

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

NATHALIA OLIVEIRA ALQUALO

**Identificação de proteínas alvo dos aptâmeros D4 e R4 ligantes de células do câncer de
próstata**

UBERLÂNDIA
2023

NATHALIA OLIVEIRA ALQUALO

Identificação de proteínas alvo dos aptâmeros D4 e R4 ligantes de células do câncer de próstata

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Biomedicina da Universidade Federal de Uberlândia para obtenção de grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientador(a): Dra. Vivian Alonso Goulart

Coorientador(a): Dra. Esther Campos-Fernández

UBERLÂNDIA
2023

NATHALIA OLIVEIRA ALQUALO

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ALVO DOS APTÂMEROS D4 E R4 LIGANTES
DE CÉLULAS DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Biomedicina da
Universidade Federal de Uberlândia para obtenção de
grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientador(a): Dra. Vivian Alonso Goulart

Coorientador(a): Dra. Esther Campos-Fernández

Uberlândia, 22 de novembro de 2023

Banca examinadora:

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

Dr. Nilson Nicolau Junior - Instituto de Biotecnologia - Universidade Federal de Uberlândia
(UFU)

Me. Letícia Lopes Dantas Santos - Instituto de Biotecnologia - Universidade Federal de
Uberlândia (UFU)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por possibilitarem a realização dessa graduação e investirem no meu conhecimento e formação.

À minha orientadora, Dra. Vivian Alonso Goulart, por me acolher no seu grupo de pesquisa, ser sempre presente e compreensiva, e me confiar tantas tarefas desafiadoras essenciais para meu desenvolvimento na pesquisa.

À minha coorientadora, Dra. Esther Campos-Fernández, por ter aceitado minha colaboração nesse trabalho e ter tido tanta paciência e disponibilidade para me ensinar tudo que era necessário para sua realização.

Aos meus amigos e colegas de graduação por tantos momentos e experiências compartilhadas. Em especial, à Maria Clara, minha dupla, que fez os dias difíceis serem mais leves e divertidos, por todo o companheirismo e surtos compartilhados.

Aos integrantes do grupo de estudos e pesquisa em marcadores moleculares (GEP-MMol), pelos conhecimentos e risadas divididos.

Aos meus professores, por dedicarem suas vidas a formarem outros profissionais, principalmente àqueles que o fazem com notável paixão.

Ao meu melhor amigo e namorado, João Paulo, por ser calma em meio ao caos, por todo incentivo, suporte e apoio, e por ser tão compreensivo com minhas escolhas, problemas e forma rígida de lidar com a vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio que tornou possível o desenvolvimento deste trabalho e dos que vieram em seguida.

A mim, por não me permitir desistir, enfrentar todas as dificuldades, sofrimentos e desafios da pesquisa, mesmo enquanto duvidei das minhas escolhas, além de toda a dedicação que tive desde o 1º dia, a qual me permitiu amadurecer e crescer tanto.

RESUMO

Os exames diagnósticos disponíveis, atualmente, para o câncer de próstata (CaP) apresentam baixa especificidade, expondo a necessidade de desenvolvimento e implementação de novos testes, a fim de diminuir os resultados falso-positivos e evitar biópsias desnecessárias. Portanto, os estudos com moléculas, como o aptâmero A4, o qual demonstrou ser uma ferramenta promissora para o diagnóstico do CaP, são de extrema importância. A identificação do alvo do aptâmero A4 contribui para o avanço no diagnóstico precoce e diminuição da mortalidade do câncer de próstata, uma vez que há a possibilidade de ser um novo biomarcador e alvo terapêutico para o CaP. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avançar na compreensão da funcionalidade do aptâmero A4, nas suas versões D4 (ssDNA) e R4 (ssRNA), identificação das suas moléculas alvo mais prováveis e a interação alvo-aptâmero. As proteínas MUC6, ADAM30 e NXPE2 foram identificadas a partir da precipitação com os aptâmeros, seguida da espectrometria de massas e tiveram suas interações avaliadas por *docking* molecular. Contudo, para que o aptâmero seja capaz de contribuir no diagnóstico do CaP, os futuros estudos deverão validar as proteínas reveladas neste trabalho e suas funções na tumorigênese.

Palavras-chave: Câncer de próstata, diagnóstico, aptâmero A4.

ABSTRACT

The diagnostic tests currently available for prostate cancer (PCa) shows low specificity, exhibiting the need of development and implementation of new tests to diminish false positive results and avoid unnecessary biopsies. Therefore, the studies with molecules like the aptamer A4 that already demonstrated to be a promising tool for PCa diagnosis, are extremely important. The aptamer A4 target identification contributes for the early diagnosis progress and prostate cancer mortality decrease once it has the possibility of being a new biomarker and therapeutic target for PCa. Hence, the present study had the aim of progressing on the aptamer A4 functionality comprehension in its D4 (ssDNA) and R4 (ssRNA) versions, identifying the more probable target molecules and the target-aptamer interaction. The proteins MUC6, ADAM30 and NXPE2 were identified from the aptamer precipitation followed by mass spectrometry and had their interactions evaluated by molecular docking. However, future studies should validate the proteins revealed in this work and their tumorigenesis function so the aptamer can contribute for PCa diagnosis.

