



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

**CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DO APTÂMERO A4 SELECIONADO CONTRA
CÉLULAS DE CÂNCER DE PRÓSTATA**

Aluna: Esther Campos Fernández

Orientadora: Profa. Dra. Vivian Alonso Goulart

UBERLÂNDIA - MG
2018



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

**CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DO APTÂMERO A4 SELECIONADO CONTRA
CÉLULAS DE CÂNCER DE PRÓSTATA**

Aluna: Esther Campos Fernández

Orientadora: Profa. Dra. Vivian Alonso Goulart

**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
2018**

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

F363c
2018 Fernández, Esther Campos, 1988
 Caracterização *in vitro* do aptâmero A4 selecionado contra células
de câncer de próstata [recurso eletrônico] / Esther Campos Fernández. -
2018.

Orientadora: Vivian Alonso Goulart.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.814>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. 2. Próstata - Câncer. 3. Diagnóstico. 4. Técnicas de
cultura de células. I. Goulart, Vivian Alonso, (Orient.) II. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



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

**CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DO APTÂMERO A4 SELECIONADO CONTRA
CÉLULAS DE CÂNCER DE PRÓSTATA**

ALUNA: Esther Campos Fernández

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Profa. Dra. Vivian Alonso Goulart

Examinadores:

Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila
Profa. Dra. Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria

Data da Defesa: 26/07/2018

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

(Profa. Dra. Vivian Alonso Goulart)

Dedico este trabalho à minha família, que me mostrou e me mostra o amor genuíno e a alegria de viver. *¡A vosotros familia!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, ao meu esposo e sua família, aos meus amigos, à minha orientadora, às minhas companheiras do grupo de pesquisa de câncer de próstata, Letícia e Aline, aos integrantes do Laboratório de Nanobiotecnologia, a minha banca de mestrado, aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica e aos integrantes do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia por serem fonte contínua de desenvolvimento e inspiração durante este mestrado. Também agradeço o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

“Life would be tragic if it weren't funny”.

Stephen Hawking, cientista e ser humano exemplar.

The Science of Second-Guessing, The New York Times, 12 de dezembro de 2004.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura bidimensional putativa do aptâmero A4 com energia livre de dobradura (-16,78kcal/mol) obtida pelo servidor web UNAFold.....	8
Figura 2. Formação de esferoide pela técnica de levitação magnética após cinco minutos de ter colocado o magneto (aumento 10x)..	10
Figura 3. Ensaio de viabilidade celular espectrofotométrico com o corante Neutral Red das linhagens prostáticas PC-3 e RWPE-1 incubadas com o aptâmero A4 durante 24 e 48 horas.....	15
Figura 4. Ensaio de proliferação celular fluorimétrico com o reagente Cytoselect das linhagens prostáticas PC-3 e RWPE-1 incubadas com o aptâmero A4 durante 24 e 48 horas.....	17
Figura 5. Ensaio de migração celular por cicatrização de ferida.....	19
Figura 6. Ensaio de clonogenicidade.....	21
Figura 7. Ensaio de ciclo celular das linhagens prostáticas incubadas com o aptâmero A4 com a distribuição de células em cada fase do ciclo celular (G0-G1, S e G2-M) e os histogramas sobrepostos correspondentes.	23
Figura 8. <i>Heatmap</i> da variação da expressão de genes relacionados ao câncer de próstata nas linhagens prostáticas PC-3 e RWPE-1 tratadas com solução 2,5µM do aptâmero A4 com dendograma.....	25

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS	vi
EPÍGRAFE	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
SUMÁRIO	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	7
2.1. Objetivo geral	7
2.2. Objetivos específicos	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1. Solução de aptâmero A4	8
3.2. Linhagens celulares	9
3.3. Cultura celular	9
3.4. Tratamentos	10
3.5. Ensaio de viabilidade celular	10
3.6. Ensaio de proliferação celular	10
3.7. Ensaio de migração celular por cicatrização	11
3.8. Ensaio de clonogenicidade	11
3.9. Ensaio de ciclo celular	11
3.10. Ensaio de expressão gênica	12
3.11. Análises estatísticas	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
5. CONCLUSÃO	30
5.1. Perspectivas	30
6. REFERÊNCIAS	33

RESUMO

O aptâmero A4 é um oligonucleotídeo de RNA com capacidade de ligação a células do câncer de próstata, selecionado pela técnica de Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento EXponencial em cultura tridimensional (*3D Cell-SELEX*). O objetivo deste estudo foi a caracterização *in vitro* do aptâmero A4. Para isto foi avaliado o perfil de viabilidade, proliferação, migração, clonogenicidade, ciclo celular e expressão de genes associados ao câncer de próstata de células de linhagens prostáticas tumorais (PC-3) e não tumorais (RWPE-1) incubadas com o aptâmero A4. A proliferação, viabilidade, migração e clonogenicidade das células prostáticas não foram alteradas após a incubação com o aptâmero A4. Entretanto, o aptâmero A4 alterou o ciclo das células RWPE-1 e a expressão de genes relacionados ao câncer de próstata em células PC-3 e RWPE-1. Assim, o aptâmero A4 pode ser usado em sistemas diagnósticos para o câncer de próstata, mas seu uso em sistemas terapêuticos necessita de mais estudos, que busquem a compreensão das alterações do ciclo celular e da expressão gênica.

Palavras-chave: aptâmero, câncer de próstata, cultura celular, diagnóstico.

ABSTRACT

Aptamer A4 is an RNA oligonucleotide with binding capability to prostate cancer cells that was selected by the Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment technique in 3D culture (3D Cell-SELEX). The aim of this study was the *in vitro* characterization of aptamer A4. For this, the profile of viability, proliferation, migration, clonogenicity, cell cycle and expression of genes associated with prostate cancer was assessed in tumor (PC-3) and non-tumor (RWPE-1) prostatic cell lines incubated with aptamer A4. Proliferation, viability, migration and clonogenicity of prostatic cells were not altered after incubation with aptamer A4. However, aptamer A4 altered RWPE-1 cell cycle and gene expression profile of genes related to prostate cancer in PC-3 and RWPE-1 cells. Thus, aptamer A4 could be used in diagnostic systems for prostate cancer, but its use in therapeutic systems requires further studies to understand the changes in cell cycle and gene expression profiles. Keywords: aptamer, prostate cancer, cell culture, diagnosis.

1. INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma de próstata, comumente conhecido como câncer de próstata (CaP) é uma neoplasia maligna altamente incidente, sendo a segunda de maior prevalência entre os homens. A estimativa global de mortalidade masculina por CaP para o ano de 2012 foi de 78 por cada 1.000 mortes, 6,6% da mortalidade masculina total. Entretanto, a estimativa de mortes devido a CaP apresenta uma tendência de queda, tanto na incidência, quanto na mortalidade como resultado das pesquisas científicas (FERLAY *et al.*, 2013). Para o presente ano de 2018, estimam-se 68.220 novos casos de CaP no Brasil, 66 casos a cada 1.000 homens. Entre os outros tipos de câncer, o CaP terá uma incidência nos homens brasileiros de 31,7%, superada apenas pelo câncer de pele não melanoma (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2017).

A idade a partir de 50 anos, a história familiar de CaP em parentes de primeiro grau e a cor escura de pele são os fatores de risco de pior prognóstico para o CaP (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2018). A sobrevida em cinco anos para o paciente diagnosticado com CaP localizado é do 88%, mas reduz até 29% para aqueles diagnosticados com CaP metastático (COFFEY, 1993). Dada a enorme diferença na sobrevida dos pacientes com CaP localizado e metastático, um diagnóstico precoce melhoraria a morbidade e mortalidade destes pacientes supondo um grande avanço na luta contra o CaP.

Este câncer é detectado através da palpação retal e da dosagem do antígeno prostático específico (do inglês *prostate-specific antigen*, PSA) no soro sanguíneo, e confirmado por análise histopatológica (*Gleason score*) em biópsia guiada por ultrassonografia transretal (VELONAS *et al.*, 2013). O PSA sérico é amplamente usado desde a década de 80, não apenas para o diagnóstico de CaP, mas também para o prognóstico de recidiva e o monitoramento da resposta a tratamentos contra o CaP.

Contudo, surgiu uma grande controvérsia no uso clínico do PSA após dois ensaios clínicos terem publicado recomendações conflitantes a respeito do uso do PSA no rastreamento de CaP. Em 2012, a *United States Preventive Services Task Force* desaconselhou aos médicos esta prática em homens assintomáticos

após o ensaio clínico *United States Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial* (PLCO) não achar evidências na melhora da sobrevida através do monitoramento do PSA sérico (ANDRIOLE *et al.*, 2012). Neste mesmo ano, o ensaio clínico *European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer* (ERSPC) encontrou evidências de que o seu uso reduziu a mortalidade em um subgrupo de pacientes (SCHRODER *et al.*, 2012). De fato, existem evidências há mais de trinta anos de que o PSA não é específico da próstata ou do sistema geniturinário masculino, mas é produzido por outras glândulas como as glândulas de Skene (conhecidas como a próstata feminina) e as glândulas salivares. O PSA está presente em outros fluidos diferentes ao sêmen ou à urina, como o líquido cefalorraquidiano e o leite materno. Ainda, outros tipos de câncer, como o câncer de bexiga, ovário e mama sintetizam PSA (DIAMANDIS; YU, 1997; SVANHOLM; ANDERSEN; ROHL, 1987; TEPPER *et al.*, 1984).

Por conseguinte, níveis elevados de PSA sérico (>4ng/mL) nem sempre são indicativos de CaP e apresentam uma grande chance de resultados falso-positivos tendo como consequência até 67% dos pacientes sobrediagnosticados e consequentemente sobretratados (LOEB *et al.*, 2014). O PSA sérico não é capaz, por exemplo, de diferenciar o CaP de prostatites ou hiperplasias prostáticas benignas (HAYTHORN; ABLIN, 2011). Além disso, aproximadamente um quarto dos homens com dosagem normal de PSA têm CaP e não são diagnosticados, sendo estes casos chamados de resultados falso-negativos, (TRICOLI; SCHOENFELDT; CONLEY, 2004) nos quais o diagnóstico acontece em um momento posterior, com um estado avançado do câncer, fato que diminui a efetividade do tratamento e a sobrevida do paciente.

Pela natureza de crescimento lento do CaP é importante o monitoramento sem tratamento, chamado de observação, em pacientes diagnosticados durante os estádios iniciais; pois a taxa de mortalidade a longo prazo é baixa (WILT, 2014). Entretanto, o PSA é um biomarcador de diagnóstico limitado, sendo necessário um procedimento invasivo de biópsia para a confirmação do diagnóstico de CaP. Os resultados do teste de PSA sérico são por conseguinte incertos e podem causar ansiedade nos pacientes, devido a possibilidade de estar associado a um falso-positivo, que levará a um procedimento de biópsia,

ou a um falso-negativo, que levará a uma primeira sensação de segurança para depois deparar com um diagnóstico de CaP avançado.

O diagnóstico tardio de CaP costuma acarretar um tratamento agressivo como a prostatectomia radical, que pode causar dor, infecção, sangramento, disfunção erétil e outras implicações emocionais, que em conjunto diminuem a qualidade de vida do paciente. Apesar do avanço nos tratamentos, pacientes com CaP localizado são submetidos a prostatectomia radical e um quarto deles ainda desenvolvem recidiva durante os primeiros dez anos (STEPHENSON *et al.*, 2006). Assim, o CaP causa também prejuízos financeiros aos sistemas de saúde públicos e aos planos de saúde.

Os fatos relacionados à baixa acurácia do teste de PSA sérico no diagnóstico de CaP apoiam a reavaliação do seu uso. De fato, a incidência de câncer de próstata tem diminuído nos últimos anos a nível mundial devido em parte à descontinuação do uso do PSA para o rastreamento de CaP por parte dos urologistas mais céticos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018). Entretanto, continuam aumentando as taxas de incidência em países em desenvolvimento como o Brasil, (FERLAY *et al.*, 2015) mas pode ser como consequência de uma tardia implementação de programas de rastreamento de CaP a partir do PSA sérico.

Por se tratar de um problema de saúde pública, a comunidade científica está avançando nessa área com o desenvolvimento de plataformas diagnósticas mais específicas e sensíveis que permitam um diagnóstico precoce e um estadiamento eficaz para diminuir a mortalidade e morbidade dos pacientes com CaP. Algumas abordagens tem desenvolvido novos testes combinando a dosagem do PSA com outros biomarcadores sorológicos, como o teste phi que usa a dosagem de PSA total, PSA livre e precursores inativos de PSA, (CATALONA *et al.*, 2011) ou o teste 4Kscore que combina o PSA total, livre e intacto com a calicreina glandular 2 (PAREKH *et al.*, 2015). Outros testes tem um enfoque genético, como o teste ProgenSA que mede a expressão do RNA não codificante PCA3 em urina (DURAND *et al.*, 2011) ou o teste da fusão dos genes TMPRSS2:ERG, que mede sua expressão em amostras de urina (TOMLINS *et al.*, 2011). Já o teste ConfirmMDx trata-se de um teste epigenético, que mede a metilação dos genes GSTP1, APC e RASSF em biópsias da próstata (WOJNO *et al.*, 2014). Ainda estes testes não são usados para o rastreamento

do CaP, mas para a confirmação de diagnóstico após PSA elevado. Desta maneira, eles são úteis para evitar a repetição de biópsias em pacientes com resultado histopatológico negativo.

