

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

MARIA PAULA SILVA SIMIÃO

Aptâmeros A6 e A11 com potencial aplicação teranóstica em câncer de próstata

Uberlândia
2024

MARIA PAULA SILVA SIMIÃO

Aptâmeros A6 e A11 com potencial aplicação teranóstica em câncer de próstata

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como pré-requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia pelo curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientadora: Profa. Dra. Vivian Alonso Goulart

Uberlândia

2024

MARIA PAULA SILVA SIMIÃO

Aptâmeros A6 e A11 com potencial aplicação teranóstica em câncer de próstata

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como pré-requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia pelo curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Uberlândia, 26 de Janeiro de 2024

Banca Examinadora:

Dra. Vivian Alonso Goulart – Instituto de Biotecnologia - Universidade Federal de Uberlândia
(UFU)

Msc. Luciana Beatriz Tiago Oliveira – Instituto de Biotecnologia - Universidade Federal de Uberlândia
(UFU)

Msc. Bianca Uliana Picolo – Instituto de Biotecnologia - Universidade Federal de Uberlândia
(UFU)

Dedico este trabalho aos meus pais, por serem
meus maiores incentivadores a seguir meus
sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora Dra. Vivian Alonso Goulart, por me dar a oportunidade de poder trabalhar em uma de suas linhas de pesquisa, por ser paciente, compreensiva e excelente orientadora, pois aprendi muito com seus ensinamentos durante o tempo em que trabalhamos juntas.

Agradeço aos meus pais Rose Elaine Silva e João Batista Simião e minha avó Diva por serem sempre os meus maiores incentivadores durante toda minha graduação e por sempre acreditarem no meu potencial e me apoiarem a seguir meus sonhos, vocês são minha fonte de inspiração em todos os momentos.

Agradeço à minha melhor amiga Larissa, que sempre esteve presente nos momentos em que eu mais precisei de alguém para me ouvir, pelos conselhos ditos e palavras que por muitas vezes confortaram meu coração.

Agradeço aos meus amigos de graduação e também de vida, Lucas Peres, Emanuelle Ferreira e Kamila Fontoura, por fazerem a graduação ser um processo mais leve e divertido. Nosso quarteto de amigos que começou em 2018, no começo da nossa graduação, foi um dos maiores presentes que eu poderia receber.

Aos amigos que fiz, em especial, Laura e Lúrian, que foram pessoas que me ajudaram em muito durante toda minha graduação.

À Adriane, Maria Eduarda e Luisa, amigas que trouxeram alegria em momentos que eu precisei.

Agradeço aos integrantes do Grupo de Estudos e Pesquisa em Marcadores Moleculares (GEP-Mmol), pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados durante nossas reuniões e rotinas dentro da sala de cultura celular, sem vocês nada seria possível.

Aos pesquisadores do Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, por tornar o ambiente laboratorial um lugar de muitos ensinamentos e inspirador para minha vida acadêmica.

Agradeço também à todos os meus professores durante meu período acadêmico, pelos ensinamentos passados e também à Universidade Federal de Uberlândia por ser o lugar onde me orgulho e tenho gratidão em poder me formar.

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é o segundo tipo de câncer mais frequente em homens e o CaP metastático é considerado um tipo de tumor mais avançado e com pior prognóstico. Dessa forma, é importante realizar o diagnóstico da doença em um estágio precoce, assim como escolher a melhor opção de tratamento para o paciente. Aptâmeros são oligonucleotídeos que permitem buscar biomarcadores nas células alvo e fornecer informações relacionadas ao diagnóstico, terapia e mecanismos da doença. O objetivo do estudo foi avaliar, pelo método da resazurina, se houve alteração da proliferação e viabilidade celular de linhagens da próstata quando incubadas com os aptâmeros A6 e A11. A maior concentração utilizada do aptâmero A6 apresentou citotoxicidade na linhagem tumoral e não foi citotóxico para a linhagem normal da próstata. O aptâmero A11 não alterou as características de viabilidade e proliferação celular em ambas as linhagens da próstata. Esses dados sugerem que o aptâmero A6 pode ser utilizado como terapia em pacientes com CaP, enquanto que o A11 pode ser usado como possível ferramenta diagnóstica. São necessárias outras análises e ensaios para validar essas informações.

Palavras-chave: câncer de próstata; aptâmeros; teranóstica.

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is the second most common type of cancer in men. Metastatic PCa is considered a more advanced type of tumor with a worse prognosis, therefore, it is important to diagnose the disease at an early stage, as well as choose the best treatment option for the patient. Aptamers are oligonucleotides that allow the search for biomarkers in target cells and can also provide information related to diagnosis, therapy and disease mechanisms. The objective of the study was to evaluate, using the resazurin method, whether there was a change in cell proliferation and viability of prostate lines when incubated with aptamers A6 and A11. The highest concentration of aptamer A6 used showed cytotoxicity in the tumor lineage and was not cytotoxic to the normal prostate lineage. The A11 aptamer did not influence cell viability and proliferation characteristics in both prostate lineages. These data suggest that aptamer A6 can be used as a therapy in patients with PCa, while A11 can be used as a possible diagnostic tool. Other analyzes and tests are needed to validate this information.

Keywords: prostate cancer; aptamers; theranostics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática da anatomia e zonas da próstata	12
Figura 2 – Representação do desenvolvimento e progressão do câncer de próstata	14
Figura 3 - Viabilidade celular da linhagem tumoral PC-3 com os aptâmeros A6 e A11 após 24h de tratamento	22
Figura 4 - Viabilidade celular da linhagem tumoral PC-3 com os aptâmeros A6 e A11 após 48h de tratamento	23
Figura 5 - Viabilidade celular após incubação por 24h e 48h das células PNT-2 com os aptâmeros A6 e A11	24
Figura 6 - Proliferação celular após incubação de 24h até 48h com os aptâmeros A6 e A11..	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CaP	Câncer de Próstata
CTCs	Células tumorais circulantes
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
NIP	Neoplasia Intraepitelial Prostática
RA	Receptor de Androgênio
SELEX	Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento
PSA	Antígeno Prostático Específico, do inglês Prostate Specific Antigen
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Câncer de Próstata	12
1.1.1	Desenvolvimento e progressão do CaP	13
1.2	Diagnóstico do CaP.....	14
1.2.1	CTCs.....	15
1.3	Terapia do CaP	15
1.4	Aptâmeros	16
2	JUSTIFICATIVA	18
3	OBJETIVOS.....	19
4	METODOLOGIA.....	20
4.1	Cultura celular	20
4.2	Ensaio de viabilidade e proliferação celular	20
4.3	Análises estatísticas.....	21
5	RESULTADOS	22
5.1	Viabilidade e Proliferação celular pelo método de resazurina.....	22
6	DISCUSSÃO	26
7	CONCLUSÃO.....	28
	REFERÊNCIAS.....	29