Keywords: Prostate cancer, diagnosis, aptamer A4

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da seleção do aptâmero A4 pela técnica 3D Cell SELEX	12
Figura 2 - <i>Heatmap</i> baseado na espectrometria de massas	24
Figura 3 - Estruturas <i>in silico</i> dos aptâmeros	26
Figura 4 - Representação dos melhores complexos aptâmero-proteína	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultado da análise da espectrometria de massas para as proteínas precipitadas com o aptâmero D4	17
Tabela 2 - Resultado da análise da espectrometria de massas para as proteínas precipitadas com o aptâmero R4	20
Tabela 3 - Pontuação de energia obtida no <i>docking</i> molecular entre as diferentes conformações dos aptâmeros D4 e R4 e as possíveis proteínas alvo	27
Tabela 4 - Interações entre as moléculas do complexo ADAM30-D4e geradas no PLIP.....	29
Tabela 5 - Interações entre as moléculas do complexo NXPE2-D4c geradas no PLIP	30
Tabela 6 - Interações entre as moléculas do complexo NXPE2-R4f geradas no PLIP	32
Tabela 7 - Interações entre as moléculas do complexo MUC6-R4i geradas no PLIP	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3 METODOLOGIA	14
3.1 Aptâmeros	14
3.2 Cultura celular	14
3.3 Extração proteica	14
3.4 Imunoprecipitação de proteínas com os aptâmeros D4 e R4	14
3.5 Quantificação proteica	15
3.6 Espectrometria de massas	15
3.7 Análise <i>in silico</i>	16
4 RESULTADOS	17
5 DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÃO.....	38
7 REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo com 1.414.259 casos e 375.304 mortes em 2020, e uma estimativa de aumento de 34,8% nos casos e 40,9% no número de mortes para os próximos 10 anos, de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (2020). No Brasil, a estimativa é de 71.730 novos casos para os anos de 2023 a 2025, o que corresponde a 67,86 casos a cada 100 mil homens (INCA, 2022). Segundo o INCA (2022), o número de mortes por CaP em 2020 foi 15.841, correspondendo a 15,30 mortes a cada 100 mil homens. Além disso, as regiões do mundo com maior incidência do CaP são: norte e oeste da Europa, Caribe, Austrália, Nova Zelândia, Américas do Norte e do Sul, e África do Sul (IARC, 2020).

Os fatores de risco são idade, histórico familiar, fatores genéticos, raça e etnia (Bancroft *et al.*, 2021). A probabilidade de desenvolver a doença aumenta a partir dos 60 anos, sendo a idade o maior fator de risco. Outro fator de risco importante é o histórico familiar, pois homens nessa condição possuem um risco 2,5 vezes maior de receber o mesmo diagnóstico, assim como o histórico de CaP metastático aumenta o risco de desenvolvimento de doença mais agressiva. A herdabilidade estimada do CaP é de 58%, sendo as mutações em genes de reparo do DNA relacionadas a aumento do risco e prevalência de CaP metastático. Entretanto, a raça e etnia de homens negros é relacionada a maior risco de desenvolver CaP mais agressivo devido a fatores genéticos associados a ancestralidade, local de origem, além de fatores ambientais e sociais (Bergengren *et al.*, 2023).

Contudo, quando diagnosticado em fases iniciais, há um melhor prognóstico e resposta ao tratamento. O diagnóstico de CaP é feito através do toque retal e exame de sangue para dosagem do antígeno prostático específico (PSA, do inglês Prostatic-Specific Antigen) e confirmado por biópsia tecidual. A quantidade de PSA considerada normal é menor ou igual a 4 ng/ml, porém o teste de PSA é pouco específico, uma vez que a quantidade do antígeno aumenta nos casos de prostatite, ejaculação ou trauma. Por isso, o teste gera resultados falsos positivos e até falsos negativos (Blackwelder; Chessman, 2019).

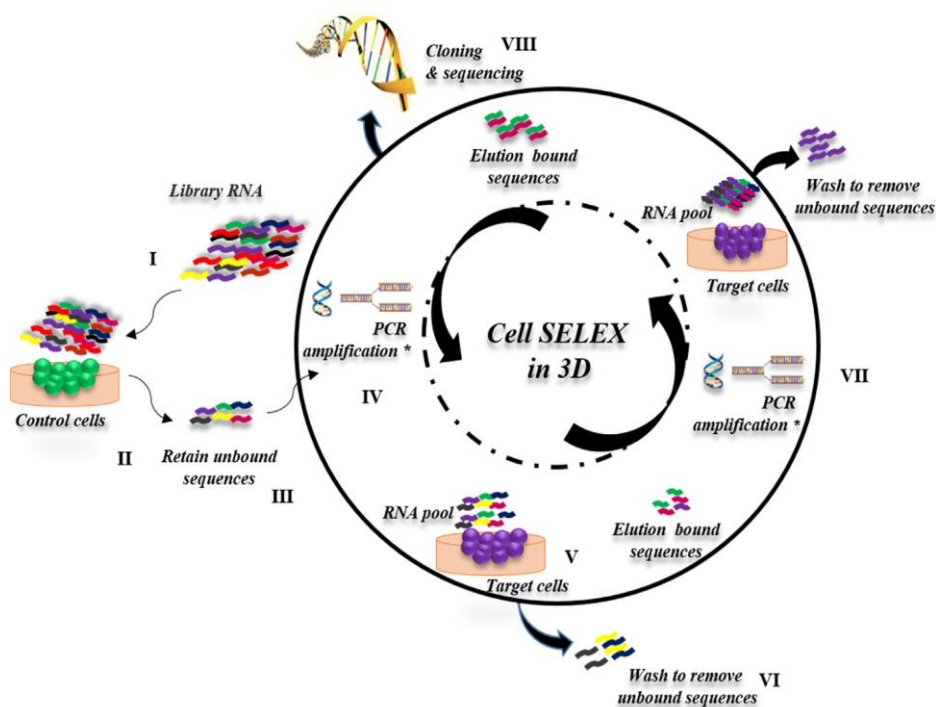
Uma vez que o CaP não apresenta sintomas no início da doença, pode ser indolente ou apresentar diferentes manifestações clínicas e padrões de progressão, há a necessidade de desenvolvimento de técnicas capazes de diferenciar tais tipos de câncer, monitorar sua progressão e prever a resposta ao tratamento. Consequentemente, os biomarcadores são alvo do desenvolvimento de novas ferramentas, já que podem auxiliar no diagnóstico, monitoramento e tratamento do CaP (Kohaar *et al.*, 2019).

