





SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE BERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

“Um estudo comparativo de aptâmeros de ssRNA e ssDNA para a teranóstica do câncer de próstata"

Aluna: Sabrina Lorenti

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Vivian Alonso Goulart

Co-Orientador: Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior

UBERLÂNDIA - MG
2024







SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE BERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

" Um estudo comparativo de aptâmeros de ssRNA e ssDNA para a teranóstica do câncer de próstata"

Aluna: Sabrina Lorenti

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Vivian Alonso Goulart

Co-Orientador: Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética

UBERLÂNDIA - MG
2024

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE BERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

L868 Lorenti, Sabrina, 1996-
2024 "Estabilidade e afinidade de ligação de aptâmeros de ssDNA: Um estudo comparativo de aptâmeros de ssRNA e ssDNA para a terapêutica do câncer de próstata" [recurso eletrônico] / Sabrina Lorenti. - 2024.

Orientadora: Vivian Alonso Goulart .
Coorientador: Nilson Nicolau Junior .
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2024.367
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Genética. I. , Vivian Alonso Goulart,1969-, (Orient.). II. , Nilson Nicolau Junior,1981-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br

ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico/PPGGB				
Data:	Primeiro de julho de dois mil e vinte e quatro	Hora de início:	08:30h	Hora de encerramento:	09:00h
Matrícula do Discente:	12222GBI012				
Nome do Discente:	Sabrina Lorenti				
Título do Trabalho:	Estabilidade e afinidade de ligação de aptâmeros de ssDNA: Um estudo comparativo de aptâmeros de RNA e ssDNA para a terapêutica do câncer de próstata.				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Biologia Molecular e Celular				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Marcadores Moleculares do Câncer				

Ao primeiro dia do mês de julho de dois mil e vinte e quatro, às 08:30h, reuniu-se via web conferência pela plataforma Cisco Webex, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Vivian Alonso Goulart (Orientador), Luciane Sussuchi da Silva e Emilia Rezende Vaz. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). Vivian Alonso Goulart apresentou a Comissão Examinadora e o candidato (a), agradeceu a presença dos participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor (a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o (a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o (a) candidato(a):

(A) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Documento assinado eletronicamente por **Emília Rezende Vaz**, **Usuário Externo**, em 01/07/2024, às 11:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **Vivian Alonso Goulart**, **Presidente**, em 01/07/2024, às 11:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **Luciane Sussuchi da Silva**, **Usuário Externo**, em 01/07/2024, às 12:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5502250** e o código CRC **22F8DF6A**.

Referência: Processo nº 23117.038879/2024-36 SEI nº 5502250

Dedico essa pesquisa ao meu pai Sebastião Roberto Lorenti e a minha mãe Elisabete Machado Lorenti, que não mediram esforços para que eu pudesse chegar onde cheguei, obrigada por serem meu esteio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois se não for diante sua permissão e diante tua graça, nada é possível. À Maria mãe de Deus e de misericórdia, que sempre intercedeu por mim e me cobriu com seu manto sagrado todas que as vezes que precisei.

Aos meus pais Elisabete Machado Lorenti e Sebastião Roberto Lorenti, por possibilitarem a realização dessa pós-graduação e investirem no meu conhecimento e formação, além de serem meu alicerce de vida e fortaleza para passar por todo o processo. À minha irmã Natalia Lorenti de Rezende, que esteve sempre comigo me mantendo confiante para não desistir diante minhas incertezas, e dificuldades, e ao meu cunhado Maicon Germano de Rezende que sempre torceu por mim.

Ao meu namorado José Antônio Amâncio Sousa que sempre acreditou na minha capacidade e foi minha calmaria diante do caos, suportando todos meus surtos e choros, além de todo companheirismo, carinho, palavras de conforto e incentivo. Aos meus sogros, Queila Odete e Ademir Antônio, e ao João Pedro Amâncio que sempre torceram por mim.

A toda minha família que sempre me apoiou, torceu pelas minhas conquistas e rezou pela minha proteção e sabedoria. Ao meu primo Guilherme Rezende, que me incentivou a não desistir e sempre se dispôs a me ajudar, mesmo estando sobrecarregado.

À minha orientadora, Dr.ª Vivian Alonso Goulart, por me acolher no seu grupo de pesquisa, ser sempre presente e compreensiva diante minhas dificuldades e limitações, por ter me ensinado a ser mais resiliente perante os desafios, me ajudando a crescer e me desenvolver cientificamente e confiar no meu potencial mesmo quando eu achava que a pesquisa não era para mim.

Ao meu coorientador, Dr. Nilson Nicolau Júnior, por ter aceitado me ensinar um pouco sobre o mundo amplo da bioinformática e ter tido tanta paciência e disponibilidade para que fosse possível realizar os estudos *in silico*.

Aos meus amigos e colegas por tantos momentos, experiencias compartilhadas e aprendizado. Em especial, à Nathalia Alqualo que me ensinou tudo o que sabe, além de me acompanhar em todo o processo e me socorrer quando tudo dava errado, sempre com muita paciência e didática, ao Danilo Caixeta, Hadassa Leslie, Silvana Assis, Bruna Mendes e ao Lucas Peres que fizeram os dias difíceis serem mais leves, por todo o companheirismo, ensinamentos, abraços e por aturarem meus surtos há cada minuto.

Aos integrantes do grupo de estudos e pesquisa em marcadores moleculares (GEP-MMol), por toda amizade e conhecimento compartilhado. Ao Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, que possibilitou que toda a pesquisa, no qual fiz grandes amizades que me impulsionaram em especial a Luciana Bastos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio que tornou possível o desenvolvimento deste trabalho.

A mim, por não me permitir desistir, enfrentar todos meus medos, ansiedade, limitações, sofrimentos e desafios da pesquisa, mesmo enquanto duvidei da minha capacidade e das minhas escolhas, além de toda a dedicação que tive desde o 1º dia, a qual me permitiu amadurecer, aprender e crescer tanto.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO **1**
CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA **4**
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 5
1.1 Caracterização do câncer 5
1.2 CaP: um problema global de saúde pública com alta incidência e mortalidade 6
1.4 Anatomia e função da próstata: relevância para a identificação de patologias prostáticas. **8**
1.5 Importância do diagnóstico precoce e desafios na detecção do CaP **9**
1.6 Biomarcadores Moleculares e Aptâmeros: Inovações no Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Próstata. 10
1.7 Técnicas SELEX, Cell-SELEX e 3D cell SELEX: Evolução, Aplicações e Avanços no Desenvolvimento de Aptâmeros para o CaP. **12**
1.8 Comparação entre ssRNA e ssDNA em Aptâmeros: vantagens, desafios e evolução dos protocolos SELEX. **18**
1.9 Modificação de Aptâmeros de ssRNA para ssDNA: Avanços em Estabilidade e Aplicações Terapêuticas. **19**
2.REFERÊNCIAS 23
CAPÍTULO II: Stability and Binding Affinity of ssDNA Aptamers: A Comparative Study of ssRNA and ssDNA Aptamers for Prostate Cancer theranostics. **29**
RESUMO 30
1. INTRODUCTION 32
2. METHODOLOGY 33
2.1 Modification of ssRNA aptamers to ssDNA *in silico*. 33
2.2 Molecular Dynamics for subsequent comparison of ssRNA and ssDNA aptamers. 34
2.3 Evaluation of the dissociation constant Kd. 36
3. RESULTS AND DISCUSSION 37
3.1 ssRNA to ssDNA aptamers show similar 3D structure 38
3.2 Molecular Dynamics Analysis 40

3.3 LN-A6 aptamer showed greater affinity to PC3 cells than LN-A11 43
4. CONCLUSION 44
5. REFERENCES 45

APRESENTAÇÃO

Os cânceres ocorrem devido ao acúmulo de modificações genéticas e epigenéticas que interferem nas funções de controle das células afetadas, levando à sua proliferação descontrolada, sobrevivência e disseminação. Apesar de a doença se desenvolver lentamente e sem sintomas na maioria dos casos, o diagnóstico precoce é crucial para um tratamento eficaz. Particularmente, o câncer de próstata (CaP) é o tipo de tumor mais comum entre homens acima de 50 anos, estabelecendo-se como um grave problema de saúde pública global.

Nesse cenário, os aptâmeros, que consistem em sequências de fita simples de DNA (ssDNA) ou RNA (ssRNA), surgem como uma ferramenta promissora controle terapêutico do CaP. Sua capacidade de se dobrar em estruturas tridimensionais permite que se liguem a alvos específicos com alta precisão. Também oferecem outras vantagens significativas, tais como a possibilidade de detectar biomarcadores em células cancerígenas e em fluidos corporais, a capacidade de ligação à drogas ou nanopartículas que possam atuar como veículo, direcionando o tratamento às células tumorais. Outra vantagem dos aptâmeros é o possível monitoramento contínuo da doença, já que a detecção contínua de células cancerígenas ou biomarcadores permite acompanhar a resposta ao tratamento e identificar precocemente recidivas da doença. Além disso, não produzem efeitos imunogênicos e apresentam alta estabilidade sob diversas condições.

Neste trabalho, as análises estão dispostas da seguinte maneira: No capitulo I descrevemos o contexto do câncer, com ênfase no segundo tipo de câncer mais prevalente entre homens acima dos 50 anos, o CaP, trazendo seus dados estimados de diagnóstico, morbidade e mortalidade, bem como seus fatores de

risco e plataformas atuais para o diagnóstico. Propomos o estudo de aptâmeros como complexo teranóstico, explicando sua origem, seleção e vantagens. No Capítulo II, utilizamos dois aptâmeros de ssRNA, A6 e A11, previamente selecionados por sua capacidade de se ligar especificamente às células tumorais do câncer de próstata (CaP), em particular à linhagem celular PC-3. Embora eficazes, apresentam limitações significativas que comprometem sua aplicabilidade clínica. Pois se comportam como RNAs não codificantes, podendo interferir na regulação da expressão gênica e estão sujeitos à degradação não controlada ou indesejada por diversas enzimas, como ribonucleases (RNases), exoenzimas e RNases extracelulares, que afetam a execução experimental (laboratorial), perda de função, fragmentação da molécula, comprometimento da terapia, impacto na estabilidade para aplicação de drug delivery. Além disso, a interação com essas enzimas pode ativar respostas inflamatórias do sistema imunológico inato, que identifica essas sequências sintéticas, como os aptâmeros, como possíveis ameaças, semelhantes ao material genético de alguns vírus. Isso pode levar à indução de uma síndrome de liberação de citocinas, provocada por inflamações descontroladas, resultando em falência de órgãos e choque séptico.

Diante dessas limitações, o objetivo foi fazer a modificação dos aptâmeros de ssRNA para ssDNA, criando os novos aptâmeros LN-A6 e LN-A11. Ao substituir o RNA pelo DNA de fita simples (ssDNA), removemos o grupo hidroxila (OH) na posição 2' do açúcar ribose, o qual aumenta significativamente a resistência à hidrólise e degradação por RNases, pois elas são especificas para o RNA, fazendo seu reconhecimento e executando sua clivagem. Já o ssDNA, que possui a desoxirribose (sem o OH 2') as RNases não conseguem atuar com eficiência, conferindo maior estabilidade à molécula, protegendo-a contra a degradação enzimática e contaminações que ocorrem no ambiente extracelular.

Assim, os aptâmeros de ssDNA podem se adequar melhor para aplicações clínicas. Frisando que são mais estáveis, oferecendo maior resistência às interações prejudiciais ao organismo humano, durabilidade em ambientes onde o ssRNA seria rapidamente degradado. Portanto a modificação de ssRNA para ssDNA otimiza a aplicabilidade dos aptâmeros na área cínica como ferramenta teranóstica para o CaP.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer de próstata, aptâmeros ssRNA e ssDNA, bioinformática, estabilidade, plataformas diagnósticas e terapêuticas.

CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Caracterização do câncer

O câncer é caracterizado pelo acúmulo de modificações genéticas e epigenéticas, que impactam o comportamento celular de forma complexa e multifacetada. As alterações genéticas referem-se a mutações na sequência do DNA, a molécula que codifica as instruções para o funcionamento celular. Por outro lado, as modificações epigenéticas, influenciadas por fatores ambientais e estilo de vida, modulam a expressão gênica sem alterar a sequência do DNA. De acordo com o modelo proposto por Douglas Hanahan (2022), essas alterações promovem a aquisição de capacidades que definem as células cancerígenas, conhecidas como hallmarks do câncer. Essas características incluem: a proliferação celular sustentada, resistência à morte celular, potencial replicativo ilimitado, indução de angiogênese, ativação da invasão e metástase, evasão do sistema imunológico, instabilidade genômica, inflamação tumoral, reprogramação do metabolismo celular, e resistência à morte celular induzida por estresse. Esses fatores combinados interferem nas funções regulatórias essenciais e permitem a progressão e disseminação tumoral. (Sierra, *et al,* 2020) (Takeshima, *et al,* 2019)

O estudo de Bray *et al*. (2024) analisou a carga global do câncer no ano de 2022, com base em estatísticas de incidência e mortalidade, além dos tipos de câncer mais frequentes. Os dados utilizados foram obtidos do Observatório Global do Câncer (GLOBOCAN), que compila informações da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), uma organização criada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). O artigo classifica o câncer como a segunda principal causa de morte no mundo, representando uma importante questão de justiça social e saúde pública. A projeção indica um aumento no número de novos diagnósticos de câncer até 2050, impulsionado por fatores demográficos e

epidemiológicos. Diante desse cenário, torna-se crucial delinear estratégias globais de prevenção e controle da doença.