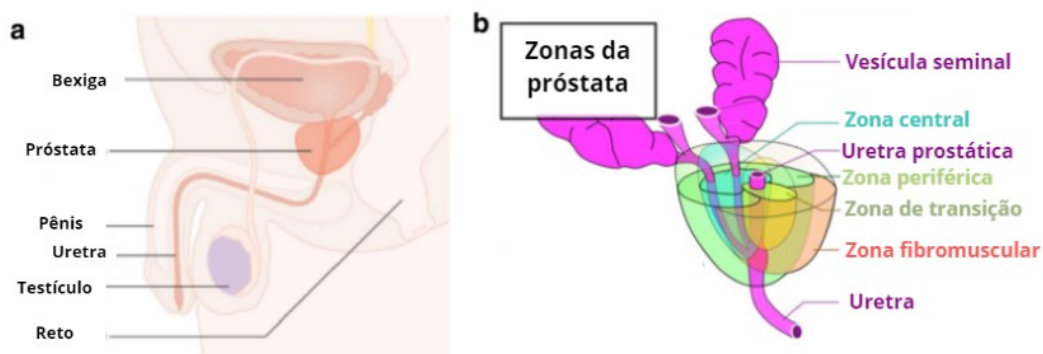
1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Próstata

O câncer é uma das doenças que mais causa mortes mundialmente. Uma estimativa do ano de 2020 divulgou o número de 19,3 milhões de ocorrências de casos de câncer no mundo, sendo o câncer de próstata (CaP) o segundo mais frequente em homens, correspondendo a 14,1% dos casos (Sung *et al.*, 2021). No Brasil, a estimativa divulgada em 2022 pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) apresentou os números de casos de câncer no Brasil para os anos de 2023, 2024 e 2025, sendo 704 mil para cada ano e o valor estimado de novos casos do CaP foi de 72 mil para cada ano do triênio (INCA, 2022).

A próstata é um órgão do sistema reprodutor masculino e está localizada na pelve inferior entre a bexiga e o pênis (Figura 1A) e pode ser dividida anatomicamente em três zonas: de transição, central e periférica (Figura 1B). Clinicamente, o estudo da anatomia das zonas da próstata é importante para compreensão de suas patologias, em relação ao CaP, em cerca de 80% dos casos a zona periférica representa o local do aparecimento do tumor (Verze; Cai; Lorenzetti, 2016; Tonry *et al.*, 2020; Rebello *et al.*, 2021).

Figura 1 - Representação esquemática da anatomia e zonas da próstata



Legenda: A) Localização da próstata no sistema reprodutor masculino. B) As zonas anatômicas da próstata: zona central, zona periférica, zona de transição e zona fibromuscular. Fonte¹: Figura adaptada de Tonry et al (2020) com Copyright © 2020 distribuído sob os termos e condições da licença Creative Commons Attribution (CC BY 4.0)¹

¹ Link de acesso para os termos e condições da licença Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) para o uso de imagem do artigo Tonry et al (2020): <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

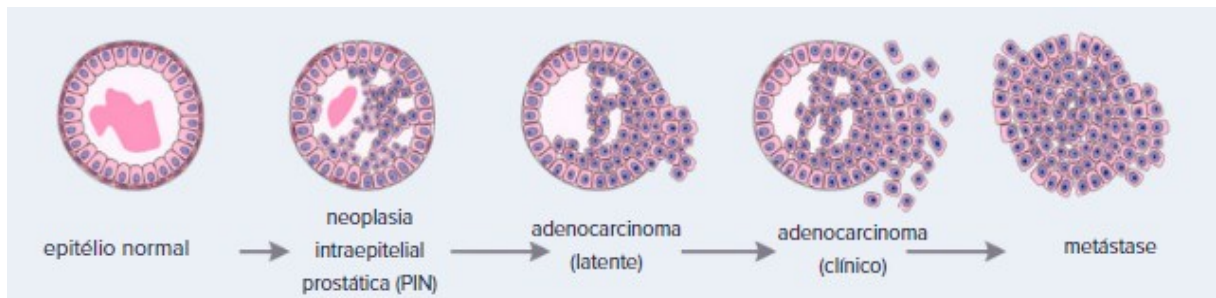
O CaP está relacionado a diversos fatores de risco, sendo a idade um fator considerável, pois geralmente homens são diagnosticados com a neoplasia na fase média tardia da vida, por volta dos 45 a 60 anos. Fatores genéticos, histórico familiar, dieta, excesso de gordura corporal e outros fatores externos estão relacionados ao desenvolvimento do CaP (Sekhoacha *et al.*, 2022; Varaprasad *et al.*, 2023).

1.1.1 Desenvolvimento e progressão do CaP

O câncer é o aumento de forma desordenada das células do corpo, perdendo suas funções originais como a diferenciação celular e apoptose (Varaprasad *et al.*, 2023). O CaP está associado a mutações somáticas nas células epiteliais da próstata, tornando-as cancerígenas por meio da desativação dos genes supressores de tumor e ativação dos oncogenes, causando desregulação da homeostase celular. As mutações são alterações predispostas aos genes que participam da via do receptor de androgênio (RA) e do metabolismo da testosterona (Rebello *et al.*, 2021; Sekhoacha *et al.*, 2022).

O CaP pode ser classificado como um tumor localizado ou metastático e essa progressão ocorre através de etapas, onde inicialmente as células normais epiteliais da próstata desenvolvem neoplasia intraepitelial prostática (NIP), um conjunto de processos relacionados a genes que estão envolvidos no estágio inicial do desenvolvimento do CaP, em seguida, desenvolve-se em adenocarcinoma invasivo maligno que posteriormente progride para o CaP metastático (Figura 2)(Saranyutanon *et al.*, 2019; Sekhoacha *et al.*, 2022).