Juntamente à busca por biomarcadores, novos testes diagnósticos estão sendo estudados e testados para que o diagnóstico precoce seja uma realidade e a mortalidade e morbidade relacionados ao CaP diminuam (Yu; Zhou, 2020). Portanto, muitos pesquisadores focaram em analisar moléculas com afinidade a alvos específicos, promissoras para o diagnóstico e tratamento de diferentes tipos de câncer, como os aptâmeros que podem ser pequenas sequências de DNA ou RNA de fita simples. Quando comparados a anticorpos, apresentam maior estabilidade, menor imunogenicidade, sendo assim, mais seguros, além de serem mais baratos, fáceis de produzir e modificar quimicamente e possuírem um tamanho reduzido, o que facilita sua internalização nas células (Maimaitiyiming *et al.*, 2019). Também chamados de anticorpos químicos, são selecionados através da técnica Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX, do inglês Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), descrita por Tuerk e Gold (1990) e Ellington e Szostak (1990). A seleção ocorre a partir de uma biblioteca de oligonucleotídeos incubada com a molécula alvo para selecionar os aptâmeros mais específicos, o processo ocorre em vários ciclos e ao final outras técnicas são empregadas para estudo dos aptâmeros obtidos. Além do SELEX convencional, outras variantes dessa técnica foram descritas, como o Cell-SELEX, um método mais complexo que mimetiza o ambiente celular por utilizar células inteiras como alvo (Bing; Zhang; Shanguan, 2019).

O Cell-SELEX associado à cultura de células 3D foi a técnica utilizada pelo grupo de estudo e pesquisa em marcadores moleculares (GEP-MMol) da Universidade Federal de Uberlândia para selecionar e caracterizar aptâmeros específicos ao CaP (Figura 1). Foi utilizada uma biblioteca de RNA produzida através de um *pool* de DNA extraído de amostras de sangue de pacientes com CaP e transcrito utilizando o kit T7 RiboMax™. Essa biblioteca foi incubada junto com as células cultivadas em cultura celular tridimensional e o processo de seleção foi executado em 9 ciclos. No primeiro ciclo, a biblioteca de RNA foi incubada com a linhagem celular normal da próstata RWPE-1 para uma seleção negativa e, todas as sequências que se ligaram às células foram descartadas. As sequências resultantes (não ligantes) foram incubadas com a linhagem celular tumoral da próstata PC-3 nos demais ciclos, a fim de selecionar aptâmeros específicos ao CaP. Os aptâmeros que se ligavam a cada ciclo eram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês Polymerase Chain Reaction) e utilizados no próximo ciclo e os não ligantes eram descartados. O *pool* de aptâmeros selecionados após os 9 ciclos foi clonado, sequenciado e teve suas sequências analisadas. Entre os 8 aptâmeros analisados, o A4 foi o selecionado para novos experimentos devido à suas características como

tamanho entre 20 e 50 nucleotídeos, baixa energia livre de Gibbs e alta especificidade (SOUZA *et al.*, 2016).

Figura 1 – Representação esquemática da seleção do aptâmero A4 pela técnica 3D Cell SELEX



Legenda: Imagem retirada do artigo de Souza *et al.* (2016). I- Biblioteca de RNA; II- Seleção negativa com células RWPE-1 (normais da próstata); III- As sequências não ligantes foram amplificadas por PCR (IV); V- A biblioteca de RNA foi incubada com as células alvo, linhagem PC-3 (tumoral da próstata); VI- As sequências não ligantes foram removidas e as ligantes foram amplificadas por PCR (VII); VIII- Ao final de 8 ciclos as sequências ligantes foram clonadas e sequenciadas.

O estudo de Souza *et al.* (2016) demonstrou a capacidade do aptâmero A4 de se ligar a proteínas de membrana das células do câncer de próstata. Já o estudo de Campos-Fernández (2020), aprimorou o aptâmero A4 adicionando desoxirribonucleotídeos nas extremidades para torná-lo mais resistente à RNases. Os ensaios demonstraram que o aptâmero otimizado mA4 possui uma capacidade de ligação semelhante à do aptâmero A4, assim como o mesmo comportamento de não interferir na viabilidade, proliferação e migração das células prostáticas. Portanto, o aptâmero mA4 foi considerado como uma possível ferramenta diagnóstica (Campos-Fernández; Barcelos; Souza *et al.*, 2020). Ademais, o aptâmero mA4 passou por novas otimizações, descritas na metodologia do presente estudo, ganhando duas novas versões, os aptâmeros D4 e R4. Contudo, o alvo desses aptâmeros era desconhecido e sua identificação pode trazer informações importantes sobre um novo biomarcador para auxiliar no diagnóstico, monitoramento ou tratamento do CaP.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar a(s) proteína(s) alvo dos aptâmeros D4 e R4, específicos às células tumorais da próstata para melhor entendimento de sua função intracelular e interação com os aptâmeros.

