:

Em especial meus pais, José e Rita, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, que sempre me incentivaram a alcançar caminhos cada vez mais distantes. Meus irmãos pela paciência, carinho e incentivo.

À orientadora Prof.^a Dr.^a Vivian Alonso Goulart expresso a mais profunda gratidão pela valiosa oportunidade, compreensão, estímulo, carinho e atenção em cada passo deste trabalho.

À co-orientadora Dr.^a Karina Marangoni (*Mamis*) por ter contribuído substancialmente neste trabalho, desde a realização de experimentos até trocas de ideias e “*rabiscos*” em papel, sempre grande fonte de inspiração. Por ter participado ativamente na minha evolução. Pela compreensão, carinho, brincadeiras e, principalmente pela confiança. Obrigada pela parceria!

Patrícia Tieme minha ‘*co-coorientadora*’ sempre tão carinhosa e paciente. Agradeço pelos conselhos, pela preocupação, amizade e disposição em me ajudar sempre.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart pela oportunidade no laboratório de Nanobiotecnologia-UFU e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À Bruna França (*sister*), Mayara Ingrid (*tia shay*) e Patrícia Terra (*agregadinha*) pelos conselhos, ideias e brincadeiras. Pela alegria e amizade de todos os dias.

A Ana Carolina Dias, Anelise Mendonça, Cássio Resende, Diane Rassi, Emília Rezende, Isis Custódio, Izabella Cristina, Hebréia Oliveira e Roberta Rosa pelas conversas, brincadeiras, conselhos e amizade construída.

Aos velhos amigos da graduação em Biotecnologia que novamente estiveram presentes em mais esta etapa da minha vida: Jéssica Regina, pela imensa ajuda no quesito informática, mas, sobretudo pelo carinho, amizade e paciência. Victor Alexandre, pelas dicas de como manter um texto sinérgico, mas também pela amizade e brincadeiras. E a Mariana Carrijo pelo carinho e amizade de todos os dias.

A todos os integrantes do laboratório de Nanobiotecnologia –UFU que sem dúvida foram, de igual forma, grandes exemplos para mim, contribuindo diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Agradeço também aos atuais integrantes e também àqueles que já passaram pelo Grupo de Estudos em Células Tronco, coordenado

pela Prof.^a Dr.^a Vivian Alonso, fonte de boas conversas e aprendizado.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica e a Universidade Federal de Uberlândia pelo ensino e pesquisa de qualidade.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro durante o desenvolvimento do Projeto.

E a todos aqueles que estiveram presentes nesta caminha, com certeza ela não seria a mesma sem vocês.

SUMÁRIO

| | Pág. |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS E TABELAS | x |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xi |
| APRESENTAÇÃO | 1 |
| Capítulo I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | |
| 1. Aspectos Biológicos da Glândula Prostática | 5 |
| 1.1. Caracterização Celular da Próstata | 7 |
| 1.2. Doenças da Próstata | 10 |
| 1.3. Epidemiologia do Câncer de Próstata | 13 |
| 1.4. Aspectos moleculares do CaP | 14 |
| 2. SELEX – A técnica | 14 |
| 2.1. Cell-SELEX | 16 |
| 3. Cultura Celular Tridimensional | 19 |
| Referências bibliográficas | 24 |

Capítulo II: 3D Cell-SELEX: Screening and characterization of a novel RNA baptamer that specifically binds to human prostate cancer cells

| | |
|---|----|
| Resumo | 30 |
| 1. Introduction | 32 |
| 2. Materials and Methods | 33 |
| 2.1. 2D-Culture | 33 |
| 2.2. Magnetic Cell Levitation | 34 |
| 2.3. RNA Library Construction | 34 |
| 2.4. 3D Cell-SELEX Procedure | 35 |
| 2.5. The Recovering of RNA Library | 36 |
| 2.6. Cloning and Sequencing | 36 |
| 2.7. Evaluation of Aptamers Sequences | 36 |
| 3. Results | 37 |
| 3.1. Evaluation of Selection Rounds | 37 |
| 3.2. Analysis of Aptamers Sequences | 37 |
| 4. Discussion | 38 |

| | |
|-------------------------|----|
| 5. Conclusion | 41 |
| Acknowledgments | 41 |
| References | 42 |
| Figures and Tables..... | 46 |

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Capítulo I

| | |
|---|----|
| Figura 1: Localização da glândula prostática | 5 |
| Figura 2: Os cinco estágios do desenvolvimento da próstata..... | 6 |
| Figura 3: Divisão anatômica da próstata | 7 |
| Figura 4: Esquema da glândula prostática | 8 |
| Figura 5: Classificação <i>score Gleason</i> | 12 |
| Figura 6: Morfologia e microambiente de células em 3D..... | 21 |
| Figura 7: Esquema representativo para formação da cultura 3D por MLM. | 23 |

Capítulo II

| | |
|--|----|
| Fig 1: Cell Culture by MLM.. | 46 |
| Fig 2: Schematic representation of the 3D cell-based aptamer selection.. | 47 |
| Fig 3: Cell lines 3D structure formation..... | 48 |
| Fig 4: Evaluation of the library in the selection..... | 49 |
| Fig 5: Predicted aptamer secondary structures. | 50 |
| Fig 6: Motifs frequency. | 51 |
| Fig 7: Sequences analysis of the two best aptamers. | 52 |
| Fig 8: Representative model of cellular structure and possible interactions between cell surface receptors and aptamers. | 53 |
| Table 1: Sequences selected aptamers with the motifs regions in bold. | 54 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------|---|
| % | porcentagem |
| μl | microlitro |
| CaP | câncer de próstata |
| CCR | câncer de cólon retal |
| cDNA | ácido desoxirribonucléico complementar |
| CSC | <i>cancer stem cell</i> |
| DNA | ácido desoxirribonucléico |
| HGF | factor de crescimento de hepatócitos |
| HPB | hiperplasia prostática benigna |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| mg | miligrama |
| MgCl₂ | cloreto de magnésio |
| mL | mililitro |
| MLM | magnetic levitation method |
| NaCl | cloreto de sódio |
| ng | nanogramas |
| NE | células neuroendócrinas |
| PAP | fosfatase ácida prostática |
| PCR | reação em cadeia da polimerase |
| Pmoles | picomoles |
| PSA | antígeno prostático específico |
| RNA | ácido ribonucléico |

| | |
|--------------|---|
| SELEX | <i>Systematic Evolution of Ligants by EXponential enrichment</i> |
| TAC | células de amplificação transitória |
| Taq | <i>thermus aquatics</i> |
| UGS | seio urogenital |

APRESENTAÇÃO

O Instituto Nacional do Câncer aponta para o ano de 2015 uma ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer. Deste total, aproximadamente 69 mil casos são de câncer de próstata (CaP). Na última estimativa mundial realizada no ano de 2012 o CaP foi o segundo tipo de câncer mais frequente na população masculina, com cerca de 1,1 milhão de casos novos. Atualmente, já é considerado como o sexto tipo de câncer mais comum no mundo, representando aproximadamente 10% do total de cânceres. O CaP está fortemente relacionado com a idade, pois cerca de três quartos dos casos são diagnosticados em homens a partir dos 65 anos. Acredita-se que outros fatores como hereditariedade, alimentação, obesidade também estejam envolvidos no desenvolvimento desta doença. No entanto, sua origem e progressão ainda são fatores pouco compreendidos. Embora significativos avanços, como a descoberta e implementação da avaliação dos níveis séricos de PSA, tenham contribuído fortemente para a detecção e tratamento do CaP, sua utilidade apresenta ainda algumas limitações. Uma vez que o paciente pode apresentar alterações nos níveis sérico de PSA, sem estar acometido pelo câncer. Neste contexto, há uma crescente necessidade de novas técnicas que auxiliem na melhoria do diagnóstico e da terapia ao CaP. Assim, nós aliamos duas metodologias atuais e bastante promissoras na pesquisa científica para o desenvolvimento de ligantes específicos às células tumorais prostáticas: a cultura de células em 3D e o Cell-SELEX. A primeira, abrange importantes aspectos relacionados à mimetização do ambiente *in vivo*. Por esta técnica, conseguimos reproduzir *in vitro* e com alta similaridade, o ambiente tumoral e as

interações célula–célula. Muitos estudos já utilizam com sucesso esta técnica para simular fatores fisiológicos, bem como penetração, ligação e bioatividade de drogas contra o câncer. A segunda, assim como a cultura de células em 3D, vem sendo aplicado expressivamente em estudos envolvendo diferentes neoplasias. Sua utilização requer a construção de uma biblioteca de oligonucleotídeos, que serão, posteriormente, selecionados contra um determinado alvo gerando assim, moléculas ligantes. Estas moléculas são denominadas aptâmeros, sequências curtas de oligonucleotídeos, que apresentam elevada afinidade e especificidade ao alvo. À combinação destas duas metodologias denominou-se 3D Cell-SELEX, por meio da qual, selecionou-se aptâmeros de RNA ligantes específicos à linhagem celular tumoral prostática, PC-3. A utilização da cultura de células em 3D possibilita a mimetização do microambiente celular tumoral, com maior confiabilidade, garantindo a seleção de ligantes altamente específicos ao alvo. Baseado nisto, propusemos a metodologia 3D Cell-SELEX, a fim de favorecer, durante os rounds de seleção, a interação entre as proteínas de superfície celular e a biblioteca de aptâmeros. A estrutura em 3D das células, torna-se mais vantajosa, por melhor representar o microambiente tumoral, favorendo a aplicação dos aptâmeros selecionados por 3D Cell-SELEX, no reconhecimento de alvos em testes *in vivo*. Desta forma, foram selecionados oito aptâmeros de RNA, ligantes específicos à linhagem tumoral prostática, PC-3. A sequência destes aptâmeros apresentaram de 20-50 nucleotídeos e com baixa energia livre, o que os tornaram moléculas bastante estáveis. Assim, quando validados estes aptâmeros poderão ser usados em ensaio futuros, visando auxiliar no prognóstico, diagnóstico e terapia do CaP.

Essa dissertação está dividida em dois capítulos: **Capítulo I** apresenta uma breve revisão do tema abordado. **Capítulo II** apresenta a metodologia 3D Cell-SELEX para a seleção de aptâmeros ligantes a linhagem tumoral, PC-3.

Capítulo I

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. ASPECTOS BIOLÓGICOS DA GLÂNDULA PROSTÁTICA

A glândula prostática compõe o sistema reprodutor masculino, localizada abaixo da bexiga (Figura 1), onde atua na secreção e armazenamento de diferentes produtos do líquido seminal importantes para a sobrevivência dos espermatozoides (PRAJAPATI et al., 2013).

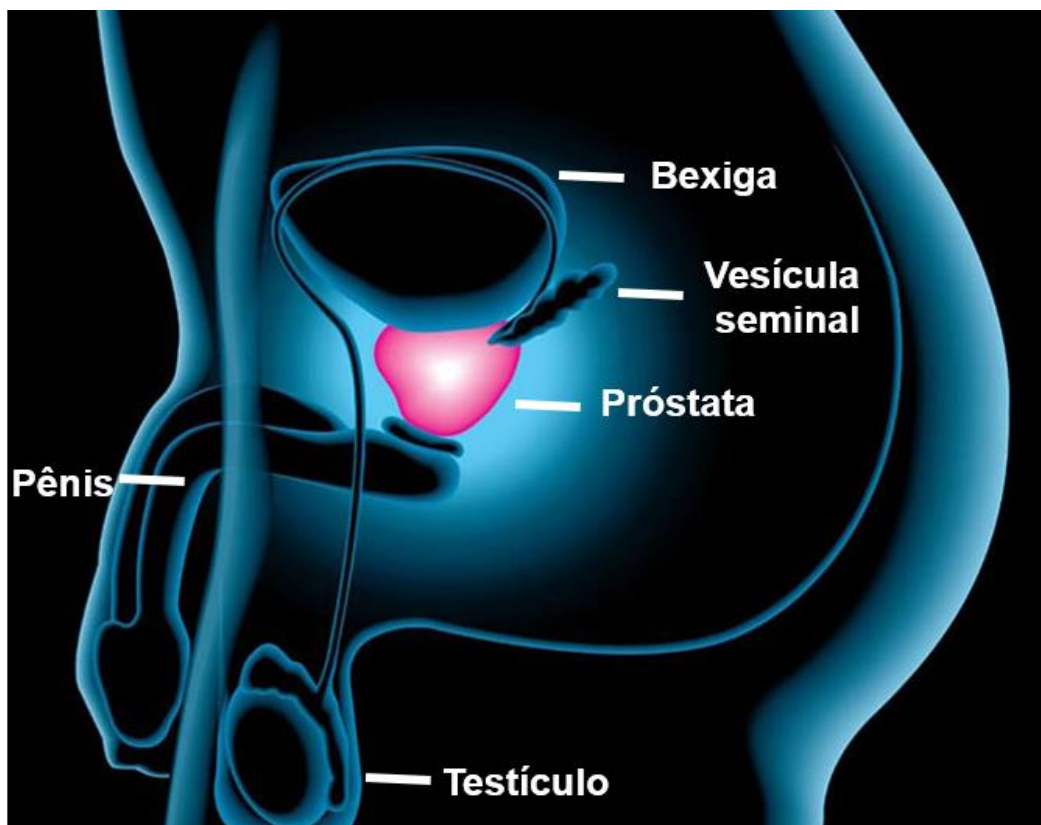


Figura 1: Localização da glândula prostática¹

Em contraste com a maioria das glândulas acessórias do sistema reprodutor masculino, que se desenvolvem embriologicamente a partir dos Ductos de *Wolff* (origem mesodermal), a próstata origina-se a partir do seio urogenital (UGS) e é uma estrutura endodérmica. O processo de desenvolvimento pode ser categorizado em cinco fases distintas: (1)

¹ <http://www.adolfolutz.com.br/blog/218-cancer-de-prostata>

determinação, (2) iniciação, (3) ramificação, (4) diferenciação e (5) maturação (Figura 2) (PRINS; PUTZ, 2010).