Figura 2 - Representação do desenvolvimento e progressão do câncer de próstata



Legenda: Etapas dos processos envolvidos no desenvolvimento e progressão do câncer de próstata. Fonte²: Figura adaptada de Sekhoacha et al (2022) com Copyright © 2022 distribuído sob os termos e condições da licença Creative Commons Attribution (CC BY 4.0)¹

O CaP metastático é o estágio mais avançado da doença e o mais relacionado à causa de mortes em pacientes com neoplasia da próstata. No caso do CaP metastático, a doença se dissemina para órgãos adjacentes à próstata, como as glândulas linfáticas, tecidos ósseos, pulmão e fígado (Wang *et al.*, 2018; Rebello *et al.*, 2021). Em pacientes com a doença metastática o prognóstico é pior em relação a pacientes com a doença localizada, pois enquanto pacientes em estágio metastático possuem sobrevida global de 30-40% em 5 anos, já os pacientes com a doença localizada apresentam a taxa de sobrevida de 60-99% para o mesmo período. Deste modo, é importante obter o diagnóstico precoce para pacientes com a doença, bem como terapias eficientes para o CaP (Rigau *et al.*, 2013; Rebello *et al.*, 2021).

1.2 Diagnóstico do CaP

As ferramentas clínicas utilizadas para o diagnóstico do CaP incluem o exame retal digital, análise dos níveis séricos do antígeno prostático específico (PSA), ressonância magnética, ultrassonografia transretal e biópsias do tecido da próstata (Matuszczak; Schalken; Salagierski, 2021; Crocetto *et al.*, 2022;). O teste do PSA, no entanto, não é capaz de diferenciar o câncer de próstata agressivo daqueles em fase inicial e seus resultados podem apresentar falso positivos devido à falta de especificidade do PSA (Lima *et al.*, 2016). Embora o PSA seja o biomarcador padrão para testes, é observado que existe necessidade de estudos em busca de

² Link de acesso para os termos e condições da licença Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) para o uso de imagem do artigo Tonry et al (2022): <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

novos biomarcadores para melhor diagnóstico e tratamento dos pacientes com câncer de próstata (Tonry *et al.*, 2020).

A biópsia líquida é um método que vem sendo utilizado para o monitoramento e diagnóstico menos invasivo em pacientes com CaP (Matuszczak; Schalken; Salagierski, 2021). O termo biópsia líquida trata-se da análise de biomarcadores relacionados ao tumor, encontrados em fluidos corporais, como sangue e urina (Marrugo-Ramírez *et al.*, 2018). Os biomarcadores obtidos pela biópsia líquida podem incluir as células tumorais circulantes (CTCs), vesículas extracelulares, DNA tumoral circulantes, marcadores genéticos e outros marcadores celulares (Crocetto *et al.*, 2022; Dathathri *et al.*, 2022).

1.2.1 CTCs

As CTCs são células disseminadas a partir de tumores primários ou metastáticos e circulam na corrente sanguínea desempenhando um papel fundamental no processo de metástase do câncer (Marrugo-Ramírez; Mir; Samitier, 2018; Zainfeld *et al.*, 2018). Atualmente, o *CellSearch* é o método aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) utilizado para quantificar as CTCs no câncer de próstata metastático, possibilitando a avaliação do prognóstico e resposta ao tratamento dos pacientes (Dathathri *et al.*, 2022).

As análises da caracterização das CTCs permitem investigar marcadores específicos do CaP, fornecendo informações relacionadas ao prognóstico, terapias e mecanismos da doença (Morrison *et al.*, 2018). Devido à alta diversidade tumoral há a necessidade de encontrar biomarcadores específicos de CTCs no CaP (Zamay *et al.*, 2017).

Os anticorpos, como os anticorpos monoclonais, possuem alta afinidade pelo seu alvo e são utilizados na clínica em busca de novos biomarcadores, no entanto, o uso de moléculas chamadas aptâmeros vem sendo estudadas devido às suas vantagens, como maior estabilidade, em relação aos anticorpos para o diagnóstico e monitoramento do câncer (Campos-Fernández *et al.*, 2021).

1.3 Terapia do CaP

As opções de tratamento para pacientes com CaP são definidas a partir do diagnóstico e dependem de fatores como o estágio do câncer, ou seja, se é um CaP localizado ou metastático e origem do tumor. As possibilidades de tratamento para o CaP incluem radioterapia, quimioterapia, remoção da próstata e terapias com hormônios. No entanto, essas metodologias

possuem efeitos colaterais sobos pacientes, como toxicidade, disfunção erétil e também podem levar à resistência ao tipo de tratamento (Sekhoacha *et al.*, 2022; Varaprasad *et al.*, 2023).

Portanto, a identificação de biomarcadores das células prostáticas pode ser útil para o manejo de tratamento específico dos pacientes com neoplasia (Sekhoacha *et al.*, 2022; Varaprasad *et al.*, 2023). O uso dos aptâmeros demonstra grande potencial para possível estratégia de tratamento aos pacientes com câncer, podendo ser utilizados em um sistema de direcionamento e liberação de fármacos, assim como inibidores de proteínas da molécula alvo, sendo interessantes para uma terapia direcionada (Fu; Xiang, 2020; Venkatesan; Chanda; Balamurali, 2023).

1.4 Aptâmeros

Os aptâmeros são oligonucleotídeos que possuem a capacidade de se ligar em alvos específicos com uma alta afinidade, e, quando comparados aos anticorpos, possuem vantagens em seu uso, pois possuem baixo peso molecular, maior estabilidade, não imunogenicidade, além da possibilidade de serem modificados e sintetizados quimicamente (Wang *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2015). As vantagens apresentadas pelos aptâmeros, como sua maior afinidade, faz com que essas moléculas sejam potenciais ferramentas de diagnóstico e tratamento (Cruz-Hernández *et al.*, 2022).

A partir do estudo feito por Souza *et al.* (2015), foi possível selecionar aptâmeros de RNA ligantes da linhagem celular do câncer de próstata PC-3 utilizando a metodologia de Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial em cultura tridimensional (3D Cell-SELEX). Essa metodologia consiste na associação de duas metodologias, o SELEX, utilizado para gerar ligantes específicos e a cultura celular tridimensional (3D), que possibilita reproduzir com eficiência o ambiente tumoral *in vivo* (Souza *et al.*, 2015).