2.2 Objetivos específicos

- Purificar a(s) proteína(s) alvo utilizando aptaprecipitação a partir de extratos proteicos de linhagens prostáticas tumorais.
- Identificar por meio da espectrometria de massa a(s) proteína(s) alvo dos aptâmeros D4 e R4 nas células tumorais da próstata.
- Analisar *in silico* através da simulação de ancoragem à(s) proteína(s) alvo dos aptâmeros D4 e R4.

3 METODOLOGIA

3.1 Aptâmeros

Foram utilizadas 2 versões do aptâmero A4 (ssRNA) previamente modificadas a fim de obter moléculas com maior estabilidade: R4 e D4. Os novos aptâmeros contêm a sequência única do A4 (5'rArGrCrCrGrArGrArGrGrUrArArGrCrArArArArCrCrArCrGrCrCrCrG3') sem as regiões que permitem amplificação por PCR, com uma molécula de biotina adicionada na porção 5' e uma desoxitimidina na porção 3' para o aptâmero R4 (ssRNA). Já o aptâmero D4 (ssDNA), possui a mesma estrutura do R4, porém os ribonucleotídeos foram substituídos por desoxirribonucleotídeos para obtenção de uma estrutura semelhante a DNA. Os aptâmeros foram sintetizados pela Integrated DNA Technology (IDT) e ressuspensos em água de injeção livre de nucleases a uma concentração de 100 μ M.

3.2 Cultura celular

Foi utilizada a linhagem celular humana de câncer de próstata PC-3 cultivada no meio RPMI 1640, e suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100U/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina. A linhagem celular foi incubada a 37°C e 5% CO² até 80% de confluência. O meio de cultura foi trocado uma vez a cada três dias. Essas células foram autenticadas por *short tandem repeat* (STR) em 2022 e testadas mensalmente para contaminação por micoplasma.

3.3 Extração proteica

Foi utilizada uma suspensão de 4 x 10⁶ células em PBS, incubadas com os reagentes de extração citoplasmática I e II (CER I e CER II) do kit Thermo Scientific™ NE-PER™ e centrifugadas, de acordo com as instruções do fabricante. Ao final do processo, o sobrenadante (extrato proteico) foi isolado para posterior incubação com os aptâmeros D4 e R4.

3.4 Imunoprecipitação de proteínas com os aptâmeros D4 e R4

Para a imunoprecipitação foram utilizadas *beads* magnéticas Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1 (Invitrogen). As *beads* foram lavadas com tampão de lavagem, acopladas a uma solução com aptâmeros a 2 μ M e água DEPC, e incubadas com o extrato proteico em uma solução tampão contendo PBS 0,01 M, MgCl₂ 5 mM e Glicose 25 mM, por 1h a 37°C. Ao final do processo, o sobrenadante foi isolado para separar as proteínas alvo dos aptâmeros e *beads*.

3.5 Quantificação proteica

Foi preparada uma série de diluições de albumina de soro bovino (BSA) para obtenção de uma curva padrão. As amostras padrão e de proteínas alvo foram adicionadas, em uma microplaca, aos reagentes do kit Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay, de acordo com as instruções do fabricante, incubadas a 60°C por 1 hora e lidas no espectrofotômetro a 562nm.

3.6 Espectrometria de massas

Para as análises de espectrometria de massas as proteínas precipitadas foram tratadas com surfactante Rapigest SF 0,2%, reduzidas com ditioneitol (DTT) 100 mM por 45 minutos a 60°C e alcalinizadas com iodocetamida (IAA) 300 mM por 30 minutos no escuro. A solução de proteínas foi, então, digerida *overnight* com tripsina 1:100 a 37°C. A digestão foi interrompida com ácido trifluoroacético (TFA) 0,5% por 30 minutos a 37°C. Os peptídeos resultantes foram purificados e concentrados com auxílio de ponteiros do tipo *ZipTip*, de acordo com as instruções do fabricante.

Os peptídeos purificados foram ressuspensos em ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%. Essa solução foi filtrada e injetada por infusão direta através de um cromatógrafo líquido (Agilent, modelo Infinity 1260) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução tipo Q-TOF com fonte de ionização por electrospray (IES) (Agilent, modelo 6520B).

Os dados adquiridos foram analisados pelo programa *Spectrum Mill MS Proteomics Workbench* (Agilent Technologies) utilizando o banco de dados de proteínas *Human Uniprot* para a identificação das proteínas presentes nas amostras.

Para identificar quais proteínas poderiam ser consideradas como possíveis alvo do aptâmero, foram estabelecidos alguns critérios, como localização na membrana plasmática ou região extracelular, pontuação maior que 2 para o *Distinct Summed MS/MS Search*. Para identificar contaminantes comumente encontrados nesse tipo de análise com a linhagem celular PC-3, foi utilizado o repositório CRAPome, onde foram considerados apenas as proteínas com menos de 10% de aparição na base de dados.