1.2 CaP: um problema global de saúde pública com alta incidência e mortalidade

No panorama atual, a neoplasia maligna prostática conhecida como câncer de próstata (CaP) classifica-se como problema de saúde pública situando-se em segundo lugar de prevalência de carcinoma masculino na esfera mundial. Ademais o CaP apresenta um índice de mortalidade elevada, uma vez que a doença é classificada como agressiva em função das células cancerosas do tumor primário migrarem para outros locais do corpo, originando novos tumores, essa disseminação de células tumorais denomina-se metástase. (Siegel, *et al*, 2020). Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), mostram registros de 1.414.259 novos casos e 375.304 óbitos no ano de 2020, indicando uma expansão no CaP de 34,8% de incidência diagnóstica, com mortalidade de 40,9% dentro de uma década[1]. Já no contexto brasileiro, a previsão é de 71.730 novos casos de diagnósticos entre os anos de 2023 a 2025, equivalendo a uma taxa de 67,86 a cada 100 mil habitantes masculinos segundo as informações do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2022)[2]. Ademais, fora registrado um total de 15.841 mortes ocasionadas por essa doença no país no ano de 2020, representando 15,3 falecimentos a cada 100 mil homens. Destaca-se ainda que as regiões com maiores taxas de incidência desse câncer, sendo o norte e oeste europeu, o

[1] Informação disponível em : https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/27-prostate-fact-sheet.pdf
[2] Informação disponível em : https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/deteccao-precoce-do-cancer

Caribe, Austrália, Nova Zelândia, as Américas do Norte e do Sul, e a África do Sul, conforme relatórios da IARC de 2020[3].

1.3 Fatores de risco para o CaP: idade, genética, epigenética e impacto das desigualdades sociais.

Os principais fatores de risco associados ao CaP incluem idade, histórico familiar, fatores genéticos e epigenéticos, raça e etnia (Bancroft et al., 2021). A incidência dessa neoplasia maligna se intensifica após os 60 anos, consolidando a idade como o maior fator de risco. Outro fator de alta relevância é o histórico familiar, que aumenta a chance de diagnóstico em até 2 a 3 vezes (Salmi et al., 2021). Diante dessa condição, é possível que haja uma tendência ao desenvolvimento de um CaP mais agressivo e com maior risco de metástases, embora não seja uma certeza. A herdabilidade da doença está presente em cerca de 58% dos casos, sendo associada a mutações em genes de reparo do DNA (HOXB13, BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, RAD51D, PALB2), o que se correlaciona ao aumento da progressão e prevalência do CaP metastático (Breyer et al., 2012). Alterações epigenéticas, como o envelhecimento, a exposição a produtos químicos mutagênicos, radiação, luz ultravioleta (UV) e radicais de oxigênio que aumentam em condições inflamatórias, em conjunto com a ocorrência da metilação do DNA (processo pelo qual grupos metila são adicionados ao DNA, podendo silenciar genes e impedir sua expressão), também são aspectos importantes na carcinogênese prostática (Salmi, et al, 2021), (Breyer et al 2012). Todavia, homens negros tendem atingir patamares mais agressivos do CaP em virtude aos contextos sociais precarizados associados a

[3] Informação disponível em : https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/27-prostate-fact-sheet.pdf

ancestralidade, local de origem, fatores ambientais, problemas com planos de saúde e determinantes sociais da saúde (Bergengren, *et al*, 2023).

1.4 Anatomia e função da próstata: relevância para a identificação de patologias prostáticas.

Compreender a anatomia e o funcionamento da próstata é importante para identificar e distinguir suas patologias. Ela desempenha dupla função, crucial no sistema reprodutivo masculino, atuando tanto como um órgão anatômico estrutural, como uma glândula produtora de fluidos prostáticos, como o liquido seminal que compõe o sêmen e mantém a viabilidade do esperma (Michael, 2018), (Rebello, *et al,* 2021) . A próstata é localizada na região inferior da pelve, abaixo da bexiga e ao redor da uretra. Anatomicamente ela é segmentada em zona central, transitória e periférica, além de conter regiões fibromusculares e periuretrais (figura 1) (Rebello, *et al,* 2021). Representando mais de 70% do volume glandular, a zona periférica é a principal responsável pelo funcionamento normal da próstata. No entanto, é nessa mesma zona que o surgimento de tumores em homens mais velhos estão propensos a se desenvolver. Em termos médicos, a identificação do sulco central durante o toque retal é essencial para que seja realizada a avaliação da próstata, permitindo a distinção entre os lobos laterais, afim de facilitar a detecção de anomalias. (Verze, *et al,* 2016).

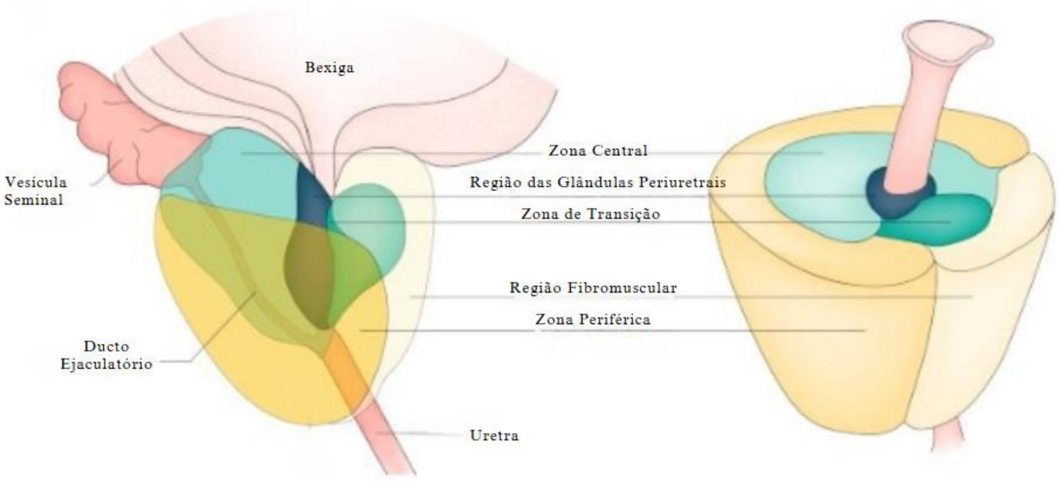


Figura 1.[4] Regiões da próstata: zona central, transitória e periférica, além de conter regiões fibromusculares e periuretrais.

1.5 Importância do diagnóstico precoce e desafios na detecção do CaP.

O diagnóstico precoce do CaP é fundamental, devido a resposta ao tratamento e ao prognóstico ser significativamente mais eficaz quando a doença é detectada em seus estágios inicias. O diagnóstico atual é realizado através dos exames de toque retal, dosagem sanguínea do antígeno prostático específico (PSA, do inglês Prostatic-Specific Antigen), biópsia tecidual guiada por ultrassonografia, bem como a utilização da ressonância magnética multiparamétrica (MRI) (Sekhoacha, *et al*, 2022). O PSA é o exame mais utilizado para diagnóstico em larga escala do CaP. Um valor de PSA inferior ou igual a 4 ng/ml é geralmente considerado dentro da normalidade. No entanto, há casos em que o homem pode apresentar níveis elevados de PSA sem ter CaP (alta taxa de falso positivo). Esse aumento pode ser causado por patologias benignas, como hiperplasia benigna da próstata (BPH), prostatite, trauma ou até mesmo após a

[4] Ilustração adaptada e traduzida do artigo (Rebello, *et al,* 2021).

ejaculação. Além disso, com o aumento da idade, os valores de PSA considerados normais também tendem a aumentar, o que deve ser levado em conta na avaliação dos resultados. Cabe ressaltar que, em cerca de 15-20% dos casos, homens podem apresentar níveis baixos de PSA (inferior a 4 ng/ml) e, ao mesmo tempo, identificar nódulos palpáveis na próstata durante o exame de toque retal. Essa discrepância entre os resultados do PSA e do exame físico configura um caso de falso negativo do antígeno, evidenciando a importância da avaliação conjunta dos resultados para o diagnóstico preciso do CaP (Dathathri, *et al*, 2022) (Prensner, *et al,* 2012).

Via de regra, a maioria dos casos iniciais de CaP é assintomática ou apresenta sintomas leves e inespecíficos. No entanto, a progressão da doença pode variar significativamente, em alguns casos evoluir de forma lenta e indolente, enquanto outros se tornam metastáticos e letais em pouco tempo. Essa heterogeneidade do CaP exige o desenvolvimento de técnicas que permitam distinguir os diferentes tipos de câncer (localizado, localizado avançado, metastático e reincidente), monitorar sua progressão além de prever a resposta do paciente ao tratamento proposto diante das características avaliadas. Dessa forma, a conduta médica pode ser individualizada e direcionada às necessidades específicas de cada paciente (Dathathri, *et al,* 2022).

1.6 Biomarcadores Moleculares e Aptâmeros: Inovações no Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Próstata.

Os biomarcadores moleculares e celulares se configuram como elementos essenciais para o desenvolvimento de novas plataformas para o diagnóstico, monitoramento e tratamento do CaP**.** Eles são indicadores objetivos e mensuráveis que refletem processos biológicos normais ou anormais, condições fisiológicas ou patológicas, ou respostas a uma intervenção terapêutica. Os

biomarcadores podem estar presentes em diversos materiais biológicos, como sangue, urina, saliva, tecido, dentre outros (Varaprasad, *et al,* 2023) (Bethesda, 2001). Pesquisadores não se limitam somente à busca por novos biomarcadores, mas também exploram moléculas que possam se ligar a eles, para que sejam desenvolvidas plataformas que possibilitem o diagnóstico precoce do CaP, afim de minimizar tanto os impactos negativos à saúde dos pacientes, quanto as taxas de morbidade e mortalidade (Wasim, *et al,* 2022), (Kouspou, *et al,* 2020). Ao buscar moléculas que possam identificar os biomarcadores do CaP, é necessário que sejam de alta capacidade de identificação, afinidade, segurança, facilidade e baixo custo na síntese, versatilidade química e estáveis. Além disso, precisam ser acessíveis ao desenvolvimento em larga escala visando aplicações clínicas. Sob essas circunstâncias os aptâmeros são moléculas inovadoras que se adequam a todas essas expectativas (Hu, *et al,* 2022). Os aptâmeros são oligonucleotídeos caracterizados por pequenas sequências de fita simples tanto de RNA (ssRNA) quanto de DNA (ssDNA), que se dobram em estruturas tridimensionais únicas e se ligam de forma específica a um alvo molecular, com alta afinidade e seletividade. Eles podem se ligar a uma ampla gama de alvos, incluindo proteínas, peptídeos, lipídeos, carboidratos, células e até mesmo vírus. Os aptâmeros são biomarcadores promissores, uma vez que apresentam baixa imunogenicidade e podem ser modificados quimicamente. Além disso, existe a possibilidade de que possam se internalizar nas células, o que abre perspectivas de aplicação em diversas áreas, como ferramentas para diagnóstico, prognóstico, monitoramento, terapia do câncer de próstata, além de serem potenciais moléculas-alvo em biossensores. (Wu, *et al,* 2022).

Além disso, os aptâmeros podem ser considerados análogos aos anticorpos devido ao reconhecimento específico, estrutura tridimensional, diversidade molecular, alta sensibilidade e versatilidade (Alhamhoom, et al, 2022). No entanto, os anticorpos comerciais podem agir de forma imunogênica, sofrer

mutações, são limitados para realizar o Direcionamento de Antígenos Associados a Tumores (TAAs), podem ocasionar reatividade cruzada, possuem meia-vida curta, penetração celular limitada, além de terem um alto custo de síntese. Devido a essas limitações, os aptâmeros se sobressaem em comparação aos anticorpos comerciais. (Alhamhoom, *et al*, 2022) (Maimaitiyiming, *et al*, 2019) (Nimjee, *et al*, 2017).

1.7 Técnicas SELEX, Cell-SELEX e 3D cell SELEX: Evolução, Aplicações e Avanços no Desenvolvimento de Aptâmeros para o CaP.