Entretanto, a técnica de biópsia padrão ouro em CaP é a realização de biópsia de seis núcleos que também conta com falsos negativos, devido ao possível erro de amostragem no qual as células cancerígenas não se encontram no tecido biopsiado, por não incluir o volume total da próstata. Para evitar estes falsos-negativos, os especialistas propõem biópsias ainda mais invasivas, com maior número de núcleos extraídos (MURPHY; MCKIERNAN; OLSSON, 2004).

No intuito de evitar as biópsias, a oncologia molecular busca marcadores moleculares de câncer em fluídos corporais, abordagem chamada de biópsia líquida, que não está focada na detecção de áreas tumorais específicas no órgão afetado, mas em moléculas liberadas por esse órgão nos fluídos corporais. Por isso, esta abordagem molecular poderia representar, em teoria, o volume total e o estado global da próstata. Outra vantagem das biópsias líquidas é que os procedimentos de amostragem de fluídos corporais como sangue, saliva, urina, e sêmen são menos invasivos. As amostras são mais acessíveis e as biópsias líquidas provocam menos desconforto e ansiedade nos pacientes.

Os tumores liberam ácidos nucleicos, proteínas, vesículas extracelulares e células, entre outros componentes, nos fluídos corporais. Estes componentes podem ser detectados e usados como biomarcadores tumorais nas biópsias líquidas. O termo biópsia líquida começou a ser usado em amostras de sangue que continham células tumorais circulantes (CTCs). A quantificação de CTCs, assim como o nível de expressão dos marcadores de superfície delas vêm sendo estudados como fatores diagnósticos, prognósticos, de rastreamento e de monitoramento do tratamento de vários tipos de câncer (STROTMAN *et al.*, 2016).

Os tumores liberam na corrente sanguínea aproximadamente 1000 CTCs por dia, que sobrevivem menos de duas horas e meia, (MENG *et al.*, 2004) estando presentes na proporção de uma CTC por um milhão de leucócitos no sangue periférico (FRANKLIN *et al.*, 1999). Por isso, seu isolamento requer técnicas de processamento rápidas e com alta especificidade. Os métodos de detecção de CTCs em sangue periférico baseiam-se no seu tamanho, densidade, carga elétrica, morfologia e principalmente em antígenos de

superfície; sendo as tecnologias de detecção mais comuns a imunocitoquímica, a imunofluorescência, a microfluídica, a PCR com transcriptase reversa (RT-PCR) e a citometria de fluxo (LEÓN-MATEOS *et al.*, 2016). A caracterização *in vitro* do efeito do aptâmero A4 em linhagens prostáticas determinaria a viabilidade do seu uso clínico na detecção de CTCs por citometria de fluxo em amostras de pacientes com CaP, como urina e sangue; primeiramente para o diagnóstico destes pacientes e conseqüentemente para seu tratamento.

A palavra aptâmero quer dizer parte que se ajusta, do latim *aptus* (ajuste) e do grego *meros* (parte). Assim, os aptâmeros são oligonucleotídeos que possuem grande estabilidade estrutural e capacidade de ligação a alvos específicos. O papel dos aptâmeros seria o equivalente aos anticorpos nos sistemas de imunocaptura, mas sua afinidade a alvos específicos é maior devido ao seu pequeno tamanho na escala nanométrica, que melhora a acessibilidade a estes alvos. Ainda, pelo fato de não serem imunogênicos não induzem uma resposta imune. Por serem sintetizados quimicamente, há uma alta reprodutibilidade e baixa variabilidade na produção dos aptâmeros. Além disso, os aptâmeros podem ser modificados com grupos químicos que melhorem suas propriedades ou que permitam o acoplamento de outras moléculas para o melhor diagnóstico ou tratamento de doenças, como no caso de acoplamento de drogas. Desta forma, os aptâmeros são potentes ferramentas teranósticas que podem ser usadas na prática clínica do CaP tanto para terapia quanto para diagnóstico (ZHAO; TAN; FANG, 2015).

Seguindo esta linha de raciocínio, nosso grupo isolou vários aptâmeros de RNA ligantes de células de CaP da linhagem PC-3 pelo método de evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment, SELEX*). Uma biblioteca de RNA, produzida a partir do *pool* de DNA do sangue de pacientes com CaP, foi incubada com linhagens celulares da próstata em um processo de nove ciclos de amplificação de aptâmeros que permitiu a seleção daqueles ligantes específicos de células tumorais da próstata da linhagem PC-3. A linhagem celular normal da próstata RWPE-1 foi usada no primeiro ciclo, que foi um ciclo de seleção negativa, pois os aptâmeros ligantes dela foram descartados e o restante de aptâmeros não ligados foram usados no seguinte ciclo. Nos oito ciclos seguintes foi usada a linhagem PC-3 para a seleção positiva dos aptâmeros de RNA, nos quais os

aptâmeros ligantes eram usados no seguinte ciclo. As células foram cultivadas em cultura tridimensional (3D) por levitação magnética reproduzindo a metodologia *3D-Cell SELEX* que permitiu a seleção de alvos mais similares aos encontrados nas condições *in vivo*, pois as células cultivadas em 3D representam melhor a arquitetura celular *in vivo* do que a cultura tradicional em monocamada (SOUZA *et al.*, 2016).

Dentre os aptâmeros isolados, o aptâmero A4 foi o que apresentou características mais desejáveis, como pequeno tamanho, baixa energia livre e alta afinidade pelas células PC-3; devido a isso ele foi testado como prova de conceito em amostras de sangue periférico de pacientes com CaP (SOUZA *et al.*, 2016). O aptâmero A4 apresentou uma alta correlação do número de CTCs detectadas com a idade e com o nível de PSA sérico dos pacientes após tratamento, mostrando um grande potencial para uma nova plataforma de diagnóstico para o CaP (OLIVEIRA, 2017). Assim, para levar o uso do aptâmero A4 à prática clínica é necessário previamente um estudo no qual o aptâmero A4 seja caracterizado *in vitro* para definir seu potencial no desenvolvimento de plataformas teranósticas.

Desta maneira nossa hipótese é que o aptâmero A4 não altera o comportamento celular quando incubado com linhagens normais e tumorais da próstata, apenas marca as células alvo sem induzir uma resposta celular. Uma vez que isto seja comprovado, o aptâmero A4, com registro de patente BR1020170015637, poderá continuar no processo de implementação em um novo sistema teranóstico de CaP a partir da detecção de CTCs em sangue de pacientes.

O uso de aptâmeros em biopsia líquida para o CaP, permitiria um diagnóstico menos invasivo e mais eficaz, que auxiliaria na saúde pública reduzindo o número de testes e intervenções cirúrgicas desnecessárias; e ainda um tratamento mais específico e direcionado que melhoraria a sobrevida e morbidade dos pacientes com CaP.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar o efeito do aptâmero de RNA A4 em células de linhagens humanas da próstata cultivadas *in vitro* para delimitar seus potenciais usos clínicos, tanto diagnósticos como terapêuticos, no câncer de próstata.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros celulares, de viabilidade, proliferação, capacidade de migração, clonogenicidade e ciclo celular, e a expressão gênica de células não tumorais RWPE-1 incubadas com o aptâmero A4;

- Avaliar aos parâmetros celulares de viabilidade, proliferação, capacidade de migração, clonogenicidade e ciclo celular, e a expressão gênica de células tumorais PC-3 incubadas com o aptâmero A4.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Solução de aptâmero A4

O aptâmero A4 de RNA (r) foi biotinizado no extremo 5' e sintetizado com uma sequência adicional de DNA da seguinte maneira 5'-biotinaTTTTTTTTTTTTGGGCGAGCAGCAGArCrArGrCrCrGrArGrArGrGrUrArArGrCrArA-3' (Integrated DNA Technology, Coralville, IA, EUA) (Figura 1). Para a reconstituição do aptâmero A4 liofilizado foi adicionada água de injeção até conseguir uma solução estoque de 100µM.

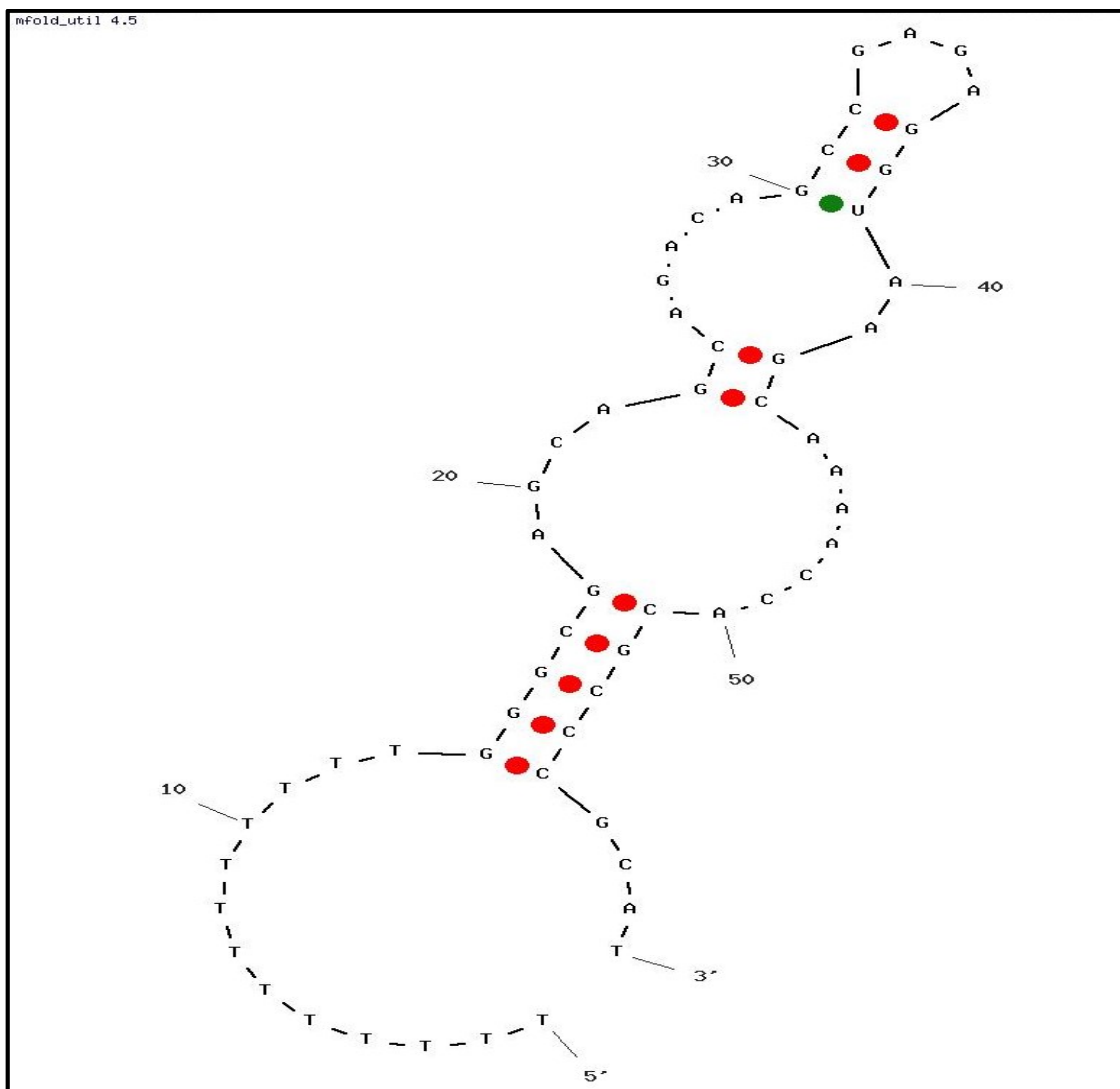


Figura 1. Estrutura bidimensional putativa do aptâmero A4 com energia livre de dobradura (-16,78kcal/mol) obtida pelo servidor web UNAFold. Ponto verde: pares de bases comuns entre a estrutura de mínima energia livre e a estrutura do centroide do conjunto. Pontos vermelhos: pares de bases apenas na estrutura centroide do conjunto. (Fonte: <https://www.idtdna.com/Unafold/Home/Index>).

3.2. Linhagens celulares

A linhagem tumoral da próstata PC-3 (ATCC® CRL-1435™) foi doada pela UNESP (Botucatu, SP) e a linhagem normal da próstata RWPE-1 (ATCC® CRL-11609™) foi doada pela UNICAMP (Campinas, SP). Ambas foram cultivadas em monocamada e em cultura 3D pelas técnicas de levitação magnética ou *bioprinting* para os ensaios *in vitro*.