3.7 Análise *in silico*

As proteínas consideradas ADAM30 (AlphaFold: AF-Q8TBZ7-F1), VNN2 (AlphaFold: AF-J3KQ55-F1), DLGAP4 (AlphaFold: AF-A0A087X246-F1), DNAH10OS (AlphaFold: AF-P0CZ25-F1), MUC6 (AlphaFold: AF-A0A0G2JN42-F1), TMPRSS13 (AlphaFold: AF-Q9BYE2-F1), WDR13 (AlphaFold: AF-B2RBN3-F1), HLA-DMB (AlphaFold: AF-B4DVC2-F1), NXPE2 (AlphaFold: AF-Q96DL1-F1) tiveram suas estruturas preparadas pelo programa AutoDock Tools (version 1.5.7) para retirar as moléculas de água e adicionar hidrogênios polares e cargas de Kollman (Forli *et al.*, 2016). As cadeias proteicas foram renomeadas através do programa UCSF Chimera (version 1.15) (Pettersen *et al.*, 2004).

A simulação de ancoragem das diferentes conformações estruturais terciárias das moléculas dos aptâmeros D4 e R4, geradas previamente através do servidor *RNA Composer e Discovery Studio Visualizer* às possíveis proteínas alvo foi realizada através do servidor online HDock (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) (Yan *et al.*, 2017) e visualizadas pelo RasMol (Windows version 2.7.5.2) (Sayle; Milner-White, 1995). Os complexos mais estáveis foram identificados através da menor de energia de ligação e considerados os prováveis alvos do aptâmero. O programa NUCPLOT (Luscombe *et al.*, 1997) e DIMPLOT (Roman; Mark, 2011) foram utilizados para identificação de resíduos que interagem com as proteínas. As ligações não covalentes foram identificadas pelo algoritmo *Protein-Ligand Interaction Profiler* (PLIP) (Adasme *et al.*, 2021).

4 RESULTADOS

Foram obtidos aproximadamente 203 µg/mL de proteínas em cada um dos 3 isolamentos utilizando o aptâmero D4 e aproximadamente 229 µg/mL em cada um dos 3 isolamentos utilizando o aptâmero R4. O espectro de peptídeos provenientes das proteínas isoladas estão detalhados nas tabelas 1 e 2. Foram detectadas 51 proteínas a partir dos precipitados, sendo 12 proteínas pertencentes ao espectro do aptâmero D4, 24 proteínas no espectro do R4 e 15 proteínas em ambos os espectros (Figura 2).

Tabela 1 - Resultado da análise da espectrometria de massas para as proteínas precipitadas com o aptâmero D4

Grupo	Sub grupo	Espectro	Peptídeos distintos	Pontuação de pesquisa MS/MS distinta somada	% Cobertura de amino ácido	Intensidade total do espectro proteico	Massa molecular das proteínas (Da)	Acesso à database
1	1.1	29	14	133.98	27.6	9.77E+05	66222.7	H6VRF8
2	1.2	5	2	15.68	4.7	1.63E+05	53703.3	P05787
3	2.1	24	12	133.4	32.5	9.58E+05	62291.5	P35527
4	3.1	18	8	79.57	24	4.98E+05	44105.2	P08727
5	4.1	12	8	47.86	52.7	2.02E+05	17259.4	A4D1U3
6	5.1	14	5	44.64	8.2	1.41E+06	71222.2	A0A0C4D GB6
7	6.1	10	4	30.93	17.7	3.30E+05	34426.5	A0A2R8Y7 93
8	7.1	2	2	12.68	3.6	2.34E+04	70531.2	B3KXU8
9	8.1	3	2	12.16	21	2.49E+04	17170.1	A0A024QY X3

Grupo	Sub grupo	Espectro	Peptídeos distintos	Pontuação de pesquisa MS/MS distinta somada	% Cobertura de amino ácido	Intensidade total do espectro proteico	Massa molecular das proteínas (Da)	Acesso à database
10	9.1	2	2	11.97	22	3.04E+04	16965.4	A0A590UK 56
11	10.1	2	2	10.97	22.5	1.64E+04	16077.2	B4E2A3
12	11.1	3	2	9.68	4.1	2.92E+04	53638.2	A8K4H1
13	12.1	1	1	5.53	14.1	1.13E+04	12110.7	B4DVC2
14	13.1	1	1	5.52	1.5	8.92E+03	59054.3	P13645
15	14.1	1	1	5.17	2.6	4.22E+03	58610.5	B3KM80
16	15.1	2	1	5.02	0.5	2.43E+05	629603.7	Q09666
17	16.1	1	1	4.74	4.8	6.23E+04	21429.7	J3QRE9
18	17.1	1	1	4.32	7.9	3.19E+03	30659.7	A0A384NL 53
19	18.1	1	1	4.02	13.2	1.38E+04	25080.9	J3KQ55
20	19.1	1	1	4.01	0.7	1.54E+06	249437.6	Q5D862
21	20.1	2	1	3.78	16.6	5.69E+05	11006.1	A0A2Y9C YF9
22	21.1	1	1	3.7	4.7	9.97E+03	14395.1	P53999
23	22.1	1	1	3.54	8	1.10E+06	16755.8	H0YNM7
24	23.1	1	1	3.29	5.1	1.11E+05	23539.6	B4DRV9