Com a metodologia 3D Cell-SELEX foi possível selecionar oito aptâmeros de RNA ligantes de CTCs do CaP, essas moléculas apresentaram boa conformação, alta estabilidade e capacidade de ligação a células do CaP (Souza *et al.*, 2015). O estudo realizado por Souza *et al.* (2015) ocorreu com aptâmeros de RNA, devido a sua capacidade de ligação mais específica ao alvo. No entanto, o RNA é uma molécula mais instável que o DNA por causa de seu grupo hidroxila no carbono secundário, que os torna mais suscetíveis à hidrólise e ação de ribonucleases (Houseley *et al.*, 2009; Navien *et al.*, 2021).

Devido a instabilidade da molécula de RNA, o uso dos aptâmeros de DNA tem sido cada vez mais estudado. A pesquisa realizada por Wang *et al.* (2014), identificou através da metodologia Cell-SELEX um aptâmero de DNA capaz de se ligar às células de linhagem

tumoral da próstata, demonstrando o potencial uso desses aptâmeros para diagnóstico e terapia. Os aptâmeros de DNA e RNA são semelhantes, no entanto, quando comparados, os aptâmeros de RNA são quimicamente instáveis e os de DNA são menos reativos e mais estáveis, além de ter um custo de produção menor (Zhu *et al.*, 2015).

Portanto, no presente estudo foram utilizados os aptâmeros A6 e A11, previamente selecionados por Souza *et al.* (2015), os quais apresentaram potencial para se ligar a células do CaP. No entanto, por ser uma molécula de alto custo e de baixa estabilidade, a estrutura desse oligonucleotídeo de RNA foi modificada³ e nesse trabalho foram utilizados o aptâmeros A6 e A11 modificados para estrutura de DNA.

³ Essa informação será publicada na tese de mestrado, de autoria de Sabrina Lorenti do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da UFU com publicação prevista para 2024.

2 JUSTIFICATIVA

De acordo a estimativa mundial, o CaP foi o segundo mais frequente em homens, sendo que no Brasil a mais recente estimativa prevê que nos anos de 2023, 2024 e 2025 o número de casos de CaP será 72 mil para cada ano. O diagnóstico é feito por meio de técnicas como a biópsia de tecido da próstata, toque retal e o exame de PSA. No entanto, com o objetivo de complementar as técnicas e melhorar o diagnóstico e o manejo de terapias de pacientes com o CaP, o uso biomarcadores de superfície de CTCs têm sido estudado, sendo que o uso de aptâmeros é de grande interesse devido sua capacidade de se ligar em células alvo, podendo identificar os biomarcadores de superfície e além disso, podem apresentar ação citotóxica, desta forma se ligando a CTCs e agindo como um fármaco.

Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo realizar testes *in vitro* com os aptâmeros A6 e A11 em linhagens normais e tumorais da próstata a fim de avaliar a viabilidade e proliferação dessas células, quando tratadas com os aptâmeros. Com os resultados dos testes *in vitro* será possível avaliar o potencial uso desse aptâmero como ferramenta de diagnóstico e terapêutica em pacientes com CaP.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar testes *in vitro* com os aptâmeros de DNA A6 e A11 modificados com o propósito de analisar o seu potencial uso clínico como aplicação diagnóstica, prognóstica e terapêutica em pacientes com CaP.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade celular dos aptâmeros A6 e A11 em linhagem celular epitelial da próstata humana (PNT-2) e linhagem tumoral da próstata (PC-3).
- Avaliar a proliferação celular dos aptâmeros A6 e A11 em linhagem celular epitelial da próstata humana (PNT-2), e linhagem tumoral da próstata (PC-3).

4 METODOLOGIA

4.1 Cultura celular

Para o cultivo de células, foram utilizadas as seguintes linhagens: linhagem celular epitelial da próstata humana (PNT-2) e linhagem celular de câncer de próstata humano (PC-3). As linhagens celulares foram autenticadas (DNA) e testadas, comprovando que são livres de micoplasma.

Ambas as linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementadas com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100 U/mL de solução Anti-Anti (*antibiotic-antimycotic*), contendo penicilina e estreptomicina.

As linhagens foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Os meios de cultura foram trocados a cada três dias e, após alcançar aproximadamente 80% de confluência em garrafas T25 e/ou T75, as células foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e semeadas em placas apropriadas para cultivo aderente.

4.2 Ensaio de viabilidade e proliferação celular

A viabilidade dos aptâmeros A6 e A11 foram analisadas pelo ensaio de redução da resazurina. O ensaio da resazurina possibilita monitorar o número de células viáveis; esse corante redox é utilizado na cultura celular para analisar ensaios de viabilidade e proliferação celular (Präbst *et al.*, 2017). O ensaio se baseia na redução intracelular da resazurina, que possui uma coloração azul, em resofurina, a qual apresenta coloração rosa, essa alteração indica que as células possuem seu metabolismo ativo, portanto são viáveis. Esse método apresenta algumas vantagens quanto ao seu uso em comparação a outros ensaios, por apresentarem menor custo e maior sensibilidade (Riss *et al.*, 2016; Präbst *et al.*, 2017).

Para o ensaio da resazurina as duas linhagens celulares foram semeadas em placas de 96 poços contendo 2×10^4 células por poço separadamente e incubadas *overnight* para permitir a aderência celular. Após esse período, foi realizada a troca do meio das placas e as células foram tratadas de acordo com o desenho experimental com 1,5, 2,5 e 5 μ M de solução dos aptâmeros A6 e A11 e incubadas por duas horas para que a interação do aptâmero com a células fosse efetiva, mas sem permitir ligações inespecíficas conforme Kelly *et al.* (2021). O controle foi feito utilizando as células (PC-3 ou PNT-2) cultivadas em meio completo. Para o controle negativo, as células foram cultivadas em meio completo contendo 5% de DMSO. O branco consistiu apenas em meio completo.

Após esse período de tratamento, o meio foi substituído por meio completo fresco e as células foram incubadas por mais 22h, totalizando 24h após o início do tratamento. Em seguida foram adicionados 20 μL de resazurina em cada poço (a uma concentração de 0,1 mM em cada poço em um volume final de 120 μL). As placas foram incubadas por até 4 horas a 37 °C, verificando frequentemente se houve a mudança da coloração em relação aos poços controle. A viabilidade celular foi avaliada após 24 e 48 horas de tratamento.

4.3 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada pelo programa Graph Pad Prism 9.5.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), pelo método *One-Way* ANOVA com pós teste Tukey. O valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo e para todos os testes.