Os aptâmeros primordialmente são selecionados através da técnica *in vitro* de SELEX (Systematic Evolution of Ligants by Exponential Enrichment) descrita por Ellington e Szostak em (1990) publicada na revista Nature, com o título: “In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands” e por Tuerk e Gold publicado no mesmo ano na revista Science com o título de “Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase”. Ambos os artigos descrevem a seleção de moléculas de ssRNA para fins de ligação específica. O primeiro artigo citado trata de forma mais ampla a seleção, demonstrando a versatilidade da técnica de SELEX para diversos tipos de ligantes. Já o segundo foca em uma enzima específica que seja capaz de se ligar na DNA polimerase T4 e detalha todo o processo do SELEX.

O SELEX convencional consiste em três etapas: seleção, subdivisão e amplificação (figura 2). A seleção ocorre a partir de uma biblioteca de oligonucleotídeos que é incubada com a molécula alvo para selecionar os aptâmeros mais específicos. Após a incubação vem a subdivisão, que separa as sequências que não se ligaram ao alvo das que se ligaram. Em seguida vem a amplificação das sequências que permaneceram ligadas ao alvo, esse processo pode ocorrer por PCR (SELEX de DNA) ou PCR de transcrição reversa (SELEX de RNA), ambas as técnicas utilizam o mesmo processo iterativo de seleção e

amplificação para a obtenção de aptâmeros de alta afinidade ao alvo, o que muda entre elas é a molécula inicial, que pode ser tanto de DNA quanto de RNA. Os produtos dessa PCR formam um novo subconjunto, que são utilizados novamente para a próxima rodada de seleção. Esse processo ocorre em média de 10 a 20 vezes até obter somente as sequências que mantiveram ligadas ao alvo. Por fim, essas sequências passam pelo sequenciamento para que possam ser realizados testes que avaliam sua capacidade de ligação. Apesar do SELEX ser uma ferramenta de grande potencial para a seleção de aptâmeros, o processo é demorado, desafiador e com taxas de sucesso variáveis. Devido a isso, outras variantes dessa técnica foram desenvolvidas a fim de expandir suas aplicações e solucionar suas limitações, como por exemplo o cell SELEX (Zhuo, *et al*, 2017), (Bing, *et al,* 2019).

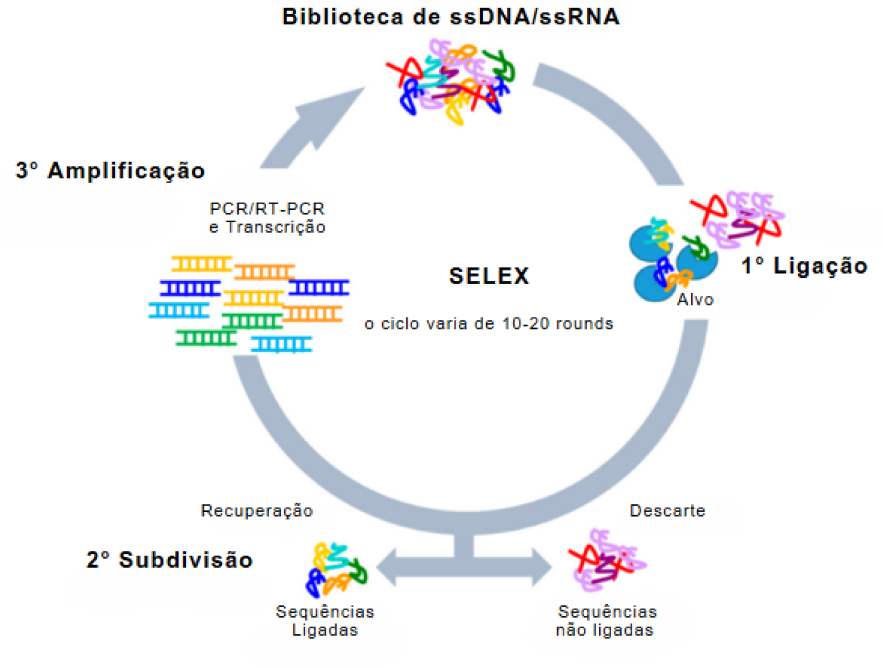


Figura 2[5]: Ilustração esquemática do processo SELEX para a biblioteca de DNA/RNA: O procedimento envolve repetidos ciclos de:1°Incubação da biblioteca com os alvos (ligação); 2° Remoção de sequências não ligadas e recuperação dos oligonucleótideos ligados (particionamento); 3° Amplificação das sequências ligadas por PCR (para biblioteca de DNA) ou RT-PCR e transcrição (para biblioteca de RNA) - Imagem adaptada (Catuogno; Esposito, 2017).[6]

O cell-SELEX baseia-se na seleção de aptâmeros com alta especificidade para células, utilizando-as como alvo. Essa metodologia explora as diferenças moleculares entre duas ou mais linhagens celulares para gerar aptâmeros que reconhecem exclusivamente cada uma delas. Através do cell SELEX é possível identificar um painel de aptâmeros que se ligam de forma especifica à linhagem celular escolhida. Durante o processo de enriquecimento, que seleciona e amplifica as sequências de aptâmeros com maior afinidade pelo alvo, a utilização de células vivas garante a preservação das características naturais dos alvos presentes na membrana celular. Essa estratégia assegura que as sequências

[5] Ilustração esquemática do processo SELEX para a biblioteca de ssDNA/ssRNA com modificações na ilustração, e legenda retirada do artigo (Catuogno; Esposito, 2017) disponível em: https://www.mdpi.com/2227-9059/5/3/49

obtidas mantenham sua afinidade e especificidade para este tipo de aplicação (Wang, *et al*, 2014), (Chen, *et al,* 2018), (Zhuo, *et al*, 2017).

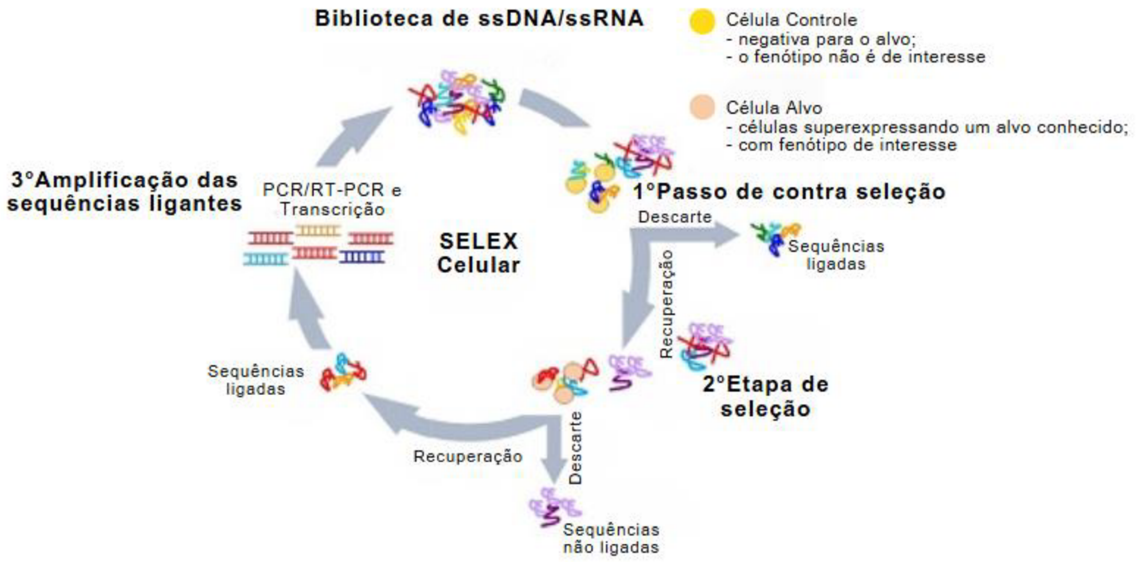


Figura 3. **1º Passo de contra seleção:** célula Controle (amarela): estas não expressam o alvo de interesse. As sequências que se ligam a estas células são descartadas. Recuperação: as sequências que não se ligaram às células controlem são recuperadas para a próxima etapa. **2° Etapa de seleção:** célula Alvo (laranja): estas superexpressam o alvo de interesse ou têm o fenótipo de interesse. Ligação e Recuperação: As sequências que se ligam às células alvo são recuperadas. Sequências não ligadas são descartadas. **3°Amplificação das sequências ligantes:** PCR/RT-PCR e Transcrição: as sequências ligantes recuperadas são amplificadas por PCR (no caso de ssDNA) ou RT-PCR (no caso de ssRNA), seguidas por transcrição se necessário, para gerar uma nova biblioteca enriquecida em sequências ligantes. O ciclo de seleção e amplificação é repetido várias vezes para aumentar a afinidade e especificidade das sequências ligantes para o alvo celular.[7]

O 3D cell-SELEX, é uma versão aprimorada do cell-SELEX, onde ambos compartilham o mesmo princípio básico de selecionar aptamêros usando células

[7] Ilustração esquemática do processo SELEX celular para biblioteca de ssDNA/ssRNA. Ilustração modificada e legenda de autoria própria. Disponivel em : Ilustração esquemática do processo SELEX para a biblioteca de DNA/RNA com modificações retirada do artigo: https://www.mdpi.com/2227-9059/5/3/49

inteiras como alvos. No entanto o 3D cell-SELEX permite que as células se organizem e interajam de forma mais natural, como no corpo humano, durante a seleção de aptâmeros. O grupo de estudos e pesquisa em marcadores moleculares (GEP-MMol) da Universidade Federal de Uberlândia empregou essa técnica para obter e caracterizar os aptâmeros com maior afinidade para o CaP (Souza, *et al,* 2016) (figura 4). Os modelos tridimensionais podem ser feitos através da metodologia de levitação magnética (MLM) (Timm, *et al*, 2013), (Haisler, *et al*, 2013), (Souza, *et al,* 2016). A cultura 3D em esferoides mimetiza a organização espacial e as interações celulares do corpo humano. Isso é possível devido à levitação celular, que facilita a interação entre as células e garante contato homogêneo com oxigênio e nutrientes no meio de cultura. Ademais, essa técnica permite avaliar os componentes da matriz extracelular (EMC), que, *in vitro,* são produzidas por esferoides (agregados celulares tridimensionais formados espontaneamente, sem *scaffolds*-estruturas suporte) e *in vivo* por tecidos e órgãos, essa EMC não é possível analisar em culturas 2D. Além disso, o 3D cell- SELEX simula o comportamento de drogas em doenças como o câncer com maior fidelidade (Souza*, et al*, 2016), (Souza, *et al*, 2010).

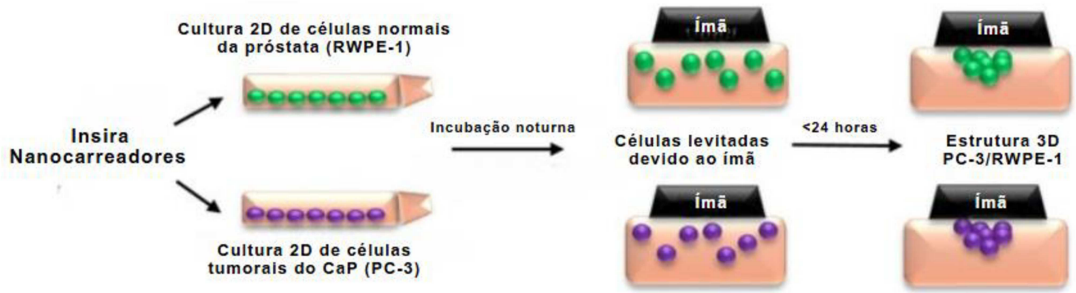


Figura 4[8] Cultivo celular em 2D e 3D utilizando nanopartículas magnéticas (Souza *et al* 2016).

Souza *et al* (2016) desenvolveram uma biblioteca de ssRNA a partir de DNA extraído de amostras de sangue de pacientes com câncer de próstata (CaP) com o objetivo de identificar aptâmeros específicos para a doença. A biblioteca foi transcrita utilizando o kit T7 RiboMax™ e as sequências de RNA resultantes foram incubadas com células cultivadas em cultura 3D. Para a seleção dos aptâmeros de alta afinidade pelas células do CaP, foi necessário um processo de 9 ciclos, composto por seleção negativa, quando a biblioteca de RNA foi incubada com a linhagem celular normal da próstata RWPE-1, as sequências ligantes dessa linhagem foram descartadas, e as não ligantes foram incubadas com a linhagem celular tumoral da próstata PC-3 (seleção positiva). Em seguida, as sequências ligadas à linhagem PC-3 a cada ciclo passavam por amplificação através da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês Polymerase Chain Reaction) e utilizadas nos ciclos seguinte, enquanto as sequências que não se ligavam eram descartadas. Após 9 ciclos de seleção, as sequências que se mantiveram ligadas à linhagem PC-3 foram clonadas, sequenciadas e analisadas (figura 5). Entre elas, os aptâmeros A6 e A11 foram selecionados para novos estudos devido às suas características, tamanho entre 20 e 50 nucleotídeos, baixa energia livre de Gibbs (conceito fundamental em termodinâmica, utilizada para prever a espontaneidade de reações químicas e processos em sistemas fechados à temperatura e pressão constantes) e alta especificidade para proteínas da membrana das células do CaP. Ilustração do processo de 3D cell-SELEX para obtenção dos oligonucletideos A6 e A11

[8] Imagem tirada do artigo (Souza *et al* 2016) traduzida para o português.