Grupo	Sub grupo	Espectro	Peptídeos distintos	Pontuação de pesquisa MS/MS distinta somada	% Cobertura de amino ácido	Intensidade total do espectro proteico	Massa molecular das proteínas (Da)	Acesso à database
25	24.1	1	1	3.21	0.6	8.57E+05	96565.7	A0A0A0M SY6
26	25.1	1	1	3.03	2	2.01E+05	91449.8	Q8TBZ7
27	26.1	1	1	2.99	1	5.23E+04	165665	A0A1C9J73 2
28	27.1	1	1	2.69	0.2	2.13E+04	321432.1	Q6AI22
29	28.1	1	1	2.53	1.4	5.26E+04	65641.8	Q96DL1
30	29.1	1	1	2.49	0.7	1.96E+04	274501.4	D3DWB6
31	30.1	1	1	2.27	16.3	2.01E+05	12009.6	C9JMM4
32	31.1	1	1	2.16	16.3	8.73E+04	13690.1	A0A5C2G9 M0
33	32.1	1	1	1.79	2.1	1.22E+04	31661.6	A0A0J9YX 90
34	33.1	1	1	1.71	19.2	2.75E+04	5866.9	A9UJN3
35	34.1	1	1	1.44	2.6	3.45E+04	91037.6	A0A024RB K8
36	35.1	1	1	0.78	1.9	2.45E+04	60668.6	A0A024QZ 33
37	36.1	1	1	0.53	2.5	1.44E+05	105351.9	Q99558

Tabela 2 - Resultado da análise da espectrometria de massas para as proteínas precipitadas com o aptâmero R4

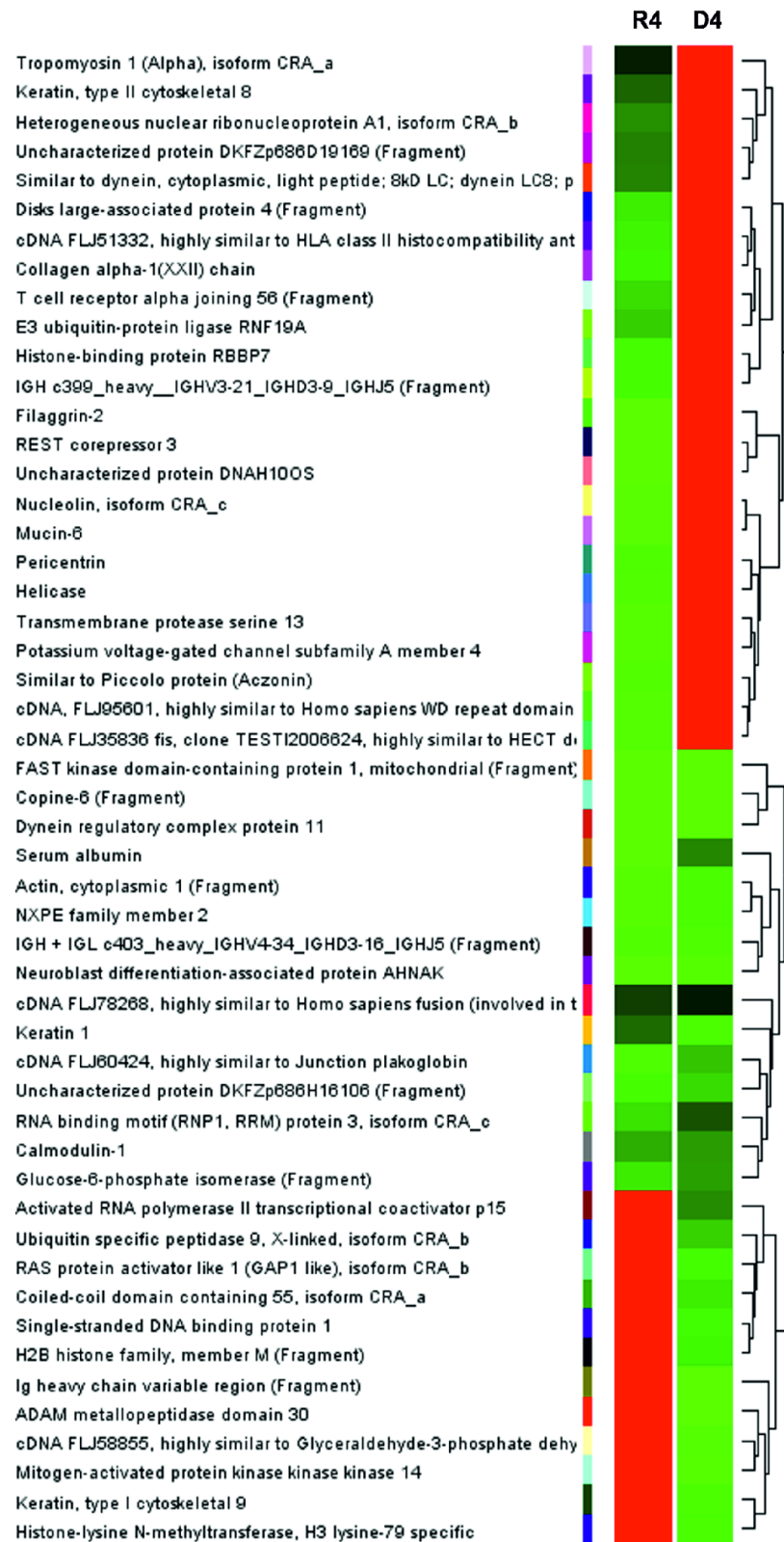
Grupo	Sub grupo	Espectro	Peptídeos distintos	Pontuação de pesquisa MS/MS distinta somada	% Cobertura de amino ácido	Intensidade total do espectro proteico	Massa molecular das proteínas (Da)	Acesso à database
1	1.1	25	14	130.31	34.7	1.08E+06	44105.2	P08727
2	2.1	27	12	105.22	24.4	9.21E+05	58610.5	B3KM80
3	3.1	19	6	55.8	8.2	3.24E+06	71222.2	A0A0C4D GB6
4	4.1	9	3	34.91	17.6	3.03E+05	42360.1	H0Y449
5	5.1	12	4	33.31	17.7	5.19E+05	34426.5	A0A2R8Y7 93
6	6.1	8	4	33.27	6.2	1.52E+05	66222.7	H6VRF8
7	7.1	4	4	24.09	9.3	3.67E+04	53638.2	A8K4H1
8	8.1	4	3	20.91	26.6	1.12E+05	16965.4	A0A590UK 56
9	9.1	4	2	17.37	21	6.53E+04	17170.1	A0A024QY X3
10	10.1	3	2	15.91	4.7	2.36E+04	53703.3	P05787
11	11.1	4	2	13.75	3.6	4.43E+04	70531.2	B3KXU8
12	12.1	2	2	13.72	3.5	1.46E+04	59054.3	P13645
13	13.1	3	2	11.31	4	2.69E+04	62291.5	P35527