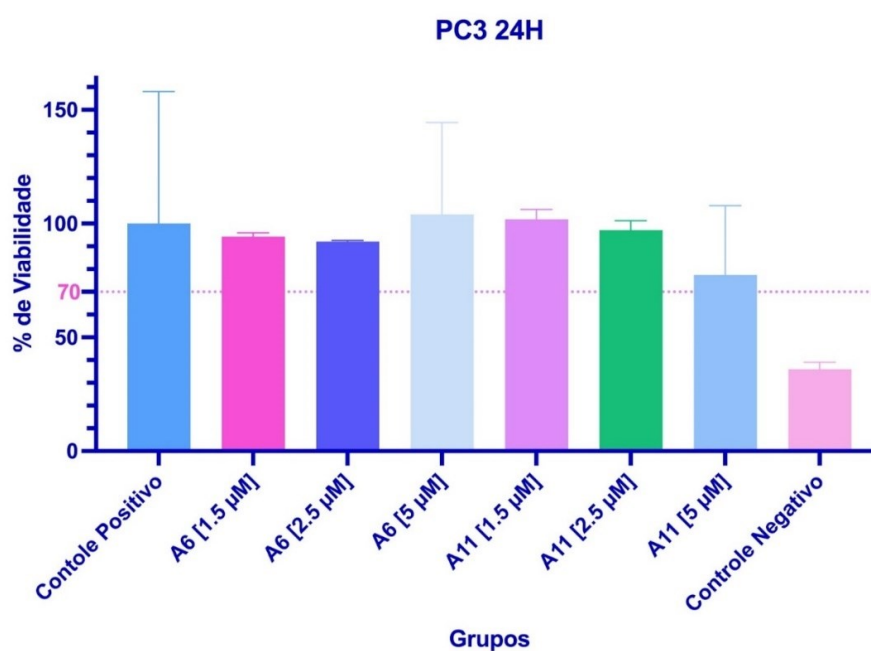
5 RESULTADOS

5.1 Viabilidade e Proliferação celular pelo método de resazurina

A avaliação da viabilidade e proliferação celular da linhagem normal (PNT-2) e tumoral (PC-3) da próstata, as quais foram incubadas com os aptâmeros A6 e A11 em diferentes concentrações, foi feita pelo ensaio da resazurina. A resazurina é um reagente redox permeável às células, portanto, ao ser internalizada em células viáveis e com metabolismo ativo, ocorrerá a redução irreversível da resazurina para resofurina, alterando a cor da solução de azul para rosa (Riss et al., 2016).

De acordo com a ISO10993:5 (2009), um composto é considerado tóxico para as células se a viabilidade da amostra tratada com esse composto em determinada concentração for menor que 70%. Os resultados apresentados na figura 3 indicam que ao cultivar células PC-3, que são células tumorais da próstata, com os aptâmeros A6 e A11 nas concentrações estabelecidas (1,5; 2,5 e 5 μM) por duas horas, após 24h do início do tratamento, não houve, nenhum indício que o aptâmero tenha capacidade de induzir a morte de maneira significativa (Teste ANOVA, one-way analysis of variance, seguido do pós-teste Tukey para comparações múltiplas), ou desacelerar a proliferação, visto que, em nenhuma concentração houve citotoxicidade, pois os dados obtidos demonstraram que em todas as concentrações de tratamentos a viabilidade foi maior que 70%.

Figura 3 - Viabilidade celular da linhagem tumoral PC-3 com os aptâmeros A6 e A11 após 24h de tratamento

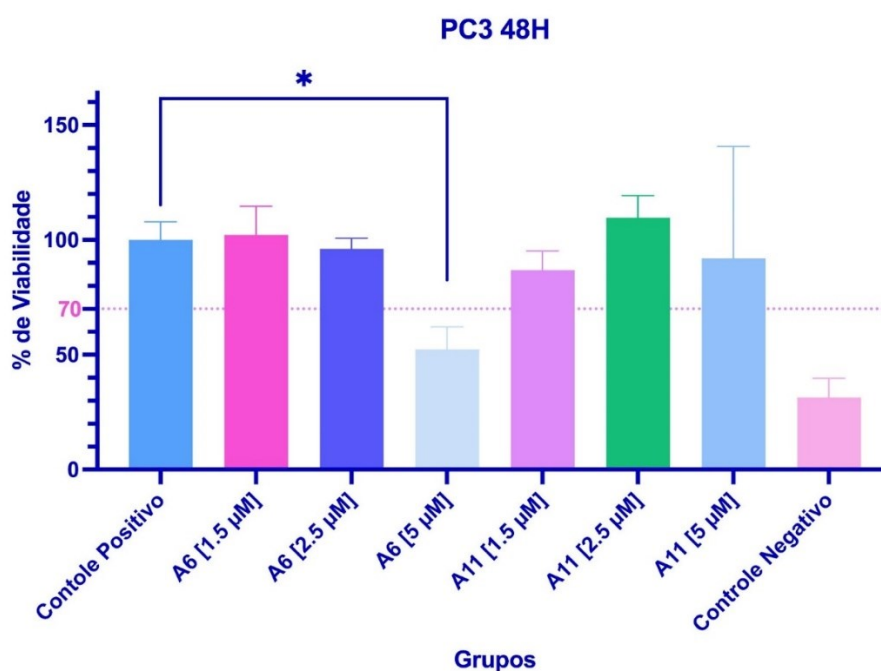


Viabilidade celular por resazurina da linhagem tumoral da próstata PC-3 após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações dos aptâmeros A6 e A11. As análises estatísticas foram avaliadas pelo método ANOVA-One-Way. Fonte: Autoria própria, com dados retirados do software GraphPad Prism 9.5.1.

Na figura 4, estão descritos os resultados do cultivo da PC-3 após 48h do início do tratamento (de duas horas em dose única) dos aptâmeros em diferentes concentrações, observa-se que somente o aptâmero A6 na sua maior concentração (5 μ M) foi citotóxico, com viabilidade próxima de 52%, apresentando diferença significativa com o controle positivo ($0,01 < p < 0,05$), indicando assim que o aptâmero A6 em uma concentração de 5 μ M pode induzir a morte celular ou desacelerar a proliferação.

Já o aptâmero A11, não apresentou diferença significativa com o controle positivo, mantendo a viabilidade e proliferação celular após 48 horas do início do tratamento.