3.3. Cultura celular

A linhagem PC-3 foi cultivada com meio RPMI-1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) complementado com 100µg/mL de gentamicina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e 10% de soro fetal bovino (Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A linhagem RWPE-1 foi cultivada com meio queratinócitos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e também complementado com 100µg/mL de gentamicina e 10% de soro fetal bovino. Ambas as linhagens foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Os meios de cultura foram trocados a cada três dias e alcançando aproximadamente 80% de confluência em garrafas T75, as células foram tripsinizadas com solução 0,25% de tripsina-EDTA (Corning, New York, NY, EUA), contadas em câmara de Neubauer e semeadas em placas apropriadas para cultivo aderente em monocamada ou em placas de aderência ultrabaixa (Corning, New York, NY, EUA) para cultivo em 3D, segundo as especificações de cada ensaio.

Para os cultivos em 3D foram usados os *kits* Bio Assembler (Nano3D Biosciences, Houston, TX, EUA) próprios para cada tipo de placa e de cultura 3D, levitação magnética ou *bioprinting*. Antes das células serem tripsinizadas, foram adicionados ao meio 400µL de partículas magnéticas denominadas NanoShuttles (incluídas nos *kits*) por cada garrafa T75 e incubados *overnight*. Uma vez semeadas as células em placas apropriadas, o magneto incluído nos *kits* foi colocado na parte superior (levitação magnética) ou inferior (*bioprinting*) da placa para permitir a formação dos esferoides (Figura 2).

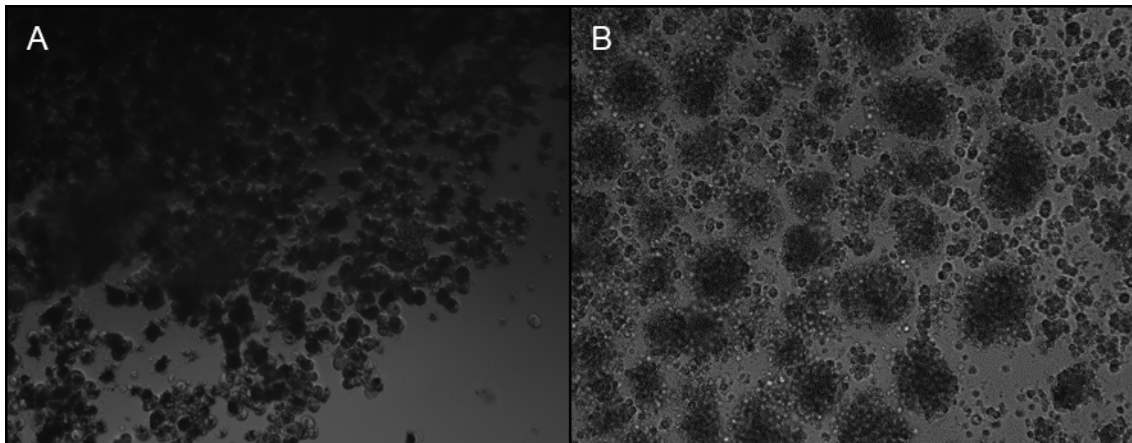


Figura 2. Formação de esferoide pela técnica de levitação magnética após cinco minutos de ter colocado o magneto (aumento 10x). A) Linhagem celular PC-3. B) Linhagem celular RWPE-1.

3.4 Tratamentos

Após 24 horas de plaqueamento, as linhagens celulares foram tratadas com soluções 5, 2,5 e 0 μ M do aptâmero A4 em meio apropriado sem soro fetal bovino (para os ensaios de viabilidade, proliferação e migração celular), ou apenas 2,5 e 0 μ M do aptâmero A4 em meio apropriado sem soro fetal bovino (para os ensaios de clonogenicidade, ciclo celular e expressão gênica). A concentração de 2,5 μ M foi escolhida por ter sido utilizada na detecção de CTCs pelo aptâmero A4 (OLIVEIRA, 2017), a de 5 μ M, por ser o dobro da concentração anterior e a de 0 μ M, como controle negativo.

3.5. Ensaio de viabilidade celular

As linhagens celulares foram semeadas em placas de 96 poços contendo 2x10³ células por poço e cultivadas pelo método de *bioprinting*. A proliferação celular foi analisada após 24 e 48 horas dos tratamentos com o reagente Neutral Red (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.6. Ensaio de proliferação celular

As linhagens celulares foram semeadas em placas de 96 poços contendo 2x10³ células por poço e cultivadas pelo método de *bioprinting*. A proliferação celular foi analisada após 24 e 48 horas dos tratamentos com o reagente

CytoSelect Cell Proliferation Assay Reagent (Cell Biolabs, San Diego, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.7. Ensaio de migração celular por cicatrização

As linhagens celulares foram semeadas em placas de 12 poços e cultivadas em monocamada, com 2×10^5 células por poço até atingirem 100% de confluência. Um risco longitudinal (ferida) foi feito na monocamada celular com uma ponteira estéril (tempo 0 hora) e então as células foram tratadas. No tempo 0 hora e após 24 e 48 horas dos tratamentos foram adquiridas imagens pelo microscópio invertido EVOS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e as áreas da ferida (não cicatrizadas) foram medidas pelo programa Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA) para avaliar o fechamento da ferida. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.8. Ensaio de clonogenicidade

As linhagens celulares foram semeadas em placas de 6 poços e cultivadas em monocamada, com 500 células por poço. Após 2 horas, as células foram incubadas com os tratamentos contendo 1% de soro fetal bovino. Após 10 dias do tratamento, tempo necessário para ocorrerem aproximadamente 6 divisões celulares, as células foram fixadas com solução de acetona-metanol 50:50 por 20 minutos, coradas com solução aquosa de cristal de violeta 1% (Synth, Diadema, SP, Brasil) por 10 minutos e lavadas com água deionizada. As colônias com mais de 50 células foram contadas com auxílio do microscópio invertido EVOS. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.9. Ensaio de ciclo celular

As linhagens celulares foram semeadas em placas de 6 poços e cultivadas em monocamada, com 1×10^6 células por poço. Após 48 horas dos tratamentos, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) 1x, fixadas com etanol 70% durante 30 minutos a 4°C, lavadas duas vezes com PBS 1x mediante centrifugação a 850 g por 5 minutos, tratadas com 50µL de RNaseA (100µg/mL) (Quiagen, Hilden, Alemanha) e coradas com 200µL de iodeto de propídio (10µg/mL) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). A fluorescência do

iodeto de propídio foi lida pelo canal FL-2 do citômetro de fluxo FACS Canto II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA). As percentagens de células em cada fase do ciclo celular foram determinadas usando a ferramenta Cell Cycle do programa FlowJo v.10 (FlowJo LLC, Ashland, OR, EUA).

3.10. Ensaio de expressão gênica

As linhagens celulares foram semeadas em placas de 6 poços e cultivadas pelo método de levitação magnética, com 1×10^6 células por poço. Após 48 horas dos tratamentos, o RNA total das células foi extraído com o reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA complementar foi sintetizado a partir de 250ng de RNA total mediante transcrição reversa realizada com o kit M-MLV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante no termociclador Mycycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) a 37°C durante uma hora. A partir do DNA complementar foi realizada a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR, do inglês *Real-time Polymerase Chain Reaction*) usando placas TaqMan® Array Plates (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) customizadas por nosso grupo de pesquisa com primers de genes relacionados ao CaP, segundo a literatura científica, no sistema RT-PCR 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As condições foram 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. Os genes de referência foram *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), *HPRT1* (hipoxantina-guanina fosforibosil-transferase 1) e *GUSB* (beta-glucuronidase). A média da expressão gênica destes três genes de referência foi usada para normalizar a expressão gênica dos genes testados. O nível de fluorescência limiar foi determinado manualmente para cada placa e o limiar do ciclo (Ct) foi determinado pelo programa SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os *foldchanges* dos genes foram representados com o valor de $\log_2 2^{-\Delta\Delta Ct}$ e plotados em um gráfico de *heatmap* pelo programa Heatmapper, disponível no servidor web <http://www.heatmapper.ca>, com um dendograma desenhado por meio do método de agrupamento de ligação média utilizando a distância euclidiana (BABICKI *et al.*, 2016).

Os genes analisados, relacionados ao CaP foram: *MAPK1* (proteína quinase ativada por mitógeno 1), *APOE* (apolipoproteína E), *DDX11*, *DDX12P*

(helicase 11 e pseudogene da helicase 12 que contêm o motivo DEAD/H), *NKX3-1* (NK3 *homeobox* 1), *ELAC2* (ribonuclease de zinco ElaC 2), *VDR* (receptor da vitamina D3), *SOX9* (gene 9 que contém a caixa para a região determinadora do sexo no cromossomo Y), *PBOV1* (gene superexpresso no câncer de próstata e mama 1), *CAV1* (caveolina 1), *CD44* (receptor de ácido hialurônico), *EGFR* (receptor do fator de crescimento epidérmico), *PTGS2* (prostaglandina-endoperóxido sintase 2), *IL6* (interleucina-6), *PCAT6* (transcrito 5 associado ao câncer de próstata), *TLR9* (receptor de tipo *Toll* 9), *TMPRSS2* (serino protease de transmembrana 2), *MDM2* (homólogo humano do gene murino *Mdm2*), *ANXA1* (anexina A1), *ADAR* (adenosina desaminase específica de RNA de dupla fita), *SPP1* (fosfoproteína 1 secretada), *EEF1A2* (fator de alongamento de tradução eucariótica 1 Alpha 2), *TP53* (proteína tumoral p53), *RNASEL* (ribonuclease L), *GHR* (receptor do hormônio do crescimento) e *ARNTL* (receptor nuclear translocador de aril-hidrocarbonetos).

3.11. Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada pelo programa PrismGraph v.7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). O teste Qui-Quadrado, o teste t de Student não-pareado, o teste de Kurskal-Wallis com pós-teste de Dunn para comparações múltiplas ou o teste de análise de variância simples com pós-teste de Tukey para comparações múltiplas foram usados para comparar as variáveis conforme as características dos dados de cada ensaio (especificado em cada gráfico). O valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo para todos os testes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aptâmero A4 liga em células de câncer de próstata através de alvos desconhecidos até o momento (SOUZA *et al.*, 2016). No presente estudo, foi implementado um modelo prático para provar a factibilidade de aptâmeros como sondas para uso teranóstico no câncer, representando uma prova de conceito do aptâmero A4 no CaP. Pela primeira vez, foi usada a cultura celular magnética em 3D para caracterizar *in vitro* o aptâmero A4, o que permitiu aumentar nosso conhecimento sobre este aptâmero e sua interação com células prostáticas, além de determinar seus usos clínicos mais plausíveis.

Os ensaios *in vitro* foram realizados na linhagem celular RWPE-1 por ter sido utilizadas na seleção negativa do aptâmero A4 durante o SELEX e por representar células com as quais o aptâmero poderia se ligar num possível diagnóstico ou tratamento, mas que não são seu alvo direto; e na linhagem celular PC-3 por ter sido utilizada na seleção positiva e por representar seu alvo, onde o aptâmero atuaria no desenvolvimento de um possível biossensor para diagnóstico ou de um sistema de direcionamento de drogas para tratamento. Devido aos aptâmeros sofrerem uma rápida remoção natural, via sistema urinário (MISSAILIDIS; HARDY, 2009), os ensaios tiveram uma duração máxima de 48 horas; tempo suficiente para avaliar o efeito deles no caso de atuar em um sistema terapêutico, que requer um maior tempo de exposição ao aptâmero do que em um sistema diagnóstico.

O aptâmero A4 não modificou significativamente a viabilidade celular das linhagens PC-3 e RWPE-1 após incubação em cultura 3D *bioprinting* (Figura 4). Assim, o aptâmero A4 não teve efeitos citotóxicos sobre as células prostáticas, o que pode ser interessante ao se induzir um efeito citotóxico nas células prostáticas tumorais acoplado a uma droga ao aptâmero A4, e tal droga seja citotóxica e específica para as células alvo tumorais da próstata. O aptâmero A4 atuaria como um carreador que libera a droga no lugar específico, onde sua ação citotóxica é necessária e assim evita efeitos colaterais em outras células, que muitas vezes limitam o efeito dos tratamentos como no caso da toxicidade dos quimioterápicos (LEONG *et al.*, 2012).