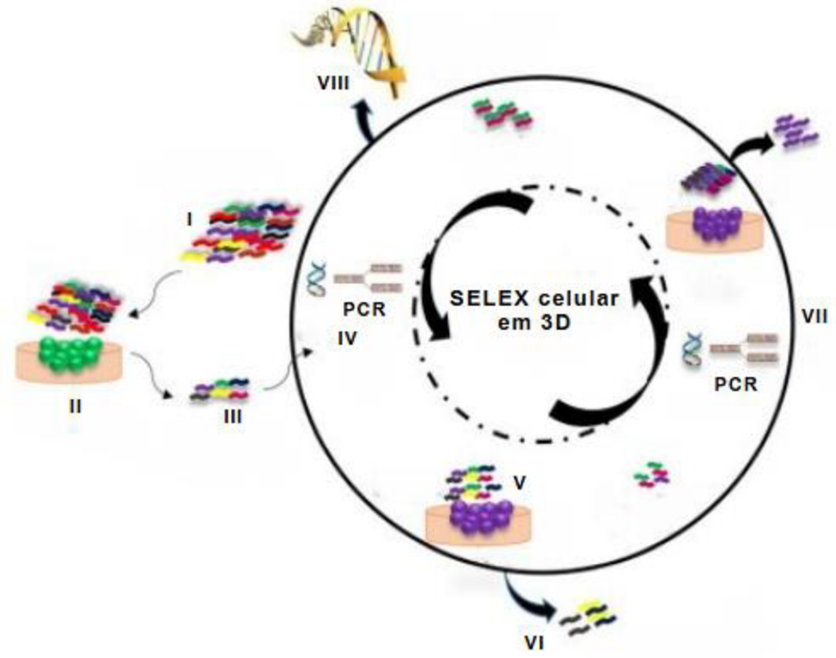


Figura 5[9] **-** Seleção de aptâmeros ligantes à células tumorais da próstata utilizando a técnica Cell-Selex 3D. **I-** Confecção da biblioteca de RNA; **II-** Seleção das sequências que não se ligaram na linhagem RWPE-1 (células normais da próstata); **III-** Amplificação por PCR das sequências não ligante (**IV**); **V-** Incubação da biblioteca de RNA com a linhagem celular alvo PC-3 (células tumorais da próstata) ; **VI**- As sequências que não se ligaram ao alvo foram removidas; **VII-** As ligantes, amplificadas por PCR; **VIII**- Após realizar o ciclo ter sido realizado 8 vezes, as sequências ligantes passaram por clonagem e sequenciamento. (Souza, *et al*, 2016)

1.8 Comparação entre ssRNA e ssDNA em Aptâmeros: vantagens, desafios e evolução dos protocolos SELEX.

Os aptâmeros poderem ser tanto de ssRNA quanto de ssDNA, no entanto inicialmente os protocolos de SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) tinham com mais frequência suas bibliotecas criadas de ssRNA como material de partida. Essa escolha ocorria devido a crença de que o ssRNA, em virtude a sua flexibilidade estrutural, apresentaria maior probabilidade de se dobrar em conformações funcionais, gerando ligantes de alta afinidade

[9] Imagem modificada, com legenda traduzida e adaptada do artigo (Souza, *et al*, 2016)

(Cheng, *et al*, 2001), (Wang, *et al,* 2018). No entanto, sequências de ssRNA podem ocasionar efeitos colaterais significativos. Devido a RNA não codificantes que podem interferir na regulação da expressão gênica, também são facilmente degradadas por ribonucleases (RNases), RNases extracelulares, exoenzimas dentre outras, representando prejuízos à saúde humana, tais como a perda de função de moléculas essenciais, ativação de respostas inflamatórias, disfunções celulares e assim por diante (Campos-Fernandez, *et al*, 2020) (Houseley, *et a*l, 2009).

Os estudos de Ulriche et al. (2006) e Adler et al. (2008) mostram que os aptâmeros de ssDNA se destacam em relação aos de ssRNA devido à sua maior estabilidade química e biológica, o que os torna mais resistentes à degradação e mais adequados para uso em ambientes complexos, como o corpo humano. A maior estabilidade do ssDNA em relação ao ssRNA pode ser explicada por diversos fatores, além da ausência do grupo hidroxila (OH) na posição 2' do açúcar desoxirribose.

A ausência do grupo hidroxila na posição 2' do açúcar desoxirribose no ssDNA, em comparação com a ribose presente no RNA, faz com que a molécula de ssDNA seja menos suscetível à clivagem hidrolítica. No ssRNA, o grupo hidroxila adicional no carbono 2' facilita a hidrólise da ligação fosfodiéster, tornando a molécula de RNA mais vulnerável à degradação espontânea em condições fisiológicas. Essa ausência no ssDNA não apenas aumenta sua resistência à hidrólise, mas também reduz a susceptibilidade à ação de nucleases, enzimas que degradam ácidos nucleicos.

Além disso, o ssDNA tem uma estrutura química mais simples e compacta, o que contribui para uma maior resistência à degradação por fatores ambientais, como pH extremo e variações de temperatura. Esses fatores, combinados com a síntese mais simples e de menor custo, tornam o ssDNA uma opção mais eficiente e com maior tempo de vida útil em comparação com o ssRNA, sendo

especialmente útil para aplicações terapêuticas e diagnósticas em ambientes complexos como o corpo humano.

1.9 Modificação de Aptâmeros de ssRNA para ssDNA: Avanços em Estabilidade e Aplicações Terapêuticas.

Reconhecendo a relevância da estabilidade para o bom desempenho dos aptâmeros de ssRNA, estudos investigam distintas técnicas, incluindo modificações químicas e hibridização com sequências de DNA, para aperfeiçoar suas propriedades e ampliar suas aplicações (Amero, *et al*, 2021), (Navien, *et al*, 2020), (Campos-Fernandez, *et al*, 2020). Em contrapartida, outras pesquisas mostram a possibilidade de modificar por completo a estrutura de ssRNA para ssDNA. O estudo de Campos-Fernandez et al, (2024) analisou a sequência A4 de ssRNA selecionada por 3D cell-SELEX do trabalho de Souza *et al,* (2006), após modificação do A4 de ssRNA para D4 de ssDNA, além de realizar diversas análises *in silico* e *in vitro* que corroboram a maior eficiência e estabilidade do aptâmero D4 em relação ao A4.

No estudo de Jeddi *et al*, (2017), foi proposto uma metodologia de modificação dos ácidos nucleicos, (ssRNA para ssDNA), pois existe uma carência de softwares dedicado à predição de estruturas 3D de aptâmeros de ssDNA, em vista a gama de ferramentas para modelagens de ssRNA em 3D. Para a modelagem de ssDNA em 3D ele precisou fazer uma combinação de softwares de modelagem, como mostra a figura 6 abaixo, para alterar a sequência, possibilitando gerar a estrutura conformacional tridimensional para aptâmeros de ssDNA. Além disso, eles realizaram análises de dinâmica molecular (estudo que avalia o comportamento físico de átomos e moléculas em um sistema fechado) sob condições mimetizadoras do ambiente real do alvo, usando diferentes temperaturas, solutos, pressão, dentre outros, para comparar seu comportamento e resistência. Jeddi *et al*, (2017) utilizaram como

base modelos 3D de ssRNA visando construir estruturas 3D de ssDNA com alta fidelidade. Essa técnica inovadora oferece uma alternativa eficiente e precisa para a modelagem de ssDNA, expandindo as ferramentas disponíveis para o estudo dessa biomolécula crucial.

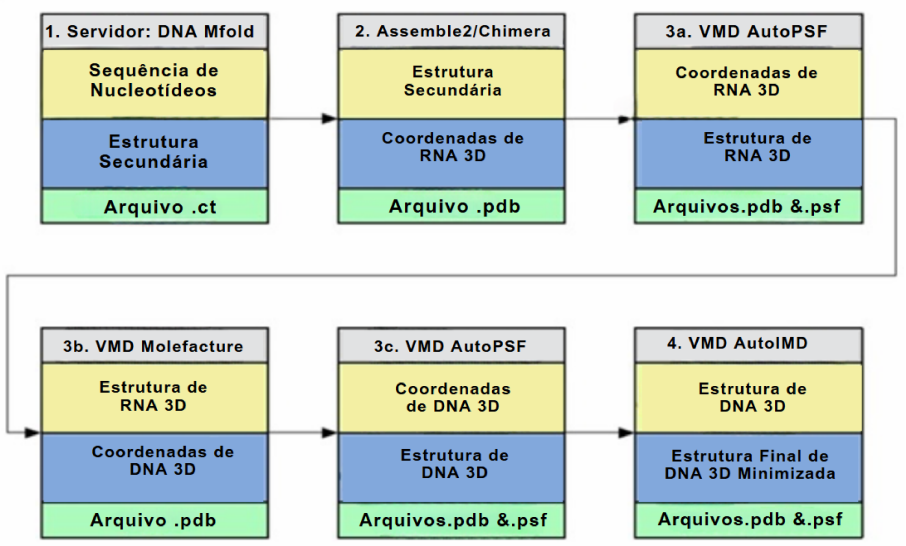


Figura 6[10]- **1-Construção da estrutura secundária do ssDNA**: previsão das estruturas secundárias de sequências de ssDNA usando o servidor web mfold, baseado em técnicas de minimização de energia livre. **2- Construção dos modelos equivalentes de ssRNA em 3D e refinamento das estruturas**: usando as estruturas secundárias previstas, é gerado os modelos em 3D equivalentes de ssRNA com Assemble2/Chimera. As estruturas foram refinadas em 100 iterações para remover deficiências geométricas e otimizar parâmetros estruturais. **3- Transformação dos modelos 3D de ssRNA em estruturas 3D de ssDNA**: Importação dos modelos refinados de ssRNA 3D para o VMD, onde átomos de hidrogênio foram adicionados e os ssRNAs modificados em ssDNA, substituindo uracila por timina e ribose por desoxirribose. O resultado inclui arquivos pdb e psf. **4- Refinamento das estruturas 3D finais de ssDNA**: refinamento adicional das estruturas 3D de ssDNA usando VMD AutoIMD através de 10.000 iterações de minimização de energia. O resultado final inclui arquivos de coordenadas (.pdb) e informações de ligação (.psf) para análises adicionais de simulação de dinâmica molecular.

Dessa forma, propusemos a modificação dos aptâmeros A6 e A11 de ssRNA para ssDNA por meio de softwares de modelagem baseado nos resultados de Campos-Fernandez *et al* (2024), que reafirmam a melhor

[10] Imagem e legenda traduzidas com adaptações (Jeddi *et al.*,2017).

estabilidade e eficiência de aptâmeros de ssDNA com resultados promissores em aplicações clínicas, bem como nos estudos de Jeddi *et al*, (2017).

Com o objetivo de comparar a estabilidade dos modelos de ssDNA com ssRNA, as estruturas foram submetidas à dinâmica molecular (MD), uma metodologia computacional avançada que permite analisar minuciosamente a estrutura e o comportamento de biomoléculas em solução, incluindo DNA e RNA.

A MD baseia-se em campos de força como o CHARMM27, que inclui parâmetros para descrever as energias associadas a diversas interações, como ligações covalentes, ângulos de ligação, torções e interações não ligantes (Van der Waals e eletrostáticas). Isso permite simular sequências de DNA e RNA, analisando suas propriedades estruturais, dinâmicas e de hidratação, incluindo ângulos diedros, conformações de açúcar e distribuições de parâmetros helicoidais (MacKerell; Banavali, 2000).

A MD é uma ferramenta essencial para a análise detalhada da estrutura e dinâmica do DNA e RNA, possibilitando uma compreensão mais profunda de suas funções biológicas e interações moleculares. Para avaliar as mudanças na conformação, foi aplicado o cálculo Root-Mean-Square Deviation (RMSD), que mensura a magnitude das alterações na estrutura ao longo do tempo. Além disso, foram avaliadas as ligações de hidrogênio (H-BOND) formadas internamente nos ssRNAs e ssDNAs.

A combinação da modificação dos aptâmeros com os estudos de dinâmica molecular traz resultados que direcionam futuros estudos de bancada como *in vitro,* visando concretizar sua aplicabilidade de ferramentas auxiliares em plataformas diagnósticas ou abordagens terapêuticas contra o CaP.