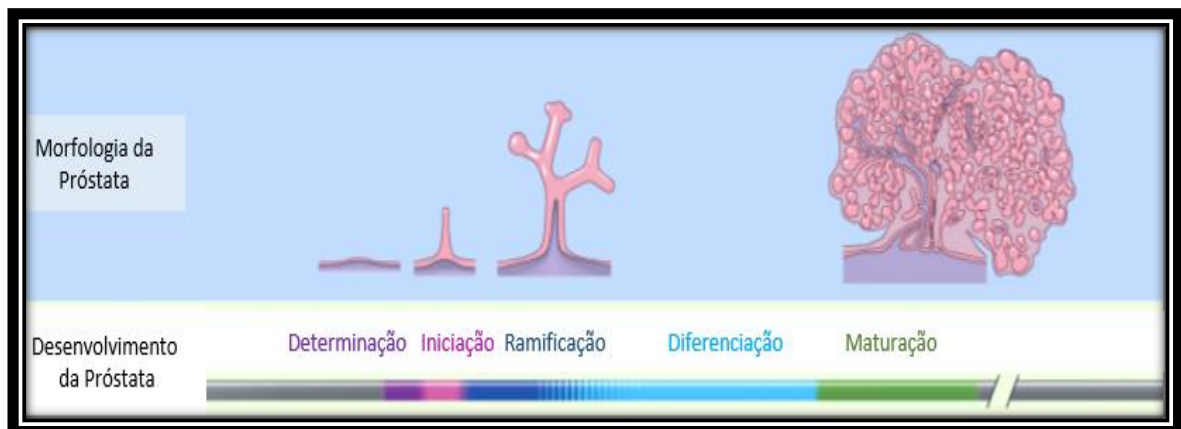


Figura 2: Os cinco estágios do desenvolvimento da próstata (PRINS; PUTZ, 2010).

Para proliferação celular, a diferenciação e o funcionamento normal da próstata a presença de andrógenos são cruciais. Uma vez que a próstata é uma glândula andrógeno-dependente altamente sensível aos distúrbios hormonais.

Após a maturação a glândula pode ser dividida anatomicamente em 5 zonas: **zona fibromuscular**, que constitui 30% do volume da próstata, com ausência de elementos glandulares; **zona central**, que abrange 25% do tecido glandular; **zona periférica**, região onde predominantemente se desenvolve os casos de câncer de próstata (CaP); **zona pré-prostática** e **zona de transição**, sendo esta última região de origem da hiperplasia prostática benigna (HPB) (Figura 3) (PRAJAPATI et al., 2013; PRINS; PUTZ, 2010).

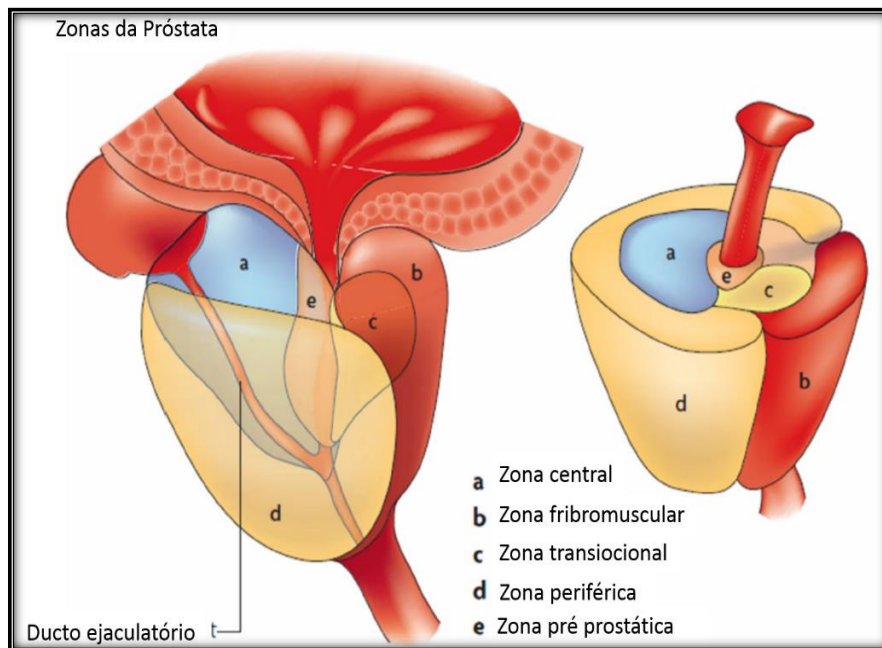


Figura 3: Divisão anatômica da próstata (MARZO et al., 2007)

1.1. CARACTERIZAÇÃO CELULAR DA PRÓSTATA

Em nível histológico a próstata é constituída por dois compartimentos: estromal e epitelial. Sendo que a camada epitelial compartilha de quatro diferentes tipos celulares: basal, luminal, transitória e neuroendócrina (Figura 4).

A proporção entre células estromais e epiteliais na próstata humana normal é de 2:1. As diferentes populações celulares que constituem a glândula próstática podem ser identificadas pela sua morfologia, localização e pela expressão de diferentes marcadores moleculares (PRINS; PUTZ, 2010; TIMMS, 2008).

As células basais em conjunto com as células-tronco são responsáveis pela renovação do epitélio, formando uma camada plana acima da membrana basal. Este tipo celular expressa marcadores como Bcl-2 um fator anti-apoptótico, CD44, p63 (homólogo do gene p53 supressor tumoral), factor de

crescimento de hepatócitos (HGF), e citoqueratinas como CK5 e CK14. Nas células basais o nível de expressão do receptor de androgênio é baixa ou praticamente indetectável, o que torna estas células independentes de andrógenos para sua sobrevivência (WANG et al., 2001).

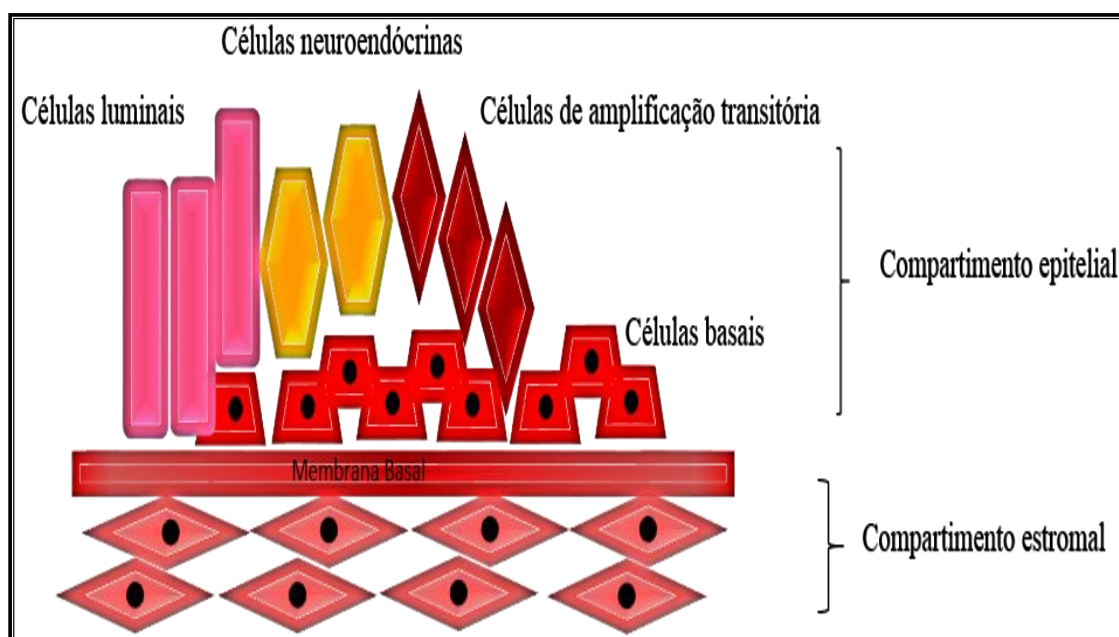


Figura 4: Esquema da glândula prostática. (Adaptado de PRAJAPATI et al., 2013)

As células luminais secretoras têm a função de secretar os fluidos prostáticos e portanto, formam o principal tipo de célula da próstata, constituindo uma camada em forma de colunas acima da membrana basal (GOLDSTEIN et al., 2010). Estas células secretam o antígeno específico da próstata (PSA) e a fosfatase ácida prostática (PAP), ao contrário das células basais, estas células são dependentes de andrógenos e expressam citoqueratinas de baixo peso molecular como CK8 e 18, CD57 e p27(Kip1) (inibidor do ciclo celular) (LONG et al., 2005; PRAJAPATI et al., 2013).

As células neuroendócrinas (NE) trata-se de uma população rara, entre a camada basal e luminal da próstata. Assim, como as células basais, estas

células são insensíveis ao andrógeno, expressam principalmente cromogranina A, sinaptofisina e enolase neurônio-específica. As células NE também podem produzir e secretar neuropeptídeos, tais como: bombesina, calcitonina e neurotensina. Acredita-se que estes neuropeptídeos suportam o crescimento e a diferenciação do conjunto de células epiteliais (AMORINO; PARSONS, 2004).

Ainda participando da composição da camada epitelial, existe um pequeno grupo de células intermediárias que expressam tanto marcadores de célula luminal como basal, estas células são ditas como células de amplificação transitória (TACs). Estas células exibem uma intensa capacidade de proliferação e são responsáveis pela amplificação celular e diferenciação em células luminais (PRAJAPATI et al., 2013).

A camada estromal rodeia a camada epitelial, sendo constituída por vários tipos celulares que incluem fibroblastos, miofibroblastos e principalmente células do músculo liso. Os fibroblastos sintetizam os componentes da matriz extracelular, enquanto as células musculares lisas são responsáveis pela contração da glândula e pela interação epitélio-estroma. As células da camada estromal expressam em sua maioria marcadores de células mesenquimais, como CD34, vimentina, CD44, CD117 e CD90 (TAKAO; TSUJIMURA, 2008).

Este conjunto de células que constituem a próstata pode estar envolvido em três principais patologias que acometem a próstata: a HPB, o CaP e as prostatites (PRAJAPATI et al., 2013).

1.2. DOENÇAS DA PRÓSTATA

A próstata apresenta uma intensa heterogeneidade celular, além de ser um dos órgãos mais sujeitos a alterações durante o envelhecimento. Tais alterações podem provocar doenças como: prostatites, HPB e em casos mais graves o CaP (PRAJAPATI et al., 2013).

Prostatite é a patologia prostática mais comum em homens com menos de 50 anos e sua incidência chega a 12%. Sua gênese é pouco compreendida e multifatorial. As formas mais comuns são: prostatites bacterianas agudas e crônicas e prostatodinia (RHODEN, 1999).

A HPB é caracterizada pelo aumento benigno da próstata, que normalmente se inicia-se em homens com mais de 40 anos. Os sintomas a ela relacionados podem causar grande prejuízo à qualidade de vida. Sendo que em alguns casos é necessário a intervenção cirúrgica (AVERBECK et al., 2010).

O CaP é uma doença multifatorial e heterogênea (BARBIERI; TOMLINS, 2014). Seu desenvolvimento, portanto, ainda não é claramente compreendido. A heterogeneidade das células do câncer em geral é explicada por dois modelos: (estocástico) modelo de evolução clonal e pelo modelo de célula-tronco do câncer (CSC) (CHEN et al., 2013; SAMPIERI; FODDE, 2012).

O modelo clássico de evolução clonal postulou que todas as células cancerosas são tumorigênicas e a cura se torna possível, quanto maior for o número de células eliminadas pelas terapias contra a doença (SPILLANE; HENDERSON, 2007; TU; LIN, 2012).

No entanto, há evidências consideráveis que mostram que alguns tipos de cânceres, como o CaP, podem conter uma população rara de células semelhantes às células-tronco que são capazes de se diferenciarem em células

tumorais, gerando assim as células cancerosas. Desta forma, as CSCs têm sido relacionadas a iniciação do tumor, formação, progressão, reincidência, metástase, e resistência à terapia contra o câncer (BAPAT, 2007).

O CaP e HBP estão desta forma, entre os problemas mais recorrentes associados a próstata, em homens idosos. Ambas as doenças representam desafios para o sistema de saúde, pela complexidade e por incluírem como causa inúmeros fatores como: desequilíbrio hormonal, estresse oxidativo, poluentes ambientais, inflamação, hereditário, envelhecimento, e, até mesmo o *crosstalk* entre as células estromais e epitelias que constituem a glândula prostática (BARCLAY et al., 2005; GOLDSTEIN et al., 2010; PRAJAPATI et al., 2013).

O acompanhamento das alterações prostáticas pode ser realizado em 4 etapas: toque retal, dosagem de antígeno prostático específico (PSA), ultrasonografia transretal e biópsia. Esta última etapa deve ser considerada sempre que houver anormalidades no toque retal ou na dosagem do PSA (INCA, 2002). O toque retal é o teste mais utilizado, apesar de suas limitações, uma vez que somente as porções posterior e lateral da próstata podem ser palpadas, deixando 40% a 50% dos tumores fora do seu alcance. As estimativas de sensibilidade variam entre 55% e 68%. O valor preditivo positivo é estimado entre 25% e 28%. Quando utilizado em associação à dosagem do PSA com valores entre 1,5 – 2 ng/ml, sua sensibilidade pode chegar a 95% (INCA, 2002; PRAJAPATI et al., 2013).

A classificação histológica universalmente aceita e utilizada para estes tumores é a classificação de *Gleason*, elaborada pelo anátomo-patologista *Donald Gleason*. Este sistema de classificação baseia-se em cinco graus básicos

(Figura 5) para gerar uma pontuação histológica para o tumor, que pode variar de 2 a 10. A avaliação é feita pela soma dos graus de padrão primário (área predominante) e graus de padrão secundário (área menos representativa). Quando maior a pontuação de *Gleason* pior o prognóstico do tumor avaliado.