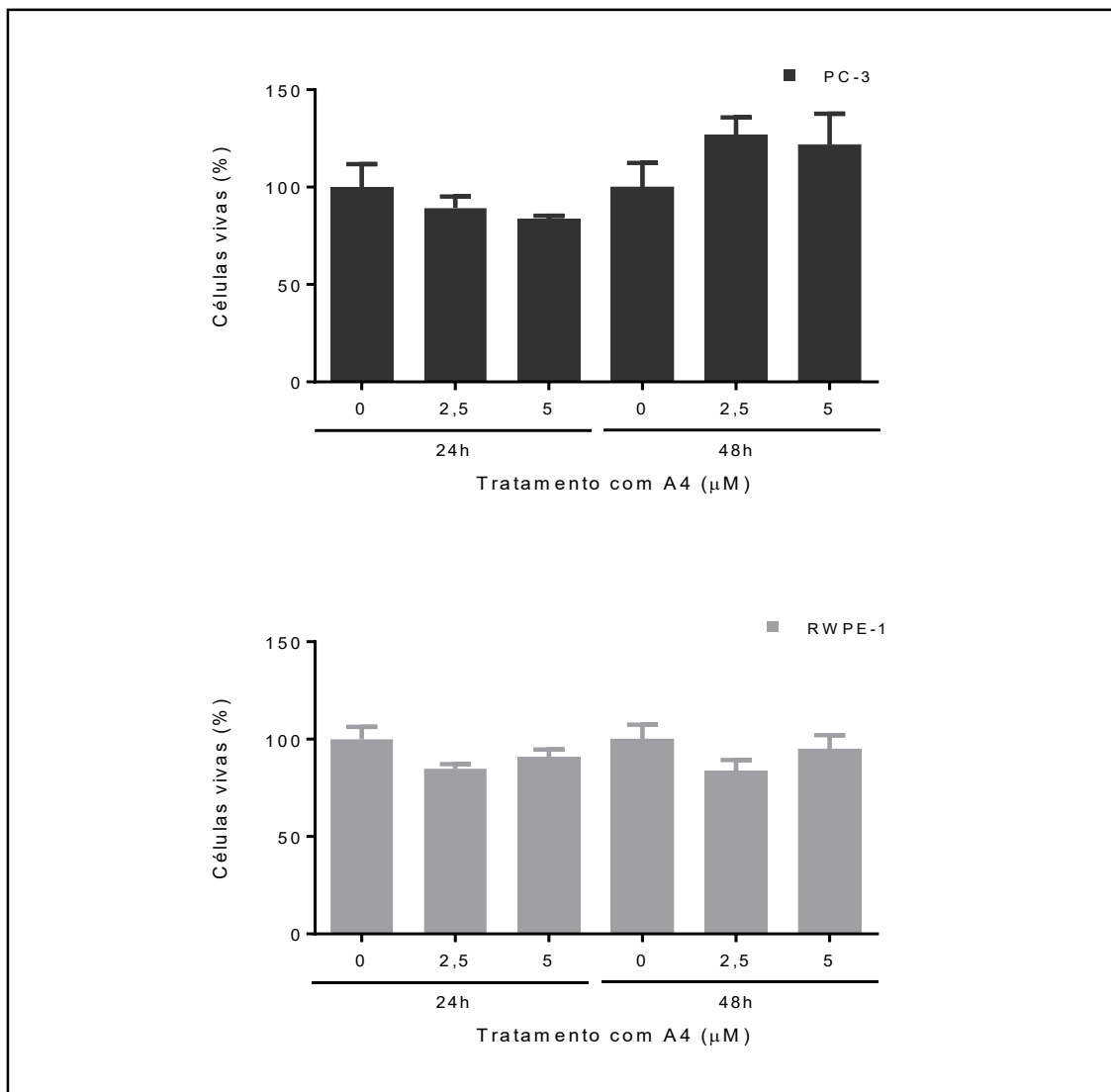


Figura 3. Ensaio de viabilidade celular espectrofotométrico com o corante Neutral Red das linhagens prostáticas PC-3 e RWPE-1 incubadas com o aptâmero A4 durante 24 e 48 horas. Para determinar as diferenças entre as condições testadas foi usado o teste de Kurskal-Wallis com pós-teste de Dunn para comparações múltiplas para PC-3 e o teste de análise de variância simples com pós-teste de Tukey para comparações múltiplas para RWPE-1. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.

Comparando com nossos ensaios de viabilidade celular, um estudo usou concentrações similares de 0 a 4 μ M de aptâmeros específicos para os alvos CD44, EpCAM ou ambos, incubados durante 72 horas em quatro linhagens de câncer de ovário. O aptâmero anti-EpCAM não teve um efeito significativo na viabilidade celular das linhagens em concentrações menores que 2 μ M, mas

reduziu a viabilidade celular em até 30% na concentração de 4 μ M. Já o aptâmero anti-CD44 conseguiu reduzir a viabilidade celular em três das linhagens, proporcionalmente à concentração utilizada; e o aptâmero anti-CD44-EpCAM reduziu a viabilidade de todas as linhagens de 50 a 95%. Estes dados mostram a especificidade dos aptâmeros pelos seus alvos e seu efeito nas células. Fato apoiado pela correlação da capacidade citotóxica dos aptâmeros e a expressão de tais alvos nas linhagens testadas, analisada pela técnica de Western blot (ZHENG *et al.*, 2017). Extrapolando estes resultados à nossa pesquisa, poderíamos considerar que se o alvo do aptâmero A4 participa de vias de morte celular, as concentrações utilizadas foram baixas para induzir uma resposta neste ensaio.

A proliferação das linhagens prostáticas usadas não sofreu mudanças significativas quando incubadas com o aptâmero A4 nos ensaios *in vitro* de cultura 3D *bioprinting* (Figura 3). O ensaio indicou que o aptâmero possivelmente não atue em células RWPE-1 por não serem seu alvo e ainda terem sido usadas para sua seleção negativa. De tal modo, um estudo que testou a proliferação de células HeLa não ligantes do aptâmero de RNA RA16, cujo alvo é a linhagem NCI-H460 de câncer de pulmão, mas cujo ligante também é desconhecido, não foi observada alteração neste parâmetro (WANG *et al.*, 2018). Em células PC-3, o aptâmero A4 mostrou não interferir em vias relacionadas com a proliferação celular. Diferente do observado nas células PC-3, a maioria dos aptâmeros usados na área da oncologia molecular mostram uma diminuição na proliferação das suas células alvo, sendo todos os ligantes moléculas-alvo que atuam em vias de sinalização de fatores de crescimento (MISSAILIDIS; HARDY, 2009).

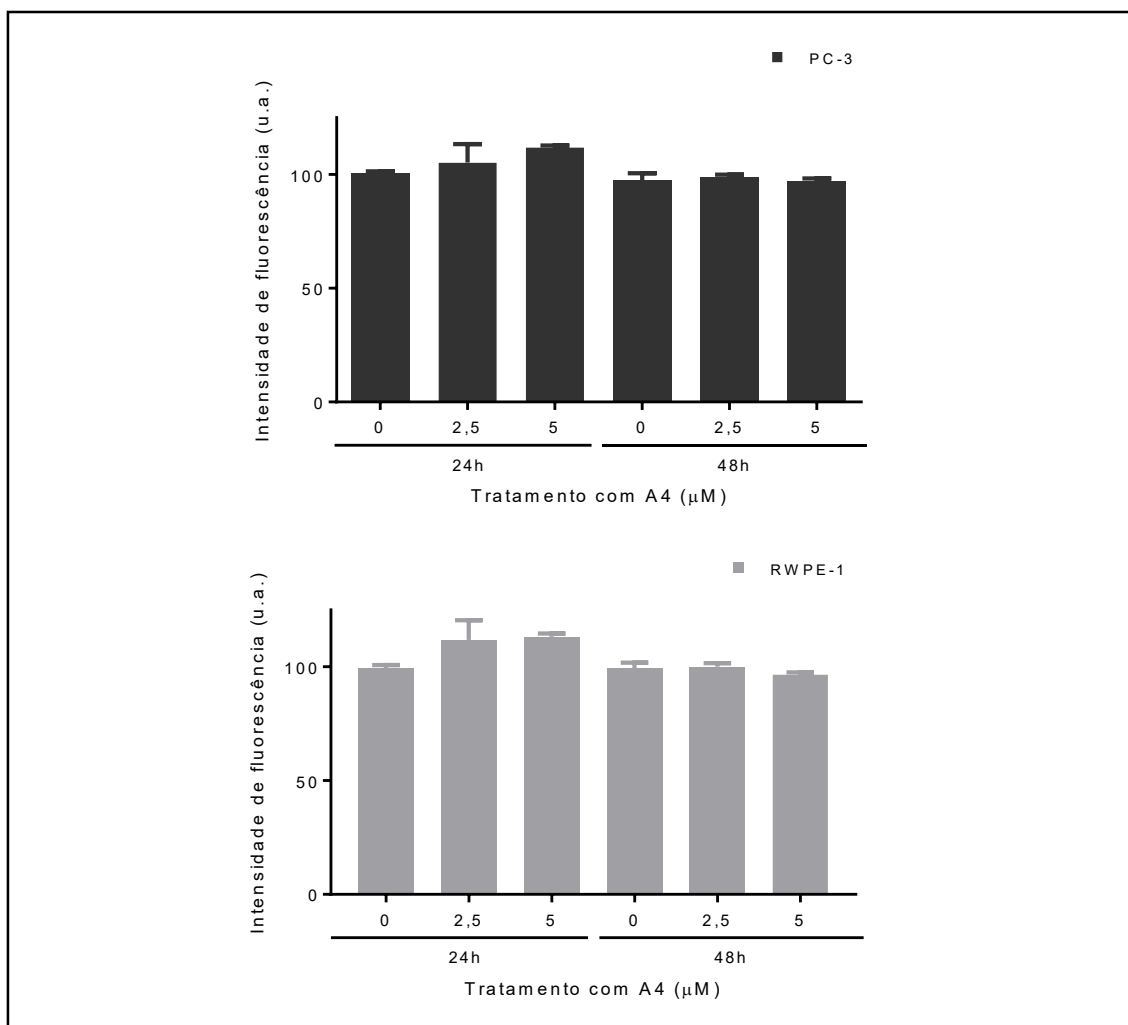


Figura 4. Ensaio de proliferação celular fluorimétrico com o reagente Cytoselect das linhagens prostáticas PC-3 e RWPE-1 incubadas com o aptâmero A4 durante 24 e 48 horas. Para determinar as diferenças entre as condições testadas foi usado o teste de Kurskal-Wallis com pós-teste de Dunn para comparações múltiplas para PC-3 e o teste de análise de variância simples com pós-teste de Tukey para comparações múltiplas para RWPE-1. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.

Por exemplo, o aptâmero U2 inibiu a proliferação de células de glioblastoma que expressam seu alvo, a variante III do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFRvIII), nas concentrações de 25 e 50nM após 24 e 48 horas (ZHANG *et al.*, 2018). O aptâmero RA16 também inibiu em 75%, a proliferação da linhagem celular NCI-H460 com uma concentração de 300nM (WANG *et al.*, 2018), seis vezes menor que a máxima concentração usada neste estudo. Os resultados observados para as altas concentrações usadas neste

ensaio reforçam a hipótese de que o aptâmero A4 parece se ligar a um alvo que não intervém na proliferação celular.

Similar aos nossos resultados, a incubação do aptâmero AS1411 (solução 10 μM) também não mostrou diferença significativa na proliferação de células de hepatocarcinoma. Todavia, uma versão do aptâmero AS1411 modificada (solução 10 μM), que aumenta sua afinidade e capacidade de ligação ao seu alvo nucleonina, conseguiu mostrar uma diminuição na proliferação destas células (CHO *et al.*, 2016). Assim, nossos resultados podem indicar que se o ligante do aptâmero A4 interfere nas vias de proliferação celular, a afinidade do aptâmero A4 por seu ligante ou a concentração de aptâmero A4 não são suficientes para alterar sua função nas concentrações utilizadas no presente estudo.

Outros aptâmeros aumentam a proliferação das suas células alvo, especialmente no campo da engenharia de tecidos, no qual os aptâmeros são combinados com nanomateriais para melhorar a reconstrução tecidual. Por exemplo, aptâmeros imobilizados em filmes de quitosana e que ligam fibronectina promoveram a adesão, proliferação e colonização de osteoblastos para a regeneração óssea (PARISI *et al.*, 2017).

De acordo com os ensaios de migração celular em cultura em monocamada, não detectamos diferenças significativas na migração das linhagens testadas *in vitro* com o aptâmero A4 (Figura 5). Isto indica que a via de sinalização do alvo do aptâmero A4 não parece estar envolvida na migração celular, nem portanto na polimerização-despolimerização de filamentos do citoesqueleto ou na adesão de membrana; ou ainda, se estiver envolvida, a via não é afetada pela ligação do aptâmero A4 nas concentrações usadas no ensaio. Estes dados apoiam os resultados observados no ensaio de proliferação, o qual compreende vias comuns de sinalização.