2.REFERÊNCIAS

ALHAMHOOM, Y; AS SOBEAI, H; ALSANEA, S; ALHOSHANI, A. Aptamer-based therapy for targeting key mediators of cancer metastasis (Review). in **International of Oncology,** vol. 60, pp. 1-15. 2022. https://doi.org/10.3892/ijo.2022.5355

AMERO, P; LOKESH, G; CHAUDHARI, R; CARDENAS-ZUNIGA, R; SCHUBERT, T; ATTIAS, Y; MONTALVO-GONZALES, E; ELSAYED, A. M; IVAN, C; WANG, Z; CRISTINI, V; FRANCISCIS, V; ZHANG, S; VOLK.D.E.; MITRA, R; RODRIGUEZ-AGUAYO, C; SOOD, A. K; LOPEZ-BERESTEIN, G. Conversion of RNA Aptamer into Modified DNA Aptamers Provides for Prolonged Stability and Enhanced Antitumor Activity. in **Journal of the American Chemical Society**, vol. 143, pp. 7655-7670. 2021. https://doi.org/10.1021/jacs.9b10460

BANCROFT, E. K; RAGHALLAIGH, H.N; PAGE, E. C; EELES, R. A. Updates in Prostate Cancer Research and Screening in Men at Genetically Higher Risk. in **Current Genetic Medicine Reports**, vol.9, pp.47-58, 2021. https://doi.org/10.1007/s40142-021-00202-5

BERGENGREN, O. PEKALA, K. R; MATSOUKAS, K; FAINBERG, J; MUNGOVAN, S. F; BRATT, O; BRAY, F; BRAWLEY, O; LUCKENBAUGH, A. N; MUCCI, L; MORGAN, T. M; CARLSSON, S. V; 2022 Update on Prostate Cancer Epidemiology and Risk Factors—A Systematic Review. in **European urology**, vol. 84, pp. 191-206, 2023. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2023.04.021

BRING, T; ZHANG, N; SHANGGUAN, D. Cell-SELEX, an Effective Way to the Discovery of Biomarkers and Unexpected Molecular Events. in **Advanced Biosystems,** p. 1900193 (13 pgs), 2019. https://doi.org/10.1002/adbi.201900193.

BRAY, F; LAVERSANNE, M; SUNG, H; FERLAY, J; SIEGEL, R. L; SOERJOMATARAM, I; JEMAL, A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **in A Cancer Journal for Clinicians,** vol. 74, pp. 229-263, 2024. https://doi.org/10.3322/caac.21834

BREYER, J.P; AVRITT, T. G; MCREYNOLDS, K. M; DUPONT, W. D; SMITH, J. R. Confirmation of the HOXB13 G84E Germline Mutation in Familial Prostate Cancer. in **Cancer Epidemiology, Biomakers & Prevention**, vol. 21, pp. 1348-1353, 2012. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-0495

CAMPOS-FERNANDES, E; BARCELOS, L. S; SOUZA, A. G; GOULART, L. R; ALONSO-GOULART, V. Post-SELEX Optimization and Characterization of a Prostate Cancer Cell-Specific Aptamer for Diagnosis. in **ACS Omega,** vol. 5, pp. 3533-3541, 2020. https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03855

CHEN, H. W; MEDLEY, C. D; SEFAH, K; TANG, Z; MENG, L; SMITH, J. E; TAN, W. Molecular Recognition of Small-Cell Lung Cancer Cells Using Aptamers. in **ChemMedChem**, vol. 3, pp. 991-1001, 2008. https://doi.org/10.1002/cmdc.200800030

CHENG, A. Design of RNA-binding proteins and ligands. in. Current Opinion in **Structural Biology**, vol. 11, pp. 478-484, 2001. https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00236-0

DATHATRI, E; ISEBIA, K. T; ABALI, F; LOLKEMA, M. P; MARTENS, J. W. M; TERSTAPEN, L. W. M. M; BANSAL, R. Liquid Biopsy Based Circulating Biomarkers in **Metastatic Prostate Cancer. in Frontiers in Oncology**, vol. 12, pp. 863472, 2022. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.863472

ELINGTON, A. D; SZOSTAK, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. in **NATURE**, vol. 346, pp. 818-822, 1990.

GORINGER, H; ADLER, A; FORSTER, N; HOMANN, M. Post-SELEX Chemical Optimization of a Trypanosome-Specific RNA Aptamer. in **Combinations Chemistry & High Troughput Screening**, vol. 11, pp. 16-23, 2008. https://doi.org/10.2174/138620708783398331

ARTHUR, J; ATKINSON, JR, MD, WARREN G. MAGNUSON CLINICAL CENTER, NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, BETHESDA, MD; WAYNE A, et. al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. in **Clinical Pharmacology e Therapeutics,** vol. 69, pp. 89-95, 2001. https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989

HAISLER, W. L; TIMM, D. M; GAGE, J. A; TSENG, H; KILLIAN, T. C; SOUZA, G. R. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. in **Nature Protocols**, vol. 8, pp. 1940-1949, 2013. https://doi.org/10.1038/nprot.2013.125

HOUSELEY, J. TOLLERVERY, D; The Many Pathways of RNA Degradation. in **Cell**, vol. 136, pp. 763-776, 2009. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.019

HU, X; ZHANG, D; ZENG, Z; HUANG, L; LIN, X; HONG, S. Aptamer-Based Probes for Cancer Diagnostics and Treatment. in **Life,** vol. 12, p. 1937, 2022. https://doi.org/10.3390/life12111937

ITTMAN, M. Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate. in **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, vol. 8, p. a03046, 2018. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030346

JEDDI, I; SAIZ, L. Three-dimensional modeling of single stranded DNA hairpins for aptamer-based biosensors. in **Scientific Reports,** vol. 7, p. 1178, 2017. https://doi.org/10.1038/s41598-017-01348-5

KOUSPOU,M. M; FONG, J. E; BREW, N; HSIAO, S, T, F; DAVIDSON, S, L; CHOYKE, P. L; CRISPINO, T; JAIN, S; JENSTER, G. W; KNUDSEN, B. S; MILLAR, J. L; MITTMANN, N; RYAN, C. J; TOMBAL, B; BUZZA, M. The Movember Prostate Cancer Landscape Analysis: an assessment of unmet research needs. in **Nature Reviews Urology,** vol. 17, pp. 499-512, 2020. https://doi.org/10.1038/s41585-020-0349-1

MACKERELL, A. D.; BANAVALI, N. K. All-Atom Empirical Force Field for Nucleic Acids: II. Application to Molecular Dynamics Simulations of DNA and RNA in Solution. **Journal of Computational Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 105–120, 2000. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(20000130)21:2<105::AID-JCC3>3.0.CO;2-P

MAIMAITIYIMING, Y; HONG, F. YANG, C; NARANMANDURA, H. Novel insights into the role of aptamers in the fight against câncer. in **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, vol. 145, pp. 797-810, 2019. https://doi.org/10.1007/s00432-019-02882-7

NAVIEN, T. N; THEVENDRAN, R; HAMDANI, H. Y; TANG, T; CITARTAN, M. In silico molecular docking in **DNA aptamer development. in Biochimie,** v. 180, pp. 54-67, 2021. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.10.005

NIMJEE, S; WHITE, R. R; BECKER, R. C; SULLENGER, B. A. Aptamers as Therapeutics. in **Annu Rev Pharmacol Toxicol,** vol. 57, pp. 61-79, 2018. http://doi.org/10.1146/annurevpharmtox-010716-104558

PRENSNER, J. R; RUBIN, M. A; WEI, J. T; CHINNAIYAN, A. M. Beyond PSA: The Next Generation of Prostate Cancer Biomarkers. in **Science Translation Medicine**, vol. 4, 23 pgs. 2013. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003180

REBELLO, R. J; OING, C; KNUDSEN, K. E; LOEB, S; JOHNSON, D. C; REITER, R. E; GILLESSEN, S; VAN DER KWAST, T; BRISTOW, R. G. Prostate câncer. in **Nature Reviews Disease Primers**, vol. 7, p.27, 2021. https://doi.org/10.1038/s41572-020-00243-0

SALMI, F; MAACHI, F; TAZZITE, A; ABOUTAIB, R; FEKKAK, J; AZEDDOUG, H; JOUHADI, H; Next-generation sequencing of BRCA1 and BRCA2 genes in Moroccan prostate cancer patients with positive family history. in **PLoS ONE**, vol. 16, p. e0254101, 2021. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254101

SEKHOACHA, M.; RIET, K.; MOTLOUNG, P.; GUMENKU, L.; ADEGOKE, A.; MASHELE, S. Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. in **Molecules**, vol. 27, p. 5730, 2022. https://doi.org/10.3390/molecules27175730

SIEGEL, R. L; MILLER, K. D; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. in **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, vol. 70, pp. 7-30, 2020. https://doi.org/10.3322/caac.21590

SIERRA, J; MARRUGO-RAMÍREZ, J; RODRIGUEZ-TRUJILLO, R; MIR, M; SAMITIER, J. Sensor-Integrated Microfluidic Approaches for Liquid Biopsies Applications in **Early Detection of Cancer. in Sensors**, vol. 20, p. 1317, 2020. https://doi.org/10.3390/s20051317

SOUZA, A. G; MARANGONI, K; FUJIMURA, P. T; ALVES, P. T; SILVIA, M. J; BASTOS, V. A. F; GOULART, L. R; GOULART, V. A. 3D Cell-SELEX: Development of RNA aptamers as molecular probes for PC-3 tumor cell line. in **Experimental Cell Research,** vol. 341, p. 147-156, 2016. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.01.015

SOUZA, G. R; MOLINA, J. R; RAPHAEL, R. M; OZAWA, M. G; STARK, D. J; LEVIN, C. S; BRONK, L. F; ANANTA, J, S; MANDELIN, J; GEORGESCU, M; BRANKSON, J. A; GELOVANI, J. G; KILIAN, T. C; ARAP, W; PASQUALINI, R. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. in **Nature Nanotechnology,** vol. 5, pp. 291-296, 2010. https://doi.org/10.1038/nnano.2010.23

TAKESHIMA, H; USHIJIMA, T. Accumulation of genetic and epigenetic alterations in **Normal cells and cancer risk**. vol. 3, P.7, 2019. https://doi.org/10.1038/s41698-019-0079-0

TIMM, D. M; CHEN, J; SING, D; GAGE, J. A; HAISLER, W. L; NEELEY, S. K; RAPHAEL, R. M; DEHGHANI, M; ROSENBLATT, K. P; KILIAN, T. C; TSENG, H; SOUZA, G. R.; A high-throughput three-dimensional cell migration assay for toxicity screening with mobile device-based macroscopic image analysis. in **Scientific Reports**, vol. 3, p. 3000. 2013. https://doi.org/10.1038/srep03000

TUERK, C; GOLD, L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. in **Science,** vol. 249. pp. 505-510, 1990. https://doi.org/10.1126/science.2200121

ULRICH, H; TRUJILLO, C; NERY, A; ALVES, J; MAJUMDER, P; RESENDE, R; MARTINS, A. DNA and RNA Aptamers: From Tools for Basic Research Towards Therapeutic Applications. in Combinatorial Chemistry & High **Throughput Screening,** vol. 9, pp. 619-632, 2006. https://doi.org/10.2174/138620706778249695

VARAPRASAD, G. L; GUPTA, V. K; PRASAD, K; KIM, E; TEJ, M. B; MOHANTY, P. VERMA, H. K; RAJU, G. S. R; BHASKAR, L; HUH, Y. S. Recent advances and future perspectives in the therapeutics of prostate câncer. in **Experimental Hematology & Oncology,** vol. 12, p. 80, 2023. https://doi.org/10.1186/s40164-023-00444-9

VERZE, P; CAI, T; LORENZETTI, S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. in **Nature Reviews Urology,** vol. 13, pp. 379-386, 2016. https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.89

WANG, T; CHEN, C; LARCHER, L. M; BARRERO, R. A; VEEDU, R. N. Three decades of nucleic acid aptamer technologies: Lessons learned, progress and opportunities on aptamer development. in **Biotechnology Advances**. vol. 37, pp. 28-50, 2019. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.001

WANG, Y; LUO, Y; BING, T; CHEN, Z; LU, M; ZHANG, N; SHANGGUAN, D; GOA, X. DNA Aptamer Evolved by Cell-SELEX for Recognition of Prostate Cancer. in **PloS ONE**, vol. 9, p. e100243, 2014. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100243

WASIM, S; LEE, S; KIM, J. Complexities of Prostate Cancer. in **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 23, p. 14257, 2022. https://doi.org/10.3390/ijms232214257

WU, L; ZHANG, Y; WANG, Z; ZHANG, Y; ZOU, J; QIU, L. Aptamer-Based Cancer Cell Analysis and Treatment. in **ChemistryOpen**, vol. 11, p. e202200141, 2022. https://doi.org/10.1002/open.202200141

ZUO, Z; YU, Y; WANG, M; LI, J; ZHANG, Z; LIU, J; WU, X; LU, A; ZHANG, G; ZHANG, B. Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in **Biomedicine. in International Journal of Molecular Sciences**, vol. 18, p. 2142, 2017. https://doi.org/10.3390/ijms18102142

CAPÍTULO II: A Comparative Study of ssRNA and ssDNA Aptamers for Prostate Cancer theranostics.