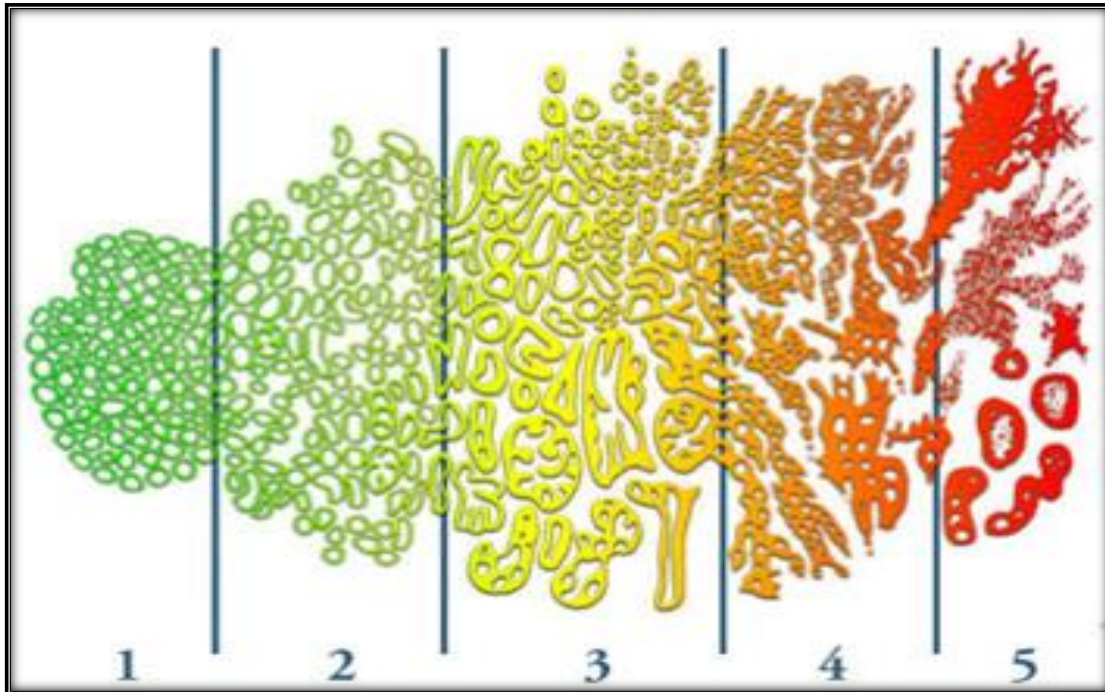


Figura 5: Classificação *score Gleason*: Grau 1 - A próstata cancerosa se parece muito com o tecido normal. As glândulas são pequenas, bem-formadas e muito próximas. Grau 2 - O tecido ainda possui glândulas bem formadas, mas elas são maiores e possuem mais tecido entre cada uma. Grau 3 - O tecido ainda possui glândulas reconhecíveis, mas as células são mais escuras. Em uma magnificação maior, algumas destas células deixaram as glândulas e estão começando a invadir o tecido circundante. Grau 4 - O tecido possui poucas glândulas reconhecíveis. Muitas células estão invadindo o tecido circundante. Grau 5 - O tecido não possui glândulas reconhecíveis²

² <http://sperlingprostatecenter.com/prostate-cancer/>

1.3. EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE PRÓSTATA

No Brasil, de acordo com os dados apontados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA-2014) a estimativa para o ano de 2014, também válida para o ano de 2015, aponta para uma ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer. Deste total aproximadamente 69 mil casos são de CaP, o que corresponde a um risco estimado de 70,42 casos novos a cada 100 mil homens, reforçando a magnitude da incidência do câncer no país (INCA, 2014).

A última estimativa mundial realizada em 2012 apontou o CaP como o segundo tipo de câncer mais frequente na população masculina, com cerca de 1,1 milhão de casos novos no ano de 2012. Segundo o INCA, o único fator de risco bem estabelecido para o desenvolvimento do CaP é a idade. Uma vez que 62% dos casos já diagnosticados mundialmente ocorrem em homens acima de 65 anos de idade (INCA, 2014). No entanto, outros fatores como histórico familiar da doença, alimentação, obesidade e até mesmo a etnia são também fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da doença.

Os dados informados pelo INCA sobre a questão da mortalidade para o CaP apresentam um perfil ascendente semelhante ao da incidência no Brasil. No entanto, o CaP uma vez diagnosticado e tratado oportunamente pode ser considerado de bom prognóstico.

Assim, muitos esforços têm sido dirigidos para melhorias no diagnóstico precoce e tratamento do CaP. Um dos triunfos da biologia molecular durante os últimos anos tem sido a elucidação dos mecanismos responsáveis pela origem e desenvolvimento do câncer.

Para isso, o estudo da expressão de diferentes genes, bem como, o estudo da parte imunológica relacionada a produção e liberação de citocinas

encontradas no ambiente tumoral, e desenvolvimento de biomarcadores candidatos ao diagnóstico e terapia do câncer vem sendo fortemente apontado como uma excelente ferramenta para a compreensão do CaP.

1.4. ASPECTOS MOLECULARES DO CaP

Os biomarcadores têm sido utilizados para diagnosticar e monitorar o câncer da próstata a mais de 50 anos. Em particular, a descoberta do PSA por Wang e colaboradores (1979) alterou significativamente a detecção e tratamento do CaP (STANGELBERGER et al., 2007; HELFAND; CATALONA, 2014). No entanto, a utilidade do PSA é limitada para distinguir entre os estágios do CaP e as condições benignas como a HPB. (STANGELBERGER et al., 2007).

Outra questão fundamental é a crescente incidência de CaP em pacientes com nível de PSA < 4 ng/mL; o que torna ainda mais evidente a necessidade e urgência em se desenvolver novas ferramentas que possam auxiliar na detecção do CaP (STANGELBERGER et al., 2007; WICHA, 2012).

Na grande maioria, o CaP, resulta em uma série de alterações somáticas que afetam muitos genes em vários cromossomos. Compreender as mudanças genéticas envolvidas no surgimento e progressão do CaP é essencial para o diagnóstico precoce e para uma abordagem terapêutica precisa (SCOTT D CRAMER, 2004; PESTELL; NEVALAINEN, 2008).

2. SELEX – A TÉCNICA

A técnica Evolução Sistemática de Ligantes por enriquecimento EXponencial (SELEX) foi desenvolvida em 1990 por três equipes distintas de pesquisadores.

Ellington e Szostak (1990) utilizaram desta técnica para explicar a existência de centros ativos, avaliando a capacidade de moléculas de RNA formarem como as proteínas ligações específicas com pequenas moléculas (AQUINO-JARQUIN; TOSCANO-GARIBAY, 2011; ELLINGTON; SZOSTAK, 1990). Enquanto, Tuerk e Gold (1990) identificaram uma região de oito nucleotídeos de um RNA que interage com a DNA polimerase T4. Neste trabalho duas sequências diferentes foram selecionadas por SELEX a partir de um pool de aproximadamente 65.536 sequências (GOLD et al., 2015; TUERK; GOLD, 1990). Robertson & Joyce (1990) descreveram RNAs com atividade catalítica a partir da seleção *in vitro* (ROBERTSON; JOYCE, 1990; MAYER, 2009).

As moléculas selecionadas a partir da metodologia SELEX são denominadas aptâmeros (do latim “*aptus*” significa ‘apto’ e do Grego “*mero*” significa partícula). Tratam-se de estruturas de oligonucleotídeos que podem se ligar especificamente a moléculas alvo como DNA, RNA, proteínas e até mesmo serem selecionados contra bactérias e células (AQUINO-JARQUIN; TOSCANO-GARIBAY, 2011; STOLTENBURG; REINEMANN; STREHLITZ, 2007)

O SELEX convencional descrito a mais de duas décadas por Ellington e Szostak (1990), Tuerk e Gold (1990) tem passado por distintas alterações proporcionando maior rapidez e especificidade contra diferentes tipos de moléculas alvo.

Comparados aos anticorpos monoclonais, os aptâmeros apresentam algumas vantagens, como: síntese rápida, baixo custo, baixo peso molecular, baixa imunogenicidade, fácil modificação estrutural, capacidade de recuperar a conformação ativa sob condições adequadas, estabilidade, fácil purificação; além de uma grande diversidade de moléculas alvo (ex. toxinas, enzimas,

proteínas, vírus, bactérias e até mesmo células), com alta especificidade. Estas características tornam os aptâmeros um candidato ideal para utilização em terapêutica, biosensoriamento e diagnóstico (LIU; LIN; LAN, 2013; ZHANG et al., 2013).

A técnica pode ser realizada em dias ou semanas, dependendo do número de ciclos de enriquecimento (*rounds*) introduzidos durante o SELEX (DARMOSTUK et al., 2015). Para iniciar os ciclos de seleção é necessário a síntese de uma biblioteca de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) que será incubada com a molécula alvo durante os rounds. Os aptâmeros que apresentarem afinidade se ligarão ao alvo e a cada round aptâmeros mais específicos e com maior afinidade serão enriquecidos por posteriores etapas de eluição e amplificação por PCR. Ao final do processo de enriquecimento metodologias como clonagem e sequenciamento podem ser empregadas para a distinção e escolha das sequências selecionadas. Etapas adicionais de transcrição *in vitro* e transcriptase reversa podem ser incluídas entre os *rounds* quando se trata da seleção de aptâmeros de RNA.

As metodologias de SELEX mais bem estabelecidas e amplamente usadas são apresentadas como variantes do SELEX convencional. Uma das variantes mais bem descritas é o Cell-SELEX (DARMOSTUK et al., 2015).

2.1. CELL-SELEX

O Cell-SELEX refere-se a uma modificação do SELEX que utiliza células vivas inteiras como alvo (OHUCHI, 2012). Os aptâmeros com alta afinidade e especificidade para células são produzidos com sucesso, o que permite a

seleção de aptâmeros para alvos complexos como células tumorais e tecidos (ZHANG et al., 2010).

O Cell-SELEX apresenta além de melhorias na eficiência do processo de seleção uma vantagem única comparada ao SELEX convencional, uma vez que múltiplos aptâmeros podem ser selecionados para múltiplos alvos e com diferentes aplicações. Sendo altamente específicos às células alvo, os aptâmeros selecionados em um processo de Cell-SELEX são capazes de diferenciar entre numerosos tipos de células ligando apenas ao alvo com elevada seletividade e afinidade (SMITH et al., 2007).

O primeiro Cell-SELEX foi realizado utilizando o agente patogênico *Trypanosoma africano* (*Trypanosoma Brucei*) (OHUCHI, 2012). Por meio desta metodologia, Homann e Goringer (1999) identificaram três classes de aptâmeros de RNA que se ligam ao parasita. Os aptâmeros selecionados apresentaram elevada especificidade e afinidade para o ciclo de vida infeccioso do parasita na corrente sanguínea, além de não exibir nenhum tipo de especificidade com os demais estágios de vida do agente patogênico (HOMANN; GÖRINGER, 1999). outros estudos também apontam o uso dos aptâmeros em vários tipos de cânceres (GUO et al., 2008).

Sefah e colaboradores (2010) selecionaram um painel de aptâmeros contra as linhagens celulares DLD1 e HCT116 de câncer de cólon retal (CCR). Estudos para avaliar a ligação destes aptâmeros com o alvo, por citometria de fluxo e microscopia confocal mostraram que estes têm elevada afinidade e seletividade. Além de comprovarem que tais aptâmeros não reconhecem as células do cólon normal, e nem a maioria das outras linhagens celulares de cânceres testadas (SEFAH et al., 2010).

Usando uma linhagem altamente metastática do câncer de colón retal, para seleção de aptâmeros específicos de metástases, Li e colaboradores (2014) descrevem por meio do cell-SELEX, sete aptâmeros que exibem ligação altamente específica às células alvo. Neste trabalho um dos aptâmeros selecionados foi funcionalizado e utilizado como transportador para a doxorrubicina, resultando na entrega da droga específica para as células alvo e uma significativa redução da sua citotoxicidade para as demais células (LI et al., 2014). Além disso, os autores descrevem que os aptâmeros podem ser usados em combinação, uma vez que não foi verificado nenhum tipo de interferência na ligação ao alvo. O estudo demonstra que um painel de aptâmeros que reconhecem características distintas de moléculas alvo pode ser obtido por meio do Cell-SELEX, e os aptâmeros selecionados podem ser funcionalizados individualmente para aplicações específicas e/ou utilizadas em combinação (LI et al., 2014).

Outro estudo significativo descreveu a utilização da metodologia Cell-SELEX para a seleção de dois aptâmeros contra a linhagem celular de glioblastoma (KANG et al., 2012).

Para o CaP algumas abordagens já foram realizadas também a partir do Cell-SELEX. Aptâmeros ligantes específicos à linhagem celular tumoral prostática PC3 foi descrito por Wang e seu grupo (2014).

O aptâmero selecionado neste trabalho exibiu uma elevada especificidade para as células alvo com a constante de dissociação (K_d) na ordem de grandeza de nanomolar. A elevada afinidade e especificidade do aptâmero selecionado torna-o com alto potencial para aplicação em diagnóstico e terapêutica para do CaP (WANG et al., 2014).

Desta forma, os estudos atuais destacam, após 60 anos da descoberta da estrutura do ácido nucléico, por Watson e Crick, o importante papel e a funcionalidade que esta molécula pode ter, além do armazenamento, transmissão e tradução das informações genéticas (SONG; LEE; BAN, 2012).

Atualmente, os aptâmeros vêm sendo apontados como a molécula do futuro, muitos estudos já abordam sua utilização conjugada a outros tipos de estruturas como nanomaterias, buscando explorar assim, suas peculiares propriedades e aplicações (LIU; LIN; LAN, 2013; SMITH et al., 2007).

Além da aplicação dos aptâmeros para auxiliar no diagnósticos e terapia de doenças como o câncer, outras abordagens na área científica têm se destacado para o estudo desta doença como, por exemplo, a construção de estruturas celulares tridimensionais (3D). A cultura de células tumorais em 3D destaca-se por conseguir mimetizar *in vitro*, características morfológicas e funcionais do microambiente tumoral *in vivo*. Estas características, aliadas à especificidade dos aptâmeros e à metodologia Cell-SELEX, estabelece uma nova fase para os estudos relacionados ao diagnóstico e terapêutica do câncer (HAISLER et al., 2013; SOUZA et al., 2010; TANNER; GOTTESMAN, 2015).

3. CULTURA CELULAR TRIDIMENSIONAL

A cultura de células assumiu um importante papel na pesquisa científica, sendo seu uso necessário para um melhor entendimento da biologia celular. Ela foi desenvolvida a partir de 1907, quando Harrison, resolveu estudar a origem das fibras nervosas, e assim, conseguiu desenvolver um método que possibilitava a sobrevivência destas células em laboratório (AMARAL; MACHADO-SANTELLI, 2011; BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013)

Baseado nos resultados de Harrison (1907) Alexis Carrel (1912) também focou seus estudos no cultivo *in vitro* de células e sua manutenção por longos períodos fora do organismo (AMARAL; MACHADO-SANTELLI, 2011).