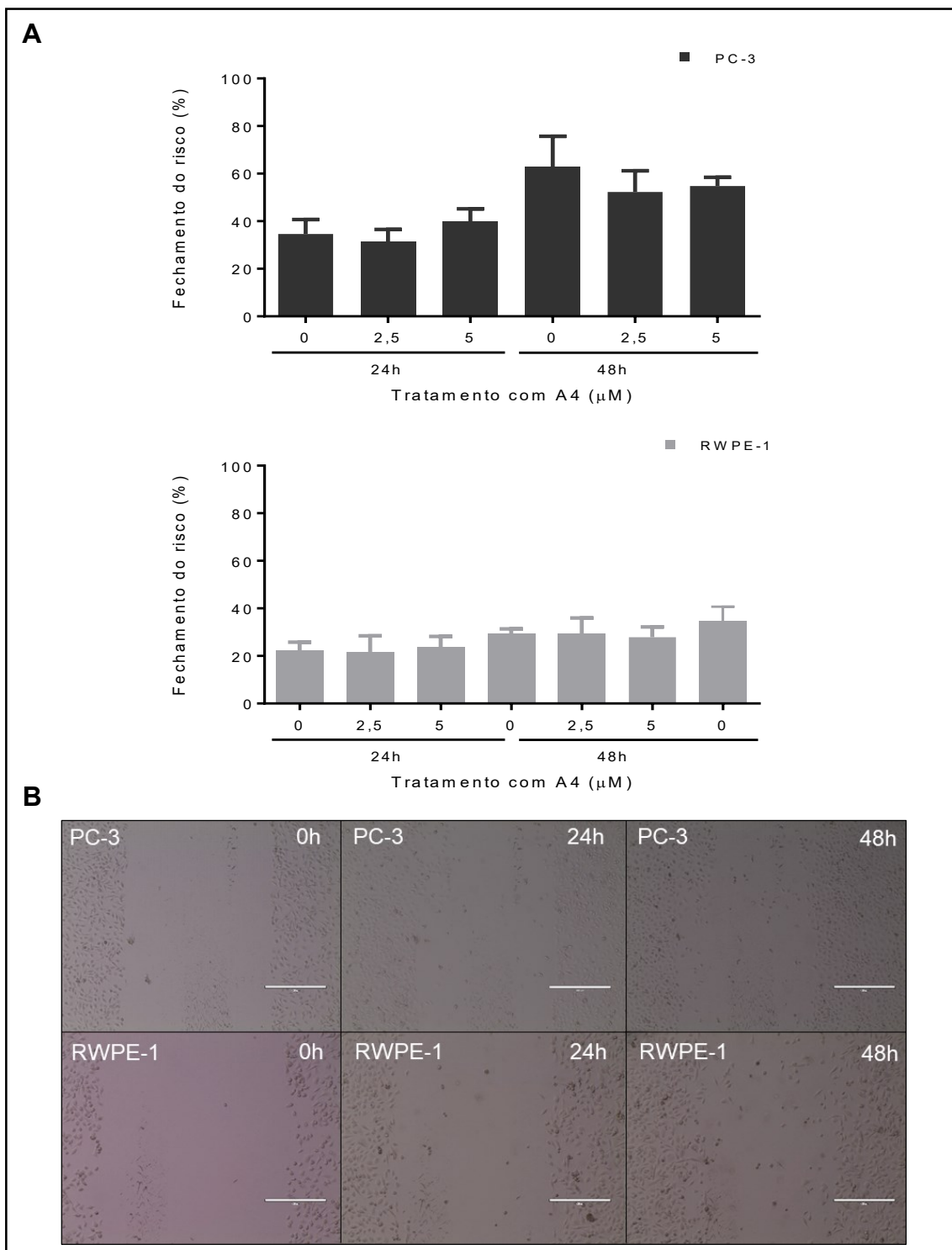


Figura 5. Ensaio de migração celular por cicatrização de ferida. A) Gráfico das linhagens prostáticas PC-3 e RWPE-1 incubadas com o aptâmero A4 durante 24 e 48 horas. B) Imagens de células tratadas com 5 μM da solução do aptâmero A4 em tempo 0, 24 e 48 horas (Aumento 10x, barra de escala 100 μm). Para determinar as diferenças entre as condições testadas foi usado o teste de análise

de variância simples com pós-teste de Tukey para comparações múltiplas para PC-3 e RWPE-1. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.

As pesquisas com aptâmeros em oncologia molecular buscam a inibição da migração. De tal modo, a migração induzida pelo fator SDF-1 em várias linhagens murinas e humanas de leucemia foi reduzida, mas não completamente inibida pela ligação do aptâmero NOX-A12 aos receptores deste fator em um ensaio de tipo *transwell* (WEISBERG *et al.*, 2017), diferente do nosso tipo de ensaio de migração celular, que foi por cicatrização. No mesmo tipo de ensaio que o nosso, o aptâmero AXL mostrou reduzir a distância migrada pelas células de câncer de ovário SKOV3-IP1 após 24 e 48 horas de incubação, quando comparado a um aptâmero controle não ligante (KANLIKILICER *et al.*, 2017). Também o aptâmero U2, cujo alvo é o receptor EGFRvIII, diminuiu significativamente o fechamento da ferida nas suas células alvo de glioblastoma multiforme, comparado às células controle após 8 e 24 horas de incubação (ZHANG *et al.*, 2018). O aptâmero CL4, que também atua no mesmo alvo que o U2, mostrou que além de reduzir a mobilidade nas células que contêm seu alvo, o efeito nessa redução não apenas depende da presença do alvo, mas também da expressão de proteínas *downstream* nas vias de sinalização ativadas pelo alvo (CAMORANI *et al.*, 2015). Portanto, não podemos descartar a possibilidade da molécula alvo do aptâmero A4 estar envolvida na migração celular, mas existir um *bypass* que faça com que a via esteja constitutivamente ativa.

Já que as diferentes concentrações de aptâmero testadas, de 5 μ M e 2,5 μ M de aptâmero A4 não mostraram diferença significativa entre elas, nem quando comparadas ao controle sem aptâmero A4 nos testes de proliferação, viabilidade e migração celular; os próximos experimentos foram realizados apenas com a concentração de 2,5 μ M.

A partir do ensaio de clonogenicidade em cultura em monocamada, observamos que a capacidade clonogênica das linhagens PC-3 e RWPE-1 não foi afetada pelo aptâmero A4 (Figura 6). Portanto, a capacidade de se multiplicar formando clones destas linhagens não é alterada, o que apoia os resultados observados nos nossos ensaios de proliferação e migração.

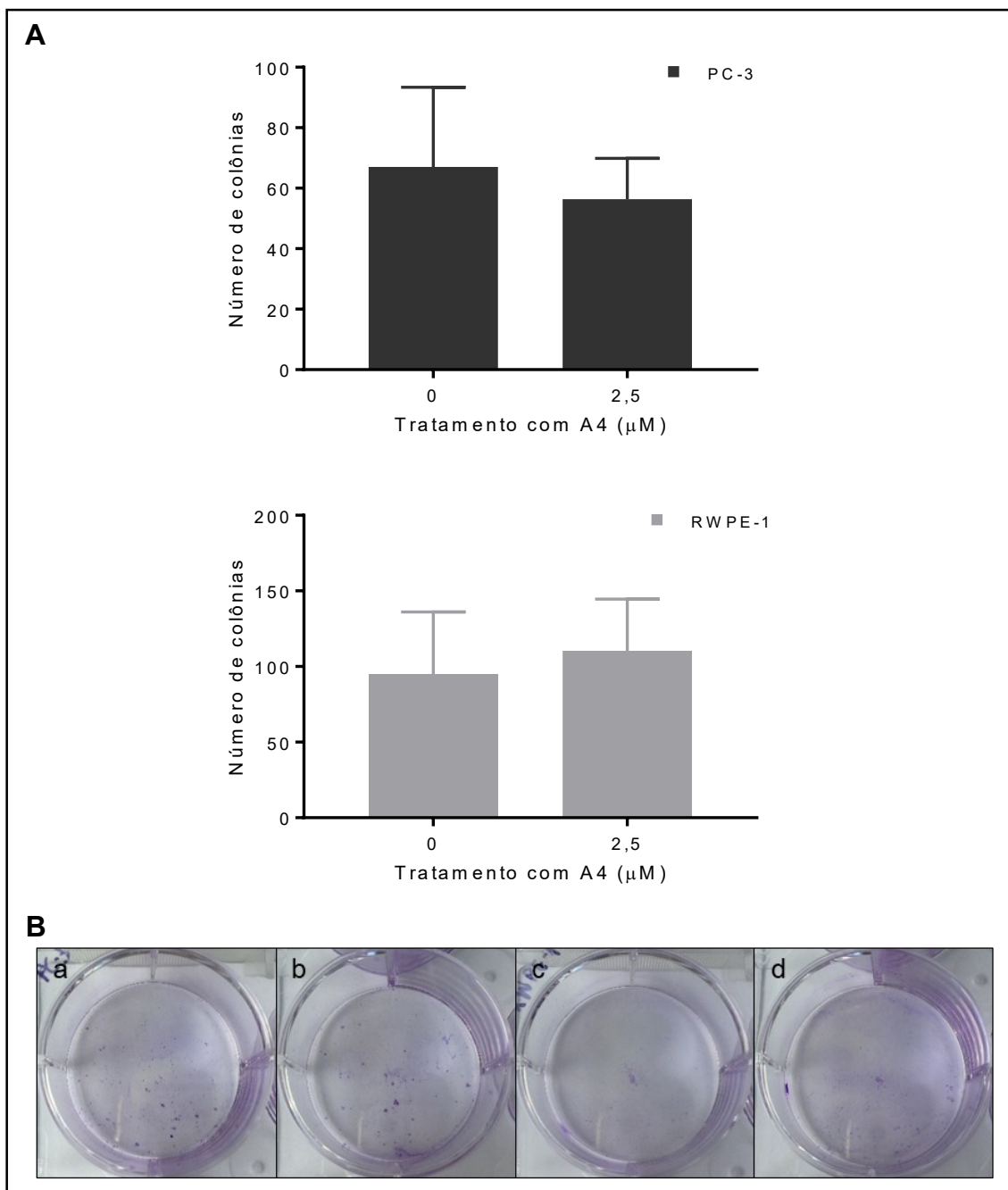


Figura 6. Ensaio de clonogenicidade. A) Número de colônias a partir de 500 células plaqueadas das linhagens prostáticas PC-3 e RWPE-1 após 7 dias de incubação com o aptâmero A4. B) Imagens ilustrativas de PC-3 a) sem tratamento e b) tratada com solução 2,5μM de aptâmero A4; e RWPE-1 c) sem tratamento e d) tratada com solução 2,5μM de aptâmero A4. Para determinar as diferenças entre as condições testadas foi usado o teste t de Student não pareado para PC-3 e RWPE-1. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média.

Nos parâmetros de proliferação e migração celular na área de câncer, os artigos científicos normalmente mostram redução na clonogenicidade das linhagens celulares alvo. Por exemplo, um aptâmero anti- β -arrestina conseguiu reduzir a divisão celular afetando as vias de sinalização Hedgehog e Wnt relacionadas com o desenvolvimento embrionário de vertebrados, em processos como a divisão celular e a tumorigênese. Assim, este aptâmero foi acoplado a um outro aptâmero anti-nucleolina formando um aptâmero bivalente que reduziu a clonogenicidade de células K562 de leucemia mielóide crônica na concentração de 40nM, dez vezes menor que a concentração necessária para o mesmo efeito do aptâmero univalente anti-nucleolina. Com estes resultados, o estudo mostrou elegantemente a inibição do crescimento de células tumorais combinando um aptâmero antagonista (anti- β -arrestina) com um aptâmero carreador (anti-nucleolina), que direciona o anterior até o núcleo para exercer sua ação (KOTULA *et al.*, 2014). Mostrando novamente que as concentrações usadas nos nossos ensaios seriam suficientes para observar a variação dos parâmetros celulares.

A distribuição das fases do ciclo celular das linhagens prostáticas cultivadas em monocamada mostrou uma diferença significativa nas células RWPE-1 quando tratadas com o aptâmero A4. Assim, o aptâmero A4 parece aumentar o número de células na fase G2-M do ciclo, diminui o número de células na fase S tanto para células tumorais quanto não tumorais, sendo de maneira significativa nas células não tumorais (Figura 7).