Figura 4 - Viabilidade celular da linhagem tumoral PC-3 com os aptâmeros A6 e A11 após 48h de tratamento

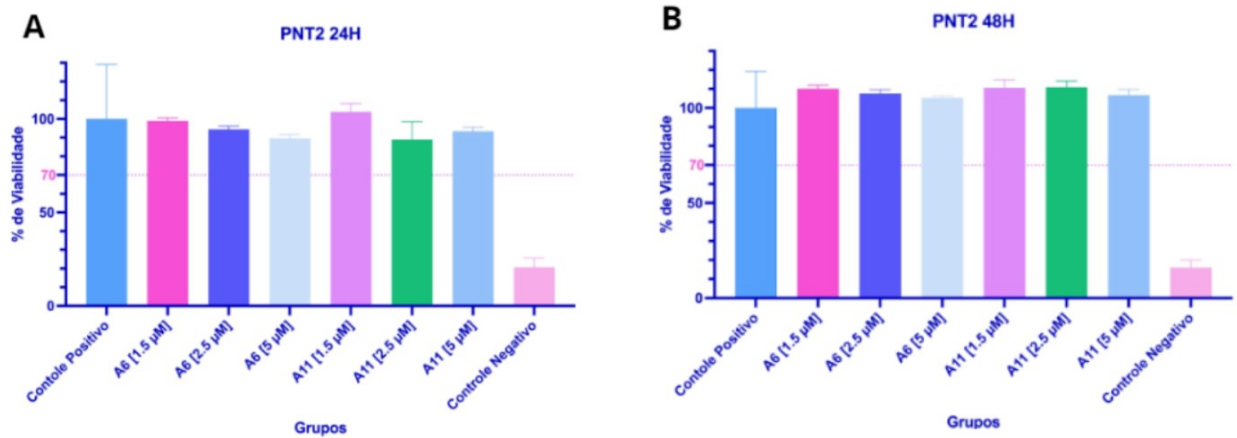


Viabilidade celular por resazurina da linhagem tumoral da próstata PC-3 após 48 horas de tratamento com diferentes concentrações dos aptâmeros A6 e A11. As análises estatísticas foram avaliadas pelo método ANOVA-One-Way (* $0,01 < p < 0,05$; ** $0,001 < p < 0,01$;). Fonte: Autoria própria, com dados retirados do software GraphPad Prism 9.5.1.

A figura 5 A indica que nenhuma concentração dos dois aptâmeros foram citotóxicas para as células de linhagem normal da próstata, PNT-2, não apresentando diferenças significativas se comparado com o controle positivo. Resultado semelhante é encontrado após

48h do início do tratamento (Figura 5 B), onde também não houve citotoxicidade nas concentrações testadas.

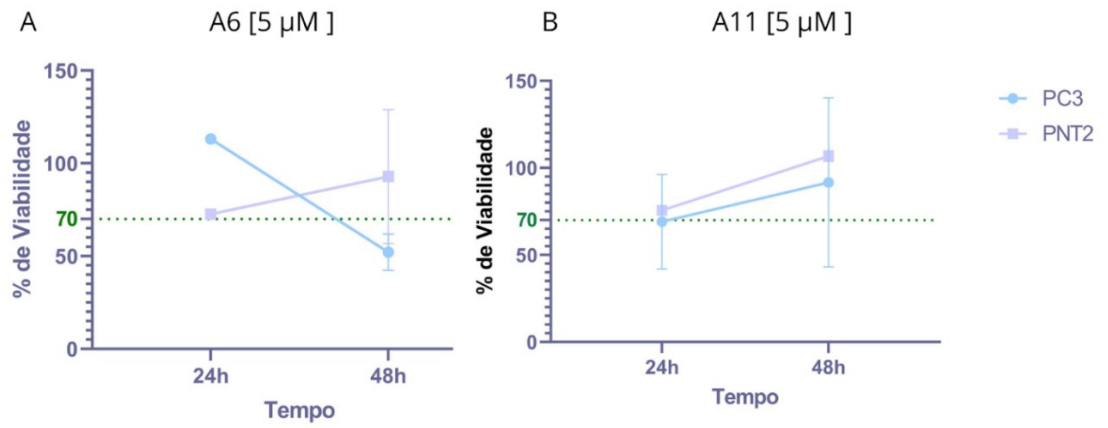
Figura 5 - Viabilidade celular após incubação por 24h e 48h das células PNT-2 com os aptâmeros A6 e A11



Viabilidade celular por resazurina, em (A) após 24h de tratamento e em (B) após 48h de tratamento com os aptâmeros A6 e A11 na linhagem normal da próstata (PNT-2). As análises estatísticas foram avaliadas pelo método ANOVA-One-Way, não houve diferença significativa entre o controle e os tratamentos. Fonte: Autoria própria, com dados retirados do software GraphPad Prism 9.5.1.

A figura 6 mostra o comportamento das células normais e tumorais da próstata tratadas com os aptâmeros A6 e A11 no tempo de 24 e 48h. A figura 6A apresenta o aumento da proliferação das células PNT-2 incubadas com o aptamero A6, mas uma queda da proliferação das células tumorais PC-3. Já a figura 6B mostra que o aptamero A11 não altera a proliferação das células normais (PNT-2) e tumorais (PC-3) no tempo de 48h.

Figura 6 - Proliferação celular após incubação de 24h até 48h com os aptâmeros A6 e A11



Proliferação celular da PC-3 (A) e PNT-2 (B) após incubação com os aptâmeros A6 [5 μ M] e A11 [5 μ M], de 24h até 48h. As análises estatísticas foram avaliadas pelo método ANOVA-Two-Way. Fonte: Autoria própria, com dados retirados do software GraphPad Prism 9.5.1.

6 DISCUSSÃO

Os aptâmeros de RNA A6 e A11, foram previamente selecionados pelo estudo realizado por Souza *et al.* (2015) como potenciais ligantes de CTCs da linhagem de células tumorais da próstata (PC-3). No presente estudo, foram utilizados os aptâmeros A6 e A11 modificados para moléculas de DNA, devido a algumas vantagens apresentadas por essas moléculas, como sua maior estabilidade e menor custo quando comparados aos aptâmeros de RNA. Além disso, os aptâmeros são oligonucleotídeos com alta seletividade de ligação ao alvo, características que os tornam importantes na teranóstica do câncer (Zhu *et al.*, 2015; Dickey; Giangrande, 2016).