Observando suas culturas CARREL (1912) avaliou que o maior contato das células com o meio de cultivo tinha relação direta com a viabilidade celular e com uma maior taxa de proliferação; uma vez que a região mais central de suas colônias apresentava elevado índice de necrose. A fim de resolver o problema, passou a cultivar suas células sobre fios de seda. Esta ideia descreve o que pode ser a primeira técnica de cultura de células em 3D desenvolvida em 1912 por Alexis Carrel (CARREL, 1912; AMARAL; MACHADO-SANTELLI, 2011).

A partir dos estudos realizados por Carrel (1912), outros pesquisadores como Holtfreter, (1944), Moscona, (1957) e Leighton, (1951) dedicaram-se em aprimorar o cultivo de células. E desde então, significativos avanços foram obtidos nesta área.

Em princípio, o cultivo em monocamada foi primordial para a pesquisa celular, entretanto, a arquitetura específica do tecido, sinais mecânicos e bioquímicos e interação célula-célula são perdidos nas condições simplificadas de monocamada (2D) (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013; LEEA et al., 2015).

Mesmo sendo os meios de cultura frequentemente alterados para fornecer nutrientes necessários as células, é de fundamental importância considerar que os tecidos e órgãos no corpo são estruturados tridimensionalmente e são continuamente perfundidos pela rede de circulação do sangue (LI; CUI, 2014). Sendo assim, é evidente que existe uma diferença significativa no comportamento celular e funcional entre uma camada plana (2D)

de células banhadas por meios de cultivo e um tecido tridimensional complexo alimentado pela circulação de sangue no interior do corpo (LI; CUI, 2014; LEEA et al., 2015).

Além das características já citadas, o ambiente em 3D oferece outras peculiaridades como, a heterogeneidade celular ocorrida pela formação de microambientes, considerando que as células não são igualmente expostas ao oxigênio e aos nutrientes, devido à formação dos esferoides celulares (Figura 6) (HAISLER et al., 2013; LI; CUI, 2014; WINDUS et al., 2012).

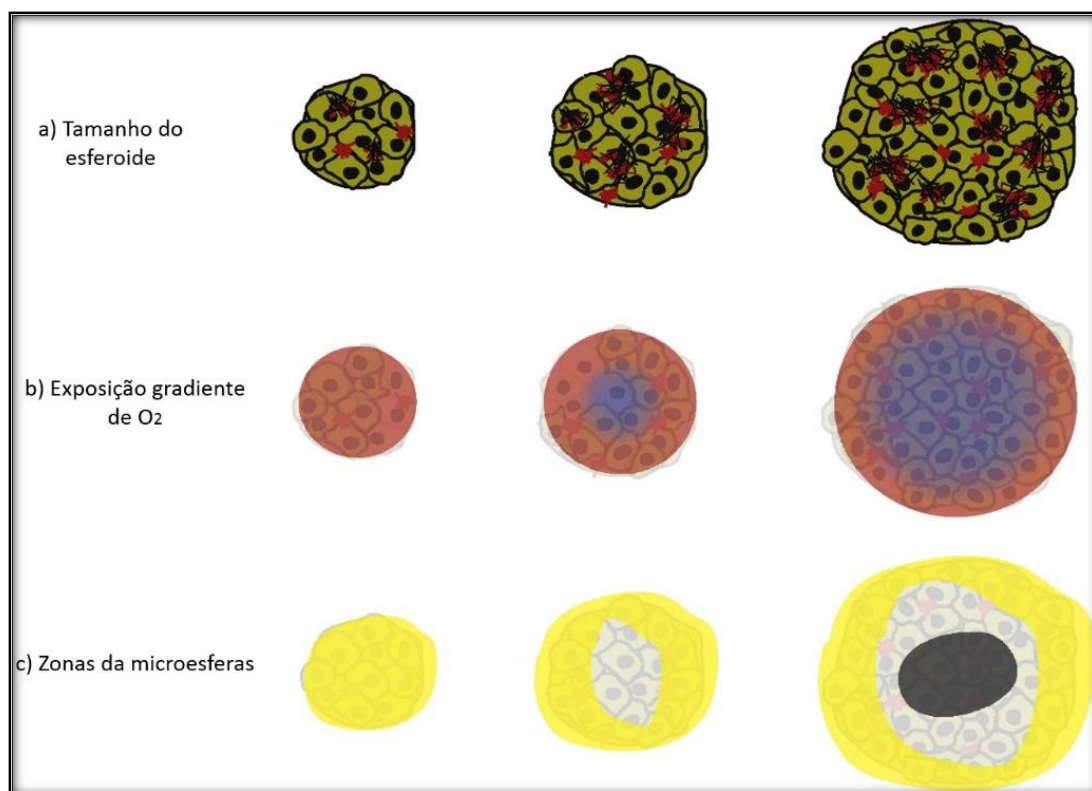


Figura 6: Morfologia e microambiente de células em 3D. a) Crescimento da microesfera tumoral em 3D; b) Exposição do gradiente ao O₂ (vermelho: alta exposição, azul: baixa exposição); c) zonas da microesfera (amarelo: zona de proliferação, preto: zona de necrose). Adaptado de THOMA et al., 2014.

Esta última peculiaridade da cultura 3D mimetiza o que acontece em um ambiente tumoral (tumores sólidos), tornando-se um modelo bastante explorado nos estudos que visam uma melhor compreensão do mecanismo de tumorigênese (CUKIERMAN et al., 2001; ELLIOTT; YUAN, 2011). Em ensaios de radioterapias, por exemplo, a cultura em 3D tem apresentado resultados similares as curvas de resistência encontradas em alguns tumores sólidos (KUNZ-SCHUGHART et al., 2004). Neste sentido, vários modelos em 3D têm sido propostos, a fim de melhor representar as condições *in vivo* (SAMBALEA et al., 2015)

Entre os principais métodos para a construção dos modelos celulares em 3D destaca-se o método de levitação magnética (MLM) abordado por Haisler e colaboradores (2013). Este método utiliza nanopartículas de óxido de ferro (Fe_2O_3) e de ouro (Au) revestidas com poli-lisina, e um aparato magnético para formação da estrutura celular em 3D (SOUZA et al., 2010).

Neste método, as células ficam suspensas na interface ar-líquido e são unidas quando submetidas a um campo magnético externo (aparato magnético) que concentra as células formando uma estrutura densa (figura 7). Esta estrutura é capaz de sintetizar componentes da matriz extracelular, não apresentados em um cultivo em monocamada de células, bem como melhor mimetizar o nicho celular (HAISLER et al., 2013; SOUZA et al., 2010).

O MLM em culturas de células tem sido abordado com diferentes técnicas como: *western blotting*, imunofluorescência e imunohistoquímica (HAISLER et al., 2013). Outros ensaios onde a técnica pode ser aplicada refere-se a ensaios de invasão, co-cultura e diferenciação celular. Molina et al., (2010) criou um ensaio de invasão celular entre duas culturas separadas de glioblastoma

humano e astrócitos normais, para investigar os mecanismos de invasão de células do glioblastoma. Tseng et al., (2013) utilizou-se do método para criar modelos de co-cultura fazendo montagem sequencial de múltiplas culturas em 3D.

Diante dos experimentos abordados o MLM tem se apresentado como uma ferramenta versátil para a realização de experimentos básicos e complexos com culturas de células em 3D (HAISLER et al., 2013).

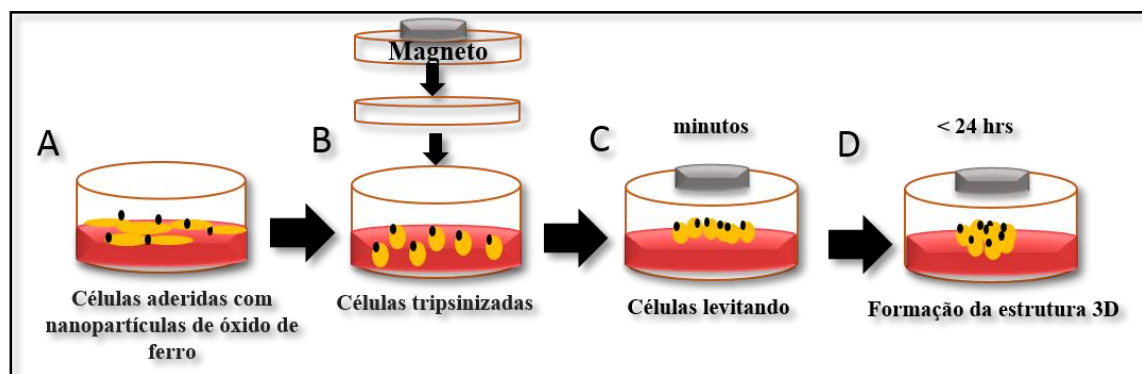


Figura 7: Esquema representativo para formação da cultura 3D por MLM.

A) As nanopartículas são incubadas com as células em monocamada. **B)** Após absorção das nanopartículas as células são tripsinizadas e transferidas para placas de baixa aderência com o aparato magnético. **C)** Depois de alguns minutos as células são atraídas para a superfície, ficando suspensas na interface ar/meio. **D)** Após 24 horas de suspensão a estrutura celular em 3D é formada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, J. B. DO; MACHADO-SANTELLI, G. M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia**, v. 34, p. 1–20, 2011.

AMORINO, G. P.; PARSONS, S. J. Neuroendocrine cells in prostate cancer. **Critical reviews in eukaryotic gene expression**, v. 14, n. 4, p. 287–300, 2004.

AQUINO-JARQUIN, G.; TOSCANO-GARIBAY, J. D. RNA aptamer evolution: Two decades of selection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 12, p. 9155–9171, 2011.

AVERBECK, M. A. et al. Diagnosis and treatment of benign prostatic hyperplasia. **Revista da AMRIGS**, v. 54, n. 4, p. 471–477, 2010.

BAPAT, S. A. Evolution of cancer stem cells. **Seminars in Cancer Biology**, v. 17, n. 3, p. 204–213, 2007.

BARBIERI, C. E.; TOMLINS, S. A. The prostate cancer genome: Perspectives and potential. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 32, n. 1, p. 95–102, 2014.

BARCLAY, W. W. et al. A system for studying epithelial-stromal interactions reveals distinct inductive abilities of stromal cells from benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. **Endocrinology**, v. 146, n. 1, p. 13–18, 2005.

BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 5-6, p. 240–249, 2013.

CARREL, A. On the permanent life of tissues outside of the organism. **Journal of Experimental Medicine**, v. 15, p. 516–528, 1912.

CHEN, X. et al. New insights into prostate cancer stem cells. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 12, n. 4, p. 579–86, 2013.

CUKIERMAN, E. et al. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. **Science**, v. 294, n. 5547, p. 1708–1712, 2001.

DARMOSTUK, M. et al. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. **Biotechnology Advances**, 2015.

ELLINGTON, A. D.; SZOSTAK, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. **Nature**, v. 346, n. 6280, p. 818–822, 1990.

ELLIOTT, N. T.; YUAN, F. A Review of Three-Dimensional In Vitro Tissue Models for DrugDiscovery and Transport Studie. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 100, n. 10, p. 59–74, 2011.

GOLD, L. et al. Aptamers and the RNA World , Past and Present. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, p. 1–10, 2015.

GOLDSTEIN, A. S. et al. Identification of a cell of origin for human prostate cancer. **Science**, v. 329, n. 5991, p. 568–571, 2010.

GUO, K. T. et al. Cell-SELEX: Novel perspectives of aptamer-based therapeutics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 4, p. 668–678, 2008.

HAISLER, W. L. et al. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. **Nature protocols**, v. 8, n. 10, p. 1940–9, 2013.

HELFAND, B. T.; CATALONA, W. J. The epidemiology and clinical implications of genetic variation in prostate cancer. **Urologic Clinics of North America**, v. 41, n. 2, p. 277–297, 2014.

HOLTFRETER, J. A study of the mechanics of gastrulation. **Journal of Experimental Zoology**, v. v. 95, n. n. 2, p. 171–212, 1944.

HOMANN, M.; GÖRINGER, H. U. Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 9, p. 2006–2014, 1999.

INCA. Câncer da próstata: consenso. **Ministério da Saúde**, v. 1, p. 20, 2002.

INCA. **Estimativa Incidência de câncer no Brasil - 2014**. [s.l: s.n.].

KANG, D. et al. Selection of DNA Aptamers against Glioblastoma Cells with High Affinity and Specificity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–9, 2012.

KUNZ-SCHUGHART, L. A. et al. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. **Journal of biomolecular screening**, v. 9, n. 4, p. 273–285, 2004.

LEEA, J. B. et al. A novel in vitro permeability assay using three-dimensional cell culture system. **Journal of Biotechnology**, 2015.

LEIGHTON, J. A sponge matrix method for tissue culture. Formation of organized aggregates of cells in vitro. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 15, p. 275–293, 1951.

LI, W. M. et al. Cell-SELEX-based selection of aptamers that recognize distinct targets on metastatic colorectal cancer cells. **Biomaterials**, v. 35, n. 25, p. 6998–7007, 2014.

LI, Z.; CUI, Z. **Three-dimensional perfused cell culture** **Biotechnology Advances**, 2014.

LIU, K.; LIN, B.; LAN, X. Aptamers: A promising tool for cancer imaging, diagnosis, and therapy. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 2, p. 250–255, 2013.

MARZO, A. M. DE et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 256–269, 2007.

MAYER, G. The chemical biology of aptamers. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 48, n. 15, p. 2672–2689, 2009.

MOLINA, J. R. et al. Invasive glioblastoma cells acquire stemness and increased Akt activation. **Neoplasia**, v. 12, n. 6, p. 453–463, 2010.

MOSCONA, A. The development in vitro of chimberic aggregates of dissociated embryonic chick and mouse cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 57, p. 184–194, 1957.

OHUCHI, S. Cell-SELEX Technology. **BioResearch Open Access**, v. 1, n. 6, p. 265–272, 2012.