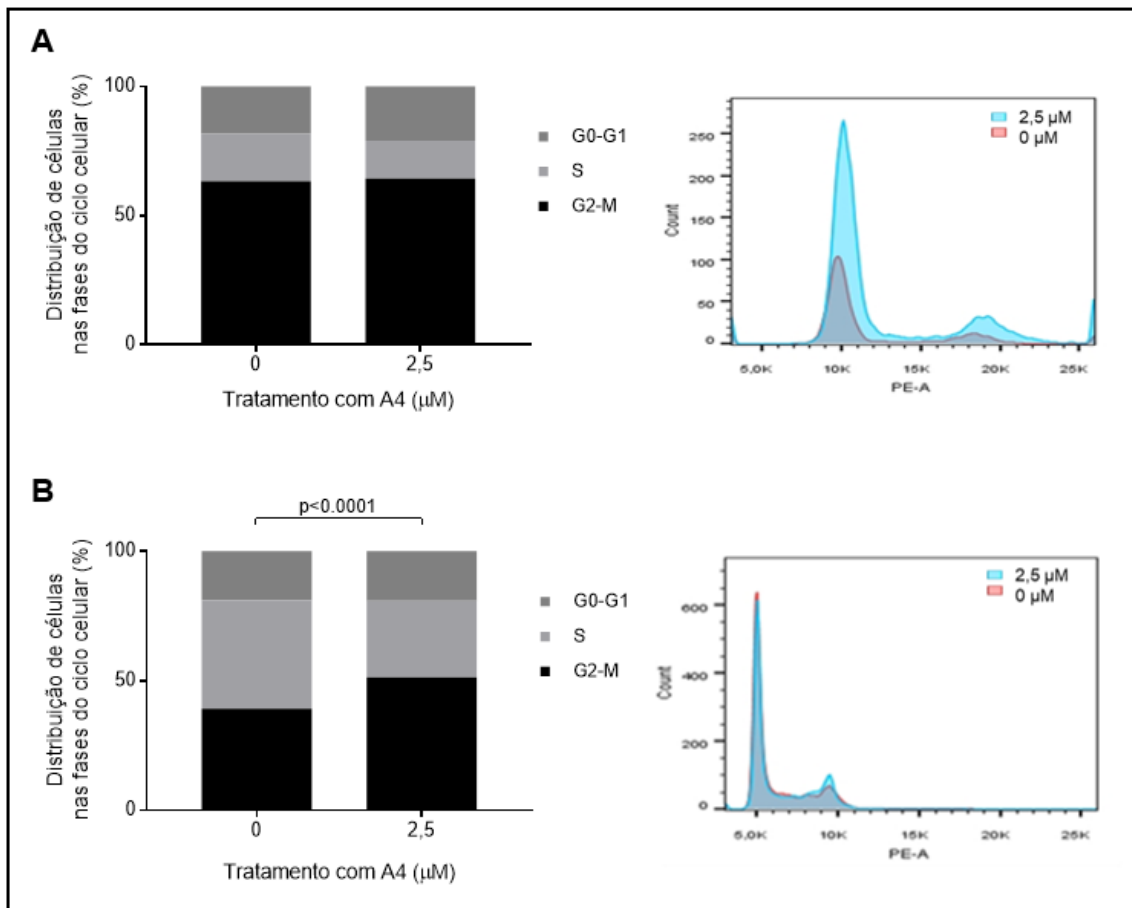


Figura 7. Ensaio de ciclo celular das linhagens prostáticas incubadas com o aptâmero A4 com a distribuição de células em cada fase do ciclo celular (G0-G1, S e G2-M) e os histograma sobrepostos correspondentes. A) PC-3 e B) RWPE-1. Para determinar as diferenças entre as condições testadas foi usado o teste de Qui-quadrado para PC-3 e RWPE-1. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.

Esses resultados sugerem que o aptâmero A4 poderia induzir mecanismos de reparo em células prostáticas normais, que estariam bloqueando a entrada das células em mitose, sem alterar o ciclo celular de células tumorais. Entretanto, a maioria dos estudos mostram paradas em alguma fase do ciclo celular apenas de células tumorais em resposta ao tratamento com aptâmeros. Por exemplo, uma versão modificada do aptâmero AS1411 também diminuiu significativamente o número de células em fase S, sendo que o aptâmero não modificado não mostrou diferença estatística em células de hepatocarcinoma (CHO *et al.*, 2016). Linhagens de câncer cervical, de próstata e de mama quando incubadas com o aptâmero GRO29A rico em guanina e com capacidade

antiproliferativa, devido à sua ligação com a nucleonina, mostraram um acúmulo de células na fase S conjuntamente com a inibição da replicação do DNA. O mesmo estudo mostrou que as células de fibroblastos normais HS27 não mostraram diferenças na distribuição das fases do ciclo celular. Porém, foi sugerido que o fato das células HS27 terem uma menor proporção de células na fase S, poderia condicionar uma menor resposta ao aptâmero (XU *et al.*, 2001). Da mesma maneira, a resposta das células tumorais PC-3 poderia ter sido menor devido a uma menor proporção inicial de células na fase S, o que teria conduzido a uma diferença de resposta não significativa, mesmo com o aptâmero A4 atuando em ambas as células como inibidor da mitose.

Os resultados da expressão gênica de PC-3 e RWPE-1 cultivadas em cultura 3D por levitação magnética mostraram que o aptâmero A4 interfere substancialmente (a partir de um *foldchange* igual ou maior que 2) na expressão de dez genes relacionados ao câncer de próstata. Na linhagem RWPE-1, o uso do aptâmero aumentou a expressão de um grupo de genes formado por *APOE*, *MAPK1* e *ELAC2*; e diminuiu a expressão de *EEF1A2* e *ARNTL* (Figura 8).

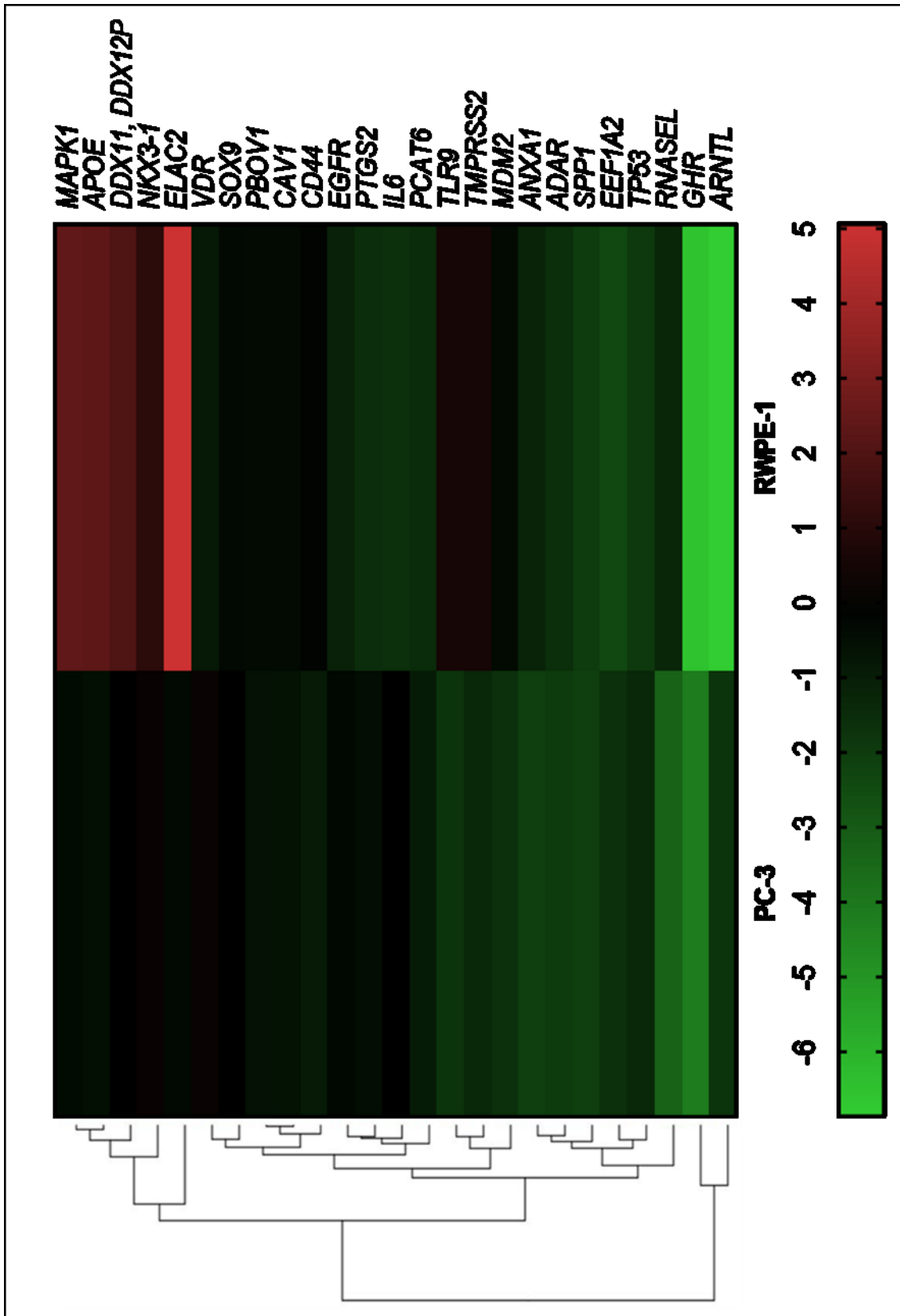


Figura 7. Heatmap da variação da expressão de genes relacionados ao câncer de próstata nas linhagens prostáticas PC-3 e RWPE-1 tratadas com solução 2,5µM do aptâmero A4 com dendograma. Escala segundo o *foldchange*.

O gene *APOE* codifica a apolipoproteína E que está associada à agressividade do CaP e é altamente expressa pela linhagem tumoral PC-3 (VENANZONI; GIUNTA, 2003). Também, várias isoformas da proteína codificada pelo gene *APOE* tem sido associadas a um fenótipo mais agressivo do CaP (IFERE *et al.*, 2013). Assim, o aumento da expressão de *APOE* em células RWPE-1 poderia indicar uma indução da tumorigênese pelo aptâmero A4.

O aumento da expressão do gene *MAPK1* poderia também induzir o potencial tumorigênico das células RWPE-1, pois *MAPK1* é considerado um oncogene que promove a proliferação e migração celular, cuja proteína participa em múltiplos processos celulares (PEARSON G *et al.*, 2001). No câncer de próstata, os reguladores negativos de *MAPK1* suprimem a progressão tumoral, como o microRNA miR-378 (CHEN *et al.*, 2016). Pelo contrário, o aptâmero A4 provavelmente ative a expressão deste gene e com ele a progressão tumoral, mas nossos ensaios *in vitro* não mostraram evidências disso; podendo existir algum tipo de regulação pós-transcricional que iniba a expressão da proteína codificada por este gene.

O gene *ELAC2* expressa uma proteína com atividade endoribonuclease que ainda interage com a γ -tubulina durante a mitose produzindo a parada do ciclo celular (NODA *et al.*, 2006). Assim, *ELAC2* é considerado um supressor tumoral e o aumento da sua expressão produziria uma diminuição da divisão celular. A variação da expressão deste gene é a maior em termos de aumento, mais do dobro comparada com os outros genes, e está de acordo com os resultados obtidos nas análises do ciclo celular das células RWPE-1.

A proteína codificada pelo gene *EEF1A2* está envolvida na tradução ribossomal de proteínas e normalmente não é expressa em tecidos não tumorais. Mesmo estando relacionada à oncogênese por aumentar a capacidade de migração (AMIRI *et al.*, 2007), sua alta expressão tem um valor prognóstico positivo no tumor primário de câncer de mama (KULKARNI *et al.*, 2007; TOMLINSON *et al.*, 2007). Assim, a proteína deste gene poderia desempenhar várias funções durante a transformação maligna e algumas delas são ainda desconhecidas. Por conseguinte, não temos informações suficientes sobre este gene para definir o possível fenótipo que derivaria da diminuição da expressão dele em células prostáticas não tumorais após tratamento com o aptâmero A4.

ARNTL é um gene que codifica um fator de transcrição que permite a expressão de genes relacionados ao ciclo circadiano e que está fortemente regulado por mecanismos epigenéticos (TAKAHASHI *et al.*, 2008). Possivelmente, *ARNTL* atua como supressor tumoral, como foi mostrado em um estudo com amostras de pacientes de câncer de ovário (YEH *et al.*, 2014) e a diminuição na expressão deste gene em células RWPE-1 pode conduzir a um perfil mais tumoral. Contudo, nossos resultados apenas mostram que existe transcrição do gene, mas não nos informam a verdadeira expressão de proteínas, pois não consideram a regulação da expressão pós-transcricional, que parece ser um fator crítico para este gene.

Na linhagem PC-3, o tratamento com o aptâmero A4 diminuiu a expressão dos genes *ADAR*, *ANXA1* e *RNASEL* (Figura 8). Cabe destacar que a variação na expressão de genes em células tumorais é complexa, pois já existe uma alteração na expressão gênica inerente à condição tumoral.

Existe pouca literatura sobre o gene *ADAR* e seu papel no CaP, mas anormalidades no número de cópias deste gene têm sido descritas como fator prognóstico no CaP (LIU *et al.*, 2013). *ADAR* codifica uma enzima que edita a conversão de adenosina para inosina em transcritos de RNA, suprimindo a via de sinalização de interferon tipo I. A diminuição da função desta enzima tem sido associada à inflamação e tumorigênese em glioma e CaP (BEYER *et al.*, 2017). Então, o aptâmero A4 poderia induzir a progressão tumoral nas células PC-3 a partir de processos inflamatórios.