Grupo	Sub grupo	Espectro	Peptídeos distintos	Pontuação de pesquisa MS/MS distinta somada	% Cobertura de amino ácido	Intensidade total do espectro proteico	Massa molecular das proteínas (Da)	Acesso à database
14	14.1	1	1	8.06	13.4	4.91E+03	11504.1	K7EJ44
15	15.1	1	1	7.76	7.7	8.23E+03	16077.2	B4E2A3
16	16.1	2	1	6.54	4.3	1.34E+04	35122	B4DMY3
17	17.1	1	1	6.34	13.4	8.91E+03	11232.5	Q6MZP9
18	18.1	2	1	5.97	16.3	9.95E+05	12009.6	C9JMM4
19	19.1	2	1	5.06	0.5	3.47E+05	629603.7	Q09666
20	20.1	1	1	4.83	2.6	2.36E+06	42144.3	B4DV59
21	21.1	1	1	4.8	8	2.36E+06	16755.8	H0YNM7
22	22.1	1	1	4.73	4.3	1.05E+04	38860.1	A0A024RA Z7
23	23.1	1	1	4.56	4.9	2.85E+03	32734.1	A0A024R5 W6
24	24.1	1	1	4.33	0.6	1.42E+06	96565.7	A0A0A0M SY6
25	25.1	1	1	4.14	3.2	1.18E+05	54262.7	B2RBN3
26	26.1	1	1	4	18.4	2.41E+04	14055.1	A0A087X2 46
27	27.1	1	1	3.87	1.8	1.46E+05	64250	Q9BYE2

Grupo	Sub grupo	Espectro	Peptídeos distintos	Pontuação de pesquisa MS/MS distinta somada	% Cobertura de amino ácido	Intensidade total do espectro proteico	Massa molecular das proteínas (Da)	Acesso à database
28	28.1	1	1	3.74	16.3	9.70E+04	13690.1	A0A5C2G9 M0
29	29.1	1	1	3.71	38	2.17E+04	2223.6	A0A075B6 Z2
30	30.1	1	1	3.61	0.2	3.76E+04	321432.1	Q6AI22
31	31.1	1	1	3.58	1	1.15E+05	55414.7	B3KSA4
32	32.1	1	1	3.54	14.1	2.57E+04	12110.7	B4DVC2
33	33.1	1	1	3.51	11	2.29E+06	17993	P0CZ25
34	34.1	1	1	3.45	0.2	1.10E+05	411895.6	A4D1A8
35	35.1	1	1	3.17	0.7	3.41E+06	249437.6	Q5D862
36	36.1	1	1	3.1	2.1	2.39E+04	31661.6	A0A0J9YX 90
37	37.1	1	1	2.74	1.4	1.60E+05	65641.8	Q96DL1
38	38.1	1	1	2.72	1.3	1.77E+05	263306.4	A0A0G2JN 42
39	39.1	1	1	2.7	7.4	3.61E+04	47279.6	E9PC52
40	40.1	1	1	1.51	1.9	1.31E+05	74111.8	P22459
41	41.1	1	1	1.48	0.4	8.39E+04	380826.2	O95613

Grupo	Sub grupo	Espectro	Peptídeos distintos	Pontuação de pesquisa MS/MS distinta somada	% Cobertura de amino ácido	Intensidade total do espectro proteico	Massa molecular das proteínas (Da)	Acesso à database
42	42.1	1	1	1.44	32.2	3.92E+04	13597	A0A5C2G6 15
43	43.1	1	1	1.18	1.4	2.67E+04	162169.4	Q8NFW1
44	44.1	1	1	1.13	4.7	9.32E+03	33054.5	A4D1D1
45	45.1	1	1	0.81	1.9	9.56E+04	94099.8	A0A126LB 09
46	46.1	1	1	0.07	3.1	1.93E+04	92691.7	Q9NV58