PESTELL, R. G.; NEVALAINEN, M. T. **Prostate cancer**. Totowa, USA: Humana Press, 2008.

PRAJAPATI, A. et al. Prostate stem cells in the development of benign prostate hyperplasia and prostate cancer: emerging role and concepts. **BioMed research international**, v. 2013, p. 107954, 2013.

PRINS, G. S.; PUTZ, O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. **Differentiation**, v. 76, n. 6, p. 641–659, 2010.

RHODEN, E. L. Urologia. In: **Próstata**. [s.l.] Artmed editora S.A, 1999. p. 50–52.

ROBERTSON, D. L.; JOYCE, G. F. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. **Nature**, v. 344, n. 6265, p. 467–468, 1990.

SAMBALEA, F. et al. **3D cultures conquer in vitro testing** Vienna Journal of Biotechnology, , 2015.

SAMPIERI, K.; FODDE, R. Cancer stem cells and metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, n. 3, p. 187–193, 2012.

SCOTT D CRAMER. **Stem cells and prostate cancer**. [s.l.] Springer US, 2004. v. 3

SEFAH, K. et al. DNA aptamers as molecular probes for colorectal cancer study. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. 1–14, 2010.

SMITH, J. E. et al. Aptamer-conjugated nanoparticles for the collection and detection of multiple cancer cells. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 8, p. 3075–3082, 2007.

SONG, K. M.; LEE, S.; BAN, C. Aptamers and their biological applications. **Sensors**, v. 12, n. 1, p. 612–631, 2012.

SOUZA, G. R. et al. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. **Nature nanotechnology**, v. 5, n. 4, p. 291–296, 2010.

SPILLANE, J. B.; HENDERSON, M. A. Cancer stem cells: A review. **ANZ Journal of Surgery**, v. 77, n. 6, p. 464–468, 2007.

STANGELBERGER, A. et al. Prostate cancer screening markers. **The Journal of Men's Health & Gender**, v. 4, n. 3, p. 233–244, 2007.

STOLTENBURG, R.; REINEMANN, C.; STREHLITZ, B. SELEX-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. **Biomolecular Engineering**, v. 24, n. 4, p. 381–403, 2007.

TAKAO, T.; TSUJIMURA, A. Prostate stem cells: The niche and cell markers. **International Journal of Urology**, v. 15, n. 4, p. 289–294, 2008.

TANNER, K.; GOTTESMAN, M. M. Beyond 3D culture models of cancer. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 283, p. 7–10, 2015.

THOMA, C. R. et al. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 69-70, p. 29–41, 2014.

TIMMS, B. G. **Prostate development: A historical perspective. Differentiation**, v. 76, p. 565-577, 2008.

TSENG, H. et al. Assembly of a three-dimensional multitype bronchiole coculture model using magnetic levitation. **Tissue engineering. Part C, Methods**, v. 19, n. 9, p. 665–75, 2013.

TU, S.-M.; LIN, S.-H. Prostate Cancer Stem Cells. **Clinical Genitourinary Cancer**, v. 10, n. 2, p. 69–76, 2012.

TUERK, C.; GOLD, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. **Science**, v. 249, n. 4968, p. 505–510, 1990.

WANG, Y. et al. Cell differentiation lineage in the prostate. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 68, n. 4-5, p. 270–279, 2001.

WANG, Y. et al. DNA aptamer evolved by cell-SELEX for recognition of prostate cancer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–10, 2014.

WICHA, M. S. PSA Lo and behold: Prostate cancer stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 5, p. 482–483, 2012.

WINDUS, L. C. E. et al. In vivo biomarker expression patterns are preserved in 3D cultures of Prostate Cancer. **Experimental Cell Research**, v. 318, n. 19, p. 2507–2519, 2012.

ZHANG, J. et al. Aptamer-conjugated gold nanoparticles for bioanalysis. **Nanomedicine**, v. 8, n. 6, p. 983–993, 2013.

ZHANG, Y. et al. Aptamers selected by cell-SELEX for application in cancer studies. **Bioanalysis**, v. 2, n. 5, p. 907–918, 2010.

Capítulo II

3D Cell-SELEX: Screening and characterization of
a novel RNA aptamers that specifically bind to
human prostate cancer cells.

*Instructions according to Cancer Letters

RESUMO

O câncer de próstata humano (CaP) é altamente heterogêneo e multifatorial, e ainda não se tem marcadores suficientemente precisos para o diagnóstico clínico. Portanto, a busca de novos biomarcadores para melhorar o diagnóstico, prognóstico e terapia ainda são necessários. Neste estudo, descrevemos o 3D Cell-SELEX, como uma estratégia para selecionar ligantes de ácidos nucleicos específicos contra células em cultura 3D, a seleção foi realizada contra a linhagem celular do câncer de próstata PC-3. Este novo sistema de seleção combina o processo SELEX que explora a estrutura celular para gerar ligantes específicos, e a cultura de células em 3D que imita o microambiente de tecido *in vitro*. A primeira rodada de seleção do 3D Cell-SELEX foi realizada contra esferóides da linhagem celular RWPE-1 não tumoral para subtrair aptâmeros ligantes que são não-tumor específico. O sobrenadante foi então usado em oito ciclos adicionais de seleção, as quais foram realizadas contra esferóides da linhagem de células PC-3. Depois de nove ciclos de seleção, oito aptâmeros de RNA específicos para PC-3 foram selecionados e sequenciados, estes apresentaram tamanhos entre 20 a 50 nucleótidos, com baixa energia livre ($\Delta G < -13,6$), que confere uma conformação espontânea e alta estabilidade. Esta nova estratégia pode proporcionar uma melhor exposição dos domínios extracelulares na membrana das culturas de esferóides, que imitam especificamente o microambiente do tumor. Os aptâmeros selecionados serão validado e aplicados em futuros estudos com foco na triagem do CaP.

Palavras Chave: Câncer de próstata, Cultura de células em 3D, Cell-SELEX, Aptâmeros de RNA.

Abstract

The human prostate cancer (PCa) is highly heterogeneous and multifactorial, and yet markers are not sufficiently accurate and none can predict the clinical outcome. Therefore, the search for new biomarkers for improved diagnosis, prognosis and therapy are still necessary. In this study, we describe the 3D Cell-SELEX, a strategy to select specific nucleic acid ligands against spheroid cells in 3D cell culture, which was performed against the PC-3 prostate cancer cell line. The new system combines the Cell-SELEX process that exploits the cellular structure to generate specific ligands, and the 3D cell culture that mimic the tissue microenvironment *in vitro*. The first round of 3D Cell-SELEX was performed against spheroids of the RWPE-1 non-tumor cell line to subtract aptamer ligands that are non-tumor specific. The supernatant was then used in eight additional rounds of selection, which were performed against spheroids of the PC-3 cell line. After nine selection cycles, eight PC-3 specific RNA aptamers were selected and sequenced, and presented sizes between 20 to 50 nucleotides-long, with low free energy ($\Delta G < -13.6$), which confers spontaneous folding and high stability. This new strategy may provide a better exposure of extracellular domains in the membrane of the spheroid cultures, which specifically mimic the tumor microenvironment. The selected aptamers will be validated and applied in future studies focusing on the PCa management.

Keywords: prostate cancer; 3D cell culture; Cell-SELEX; RNA aptamers.

1. Introduction

Recent estimates have shown that the prostate cancer (PCa) is the sixth most common worldwide type of cancer and the second cause of death among the male population. Its origin, progression and recurrence are still poorly understood, due to its high complexity and heterogeneity [1], [2].

Biomarkers that assist PCa diagnosis are essential to increase patients' survival, but sensitivity and specificity of current markers are still imprecise. The use of the prostate specific antigen (PSA), although has significantly contributed for PCa screening in the past, it is not exclusively related to the tumor occurrence, and presents very low specificity. Thus, markers are still needed to improve PCa diagnosis [3]. Thereby, we are proposing the combined use of three-dimensional (3D) cell culture [4] and Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX) [5] to develop novel biomarkers aiming to improve PCa diagnosis and to elucidate some of the biological mechanisms associated with tumor occurrence and staging.

One way to construct 3D models is using a magnetic levitation method (MLM) [6], [7]. This method is based on iron oxide (Fe_2O_3) and gold (Au) nanoparticles, and poly-lysine that are absorbed by cells after an incubation period. The cells bound to these nanoparticles can be manipulated by using an external magnetic field [6]. When this magnetic field is applied on top of the culture dish, the cells are levitated, forming a cell aggregate, which allows cell-cell interaction and exposure of cells to both oxygen and nutrients in the culture medium [8]. In addition, this method also enables the evaluation of extracellular matrix components (EMC) formed by spheroid-like organs, since those characteristics are not shown in monolayer cell cultures (2D) [5], [9]. Thus, similarities to the *in vivo* microenvironment are observed in 3D cell cultures, contributing to the

application of this model to simulate physiological factors and drug bioactivity in some diseases, such as cancer [10], [11].

The SELEX methodology is a selection strategy that uses small RNA or DNA molecules as probes [12], [14], also called aptamers, which are capable of specifically bind any biological target. The identification of aptamers against whole cells is called Cell-SELEX [15], [16], a technique that offers great advantage related to the discovery of specific ligands of tumor cells, which can be employed to assist diagnosis and therapy due to their high selectivity [17], [18].

Our investigation describes the use of both technologies, named 3D Cell-SELEX, as a strategy to develop new and promising ligands against the tumor cells microenvironment. Our strategy led us to develop novel specific aptamers that bound to spheroid cells formed by the aggressive prostate tumor cell line, PC-3, and this proof-of concept may be more advantageous due to the microenvironment provided by 3D cell culture, and may represent an evolution of the SELEX method proposed by Ellington and Tuerk in 1990 [12], [13].

2. Materials and Methods

2.1. 2D-Culture

Human prostate epithelial cell line (RWPE-1) and human prostate cancer cell line (PC-3) were kindly donated by Hernandes F. Carvalho, PhD from Campinas State University (UNICAMP-SP, Brazil) and the National Institute of Cancer (INCA-RJ, Brazil), respectively. RWPE-1 was cultured in keratinocyte serum free medium with bovine pituitary extract (BPE), human recombinant epidermal growth factor (EGF) and 10% fetal bovine serum (Gibco), 100 U/mL of penicillin and 100 mg/mL of streptomycin. PC-3 was cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% of fetal bovine serum

(Gibco), 100 U/mL of penicillin, and 100 mg/mL of streptomycin. Both cell lines, were cultured to obtain ~80% confluence (37°C, 5% CO₂). Culture medium was changed each every three days.

2.2. Magnetic Cell Levitation

Magnetic Levitation Method (MLM) was used for 3D cell culture, using the Nano3D Biosciences Kit, as described elsewhere [7]. This kit was supplied with magnetic apparatus and nanoshuttle solution (NS), composed of iron oxide (Fe₂O₃) and gold nanoparticles covered with poly-lysine.

The NS was added in both cell cultures (PC-3 and RWPE-1) at about 80% confluence in the ratio of 8 µL of NS *per* cm² and placed in a standard CO₂ cell culture incubator (37°C, 5% CO₂). Cells were trypsinized using trypsin-EDTA solution (Corning) after 12 hours in standard adherent culture condition. Trypsin was inactivated using of fetal bovine serum (Gibco), and then cells were submitted to centrifugation and cultured (3.2 x 10⁶ cells/well) in 6 multi-well ultralow-attachment plates (Corning). The magnetic apparatus was placed over the culture plate lid for magnetic levitation during 48 hours to generate levitated spheroids (Fig. 1).

2.3. RNA Library Construction

For the library construction, we used 1 µg from the genomic DNA pool of PCa human blood. The pool of DNA was randomly fragmented using a sonicator (Thorton) and amplified by asymmetric PCR, in which hybridization primers (reverse: hyb-REV and forward: hyb-FOR) were used as described elsewhere [18].

After the asymmetric PCR, the reaction products were separated on a 2.5% agarose gel electrophoresis. Amplicons with sizes ranging from 40-700 nucleotides were purified by DNA precipitation with ammonium acetate (7.5 M) and the pellet was resuspended

in 10 μ L of purified water. The RNA library was completed by introducing the T7 promoter sequence at the 5' end through PCR amplification (26 cycles) in the following conditions: 20 s denature at 93°C, 40 s annealing at 50°C and 40 s extension at 72°C; the last cycle followed by 10 min at 72°C, using the fix-primers (5' – GAG GAC GAT GCG G -N₄₀₋₇₀₀- GTC TGC TGC TCG CCC T– 3') flanking all library sequences. The T7 promoter was introduced in order to express the RNA aptamers with random sequences. Purified fragments were converted into RNA by *in vitro* transcription using T7 RiboMAX Kit, according to manufacturer's instruction (Promega).

2.4. 3D Cell-SELEX Procedure

The process was carried out as demonstrated in Fig. 2. The 3D Cell-SELEX was performed with 9 rounds of selection. In the first selection round, we have used spheroid cells of RWPE-1 for negative selection in order to subtract aptamers that were not exclusive bound to PC-3. The other eight cycles (2nd- 9th) were performed with target spheroid cells of PC-3.

Before each round of 3D Cell-SELEX, cells were cultured with MLM to form the 3D cell structure (Fig. 3). After 48 hours of magnetic levitation, spheroids were washed three times with pre-cooled PBS. Then, 10 nmol of the RNA library were dissolved in 1 mL of binding buffer (0.01M PBS with 5mmol MgCl₂ and 4.5 g glucose) and incubated with spheroid control cells (RWPE -1) at 37° C for 1h. After incubation, the RNA library was removed and then reverse transcribed. The obtained cDNA was used as template and amplified by PCR with fix-primers. The amplified fragment was purified as described above and used for *in vitro* transcription reaction (RiboMAX™), according to manufacturer's instruction (Promega). In the second round of selection, PC-3 spheroids were incubated at 37°C for 1h with the supernatant of the RNA aptamer library recovered in the first round. Then, the supernatant was removed and cells washed with buffer

(0.01M PBS; 5mmol MgCl₂). Aptamers that were specifically bound to target cells were eluted by adding 500 µL of washing buffer, and heating to 95° C for 5 min.

After centrifugation, this solution was precipitated, as described above and, then used for reverse transcription. The recovered cDNA was used as described in the first round. Aptamers that were specifically enriched for PC-3 spheroid cells after 9 cycles of selection were subcloned and evaluated.