A superexpressão da proteína codificada pelo gene *ANXA1* está associada à invasividade em condições de hipóxia conferindo um perfil mesenquimal às células, prognóstico ruim e quimioresistência no CaP (BIZZARRO *et al.*, 2017). A diminuição de *ANXA1* nas células da linhagem PC-3 poderia ser explicada como uma resposta da célula ao contato com o aptâmero A4 para evitar um possível efeito nela, mantendo suas características epiteliais e inibindo a transição epitélio-mesenquimal.

Mutações no gene *RNASEL* estão associadas ao CaP hereditário, sendo que o produto deste gene atua como supressor tumoral (SILVERMAN, 2003). A endonuclease de RNA codificada por este gene promove a morte celular por autofagia em resposta à presença de RNA de fita simples, por exemplo de vírus, e depois apoptose em resposta ao estresse decorrente da degradação de RNA

(SIDDIQI *et al.*, 2015). A diminuição na expressão de *RNASEL* nas células PC-3 poderia indicar, além de uma possível indução da progressão tumoral, que o aptâmero A4 pode não ser internalizado, pois sua internalização levaria a um possível aumento do gene *RNASEL* e à indução de morte celular.

Em ambas as linhagens celulares ocorreu uma diminuição da expressão dos genes *SPP1* e *GHR*, mais intensa na linhagem não tumoral RWPE-1 (Figura 8). O gene *SPP1* codifica a proteína osteopontina, relacionada tanto com estádios iniciais, quanto avançados do câncer com potencial proliferativo e invasivo (KHODAVIRDI *et al.*, 2006). A osteopontina está relacionada principalmente com a metástase óssea (THALMANN *et al.*, 1999), tão comum no CaP. A baixa expressão deste gene pode estar relacionada a diferentes fenômenos de regressão tumoral induzidos pelo aptâmero A4, tanto em células PC-3, quanto em células RWPE-1. A maior queda na expressão deste gene em células RWPE-1 poderia explicar os resultados obtidos no ensaio de ciclo celular.

GHR é um gene envolvido em mecanismos de crescimento tumoral no CaP associados a hormônios e vários fatores de crescimento (BIDOSEE *et al.*, 2011). A co-expressão do seu ligante, o hormônio do crescimento, induz uma via autócrina ou parácrina capaz de promover o crescimento da próstata (CHOPIN *et al.*, 2002). Porém, foi mostrado que o hormônio de crescimento exógeno, endócrino por exemplo, aumenta a proliferação e não afeta à apoptose, enquanto o hormônio de crescimento autócrino reduz a proliferação celular e aumenta a apoptose (NAKONECHNAYA *et al.*, 2013). Após hormonioterapia, este gene é induzido e pode contribuir para a resistência à castração, que induz um fenótipo mais agressivo nas células do CaP (RECOUVREUX *et al.*, 2017). Assim, a diminuição na expressão deste gene em células PC-3 e RWPE-1 no ensaio *in vitro*, desenvolvido sem presença de soro fetal bovino e por consequência sem exposição a hormônio exógeno, pode estar associada a fenótipos mais agressivos. Contudo, devido aos dados conflitantes a respeito da ação do hormônio no receptor codificado por este gene segundo sua origem, seriam necessários mais estudos para compreender a função do gene em cada tipo celular e se o aptâmero A4 atua no receptor do hormônio do crescimento de uma forma exógena ou autócrina.

Os ensaios de proliferação, viabilidade, migração e clonogenicidade apoiam a hipótese de que o aptâmero A4 não modifica o comportamento das

células prostáticas RWPE-1 e PC-3. Já, as alterações encontradas nos resultados dos ensaios de ciclo celular na linhagem normal prostática RWPE-1 e da expressão gênica em ambas as linhagens quando são tratadas com o aptâmero A4 mostram efeitos nas células que requerem uma investigação mais aprofundada que determine os efeitos reais resultantes da exposição ao aptâmero A4, não somente em células cultivadas *in vitro*, mas também em ensaios *in vivo*.

Considerando que a ligação do aptâmero na sua proteína alvo inibiria a função desta proteína (THIEL; GIANGRANDE, 2009), a ausência de resposta funcional *in vitro* das células PC-3 incubadas com o aptâmero A4 pode indicar que seu alvo é pouco expresso por estas células e não chega a produzir um efeito perceptível, ou que seu alvo é um ligante de superfície celular que não interfere nas vias dos parâmetros analisados. Portanto, os resultados da mudança na expressão gênica devem ser considerados, mas não mostram a resposta definitiva à incubação do aptâmero A4, porque não levam em consideração a regulação pós-transcricional e conseqüentemente a expressão proteica final. Além disso, a expressão de uns genes pode anular o efeito da expressão de outros genes.

A escassez de publicações relatando a falta de resposta celular na presença de um aptâmero, faz com que nossos resultados sejam difíceis de serem comparados com outros similares e também manifesta uma tendência geral ao viés de publicação, como exemplificado tanto na área oncológica, que tende a publicar aptâmeros atuando como antagonistas (antitumorais); quanto na área da engenharia de tecidos que tende a publicar aptâmeros atuando como agonistas (regeneradores de tecidos).

A partir dos nossos resultados, podemos destacar que o aptâmero A4 poderia ser usado em sistemas de diagnóstico *ex vivo*, onde a ligação ao alvo sirva como biomarcador da doença do CaP e não importe as possíveis mudanças fisiológicas na amostra, apenas o resultado da detecção do biomarcador.

5. CONCLUSÃO

Os ensaios funcionais com o aptâmero A4 não alteraram a viabilidade, proliferação migração, e clonogenicidade das linhagens de células da próstata usadas no estudo. Entretanto, o perfil do ciclo das células não tumorais da próstata e a expressão gênica tanto de células tumorais, quanto de células não tumorais da próstata foram alterados na presença do aptâmero A4. Assim, nossos resultados sugerem o uso clínico do aptâmero A4 não como ferramenta teranóstica, mas apenas como ferramenta diagnóstica.

5.1. Perspectivas

Partimos da premissa de que sabendo qual é o ligante do aptâmero A4 responderemos melhor aos resultados da caracterização *in vitro* deste aptâmero. O alvo do aptâmero A4 ainda é desconhecido e sua identificação por espectrometria de massas a partir da técnica de imunoprecipitação com o uso do aptâmero A4, aportaria informações preciosas sobre a função do próprio alvo e a possível ativação ou inibição de vias nas células pela ação do aptâmero A4.

Uma vez identificado o alvo, também seria de interesse identificar a região de ligação ao alvo, para determinar com maior precisão a função biológica que o alvo poderia exercer na célula após sua interação; e ainda desenhar versões melhoradas do aptâmero A4, com maior estabilidade (YOON; ROSSI, 2017) e maior afinidade de ligação (LEE *et al.*, 2010).

O lugar de expressão do ligante do aptâmero A4 poderia ser confirmado com ensaios de internalização celular com o aptâmero A4 conjugado a um marcador fluorescente e observado no microscópio confocal. Determinando se a expressão do alvo é na superfície celular, no citoplasma ou no núcleo, poderíamos entender melhor por que existem mudanças na transcrição gênica e no ensaio funcional do ciclo celular de RWPE-1 e não nos ensaios de proliferação, viabilidade, migração e clonogenicidade celular. Com estes ensaios também seria confirmada a ausência de indução do gene *RNASEL*.

Um estudo proteômico das células prostáticas verificaria se existe alguma via constitutivamente ativa *downstream* do alvo do aptâmero A4 nas vias de sinalização para os parâmetros celulares testados, explicando assim porque a variação da expressão dos genes não teve efeitos nos ensaios funcionais. Complementando este estudo com experimentos de silenciamento e

superexpressão gênica, compreenderíamos melhor a função dos genes em cada tipo celular e se existe regulação pós-transcricional que impede que as mudanças na expressão gênica sejam visíveis nos ensaios funcionais. Também seria interessante demonstrar por Western blot ou citometria de fluxo a expressão dessas proteínas codificadas pelos genes afetados para certificar de fato o fenótipo apresentado pelas células.

Ensaio de ciclo celular com sincronização das células prostáticas em uma fase do ciclo, ajudariam a verificar se a distribuição de células nas fases do ciclo celular depende da proporção inicial de células em cada fase e elucidariam a seletividade do aptâmero A4 pelas células prostáticas não tumorais neste ensaio.

A análise de expressão de marcadores epiteliais e mesenquimais com anticorpos por citometria de fluxo, confirmaria a diminuição do gene *ANXA1* e a inibição da transição epitélio-mesenquimal dando lugar a um fenótipo mais epitelial após incubação com o aptâmero A4. A citometria de fluxo também poderia ser utilizada para analisar a expressão de citocinas, o que permitiria confirmar a hipótese de que o aptâmero A4 induz tumorigênese a partir da inflamação como consequência da diminuição do gene *ADAR*.

Além dos testes *in vitro*, testes em modelos *in vivo* verificariam os efeitos sistêmicos e em cada tecido após a administração do aptâmero A4, para poder comparar os resultados obtidos com o sistema de cultura magnética em 3D. Além disso, os ensaios *in vivo* permitiriam aceitar ou rejeitar definitivamente o estudo do uso do aptâmero A4 em sistemas de direcionamento de drogas para o tratamento de pacientes com CaP.

Futuros trabalhos abordarão estes assuntos para elucidar o comportamento do aptâmero A4 no contexto *in vitro* e *in vivo*. Acreditamos que estas pesquisas também ajudarão a entender melhor os mecanismos moleculares que desencadeiam o desenvolvimento do CaP.

6. REFERÊNCIAS

- AMIRI, A. *et al.* eEF1A2 activates Akt and stimulates Akt-dependent actin remodeling, invasion and migration. **Oncogene** v. 26, n. 21, p. 3027–3040 , 2007. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210101>
- ANDRIOLE, Gerald L. *et al.* Prostate cancer screening in the randomized prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial: Mortality results after 13 years of follow-up. **Journal of the National Cancer Institute** v. 104, n. 2, p. 125–132 , 2012. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr500>
- BABICKI, Sasha *et al.* Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. **Nucleic acids research** v. 44, n. W1, p. W147–W153 , 2016. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw419>
- BEYER, Ulrike *et al.* Rare ADAR and RNASEH2B variants and a type I interferon signature in glioma and prostate carcinoma risk and tumorigenesis. **Acta Neuropathologica** v. 134, n. 6, p. 905–922 , 2017. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1774-y>
- BIDOSEE, M. *et al.* Growth hormone affects gene expression and proliferation in human prostate cancer cells. **International Journal of Andrology** v. 34, n. 2, p. 124–137 , 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01064.x>
- BIZZARRO, Valentina *et al.* Hypoxia regulates ANXA1 expression to support prostate cancer cell invasion and aggressiveness. **Cell Adhesion and Migration** v. 11, n. 3, p. 247–260 , 2017. <https://doi.org/10.1080/19336918.2016.1259056>
- CAMORANI, Simona *et al.* Aptamer targeting EGFRvIII mutant hampers its constitutive autophosphorylation and affects migration, invasion and proliferation of glioblastoma cells. **Oncotarget** v. 6, n. 35, p. 37570–87 , 2015.1949-2553. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6066>
- CATALONA, William J. *et al.* A Multi-Center Study of [-2]Pro-Prostate-Specific Antigen (PSA) in Combination with PSA and Free PSA for Prostate Cancer Detection in the 2.0 to 10.0 ng/mL PSA Range. **The Journal of Urology** v. 185, n. 5, p. 1650–1655 , 2011. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2010.12.032>
- CHEN, Qi guang *et al.* MiR-378 suppresses prostate cancer cell growth through downregulation of MAPK1 in vitro and in vivo. **Tumor Biology** v. 37, n. 2, p. 2095–2103 , 2016. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3996-8>
- CHO, Yuri *et al.* Modified AS1411 Aptamer Suppresses Hepatocellular Carcinoma by Up-Regulating Galectin-14. **PLoS ONE** v. 11, n. 8, p. 1–14 , 2016.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160822>

CHOPIN, L. K. *et al.* Co-expression of GH and GHR isoforms in prostate cancer cell lines. **Growth Hormone and IGF Research** v. 12, n. 2, p. 126–136 , 2002.

<https://doi.org/10.1054/ghir.2002.0271>

COFFEY, Donald S. Prostate cancer. An overview of an increasing dilemma. **Cancer** v. 71, n. 3 S, p. 880–886 , 1993. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19930201\)71:3+%3C880::AID-CNCR2820711403%3E3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19930201)71:3+%3C880::AID-CNCR2820711403%3E3.0.CO;2-6)

DIAMANDIS, E P; YU, H. Nonprostatic sources of prostate-specific antigen. **The Urologic clinics of North America** v. 24, n. 2, p. 275–282 , maio 1997.

[https://doi.org/10.1016/S0094-0143\(05\)70373-6](https://doi.org/10.1016/S0094-0143(05)70373-6)

DURAND, Xavier *et al.* Progensa (TM) PCA3 test for prostate cancer. **Expert Review of Molecular Diagnostics** v. 11, n. 2, p. 137–144 , 2011.