RESUMO

Os aptâmeros de RNA A6 e A11 apresentam alta especificidade para células tumorais de câncer de próstata (CaP), especialmente a linhagem PC-3. No entanto, a instabilidade e os efeitos colaterais limitam seu uso clínico. Este estudo visa desenvolver aptâmeros de ssDNA modificados (LN-A6 e LN-A11) com maior estabilidade e potencial terapêutico. Os aptâmeros de ssRNA A6 e A11 foram modificados *in silico* com o intuito de gerar aptâmeros de ssDNA (LN-A6 e LN-A11) que desprovidos do grupo hidroxila 2'apresentam naturalmente resistência à degradação por RNases. A similaridade estrutural entre os aptâmeros originais (ssRNA) e modificados (ssDNA) foram analisados visualmente e simulações de dinâmica molecular (MD) foram conduzidas a 100 ns e um duas diferentes temperaturas, 300K e 310K. A estabilidade dos complexos submetidos a dinâmica foi analisada por meio do número interno de ligações de hidrogênio (H-bond) e *root mean square deviation* (RMSD) das estruturas ao longo da dinâmica. Além disso, foi medida a afinidade e a força de ligação dos aptâmeros as células PC-3 pela análise de constante de dissociação (Kd) por citometria de fluxo em diferentes concentrações. Os resultados demonstram que a modificação dos aptâmeros de ssRNA para ssDNA resultou em moléculas com alta similaridade estrutural, maior afinidade e força de ligação às células PC-3, e maior estabilidade. O LN-A6 se destaca como um candidato promissor para pesquisas futuras visando o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas e terapêuticas inovadoras para o CaP.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer de próstata, aptâmeros ssRNA e ssDNA, bioinformática, estabilidade, plataformas diagnósticas e terapêuticas.

ABSTRACT

The ssRNA aptamers A6 and A11 exhibit high specificity for prostate cancer (CaP) tumor cells, particularly the PC-3 cell line. However, their clinical application is limited by instability and side effects. This study aims to develop modified ssDNA aptamers (LN-A6 and LN-A11) with enhanced stability and therapeutic potential. The ssRNA aptamers A6 and A11 were modified in silico to generate ssDNA aptamers (LN-A6 and LN-A11) that naturally resist degradation by RNases due to the absence of the 2' hydroxyl group. The structural similarity between the original (ssRNA) and modified (ssDNA) aptamers was visually analyzed, and molecular dynamics (MD) simulations were conducted for 100 ns at two different temperatures, 300K and 310K. The stability of the complexes during dynamics was assessed through the internal number of hydrogen bonds (H-bond) and root mean square deviation (RMSD) of the structures throughout the simulations. Additionally, the affinity and binding strength of the aptamers to PC-3 cells were measured by dissociation constant (KD) analysis using flow cytometry at different concentrations. The results demonstrate that the modification from ssRNA to ssDNA aptamers resulted in molecules with high structural similarity, greater affinity and binding strength to PC-3 cells, and increased stability. LN-A6 stands out as a promising candidate for future research aimed at developing innovative diagnostic and therapeutic tools for CaP.

KEYWORDS:

Prostate cancer, ssRNA and ssDNA aptamers, bioinformatics, stability, diagnostic and therapeutic platforms.

1. INTRODUCTION

Prostate cancer (CaP) constitutes a global public health issue, with high incidence and mortality rates, particularly among men aged 65 and older. In 2020, the WHO reported 1,414,259 cases and 375,304 deaths due to CaP worldwide, with projections indicating an increase in the coming decades. The distribution of the disease is closely linked to the Human Development Index (HDI) and the Gross Domestic Product (GDP) of countries, with developed nations generally exhibiting higher incidence rates compared to low or developing nations. This disparity may be attributed to limited access to healthcare services and delayed diagnoses in less developed regions (Rebello *et al.*, 2021). In Brazil, prostate cancer (CaP) is the second most common cancer among men, with an estimated 71,730 new cases projected between 2023 and 2025. The relatively uniform incidence across different regions of the country is influenced by various factors, including deficiencies in case registration, inadequate healthcare systems, genetic predispositions, age, race, ethnicity, and environmental differences. According to INCA 2022, understanding global and national disparities in CaP incidence and mortality is crucial for developing effective prevention, diagnosis, and treatment strategies to combat this disease, which impacts millions of lives worldwide. Given the epidemiology, early detection is crucial for effective prognosis and treatment. However, current diagnostic methods have limitations such as false positives and negatives, inability to distinguish between cancer stages (localized, locally advanced, metastatic, and recurrent), lack of monitoring for disease progression, and inefficiency in predicting treatment response (Dathathri *et al.*, 2022), (Prensner *et al.*, 2012). In this context, aptamers emerge as a promising solution to overcome these limitations. These innovative molecules exhibit high affinity and selectivity, reduced immunogenicity, ease of chemical modification, and lower production costs (Wu *et al.*, 2022), (Hu *et al.*, 2022). The study and research group on molecular markers (GEP-MMol) at the Federal University of Uberlândia employed the 3D cell-SELEX technique to select eight ssRNA aptamers with high affinity for the membrane of CaP tumor cells (PC-3 cell line). Among these, aptamers A6 and A11 were chosen for further investigation (Souza *et al.*, 2016). However, ssDNA aptamers offer several advantages over ssRNA aptamers. RNA aptamers can present significant side effects, as non-coding RNAs may interfere with the regulation of gene expression. Additionally, RNA is easily degraded by ribonucleases (RNases), extracellular RNases, exoenzymes, and others, leading to detrimental effects on human health. These include the loss of

function of essential molecules, activation of inflammatory responses, cellular dysfunctions, and more (Campos-Fernández *et al.*, 2020), (Houseley; Tollervey, 2009). Due to their greater chemical and biological stability and longer lifespan, ssDNA aptamers are advantageous because of the absence of the 2' hydroxyl (OH) group on the deoxyribose sugar. This structural difference increases their resistance to hydrolysis and degradation by nuclease enzymes. Additionally, their synthesis is simpler, more efficient, and less costly (Ulrich *et al.*, 2006). The proposal of this work was to modify the ssRNA aptamers A6 and A11 to ssDNA is based on the study by Campos-Fernandez et al. (2024), which analyzed the sequence A4 of ssRNA, also extracted from the article by Souza et al. (2016). Campos et al. modified the ssRNA A4 to ssDNA D4, and conducted various in silico and in vitro analyses that support the greater efficiency of the aptamer D4 compared to A4. To modify our chosen sequences (A6 and A11), we relied on the study by Jeddi et al. (2017), which provided a protocol for the modification of ssRNA to ssDNA using modeling and molecular dynamics software. This study enables the analysis of both molecular types and determines which one better preserved the structural conformation and stability under preconceived dynamic conditions. It starts from the understanding that aptamers A6 and A11 bind to the PC-3 cell line through recognition of the three-dimensional structure (conformation).

2. METHODOLOGY

2.1 Modification of ssRNA aptamers to ssDNA *in silico*.

The ssRNA sequences of the A6 and A11 aptamers, described in the work of Souza et al. (2016), were modified by substituting ribonucleotides with deoxyribonucleotides, aiming to enhance the stability of these molecules.

Initially, using Unafold (https://www.idtdna.com/UNAFold), the secondary structures of the ssRNA oligonucleotides were generated. With the 2D structure in hand, we were able to model the three-dimensional structure of these oligonucleotides using the RNAcomposer platform (https://rnacomposer.cs.put.poznan.pl/).

The three-dimensional models of the ssRNAs were transformed into ssDNAs through the following modifications: removal of the hydroxyl (OH) group from the 2' carbon of the pentose (Discovery Studio); alteration of the H on the 5' carbon of the uracil base to CH3; and manual

adjustment of the nomenclature of the modified uracil residues to thymine in the pdb file extension. Finally, after this process, it was possible to visualize the 3D structure of the modified aptamers to ssD

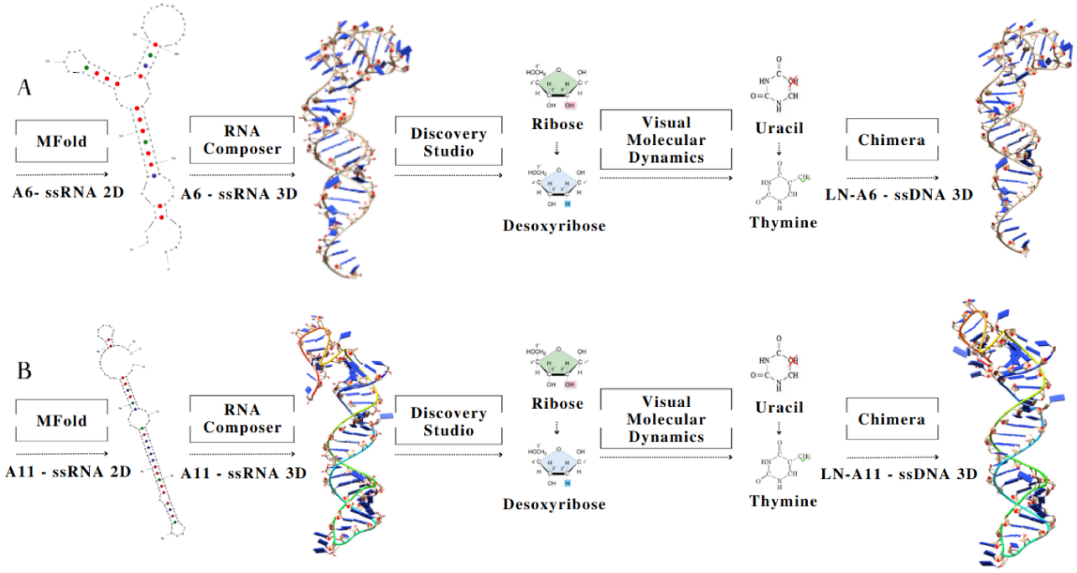


Figure 1. **Modedeling of ssRNA aptamers to ssDNA:** The 2D and 3D modeling pipeline and modification of ssRNA to ssDNA involves a series of steps that enable the visualization and analysis of aptamer structures in both two and three dimensions, as well as the conversion of single-stranded RNA (ssRNA) to single-stranded DNA (ssDNA). This process begins with 2D modeling, where the sequence and base pairs of the nucleic acids are represented in a flat layout, allowing for an initial analysis of their conformation. Next, 3D modeling is performed to visualize the three-dimensional structure, revealing spatial interactions and structural stability. The conversion from ssRNA to ssDNA includes replacing ribose with deoxyribose, and uracil with thymine. The ssRNA aptamers were converted to ssDNA and named LN-A6 (figure A) and LN-A11 (figure B).

2.2 Molecular Dynamics for subsequent comparison of ssRNA and ssDNA aptamers.

Following the modification of ssRNA aptamers (A6 and A11) to ssDNA (LN-A6 and LN-A11) (Figure 1 A and B), we proceeded with molecular dynamics (MD) for both nucleic acid types using the GROMACS program (https://www.gromacs.org/). (Abraham *et al.*, 2015). The molecular dynamics of ssDNAs (Figure 2) was conducted employing the CHARMM27 (GROMACS Force Fields) force field and the TIP3P water model (Jorgensen *et al.*, 1983). The simulation cell was defined as triclinic in shape. Water molecules and ions (Na+ and Cl-) were

added, and energy minimization was performed using the steepest descent algorithm. The NVT (constant volume and temperature) and NPT (constant pressure and temperature) equilibration phases were conducted for 100 ps each, followed by a production phase of 200 ns under NPT conditions. The Particle Mesh Ewald (PME) technique was employed to calculate long-range electrostatic interactions during MD (Essmann *et al.*, 1995). The simulations were performed twice for each ssDNA, with the only variable being the temperature, which was maintained constant at 300 K and 310 K, respectively, using a modified Berendsen thermostat (Berendsen *et al.*, 1984). The pressure was adjusted to 1 atm using the Parrinello-Rahman method (Parrinello; Rahman, 1980). The short-range van der Waals and electrostatic forces were set to 1.2 nm. The MD results were evaluated using tools provided by the GROMACS program, including root mean square deviation (RMSD) to measure changes in aptamer conformation throughout the dynamics, and hydrogen bond (H-BOND) analyses, which calculate the number of internal hydrogen bonds formed within the aptamers.