2.5. The Recovering of RNA Library

The amount of RNA library recovered after each round was quantified using NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, USA) at a wavelength of 260 nm and 280 nm after elution at 95°C- 5 min.

2.6. Cloning and Sequencing

After 9 rounds of 3D Cell-SELEX, the resulting aptamers' pool was cloned into competent *E. coli* DH5α, using pGEM® - T Easy Vector (Promega), according to the manufacturer's instructions. After extraction of the plasmid DNA, 96 clones of the eighth round were sequenced using the M13 forward primer. Plasmids were sequenced at Campinas State University (UNICAMP- Brazil).

2.7. Evaluation of Aptamers Sequences

Clone sequences were aligned and consensus motifs were identified by the *Clustal software package* from the GCG suite of molecular biology programs. The online software, *Sfold*, was used to predict the secondary structures and to obtain the ΔG values for each aptamer. Three parameters were established to evaluate the most specific RNA aptamers PC-3-binding, selected in the 9th round of the 3D Cell-SELEX: (1) aptamers

should have sequence sizes between 20 to 50 nucleotides-long, (2) the selection of sequences should be based on the presence of common motifs, and (3) the aptamers' sequences should present minimum free energy (*Gibbs free energy- ΔG*) of predicted secondary structures that would lead to spontaneous folding.

3. Results

3.1.Evaluation of Selection Rounds

Nine selection rounds were performed to select highly specific aptamers against 3D spheroids cell of the PC-3 cell line. The enrichment in each round was monitored by quantification of eluted molecules. In the first round of negative selection, 0.06 nmol of aptamers from the original library were bound to RWPE-1. On the second round, the aptamers-binding ratio was 4-fold higher for PC-3 when compared to RWPE-1, the negative control. However, in the third round, only about one third of molecules were bound to the target cells, indicating a higher selectivity and specificity over the course of rounds. Thus, between the 3th and 9th rounds we could follow the enrichment of specific-ligands by observing the variation in the number of ligands during each round. After the 7th selection cycle no significant variation in the number of molecules was observed, implying that RNA specific aptamers to PC-3 have reached the maximum binding specificity (Fig. 4).

3.2.Analysis of Aptamers Sequences

After sequencing, 45 (out of 96) valid sequences were obtained from the last round of selection, and among them, 37 (out of 45) sequences were excluded, because it did not reach all three criteria parameters to be an aptamer as previously described. The 8 remaining sequences with 20 to 50 nucleotides-long were chosen for additional

characterization and validation (Table 1). The predicted secondary structures and their minimum free energy values for the eight aptamers were obtained by *S-fold software* and are presented in Fig. 5. Alignments performed among the selected aptamers showed 13 different types of sequences motifs in random regions. All selected aptamers presented more than one motif, with many repetitive motifs in the same sequence (Fig. 6)

4. Discussion

Aptamers selected by Cell-SELEX present different advantages compared with the monoclonal antibodies, as: small size, easy synthesis, lack of immunogenicity, high stability, ability to recognize the native conformation of the target molecules present in the cell surface, and can be easily synthesized and modified [19], [20]. In this context, the cellular surface is an extremely important component for the success of the aptamers selection by Cell-SELEX, in which the aptamers' targets are located in the membrane surface [19]. However, the cellular surface in 2D cell culture do not represent the complexity of cells *in vivo*, which are better replicated by 3D cell cultures [20]. Therefore, we introduced the 3D Cell-SELEX as a promising tool for aptamer selection against specific tissue microenvironment using spheroids of an aggressive tumor cell line (PC-3) as a proof-of-concept.

Although, aptamers can be DNA or RNA, we perform the 3D Cell-SELEX with an RNA library, because it has been proposed that RNA aptamers besides allowing better conformation of the tertiary structure, may be more specific for the binding to the target, compared to the DNA aptamer and proteins [21]. The small size of single-stranded RNA aptamers makes them more prone to be introduced into cells than DNA aptamers, with the same number of nucleotides. Moreover, when conjugated to additional ligands, such as nanoparticles, it can be used for intracellular drug delivery [21], [22], [23].

Aptamers have been described as an important tool for biomarkers' discovery, and by using Cell-SELEX, the detection and characterization of specific set of cell surface proteins at the membrane comprises the new concept coined by Cavalier-Smith, as membranome [19], [24], [25]. In this way, previous studies have described the selection of aptamers by Cell-SELEX against different tumor cell lines of colorectal cancer [26], prostate cancer [27], glioblastoma [28], breast cancer, colon cancer [29] and gastric cancer [30]. However, aptamers can also be directly selected against specific targets, such as: PSMA [31], EGFR [32], [33], CD4 [34], CTLA-4 [35], β -secretase [36], HER3 [37], NF- κ B [38], β -catenin [39], Wilms' Tumor Protein [40], CD133 [41] and TGF-B [42]. Nevertheless, to the best of our knowledge, no specific PC-3 aptamer has been selected against spheroids produced in 3D cell culture using the MLM method.

In this study we described the 3D cell culture by using MLM, allowing the formation of tumor-like structures, phenotypically similar to tumors *in vivo* [20]. This similarity is due to the unequal availability of biophysical factors such as nutrients and oxygen, causing the formation of heterogeneous microenvironments, with presence of necrosis and hypoxia as seen in tumors *in vivo* [7], [43]. Furthermore, this method, when compared to the 2D-cell culture, provides a better exposure of the extracellular domains of membrane proteins, due to the three-dimensional conformation, where the binding of aptamers occurs [19].

Although the 2D-cell culture has strongly contributed to the understanding of many aspects of cell biology, it does not reliably represent the specific architecture of the tissue, causing loss of mechanical and biochemical signs, and lowering the cell-cell interactions, when compared to the *in vivo* microenvironment [9], [20], [21]. Thus, we believe that the selection of aptamers performed by 3D Cell-SELEX may be a better tool

for *in vitro* selection of specific aptamers that bind specifically to *in vivo* targets, contributing to the improved diagnosis, prognosis and therapy of different diseases.

In our 3D Cell-SELEX process, eight aptamers were selected and their secondary structure were predicted and analyzed *in silico*. The secondary structures of aptamers presented inner loops where putative interactions between aptamers and their targets will occur. It is important to emphasize that mismatched RNA bases within those structures are more flexible and can easily change their conformation to form hairpin structures to accommodate a linker and/or act as donors or recipients of atoms to form hydrogen bonds [44]. Interestingly, the ribonucleotides conserved in some of the eight selected aptamers are located mostly within loop regions, suggesting that the motifs are directly related to the interaction between aptamers and their target proteins present on the cell surface (Fig.7).

Among the selected aptamers, some of them attract more attention, like the A4 and A6 sequences, due to the similarity of their linear sequences and structures. However, this similarity does not ensure that those aptamers will exhibit the same affinity to the PC-3 cell line. Since, the change of only one base in the sequence of the aptamer can significantly alter the affinity constant value, calculated between the aptamer and its target [27]. Accordingly to that, aptamers are highly specific and can detect overexpressed target proteins on the cell surface, as well as recognize small differences among them. This capability allows aptamers to differentiate unique cellular characteristics, particularly between cancerous and non-cancerous cells [19].

Based on this, we realize that the cell surface is an important component for the success in the discovery of new biomarkers by Cell-SELEX. Thus, we believe that, cell conformation, in other words, the cell structure *in vitro*, can promote or limit the aptamer selection process. Thus, we proposed the 3D Cell-SELEX method in order to improve the

arrangement of cell surface proteins, the extracellular matrix, and their interaction with the aptamers' library, once the 2D-cell culture cannot represent the tissue microenvironment (Fig. 8). In addition, the selection of specific ligands against spheroid cells in a 3D cell structure will best mimic the tumor microenvironment, and becomes advantageous due to the easiness of *in vitro* selection with a better target recognition *in vivo*.

5. Conclusion

In summary, we proposed the use of 3D Cell-SELEX as a new method to select aptamers against cellular and extracellular matrix targets. We believe that selection by 3D Cell-SELEX is more reliable than the conventional Cell-SELEX. Therefore, we screened and characterized eight potential RNA aptamers sequences, capable of specifically binding to spheroids of the PC-3 prostate tumor cell line, which can be used in future studies to validate new biomarkers that may improve PCa diagnosis, prognosis and therapy.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Brazilians funding agencies, CAPES, FAPEMIG and CNPq. The authors would also like to thanks Hernandes F. Carvalho, PhD, from Campinas State University (UNICAMP-SP, Brazil) for the donation of the cell line RWPE-1.

Conflict of interest

The authors have no potential conflicts of interest relevant to the content of this manuscript.

References

- [1] E.-K. Lee, H. Cho, C.-W. Kim, Proteomic analysis of cancer stem cells in human prostate cancer cells., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412 (2011) 279–285.
- [2] G. Zadra, C. Photopoulos, M. Loda, The fat side of prostate cancer, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1831 (2013) 1518–1532.
- [3] G. Yardy, S. McGregor, W. Bodmer, The molecular staging of prostate cancer, *BJU Int.* 95 (2004) 907.
- [4] Z. Li, Z. Cui, Three-dimensional perfused cell culture, *Biotechnol. Adv.* 32 (2014) 243–254.
- [5] G.R. Souza, J.R. Molina, R.M. Raphael, M.G. Ozawa, D.J. Stark, C.S. Levin, et al., Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation., *Nat. Nanotechnol.* 5 (2010) 291–296.
- [6] D.M. Timm, J. Chen, D. Sing, J. a Gage, W.L. Haisler, S.K. Neeley, et al., A high-throughput three-dimensional cell migration assay for toxicity screening with mobile device-based macroscopic image analysis., *Sci. Rep.* 3 (2013) 3000.
- [7] W.L. Haisler, D.M. Timm, J. a Gage, H. Tseng, T.C. Killian, G.R. Souza, Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation., *Nat. Protoc.* 8 (2013) 1940–1949.
- [8] K. Tanner, M.M. Gottesman, Beyond 3D culture models of cancer, *Sci. Transl. Med.* 7 (2015) 7–10.
- [9] C.R. Thoma, M. Zimmermann, I. Agarkova, J.M. Kelm, W. Krek, 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 69-70 (2014) 29–41.
- [10] S. Breslin, L. O’Driscoll, Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery, *Drug Discov. Today.* 18 (2013) 240–249.
- [11] L.C.E. Windus, D.L. Kiss, T. Glover, V.M. Avery, In vivo biomarker expression patterns are preserved in 3D cultures of Prostate Cancer, *Exp. Cell Res.* 318 (2012) 2507–2519.
- [12] A.D. Ellington, J.W. Szostak, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature.* 346 (1990) 818–822.
- [13] C. Tuerk, L. Gold, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase., *Science.* 249 (1990) 505–510.
- [14] K.T. Guo, A. Paul, C. Schichor, G. Ziemer, H.P. Wendel, Cell-SELEX: Novel perspectives of aptamer-based therapeutics, *Int. J. Mol. Sci.* 9 (2008) 668–678.

- [15] K. Sefah, D. Shangguan, X. Xiong, M.B. O'Donoghue, W. Tan, Development of DNA aptamers using Cell-SELEX., *Nat. Protoc.* 5 (2010) 1169–1185.
- [16] S. Ohuchi, Cell-SELEX Technology, *Biores. Open Access.* 1 (2012) 265–272.
- [17] Y. Zhang, Y. Chen, D. Han, I. Ocsoy, W. Tan, Aptamers selected by Cell-SELEX for application in cancer studies, *Bioanalysis.* 2 (2010) 907–918.
- [18] B.S. Singer, T. Shtatland, D. Brown, L. Gold, Libraries for genomic SELEX, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 781–786.
- [19] Y.M. Chang, M.J. Donovan, W. Tan, Using aptamers for cancer biomarker discovery, *J. Nucleic Acids.* (2013).
- [20] H. Jaganathan, J. Gage, F. Leonard, S. Srinivasan, G.R. Souza, B. Dave, et al., Three-dimensional in vitro co-culture model of breast tumor using magnetic levitation, *Sci. Rep.* 4 (2014) 6468.
- [21] K. Germer, M. Leonard, X. Zhang, RNA aptamers and their therapeutic and diagnostic applications, *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 4 (2013) 27–40.
- [22] K.W. Thiel, P.H. Giangrande, Intracellular delivery of RNA-based therapeutics using aptamers, *Ther. Deliv.* 1 (2010) 849–861.
- [23] P. Dua, S. Kim, D.K. Lee, Nucleic acid aptamers targeting cell-surface proteins, *Methods.* 54 (2011) 215–225.
- [24] D. Ghosh, R.C. Beavis, J. a. Wilkins, The identification and characterization of membranome components, *J. Proteome Res.* 7 (2008) 1572–1583.
- [25] T. Cavalier-Smith, “Membranome and membrane heredity] in development and evolution,” in *Organelles, Genomes and Eukaryote Phylogeny an Evolutionary Synthesis in the Age of Genomics*, 2012.
- [26] K. Sefah, L. Meng, D. Lopez-Colon, E. Jimenez, C. Liu, W. Tan, DNA aptamers as molecular probes for colorectal cancer study, *PLoS One.* 5 (2010) 1–14.
- [27] Y. Wang, Y. Luo, T. Bing, Z. Chen, M. Lu, N. Zhang, et al., DNA aptamer evolved by Cell-SELEX for recognition of prostate cancer, *PLoS One.* 9 (2014) 1–10.
- [28] D. Kang, J. Wang, W. Zhang, Y. Song, X. Li, Y. Zou, et al., Selection of DNA Aptamers against Glioblastoma Cells with High Affinity and Specificity, *PLoS One.* 7 (2012) 1–9.
- [29] K.H. Choi, M.W. Park, S.Y. Lee, M.-Y. Jeon, M.Y. Kim, H.K. Lee, et al., Intracellular expression of the T-cell factor-1 RNA aptamer as an intramer., *Mol. Cancer Ther.* 5 (2006) 2428–2434.