<https://doi.org/10.1586/erm.10.122>

FERLAY, Jacques *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer** v. 136, n. 5, p. 359–386 , 2015. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>

FERLAY, Jacques *et al.* GLOBOCAN 2012 v1.0, *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11*. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 23 abr. 2018.

FRANKLIN, W A *et al.* Incidence of tumor-cell contamination in leukapheresis products of breast cancer patients mobilized with stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) or with G-CSF alone. **Blood** v. 94, n. 1, p. 340–7 , 1999. <http://www.bloodjournal.org/content/94/1/340>.

HAYTHORN, Mark R; ABLIN, Richard J. Prostate-specific antigen testing across the spectrum of prostate cancer. **Biomarkers in medicine** v. 5, n. 4, p. 515–526 , ago. 2011. <https://doi.org/10.2217/bmm.11.53>

IFERE, Godwin O. *et al.* Apolipoprotein e gene polymorphism influences aggressive behavior in prostate cancer cells by deregulating cholesterol homeostasis. **International Journal of Oncology** v. 43, n. 4, p. 1002–1010 , 2013. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2057>

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. *Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil*. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em: 23 abr. 2018.

KANLIKILICER, Pinar *et al.* Therapeutic Targeting of AXL Receptor Tyrosine Kinase Inhibits Tumor Growth and Intraperitoneal Metastasis in Ovarian Cancer Models. **Molecular Therapy - Nucleic Acids** v. 9, n. December, p. 251–262 , 2017. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.06.023>

KHODAVIRDI, Ani C. *et al.* Increased expression of osteopontin contributes to the progression of prostate cancer. **Cancer Research** v. 66, n. 2, p. 883–888 , 2006. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2816>

KOTULA J.W. *et al.* Targeted Disruption of β -Arrestin 2-Mediated Signaling Pathways by Aptamer Chimeras Leads to Inhibition of Leukemic Cell Growth. **PLoS ONE** v. 9, n. 4, e93441, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093441>

KULKARNI, Geeta *et al.* Expression of protein elongation factor eEF1A2 predicts favorable outcome in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment** v. 102, n. 1, p. 31–41 , 2007. <https://doi.org/10.1007/s10549-006-9315-8>

LEE K. Y. *et al.* Bioimaging of Nucleolin Aptamer-Containing 5-(N-benzylcarboxyamide)-2'-deoxyuridine More Capable of Specific Binding to Targets in Cancer Cells. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, n. 168306, 9 páginas, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/168306>.

LEÓN-MATEOS, Luis *et al.* Clinical application of circulating tumour cells in prostate cancer: From bench to bedside and back. **International Journal of Molecular Sciences** v. 17, n. 9, p. 1580 , 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms17091580>

LEONG, Sharon *et al.* Biomarkers of breast cancer apoptosis induced by chemotherapy and TRAIL. **Journal of Proteome Research** v. 11, n. 2, p. 1240–1250 , 2012. <https://doi.org/10.1021/pr200935y>

LIU, Wennuan *et al.* Genetic markers associated with early cancer-specific mortality following prostatectomy. **Cancer** v. 119, n. 13, p. 2405–2412 , 2013. <https://doi.org/10.1002/cncr.27954>

LOEB, Stacy *et al.* Overdiagnosis and overtreatment of prostate cancer. **European Urology** v. 65, n. 6, p. 1046–1055 , 2014. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.12.062>

MENG, Songdong *et al.* Circulating Tumor Cells in Patients with Breast Cancer Dormancy. **Clinical Cancer Research** v. 10, n. 24, p. 8152–8162 , 2004. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1110>

MISSAILIDIS, S; HARDY, A. Aptamers as inhibitors of target proteins. **Expert Opinion on Therapeutic Patents** v. 19, n. 8, p. 1073–1082 , 2009. <https://doi.org/10.1517/13543770903042337>

MURPHY, Alana M; MCKIERNAN, James M; OLSSON, Carl A. Controversies in cancer screening. **The Journal of Urology** v. 172, n. 5 Pt 1, p. 1822–1824 , 2004. <https://doi.org/10.18043/nm.75.4.253>

NAKONECHNAYA, Alona O. *et al.* Differential effects of exogenous and autocrine growth hormone on LNCaP prostate cancer cell proliferation and survival. **Journal of Cellular Biochemistry** v. 114, n. 6, p. 1322–1335 , 2013. <https://doi.org/10.1002/jcb.24473>

NATIONAL CANCER INSTITUTE. *PDQ® Screening and Prevention Editorial Board. PDQ Prostate Cancer Prevention.* Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/prostate/patient/prostate-prevention-pdq>>.

Acesso em: 24 abr. 2018.

NODA, D. *et al.* ELAC2, a putative prostate cancer susceptibility gene product, potentiates TGF- β /Smad-induced growth arrest of prostate cells. **Oncogene** v. 25, n. 41, p. 5591–5600 , 2006. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209571>

OLIVEIRA, Leandro Alves De. **Implicações translacionais de uma nova ferramenta de detecção de células tumorais circulantes no monitoramento do câncer de próstata.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia p. 49. 2017. <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/19651>

PAREKH, Dipen J. *et al.* A Multi-institutional Prospective Trial in the USA Confirms that the 4Kscore Accurately Identifies Men with High-grade Prostate Cancer. **European Urology** v. 68, n. 3, p. 464–470 , 2015. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.10.021>

PARISI, L. *et al.* Anti-fibronectin aptamers improve the colonization of chitosan films modified with D-(+) Raffinose by murine osteoblastic cells. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine** v. 28, n. 9 , 2017. <https://doi.org/10.1007/s10856-017-5931-6>

PEARSON G *et al.* Mitogen-activated protein (MAP) Kinase pathways: Regulation and Physiological Functions. **Endocrine Reviews** v. 22, n. 2, p. 153–183 , 2001. <https://doi.org/10.1210/er.22.2.153>

RECOUVREUX, M. Victoria *et al.* Androgen receptor regulation of local growth

hormone in prostate cancer cells. **Endocrinology** v. 158, n. 7, p. 2255–2268 , 2017. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1939>

SCHRODER, Fritz H. *et al.* Screening for Prostate Cancer Decreases the Risk of Developing Metastatic Disease: Findings from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC). **European Urology** v. 62, n. 5, p. 745–752 , 2012. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.05.068>

SIDDIQUI, Mohammad A. *et al.* RNase L cleavage products promote switch from autophagy to apoptosis by caspase-mediated cleavage of beclin-1. **International Journal of Molecular Sciences** v. 16, n. 8, p. 17611–17636 , 2015. <https://doi.org/10.3390/ijms160817611>

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2018. **CA: A Cancer Journal for Clinicians** v. 68, n. 1, p. 7–30 , 2018. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>

SILVERMAN, Robert H. Implications for RNase L in prostate cancer biology. **Biochemistry** v. 42, n. 7, p. 1805–1812 , 2003. <https://doi.org/10.1021/bi027147i>

SOUZA, Aline G. *et al.* 3D Cell-SELEX: Development of RNA aptamers as molecular probes for PC-3 tumor cell line. **Experimental Cell Research** v. 341, n. 2, p. 147–156 , 2016. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.01.015>

STEPHENSON, Andrew J. *et al.* Preoperative Nomogram Predicting the 10-Year Probability of Prostate Cancer Recurrence After Radical Prostatectomy. **Journal of the National Cancer Institute** v. 98, n. 10, 715–717, 2006. <http://doi.org/10.1093/jnci/djj190>

STROTMAN, Lindsay N. *et al.* Liquid Biopsies in Oncology and the Current Regulatory Landscape. **Molecular Diagnosis and Therapy** v. 20, n. 5, p. 429–436, 2016. <https://doi.org/10.1007/s40291-016-0220-5>

SVANHOLM, H; ANDERSEN, O P; ROHL, H. Tumour of female paraurethral duct. Immunohistochemical similarity with prostatic carcinoma. **Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histopathology** v. 411, n. 4, p. 395–398 , 1987.

TAKAHASHI, Joseph S. *et al.* The genetics of mammalian circadian order and disorder: Implications for physiology and disease. **Nature Reviews Genetics** v. 9, n. 10, p. 764–775 , 2008. <https://doi.org/10.1038/nrg2430>

TEPPER, S L *et al.* Homology between the female paraurethral (Skene's) glands and the prostate. Immunohistochemical demonstration. **Archives of pathology & laboratory medicine** v. 108, n. 5, p. 423–425 , maio 1984.

THALMANN, G N *et al.* Osteopontin: possible role in prostate cancer progression. **Clin.Cancer Res.** v. 5, n. 8, p. 2271–2277 , 1999.

THIEL, Kristina W.; GIANGRANDE, Paloma H. Therapeutic Applications of DNA and RNA Aptamers. **Oligonucleotides** v. 19, n. 3, p. 209–222 , 2009. <https://doi.org/10.1089/oli.2009.0199>

TOMLINS, Scott A. *et al.* Urine TMPRSS2:ERG fusion transcript stratifies prostate cancer risk in men with elevated serum PSA. **Science Translational Medicine** v. 3, n. 94, p. 94ra72 , 2011. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001970>

TOMLINSON, V. A. L. *et al.* Expression of eEF1A2 is associated with clear cell histology in ovarian carcinomas: Overexpression of the gene is not dependent on modifications at the EEF1A2 locus. **British Journal of Cancer** v. 96, n. 10, p. 1613–1620 , 2007. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603748>

TRICOLI, James V.; SCHOENFELDT, Mason; CONLEY, Barbara A. Detection of Prostate Cancer and Predicting Progression : Current and Future Diagnostic Markers Detection of Prostate Cancer and Predicting Progression : Current and Future Diagnostic Markers. **Clinical Cancer Research** v. 10, n. 301, p. 3943–3953 , 2004. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0200>

VELONAS, Vicki M. *et al.* Current status of biomarkers for prostate cancer. **International Journal of Molecular Sciences** v. 14, n. 6, p. 11034–11060 , 2013. <https://doi.org/10.3390/ijms140611034>

VENANZONI, Marco C.; GIUNTA, S. Apolipoprotein E expression in localized prostate cancers. **International journal of oncology** v. 22, n. 4, p. 779–786 , 2003. <https://doi.org/10.3892/ijo.22.4.779>

WANG, Hanlu *et al.* In Vivo SELEX of an Inhibitory NSCLC-Specific RNA Aptamer from PEGylated RNA Library. **Molecular Therapy - Nucleic Acids** v. 10, n. March, p. 187–198 , 2018. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.12.003>

WEISBERG, Ellen L *et al.* Inhibition of SDF-1-induced migration of oncogene-driven myeloid leukemia by the L-RNA aptamer (Spiegelmer), NOX-A12 , and potentiation of tyrosine kinase inhibition. **Oncotarget** v. 8, n. 66, p. 109973–109984 , 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22409>

WILT, Timothy J. Management of Low Risk and Low PSA Prostate Cancer: Long Term Results from the Prostate Cancer Intervention Versus Observation Trial. In: CUZICK, J.; THORAT, M. A. **Prostate Cancer Prevention, Recent Results in**

Cancer Research. Heidelberg (Germany): Springer Berlin, 2014. 202 v. p. 149–169. https://doi.org/10.1007/978-3-642-45195-9_18

WOJNO, Kirk J. *et al.* Reduced rate of repeated prostate biopsies observed in ConfirmMDx clinical utility field study. **American Health and Drug Benefits** v. 7, n. 3, p. 129–134 , 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4070628/>

XU, Xiaohua *et al.* Inhibition of DNA Replication and Induction of S Phase Cell Cycle Arrest by G-rich Oligonucleotides. **Journal of Biological Chemistry** v. 276, n. 46, p. 43221–43230 , 2001. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104446200>

YEH, Chia-Ming *et al.* Epigenetic silencing of ARNTL, a circadian gene and potential tumor suppressor in ovarian cancer. **International Journal of Oncology** p. 2101–2107 , 2014. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2627>

YOON, Sorah; ROSSI, John J. Emerging cancer-specific therapeutic aptamers. **Current Opinion in Oncology** v. 29, n. 5, p. 366–374 , 2017. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000389>

ZHANG, Xingmei *et al.* Effects of Aptamer to U87-EGFRvIII Cells on the Proliferation, Radiosensitivity, and Radiotherapy of Glioblastoma Cells. **Molecular Therapy - Nucleic Acids** v. 10, n. 1838, p. 438–449 , 2018. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.01.001>

ZHAO, Libo; TAN, Weihong; FANG, Xiaohong. Introduction to Aptamer and Cell-SELEX. **Aptamers Selected by Cell-SELEX for Theranostics**. 1st. ed. Heidelberg (Germany): Springer, 2015. p. 1–11. https://doi.org/10.1007/978-3-662-46226-3_1

ZHENG, Jingying *et al.* Simultaneous targeting of CD44 and EpCAM with a bispecific aptamer effectively inhibits intraperitoneal ovarian cancer growth. **Theranostics** v. 7, n. 5, p. 1373–1388 , 2017. <https://doi.org/10.7150/thno.17826>