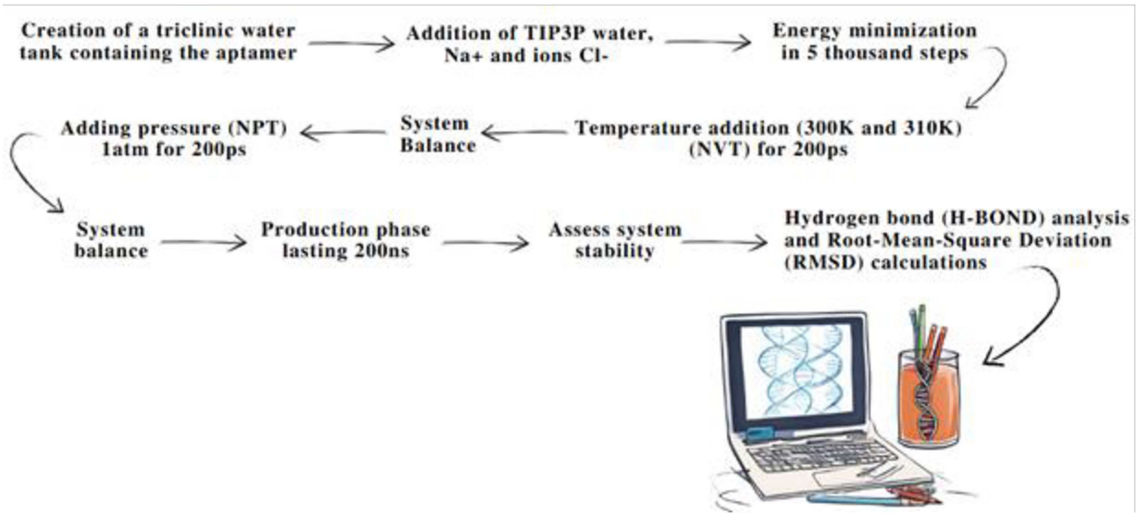


Figure 2. Steps of molecular dynamics and post-dynamics: The molecular dynamics simulation pipeline for aptamers using GROMACS starts with the creation of a triclinic box containing water and the aptamer, followed by the addition of TIP3P water and Na+ and Cl- ions. This is followed by energy minimization, then gradual heating (from 300K to 310K) in the NVT ensemble for 200 ps, and equilibration with pressure adjustment (NPT). The production phase lasts for 200 ns, with subsequent analysis of system stability, hydrogen bonds (H-bonds), and root mean square deviation (RMSD).

2.3 Synthesis of aptamers and their dissociation constant Kd.

After the modification from ssRNA to ssDNA, the aptamers LN-A6 and LN-A11 were synthesized by the company IDT (Integrated DNA Technologies). Each aptamer was synthesized with flanking primers at their ends, and biotin was added at the 5' position to enable binding to streptavidin-FITC, facilitating visualization of the aptamers in fluorescence and chemiluminescence assays (Figure 3).

LN-A6 – DNA 5 'biotina**CCG CAT CGT CCC** AAG CCG ATT TTG GCG AGC AGC AGA CAG GTT CCG **GGG CGA GCA GCA GAC** 3'

LN-A11 – DNA 5' biotina**CGA TGC GG**A ATA GGG GCC AGG CGT ATC TGA GCT ATT CTC TTT GTC CCG **TCT GCT GCT** 3'

Figure 3. Sequences of the aptamers LN-A6 and LN-A11: utilized in the Kd assay. Biotin protein was added at the 5' position of each aptamer. Bold bases correspond to the primer sequences used in the construction of the aptamers.

For the Kd test analysis, the PC-3 cell line was initially cultured. The PC-3 cell line, previously authenticated and confirmed to be mycoplasma-free, was cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco) and 100 U/mL Antibiotic-Antimycotic solution, containing penicillin and streptomycin. Cells were incubated in a 37°C, 5% CO_2 incubator. The culture medium was changed every three days, and cells reached approximately 80% confluency in T75 flasks. Cells were trypsinized, counted using a Neubauer chamber, and 2x10^5 cells were placed in an Eppendorf tube for testing with LN-A6 and another tube with the same number of cells for LN-A11.

Next, cell preparation involved centrifugation cycles at 200g for 5 minutes and washing with 100 µL of 1X PBS. Cells were then incubated with 100 µL of blocking solution (1% BSA in PBS) for 15 minutes at room temperature, followed by repeating centrifugation and washing steps. Cells were then incubated with LN-A6 and LN-A11 aptamers at different concentrations (400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, and 0 nM) in binding buffer (0.01M PBS, 5mM MgCl2, 25mM glucose, and 15mM BSA) for 1 hour at 37°C.

After incubation, centrifugation cycles and washes were repeated. Cells with their

respective aptamers and at their respective concentrations were then incubated with 1 µL of streptavidin-FITC for 30 minutes at 4°C, avoiding light exposure. Subsequently, another cycle of centrifugation and washes was performed to conduct the reading on the flow cytometer with a minimum of 5,000 events. To obtain the Kd values of the LN-A6 and LN-A11 aptamers, the mean fluorescence intensity (MFI) of specific binding at different aptamer concentrations was measured, and the MFI of nonspecific binding of cells incubated only with streptavidin-FITC conjugates was subtracted.

The statistical analysis to determine the Kd (dissociation constant) value is performed by fitting the experimental data to a nonlinear binding model using software such as PrismGraph (v.7, GraphPad Software). The goal of this analysis is to model the interaction between the aptamer and the target cell or molecule based on the concentration of the aptamer and the observed binding response.

The binding equation used is:

$$Y = \frac{B_{max} \cdot X}{Kd + X}$$

Where:

Y represents the observed response, meaning the amount of aptamer bound to the target cell or molecule.

Bmax is the theoretical maximum binding, which indicates the highest possible level of binding.

X is the concentration of the aptamer used in the experiment.

Kd is the dissociation constant, which indicates the concentration of aptamer required for 50% of the receptors to be occupied, serving as a measure of affinity between the molecules. A lower Kd value signifies higher affinity.

The software fits the experimental data to this equation through nonlinear regression, optimizing the parameters to minimize the difference between the experimental values and the predicted values from the model. This fitting process generates a binding

curve that allows for the precise determination of Kd.

Additionally, the software provides statistical parameters, such as the coefficient of determination (R^2) and confidence intervals, to assess the quality of the fit and the reliability of the Kd values obtained, ensuring that the results are robust and accurately represent the molecular interaction under study.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Nosso estudo se destaca como um dos primeiros a realizar uma análise detalhada dos aptâmeros, além do trabalho de Jedd et al., o que caracteriza nossa pesquisa como inovadora na área. No entanto, muitos dos resultados obtidos não puderam ser amplamente discutidos devido à ausência de estudos semelhantes na literatura. A falta de referências comparativas torna difícil contextualizar alguns achados, reforçando a originalidade do presente estudo e evidenciando a necessidade de futuras pesquisas que explorem mais profundamente essa temática. Our study stands out as one of the first to conduct a detailed analysis of aptamers, alongside the work of Jedd et al., which characterizes our research as innovative in the field. However, many of the results obtained could not be thoroughly discussed due to the lack of similar studies in the literature. The absence of comparative references makes it challenging to contextualize some of the findings, further highlighting the originality of this study and emphasizing the need for future research to explore this topic more deeply.

3.1 ssRNA to ssDNA aptamers show similar 3D structure

The new designs of the oligonucleotides remained structurally similar to the initial ssRNA ones (Figure 4), potentially indicating that the ssDNA aptamers retained their binding affinity for the PC-3 cell line. This step aimed to maintain the conformational structure as closely as possible, intending to preserve the conformational characteristics of the ssRNA aptamers. In addition to the three-dimensional modeling of the ssRNAs, we obtained the ssDNA structure of each aptamer, which was modified by substituting the uracil (U) nitrogenous bases with thymine (T). The

sequences that were previously: A6 RNA – 5' **CCG CAU CGU** CCC AAG CCG AUU UUG GCG AGC AGC AGA CAG GUU CCG **GGG CGA GCA GCA GAC** 3' and A11 RNA – 5' **CGA UGC GG**A AUA GGG GCC AGG CGU AUC UGA GCU CCU AUU CUC UUU GUC CC**G UCU GCU GCU** 3' were altered to have Thymine instead of Uracil after refinement: LN-A6 – DNA 5'**CCG CAT CGT CCC** AAG CCG ATT TTG GCG AGC AGC AGA CAG GTT CCG**GGG CGA GCA GCA GAC** 3' and LN-A11 – DNA 5'**CGA TGC GG**A ATA GGG GCC AGG CGT ATC TGA GCT ATT CTC TTT GTC CC**G TCT GCT GCT** 3'.



Figure 4. Aptamers of ssRNA and ssDNA: (A) RNA A6; (B) ssDNA LN-A6; (C) RNA A11; (D) ssDNA LN-A11.

The structural modeling of ssDNA aptamers is crucial for their application in biosensors. An innovative approach, akin to our work, has been developed to predict the three-dimensional structures of ssDNA hairpins, which are essential for aptamer-based biosensors. This method integrates secondary structure prediction, 3D modeling, and refinement, providing a reliable tool for the design and optimization of ssDNA aptamers (Jeddi; Saiz, 2017). The ssDNA aptamers have been successfully applied in various diagnostic assays. For instance, aptamers specific to the Newcastle disease virus (NDV) have been developed and employed in an enzyme-linked aptamer assay (ELAA) for rapid and sensitive detection of NDV in field samples. The selected aptamers demonstrated high specificity and affinity, with dissociation constants of 31 nM and 78.1 nM, respectively (Marnissi *et al.*, 2020). Another study developed ssDNA aptamers for the detection of

Vibrio alginolyticus, a pathogen that affects marine animals and humans. These aptamers demonstrated high affinity and specificity of binding, making them suitable for diagnostic applications in complex sample matrices (Yu *et al.*, 2019). In addition to diagnostics, ssDNA aptamers hold therapeutic potential. For instance, ssDNA aptamers targeting the CD30 receptor on lymphoma cells were developed using a hybrid SELEX methodology. These aptamers induced oligomerization of CD30 receptors, leading to apoptosis of lymphoma cells, demonstrating their potential as therapeutic agents (Parekh *et al.*, 2013). Another study described the development of ssDNA aptamers against the E2 glycoprotein of the envelope of *Hepatitis C Virus* (HCV). These aptamers exhibited high specificity and affinity, and were able to inhibit HCV infection *in vitro*, highlighting their potential as therapeutic drugs (Chen *et al.*, 2009).

3.2 Molecular Dynamics Analysis

In the molecular dynamics study, the ssRNA aptamers (A6 and A11) exhibited greater stability compared to the ssDNAs in both hydrogen bond formation (Figure 5) and RMSD, which showed lower and consistent values, indicating lesser conformational variation throughout the dynamics (Figure 6). The analyses maintained consistency at both temperatures, 300 K (26.85°C), simulating room temperature, and 310 K (36.85°C), simulating human body temperature.

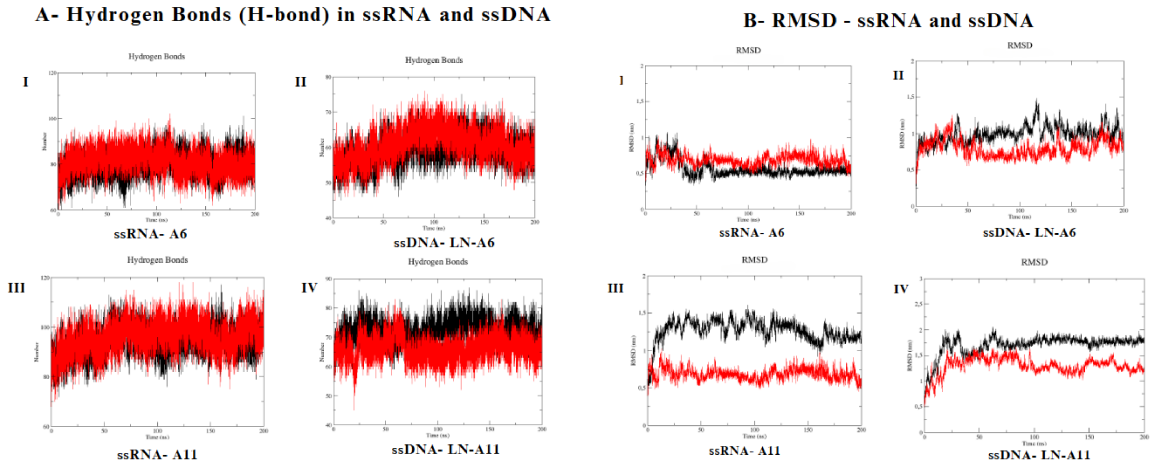


Figure 5A: Hydrogen bonds (H-bond) of ssRNA and ssDNA aptamers: At temperatures of 300 K – black curve, 310 K – red curve. I- ssRNA A6 (300 K and 310 K); II- ssDNA LN-A6 A6 (300 K and 310 K); III- ssRNA A11 (300 K and 310 K); IV- ssDNA LN-A11 (300 K and 310 K). **5B: Root Mean Square Deviation (RMSD) of ssRNA and ssDNA:** At temperatures of 300 K – black curve, 310 K – red curve. I- ssRNA A6

(300 K and 310 K); II- ssDNA LN-A6 A6 (300 K and 310 K); III- ssRNA A11 (300 K and 310 K); IV- ssDNA LN-A11 (300 K and 310 K).