- [30] X. Zhang, J. Zhang, Y. Ma, X. Pei, Q. Liu, B. Lu, et al., A cell-based single-stranded DNA aptamer specifically targets gastric cancer, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 46 (2014) 1–8.
- [31] J.O. McNamara, E.R. Andrechek, Y. Wang, K.D. Viles, R.E. Rempel, E. Gilboa, et al., Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras., *Nat. Biotechnol.* 24 (2006) 1005–1015.
- [32] N. Li, H.H. Nguyen, M. Byrom, A.D. Ellington, Inhibition of cell proliferation by an anti-egfr aptamer, *PLoS One.* 6 (2011) 1–10.
- [33] Y. Liu, C.-T. Kuan, J. Mi, X. Zhang, B.M. Clary, D.B. D., et al., Aptamers selected against the unglycosylated EGFRvIII ectodomain and delivered intracellularly reduce membrane- bound EGFRvIII and induce apoptosis, *Biol Chem.* 390 (2009) 137–144.
- [34] J. Zhou, H. Li, S. Li, J. Zaia, J.J. Rossi, Novel Dual Inhibitory Function Aptamer–siRNA Delivery System for HIV-1 Therapy, *Mol Ther.* 16 (2008) 1481–1489.
- [35] S. Santulli-marotto, S.K. Nair, C. Rusconi, B. Sullenger, E. Gilboa, Multivalent RNA aptamers that inhibit ctla-4 and enhance tumor immunity, (2004) 7483–7489.
- [36] A. Rentmeister, A. Bill, T. Wahle, J. Walter, M. Famulok, RNA aptamers selectively modulate protein recruitment to the cytoplasmic domain of β -secretase BACE1 in vitro RNA aptamers selectively modulate protein recruitment to the cytoplasmic domain of b -secretase BACE1 in vitro, (2006) 1650–1660.
- [37] N. Li, J.N. Ebright, G.M. Stovall, X. Chen, H.H. Nguyen, A. Singh, et al., Technical and biological issues relevant to cell typing with aptamers, *J. Proteome Res.* 8 (2009) 2438–2448.
- [38] D.-B. Huang, D. Vu, L. a Cassiday, J.M. Zimmerman, L.J. Maher, G. Ghosh, Crystal structure of NF-kappaB (p50)₂ complexed to a high-affinity RNA aptamer., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 9268–9273.
- [39] H.K. Lee, Y.S. Choi, Y.A. Park, S. Jeong, Modulation of oncogenic transcription and alternative splicing by beta-catenin and an RNA aptamer in colon cancer cells, *Cancer Res.* 66 (2006) 10560–10566.
- [40] N. Bardeesy, J. Pelletier, Overlapping RNA and DNA binding domains of the wt1 tumor suppressor gene product., *Nucleic Acids Res.* 26 (1998) 1784–1792.
- [41] S. Shigdar, L. Qiao, S.-F. Zhou, D. Xiang, T. Wang, Y. Li, et al., RNA aptamers targeting cancer stem cell marker CD133., *Cancer Lett.* 330 (2013) 84–95.
- [42] S.P. Ohuchi, T. Ohtsu, Y. Nakamura, Selection of RNA aptamers against recombinant transforming growth factor- β type III receptor displayed on cell surface, *Biochimie.* 88 (2006) 897–904.

- [43] J.B. Leea, S.H. Sonb, M.C. Parkb, T.H. Kima, M.G. Kima, S.D. Yooa, et al., A novel in vitro permeability assay using three-dimensional cell culture system, J. Biotechnol. (2015).
- [44] Y. Chushak, M.O. Stone, In silico selection of RNA aptamers, Nucleic Acids Res. 37 (2009) 1–9.

Figures and Tables

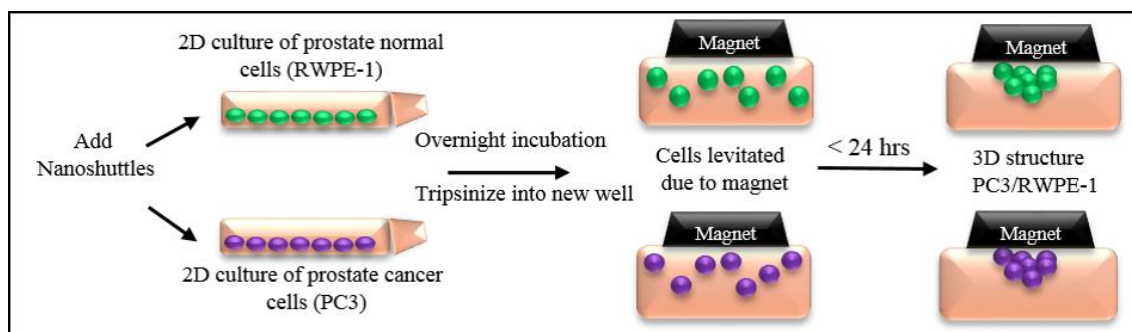


Fig 1: Cell Culture by MLM. Representative scheme to demonstrate the three-dimensional cell structure formation in both cell lines, RWPE-1 and PC3 by MLM.

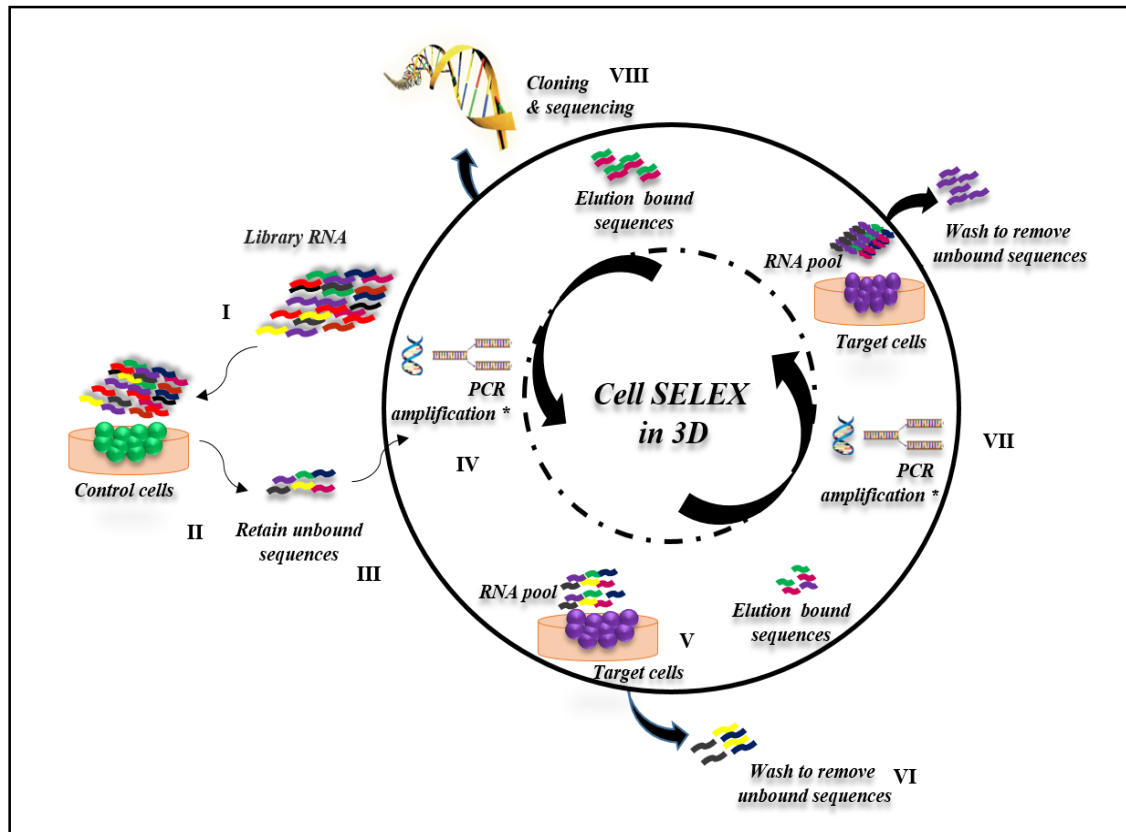


Fig 2: Schematic representation of the 3D cell-based aptamer selection. **I-** Construction of the RNA library. **II-** Negative selection with non-target cells (RWPE-1). **III-** Unbound sequences were amplified by PCR (**IV**) and then transcribed. **V-** RNA pool was incubated with the target cells, starting a new round of selection. **VI-** Unbound sequences were removed. **VII-** The linked sequences were eluted from the target cell, amplified by PCR and then transcribed again. This cycle was repeated 8 times and then held up cloning and sequencing (**VIII**) to obtained the aptamers. Adapted from the Wang et al., 2014[1].

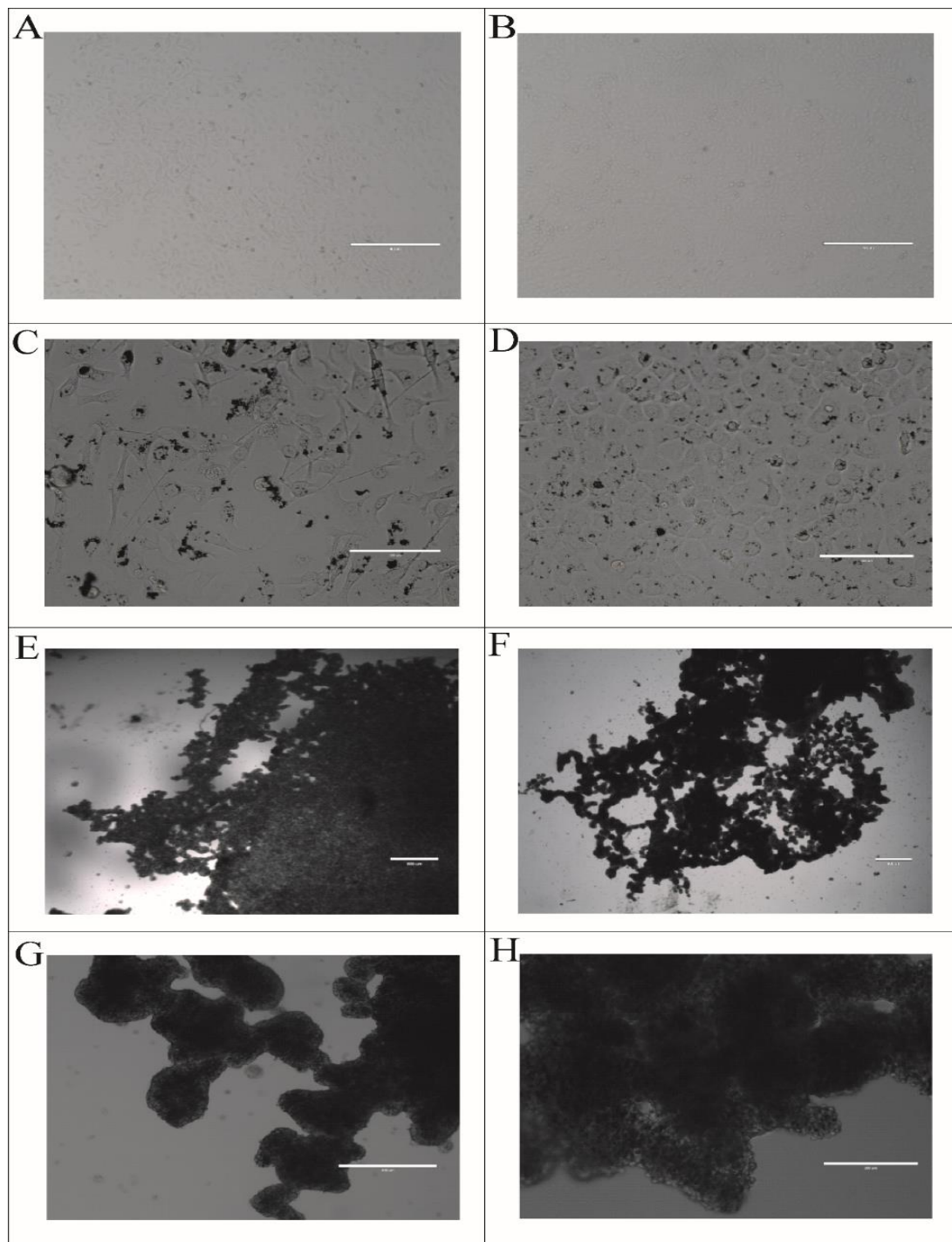


Fig 3: Cell lines 3D structure formation. **A)** RWPE-1 2D-culture (20x). **B)** PC-3 2D-culture (20x). **C)** RWPE-1 2D-culture with nanoshuttle solution (40x). **D)** PC-3 2D-culture with nanoshuttle solution (40x). **E)** RWPE-1 3D magnetically levitated culture (2x). **F)** PC-3 3D magnetically levitated culture (2x). **G)** RWPE-1 3D magnetically levitated culture (20x). **H)** PC-3 3D magnetically levitated culture (20x).

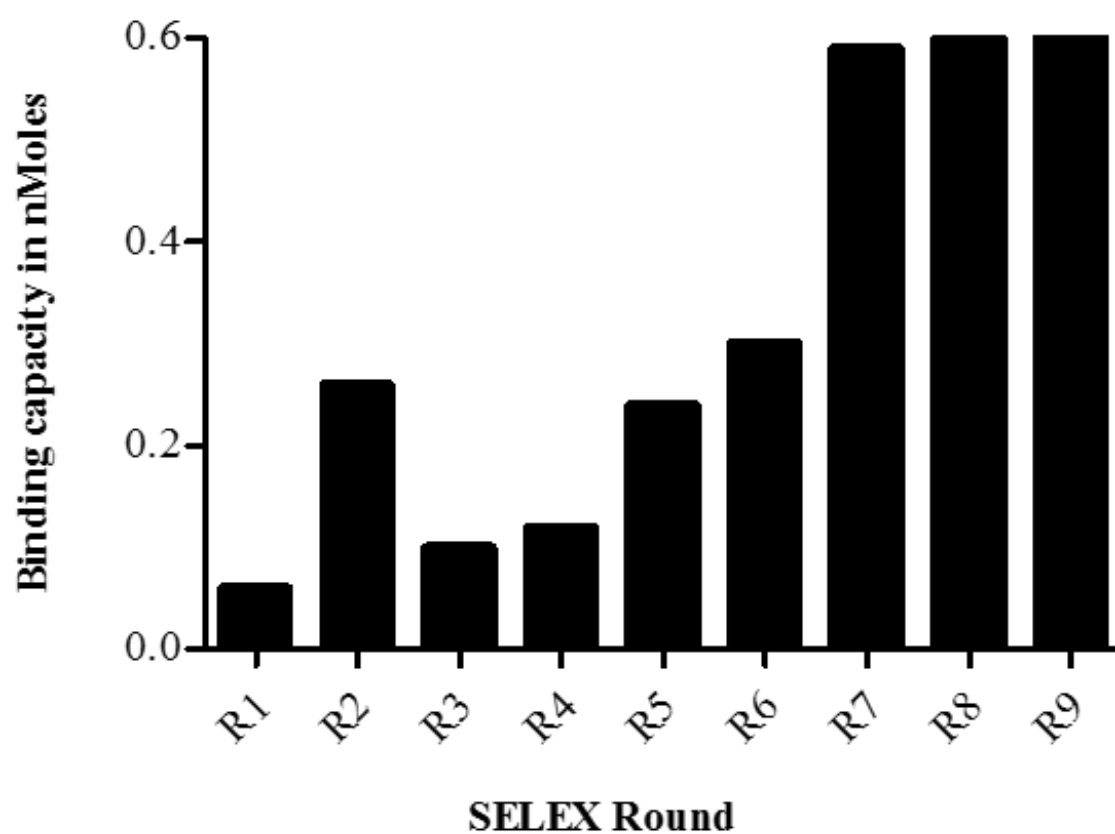


Fig 4: Evaluation of the library in the selection. Enrichment of oligonucleotide library during the nine rounds of selection by 3D Cell-SELEX. R1: negative selection RWPE-1 cell line in 3D; R2-R9: PC-3 cell line target in 3D.