As CTCs são detectáveis através da biópsia líquida, utilizando amostras de sangue, sendo assim uma metodologia menos invasiva, a qual permite monitorar o desenvolvimento do CaP (Marrugo-Ramírez Mir; Samitier, 2018). Além disso, as CTCs possibilitam a busca de biomarcadores presentes nessas células tumorais, podendo ser utilizadas no diagnóstico precoce e na escolha da terapia mais adequada (Campos-Fernández *et al.*, 2019).

Deste modo, para avaliar o potencial uso dos aptâmeros de DNA A6 e A11 como uma possível ferramenta teranóstica foram feitas as análises de viabilidade celular e proliferação das duas linhagens celulares da próstata, normal (PNT-2) e tumoral (PC-3), incubadas com os aptâmeros em três diferentes concentrações (1,5, 2,5 e 5 μM) nos tempos de 24h e 48h.

De acordo com o resultado obtido através do ensaio de resazurina, foi observado que o aptâmero A6 na sua maior concentração (5 μM) após 48h apresentou citotoxicidade para a linhagem tumoral PC-3, pois a viabilidade das células incubadas com o aptâmero foi aproximadamente 52%. Este resultado está de acordo com o padrão definido pela ISO10993:5 (2009), a qual considera um composto citotóxico aqueles que apresentam valores de viabilidade celular abaixo de 70%. No entanto, ao observar os resultados do aptâmero A6 incubado com as células PNT-2 não houve diferença estatística significativa quanto a sua interferência na proliferação celular e citotoxicidade, sugerindo que o aptâmero A6 poderia ser utilizado como uma forma de tratamento por somente alterar a atividade das células tumorais. Similar ao resultado obtido, Bossuti *et al.* (2022), utilizaram o aptâmero de DNA GT75 na linhagem tumoral da próstata PC-3 e linhagem não tumoral PZHPV-7 para identificar a expressão da proteína eEF1A1 e investigar seu uso como potencial biomarcador de CaP. Os resultados deste estudo demonstraram que houve redução da viabilidade das células tumorais PC-3 e não houve perda da viabilidade das células não tumorais, indicando um potencial uso terapêutico.

O estudo realizado por Campos-Fernández *et al.* (2020) utilizou o aptâmero A4, selecionado pelo estudo de Souza *et al.* (2015), e dando continuidade à pesquisa, esse aptâmero passou por modificações em sua estrutura, adicionando a ele uma terminação de DNA, que foi denominado mA4. Neste estudo, foram feitas análises nas linhagens tumorais (PC-3) e normais (RWPE-1) da próstata quanto ao efeito do aptâmero mA4 sob a proliferação e viabilidade das células. Os resultados apresentados pelos testes realizados por Campos-Fernández *et al.* (2020) indicaram que o aptâmero mA4 em concentrações de 2,5 e 5 μM não alteraram a viabilidade e proliferação celular das duas linhagens da próstata, após 24h e 48h de tratamento, o que corrobora com os resultados do presente estudo, onde o aptâmero A11 durante 24h de tratamento em PC-3 e PNT-2 e 48h em PNT-2 não apresentaram alteração da viabilidade e proliferação celular, podendo sugerir que o aptâmero A11 possa ser utilizado como ferramenta diagnóstica, como o mA4.

No entanto, quanto à análise de viabilidade em 48h e proliferação celular da PC-3 os resultados foram diferentes para o aptâmero A6. Utilizando-se o aptâmero A6 em sua maior concentração (5 μM) após 48h de tratamento, obteve-se resultado significativo quanto à sua viabilidade, podendo sugerir que o aptâmero A6 possa induzir morte celular ou redução da proliferação celular. Esses resultados de citotoxicidade de aproximadamente 48% do aptâmero A6 pode ser devido às diferenças estruturais e conformacionais quando comparado ao aptâmero mA4 e A11, sugerindo que o A6 se ligue de uma forma específica a célula PC-3 provocando alterações em vias de morte celular e/ou no seu ciclo celular. O ligante do aptâmero A6 nas células PC-3 não é conhecido, no entanto supõe-se que essa ligação ocorra em algum biomarcador relacionado à tumorigênese, sendo uma questão que requer estudos futuros pois as análises realizadas neste estudo não possibilitam obter a informação sobre o biomarcador, para isso seriam necessárias mais análises como a espectrometria de massas (Sun *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2015). Portanto, são necessários mais ensaios com um número amostral maior para validar essa hipótese, onde o A6 pode ter aplicação terapêutica e o A11 uma aplicação diagnóstica, uma vez que, as informações na literatura sobre esses aptâmeros ainda são escassas.

7 CONCLUSÃO

O aptâmero A6 em sua maior concentração, quando incubado por 48h apresentou 48% de citotoxicidade em células tumorais da próstata levando a diminuição da proliferação destas células, não alterando a viabilidade e proliferação de células normais da próstata, podendo ser um indicativo do seu potencial uso para a terapia de pacientes com CaP. Já o aptâmero A11 não apresentou resultados quanto ao seu efeito citotóxico e não houve alteração da proliferação de ambas as linhagens prostáticas, sugerindo que o aptâmero A11 possa ser utilizado como uma possível ferramenta diagnóstica para pacientes com CaP. No entanto, é necessário a realização de outros ensaios para validar esses resultados, podendo ser feitos testes como cálculo do IC50 e o do índice de seletividade (IS) do aptamero A11, microscopia confocal para avaliar o local da ligação do aptâmero à molécula alvo e espectrometria de massas para identificação dos biomarcadores.