The graphs related to the H-bond test of the A6 and LN-A6 aptamers (Figure 5A - I and II respectively) show that A6 exhibits potentially greater stability than LN-A6, as its curve at both temperatures remained similar, forming a defined plateau and showing a higher number of hydrogen bonds. Additionally, the numerical values of mean and standard deviation at both temperatures were consistent with what is observed in the graphs (Table 1). A6 at 300 K had a mean of 79.85 and a standard deviation of 5.02, and at 310 K, a mean of 81.09 and a standard deviation of 5.13. On the other hand, for LN-A6 at 300 K, the mean was 59.15 with a standard deviation of 3.99, and at 310 K, the mean was 60.72 and the standard deviation was 4.45. However, LN-A6 still appears to be a stable molecule because even with the variations presented, the behavior of this ssDNA is very similar at both temperatures, showing an increasing number of hydrogen bonds throughout the dynamics (Figure 5A - II).

	HB number		**RMSD**	
ssRNA	**Average**	**SD**	**Average**	**SD**
A6 **(300K)**	79,85	5,02	0,56	0,11
A6 **(310K)**	81,09	5,13	0,69	0,08
A11 **(300K)**	94,31	5,59	1,27	0,15
A11 **(310K)**	95,85	6,00	0,69	0,08
ssDNA				
LN-A6 **(300K)**	59,15	3,99	0,99	0,12
LN-A6 **(310K)**	60,72	4,45	0,79	0,12
LN-A11 **(300K)**	72,11	3,87	1,69	0,20
LN-A11 **(310K)**	66,07	3,95	1,30	0,17

Table 1: Means and Standard Deviations of H-bond and RMSD Analyses for ssRNA and ssDNA: The analyses were conducted at the temperature of 300 K (in black) and at 310 K (in red).

Regarding the RMSD of the A6 and LN-A6 aptamers (Figure 5B - I and II respectively), the ssRNA appears to be more stable. Its curve at both temperatures initially reaches a maximum of

1 nm, and then the curve decreases and stabilizes after 100 ns, which is not observed in the ssDNA. The peaks of the ssDNA vary more over time, exceeding 1 nm, and stabilize after 150 ns at both temperatures. The data from Table 1 corroborate with the graphical illustration; A6 at 300 K has a mean of 0.56 and a standard deviation of 0.11, while at 310 K, the mean is 0.69 with a standard deviation of 0.08. On the other hand, LN-A6 at 300 K has a mean of 0.99 and a standard deviation of 0.12, and at 310 K, the mean is 0.79 with a standard deviation of 0.12. Despite the RMSD variations at both temperatures, both nucleic acids seem to stabilize.

The graphical analyses of ssRNA A11 and ssDNA LN-A11 (Figure 5A - III and IV respectively) show that A11 remains similar at both temperatures, while LN-A11 has more hydrogen bonds at 300 K, and it is still possible to observe a decline at 310 K before reaching 50 ns. The numerical data (Table 1) validate the figures; A11 at 300 K had a mean of 94.31 and a standard deviation of 5.59, while at 310 K, the mean was 95.85 with a standard deviation of 6.0. LN-A11, as mentioned earlier, had larger variations; at 300 K, the mean was 72.11, with a standard deviation of 3.87, whereas at 310 K, it decreased to a mean of 66.07 with a standard deviation of 3.95.

The RMSD of A11 and LN-A11 (Figure 5B - III and IV respectively) conflicts when compared to the H-bond (Figure 5A - III and IV), as it is expected that with a greater number of hydrogen bonds, the RMSD variation should be smaller. However, in A11, we can observe a significant difference in the RMSD variation between the different temperatures, where a higher stability at 310 K is clearly evident. On the other hand, LN-A11 showed a higher number of H-bonds at 300 K, but the RMSD was also high when compared to 310 K. Nevertheless, a clear plateau can be seen after 100 ns simulation in LN-A11 at 300 K, indicating variations that configure stabilization of the ssDNA structure. Furthermore, Table 1 corroborates these findings. At 300 K, the RMSD of A11 had a mean of 1.27 and a standard deviation of 0.15, whereas its H-bond at the same temperature had a mean of 94.31 and a standard deviation of 5.59. At 310 K, the mean RMSD was 0.69 with a standard deviation of 0.08, contrasting with the H-bond mean of 95.85 and standard deviation of 6.0. As for the RMSD of LN-A11, the mean was 1.69 with a standard deviation of 0.15, contrasting with the H-bond mean of 72.11 and standard deviation of 3.87. At 310 K, the RMSD mean was 1.27 with a standard deviation of 0.15, contrasting with the H-bond mean of 66.07 and standard deviation of 3.95.

Both RMSD and hydrogen bonds are essential tools widely used in the analysis of molecular dynamics simulations of biomolecules. The combination of these analyses allows for a deeper understanding of the dynamic and structural mechanisms of biomolecules and their stability, contributing to significant advances in structural biology. This study presented, for the first time, a comparative study of ssRNAs and ssDNAs through molecular dynamics simulations, which may open up a new line of research supporting various areas of research, such as those developed by the 3D cell-SELEX technique.

3.3 LN-A6 aptamer showed greater affinity to PC3 cells than LN-A11

A figura 7 apresentada ilustra a relação entre a concentração de dois aptâmeros, LN-A6 e LN-A11, e a intensidade de fluorescência resultante da ligação desses aptâmeros às células PC-3. A análise deste gráfico, nos permite inferir sobre a afinidade relativa dos aptâmeros para as células PC-3.

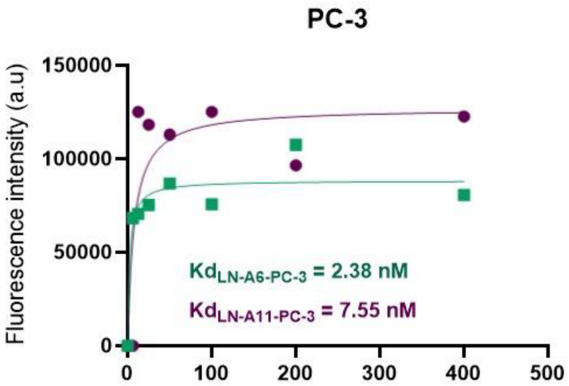


Figure 7: Fluorescence intensity resulting from the binding of aptamers LN-A6 and LN-A11 to PC-3 cells.

O eixo X representa as concentrações dos aptâmeros LN-A6 e LN-A11, variando de 0 nM a 400 nM. Essa faixa de concentrações permite avaliar a capacidade de cada aptâmero em se ligar às células PC-3 em diferentes níveis de disponibilidade. O eixo Y representa a intensidade de fluorescência emitida pelo complexo formado pela ligação do aptâmero à célula PC-3.

A interação da linhagem celular PC-3 com os aptâmeros LN-A6 e LN-A11, foi calculada de forma quantitativa pela constante de equilíbrio, mostrando alta afinidade com Kd na escala

nanomolar. De acordo com o seu Kd, o LN-A6 teve uma força de aproximadamente três vezes maior para permanecer ligado as células. Uma vez que quanto menor o valor de Kd, maior a sua força de ligação. LN-A6 obteve Kd de 2,38nM e o LN-A11 de 7,55nM

4. CONCLUSION

The results of this study contribute significantly to the advancement of research by enhancing our understanding of aptamers and their potential applications in diagnostics and therapies. Aptamers, with their promising properties, offer several benefits, such as high specificity, stability, and the ability to be tailored for various uses in the clinical field. Among the aptamers analyzed, LN-A6 demonstrated superior binding affinity, as indicated by its lower dissociation constant (Kd), suggesting a stronger interaction with the PC-3 cell line compared to LN-A11. This makes LN-A6 a more promising molecule for future in vitro and in vivo tests.

Molecular dynamics analyses and structural modeling provided important insights into the stability of both ssRNA and ssDNA aptamers. While ssRNA molecules generally showed greater stability through lower RMSD values and a higher number of hydrogen bonds, the ssDNA aptamers, particularly LN-A6, displayed consistent stability at different temperatures (300 K and 310 K). These results highlight the versatility and robustness of ssDNA aptamers, suggesting that they could perform effectively in both diagnostic and therapeutic applications.

In conclusion, this study demonstrates that structural modeling, molecular dynamics analyses, and dissociation constant measurements are valuable tools for the validation and optimization of aptamers. The insights gained from this research pave the way for the development of highly efficient and specific theranostic tools, enhancing the potential use of aptamers in the clinical field.

5. REFERENCES

ABRAHAM, Mark James *et al.* Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, [*s. l.*], v. 1–2, p. 19–25, 2015.

BERENDSEN, H J C *et al.* Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, [*s. l.*], v. 81, n. 8, p. 3684–3690, 1984.

CAMPOS-FERNÁNDEZ, Esther *et al.* Post-SELEX Optimization and Characterization of a Prostate Cancer Cell-Specific Aptamer for Diagnosis. **ACS Omega**, [*s. l.*], v. 5, n. 7, p. 3533–3541, 2020.

CATUOGNO, Silvia; ESPOSITO, Carla Lucia. Aptamer cell-based selection: Overview and advances. **Biomedicines**, [*s. l.*], v. 5, n. 3, 2017.

CHEN, Fang *et al.* CS-SELEX Generates High-Affinity ssDNA Aptamers as Molecular Probes for Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2. **PLoS ONE**, [*s. l.*], v. 4, 2009.

DATHATHRI, Eshwari *et al.* Liquid Biopsy Based Circulating Biomarkers in Metastatic Prostate Cancer. **Frontiers in Oncology**, [*s. l.*], v. 12, n. May, p. 1–13, 2022.

ESSMANN, Ulrich *et al.* A smooth particle mesh Ewald method. **The Journal of Chemical Physics**, [*s. l.*], v. 103, n. 19, p. 8577–8593, 1995.

HOUSELEY, Jonathan; TOLLERVEY, David. The Many Pathways of RNA Degradation. **Cell**, [*s. l.*], v. 136, n. 4, p. 763–776, 2009. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.019.

HU, Xueqi *et al.* Aptamer-Based Probes for Cancer Diagnostics and Treatment. **Life**, [*s. l.*], v. 12, n. 11, 2022.

JEDDI, Iman; SAIZ, Leonor. Three-dimensional modeling of single stranded DNA hairpins for aptamer-based biosensors. **Scientific Reports**, [*s. l.*], v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-01348-5.

JORGENSEN, William L. *et al.* Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, [*s. l.*], v. 79, n. 2, p. 926–935, 1983.

MACKERELL, Alexander D.; BANAVALI, Nilesh K. All-Atom Empirical Force Field for Nucleic Acids: II. Application to Molecular Dynamics Simulations of DNA and RNA in Solution. **Journal of Computational Chemistry**, [*s. l.*], v. 21, n. 2, p. 105–120, 2000.

MARNISSI, Boutheina *et al.* Generation of ssDNA aptamers as diagnostic tool for Newcastle

avian virus. **PLoS ONE**, [*s. l.*], v. 15, 2020.

PAREKH, Parag *et al.* Immunotherapy of CD30-expressing lymphoma using a highly stable ssDNA aptamer. **Biomaterials**, [*s. l.*], v. 34 35, p. 8909–8917, 2013.

PARRINELLO, M; RAHMAN, A. Crystal Structure and Pair Potentials: A Molecular-Dynamics Study. **Physical Review Letters**, [*s. l.*], v. 45, n. 14, p. 1196–1199, 1980.

PRENSNER, John R. *et al.* Beyond PSA: The next generation of prostate cancer biomarkers. **Science Translational Medicine**, [*s. l.*], v. 4, n. 127, 2012.

REBELLO, Richard J. *et al.* Prostate cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, [*s. l.*], v. 7, n. 1, 2021. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41572-020-00243-0.

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

ULRICH, Henning *et al.* DNA and RNA Aptamers: From Tools for Basic Research Towards Therapeutic Applications. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, [*s. l.*], v. 9, n. 8, p. 619–632, 2006.

WU, Limei *et al.* Aptamer-Based Cancer Cell Analysis and Treatment. **ChemistryOpen**, [*s. l.*], v. 11, n. 10, 2022.

YU, Qing *et al.* Selection and characterization of ssDNA aptamers specifically recognizing pathogenic Vibrio alginolyticus. **Journal of fish diseases**, [*s. l.*], v. 42 6, p. 851–858, 2019.