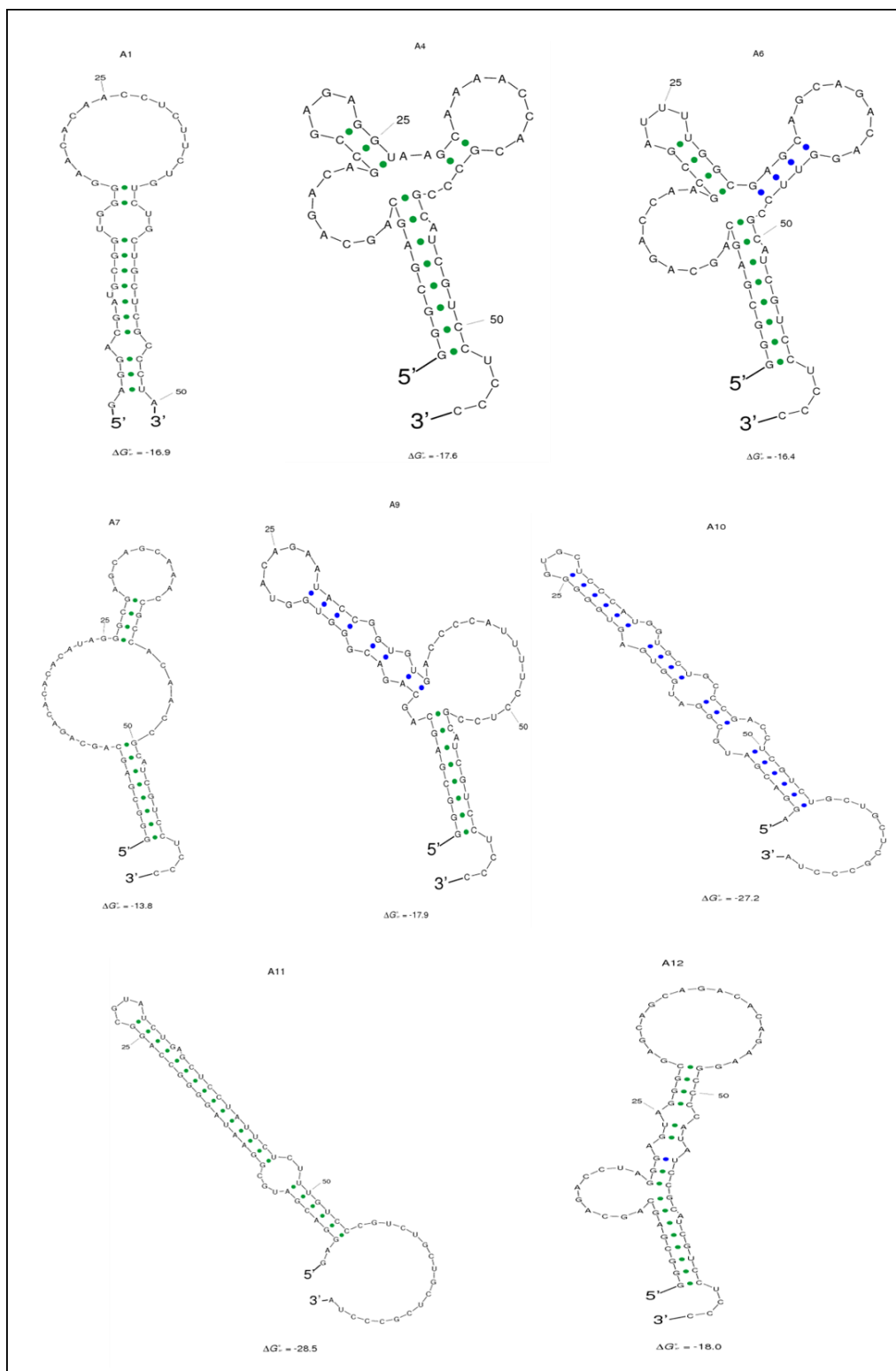


Fig 5: Predicted aptamer secondary structures. The secondary structures of each aptamers were demonstrated. The lowest free energy (ΔG) strutures were exhibit. Secondary structure predictions were determined using S-fold program.

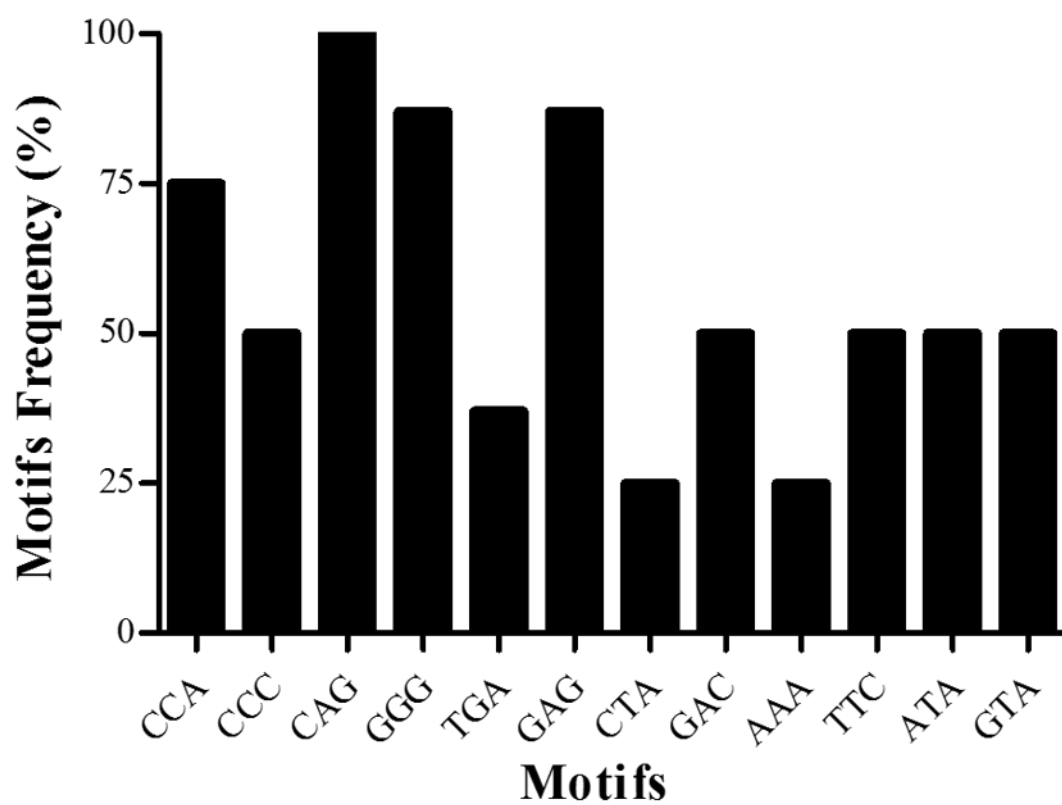


Fig 6: Motifs frequency. Frequency of sequences motifs on aptamers selected by 3D Cell-SELEX

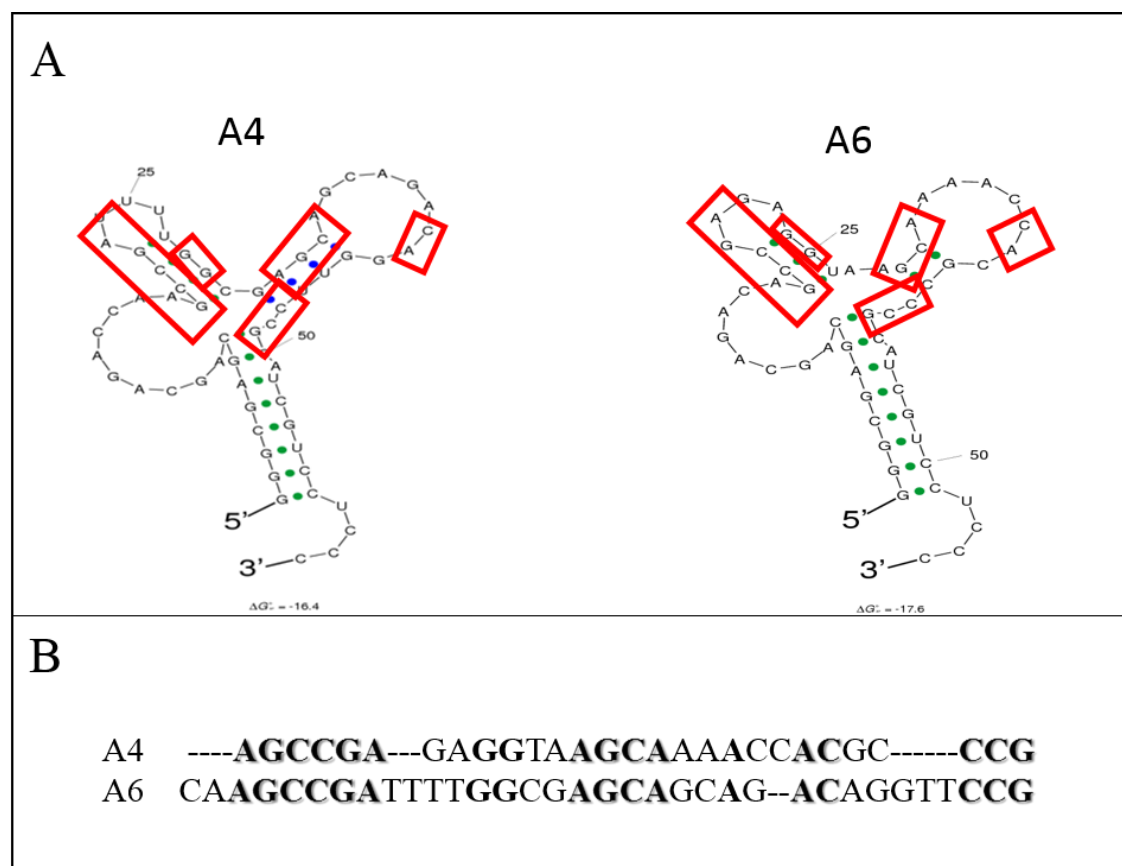


Fig 7: Sequences analysis of the two best aptamers. A) Secondary structure of aptamers A4 and A6. The motifs were highlighted in the loops regions. B) The linear sequences of the A4 and A6 aptamers were demonstrated, with 18 conserved nucleotides (in bold).

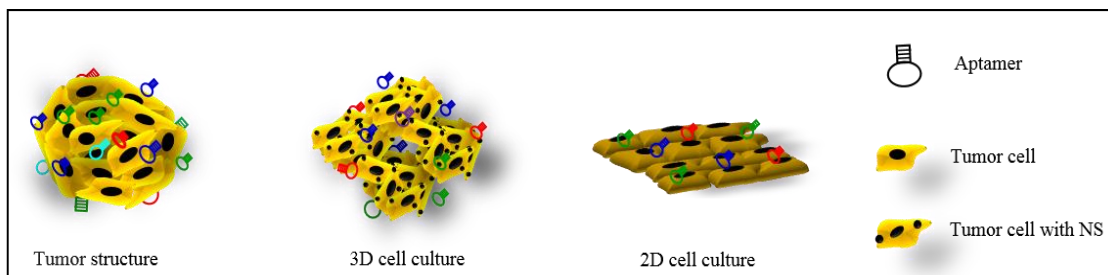


Fig 8: Representative model of cellular structure and possible interactions between cell surface receptors and aptamers. A) Tumor structure and interaction with aptamers. B) Cell structure in 3D and interaction with aptamers. C) Cell structure in 2D and interaction with aptamers.

Table 1: Sequences selected aptamers with the motifs regions in bold.

| Name | Seq 5'-3' | Base pairs | ΔG |
|---|---|------------|------------|
| A1 | TGGGGAACACAACCTCTTCT | 20 | -16.9 |
| A4 | AGCCGAGAGGTAAGCAAAACCACGCCCG | 28 | -17.6 |
| A6 | CAAGCCGATTTTGGCGAGCAGCAGACAGGTTCCG | 34 | -16.4 |
| A7 | ACACACATAGGGCGAGCAGCAAACCGCCACAACCG | 35 | -13.8 |
| A9 | GGGTGGTACAGAATACCGGTGTGACCCCATTTTCCTCCG | 39 | -17.9 |
| A10 | ATGGTGAGTGGGGGTGCTCCCATGGTGCTGCCCGACCTC | 39 | -22.2 |
| A11 | AATAGGGGCCAGGCGTATCTGAGCTCCTATTCTCTTTGTCCC | 42 | -28.5 |
| A12 | CTAGGGAGTAGGGCGAGCAGCAGACACAGAAGGCCCCATATCCG | 44 | -18.8 |
| - All Aptamer sequences are flanked by the primer sequences: 5' GAG GAC GAT GCG G; 3' GTC TGC TGC TCG CCC TA. | | | |