REFERÊNCIAS

- BOSUTTI, A. et al. High eEF1A1 Protein Levels Mark Aggressive Prostate Cancers and the In Vitro Targeting of eEF1A1 Reveals the eEF1A1–actin Complex as a New Potential Target for Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 8, p. 4143, 8 abr. 2022.
- CAMPOS-FERNÁNDEZ, E. et al. Post-SELEX Optimization and Characterization of a Prostate Cancer Cell-Specific Aptamer for Diagnosis. **ACS Omega**, v. 5, n. 7, p. 3533–3541, 13 fev. 2020.
- CAMPOS-FERNÁNDEZ, E. et al. The use of aptamers in prostate cancer: A systematic review of theranostic applications. **Clinical Biochemistry**, v. 93, p. 9–25, jul. 2021.
- CAMPOS-FERNÁNDEZ, E. et al. Research landscape of liquid biopsies in prostate cancer. **American Journal of Cancer Research**, v. 9, n. 7, p. 1309–1328, 2019.
- CROCETTO, F. et al. Liquid Biopsy in Prostate Cancer Management—Current Challenges and Future Perspectives. **Cancers**, v. 14, n. 13, p. 3272, 4 jul. 2022.
- CRUZ-HERNÁNDEZ, C. D. et al. Aptamers as Theragnostic Tools in Prostate Cancer. **Biomolecules**, v. 12, n. 8, p. 1056, 29 jul. 2022.
- DATHATHRI, E. et al. Liquid Biopsy Based Circulating Biomarkers in Metastatic Prostate Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 863472, 20 maio 2022.
- DICKEY, D. D.; GIANGRANDE, P. H. Oligonucleotide aptamers: A next-generation technology for the capture and detection of circulating tumor cells. **Methods**, v. 97, p. 94–103, mar. 2016.
- FU, Z.; XIANG, J. Aptamers, the Nucleic Acid Antibodies, in Cancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 2793, 17 abr. 2020.
- HOUSELEY, J.; TOLLERVEY, D. The Many Pathways of RNA Degradation. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 763–776, fev. 2009.
- INCA estima 704 mil casos de câncer por ano no Brasil até 2025. **Instituto Nacional de Câncer - INCA**, 23 nov. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>. Acesso em: 20 jan. 2023.
- ISO. 10993–5: 2009. Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity. **International Organization for Standardization**. 2009. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/36406.html> Acesso em: 07 jan. 2024
- KELLY, L. et al. A comparative analysis of cell surface targeting aptamers. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 6275, 1 nov. 2021.
- LIMA, A. R. et al. Biomarker Discovery in Human Prostate Cancer: an Update in Metabolomics Studies. **Translational Oncology**, v. 9, n. 4, p. 357–370, ago. 2016.

MARRUGO-RAMÍREZ, J.; MIR, M.; SAMITIER, J. Blood-Based Cancer Biomarkers in Liquid Biopsy: A Promising Non-Invasive Alternative to Tissue Biopsy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, p. 2877, 21 set. 2018.

MATUSZCZAK, M.; SCHALKEN, J. A.; SALAGIERSKI, M. Prostate Cancer Liquid Biopsy Biomarkers' Clinical Utility in Diagnosis and Prognosis. **Cancers**, v. 13, n. 13, p. 3373, 5 jul. 2021.

MORRISON, G. J.; GOLDKORN, A. Development and Application of Liquid Biopsies in Metastatic Prostate Cancer. **Current Oncology Reports**, v. 20, n. 4, p. 35, abr. 2018.

NAVIEN, T. N. et al. In silico molecular docking in DNA aptamer development. **Biochimie**, v. 180, p. 54–67, jan. 2021.

PRÄBST, Konstantin et al. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. In: GILBERT, Daniel F.; FRIEDRICH, Oliver (org.). **Cell Viability Assays**. New York, NY: Springer New York, 2017. (Methods in Molecular Biology). v. 1601, p. 1–17. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6960-9_1. Acesso em: 16 jan. 2024.

RIGAU, M. et al. The Present and Future of Prostate Cancer Urine Biomarkers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 12620–12649, 17 jun. 2013.

RISS, Terry L. et al. Cell viability assays. **Assay Guidance Manual [Internet]**, 2016.

REBELLO, R. J. et al. Prostate cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 7, n. 1, p. 9, 4 fev. 2021.

SARANYUTANON, S. et al. Therapies Targeted to Androgen Receptor Signaling Axis in Prostate Cancer: Progress, Challenges, and Hope. **Cancers**, v. 12, n. 1, p. 51, 23 dez. 2019.

SEKHOACHA, M. et al. Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. **Molecules**, v. 27, n. 17, p. 5730, 5 set. 2022.

SOUZA, A. G. d. et al. 3d cell-selex: seleção e caracterização in vitro de aptâmeros de rna ligantes específicos às células tumorais prostáticas. Universidade Federal de Uberlândia, 2015

SUN, H. et al. Oligonucleotide Aptamers: New Tools for Targeted Cancer Therapy. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 3, p. e182, jan. 2014.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, maio 2021.

TONRY, C. et al. Clinical proteomics for prostate cancer: understanding prostate cancer pathology and protein biomarkers for improved disease management. **Clinical Proteomics**, v. 17, n. 1, p. 41, dez. 2020.

VARAPRASAD, G. L. et al. Recent advances and future perspectives in the therapeutics of prostate cancer. **Experimental Hematology & Oncology**, v. 12, n. 1, p. 80, 22 set. 2023.

VENKATESAN, S.; CHANDA, K.; BALAMURALI, M. M. Recent Advancements of Aptamers in Cancer Therapy. **ACS Omega**, v. 8, n. 36, p. 32231–32243, 12 set. 2023.

VERZE, Paolo; CAI, Tommaso; LORENZETTI, Stefano. The role of the prostate in male fertility, health and disease. **Nature Reviews Urology**, [S.L.], v. 13, n. 7, p. 379-386, 1 jun. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2016.89>.

GORINGER, H. U. et al. Post-SELEX chemical optimization of a trypanosome-specific RNA aptamer. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 11, n. 1, p. 16-23, 2008.

WANG, G. et al. Genetics and biology of prostate cancer. **Genes & Development**, v. 32, n. 17–18, p. 1105–1140, 1 set. 2018.

WANG, Y. et al. DNA Aptamer Evolved by Cell-SELEX for Recognition of Prostate Cancer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e100243, 23 jun. 2014.

ZAINFELD, D.; GOLDKORN, A. Liquid Biopsy in Prostate Cancer: Circulating Tumor Cells and Beyond. Em: DANESHMAND, S.; CHAN, K. G. (Eds.). **Genitourinary Cancers**. Cham: Springer International Publishing, 2018. v. 175p. 87–104.

ZAMAY, A. S. et al. Aptamer-Based Methods for Detection of Circulating Tumor Cells and Their Potential for Personalized Diagnostics. Em: MAGBANUA, M. J. M.; PARK, J. W. (Eds.). **Isolation and Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells**. Cham: Springer International Publishing, 2017. v. 994p. 67–81.

ZHU, Q.; LIU, G.; KAI, M. DNA Aptamers in the Diagnosis and Treatment of Human Diseases. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 20979–20997, 25 nov. 2015.