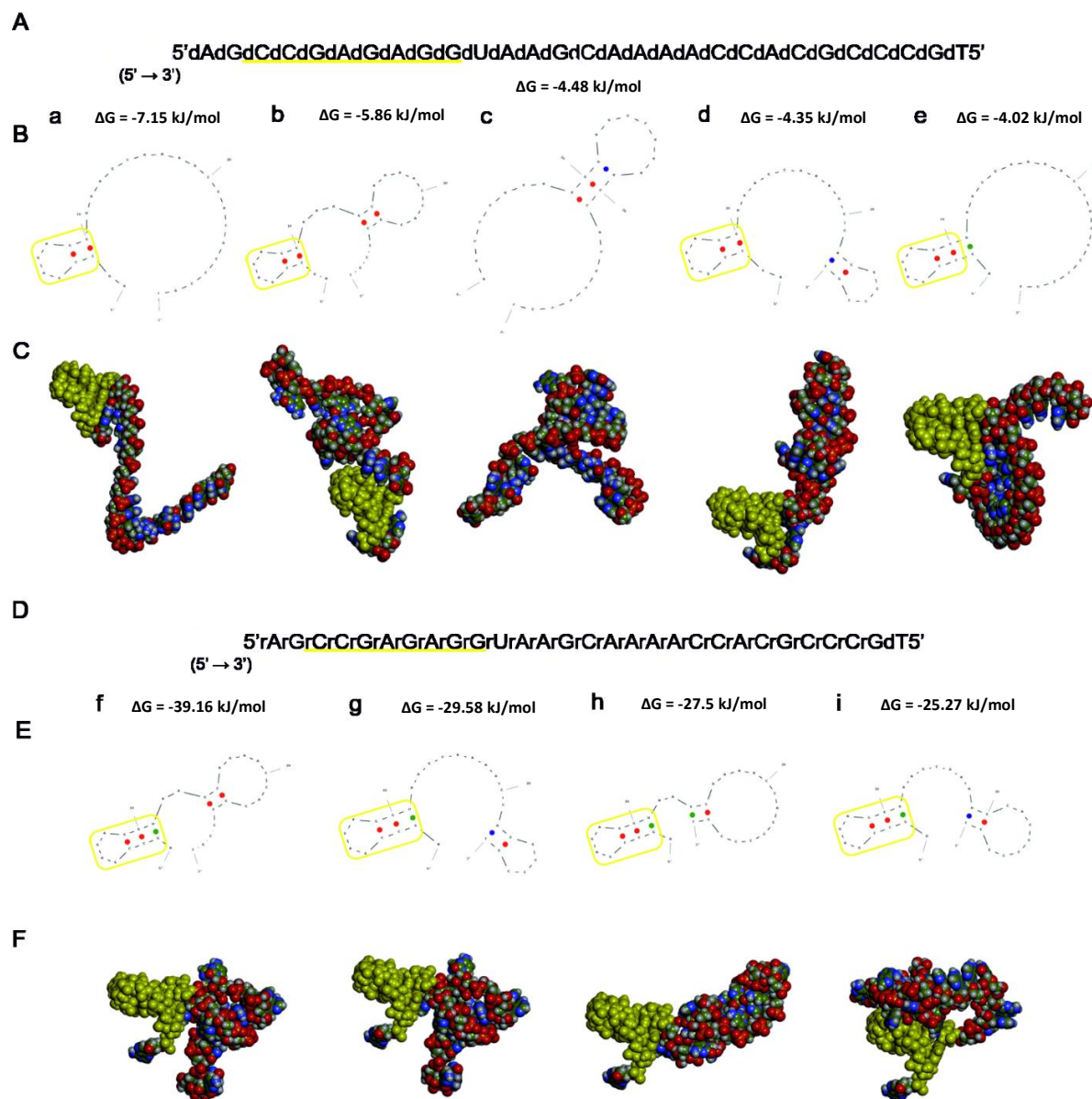
Figura 2 - Heatmap baseado na espectrometria de massas



Legenda: Os retângulos indicam a abundância das proteínas de verde escuro (alta abundância) à vermelho (ausência).

As proteínas *A disintegrin and metalloproteinase domain 30* (ADAM30 – Uniprot: Q8TBZ7), *Vanin 2* (VNN2 – Uniprot: J3KQ55) e *Disks large-associated protein 4* (DLGAP4 – Uniprot: A0A087X246) do espectro D4 foram as proteínas que atenderam aos critérios de serem localizadas na membrana ou região extracelular, possuírem uma pontuação acima de 2 no *Distinct Summed MS/MS Search Score* e aparecer em menos de 10% como possível contaminante no repositório CRAPome. Já para o espectro do R4, as proteínas selecionadas foram *Dynein axonemal heavy chain 10 opposite strand* (DNAH10OS – Uniprot: P0CZ25), *Mucin 6* (MUC6 – Uniprot: A0A0G2JN42), *Transmembrane protease serine 13* (TMPRSS13 – Uniprot: Q9BYE2) e *WD repeat domain 13* (WDR13 – Uniprot: B2RBN3). Para ambos os espectros, as proteínas *Major histocompatibility complex, class II, DM beta* (HLA-DMB – Uniprot: B4DVC2) e *Neurexophilin e PC-esterase domain family member 2* (NXPE2 – Uniprot: Q96DL1) foram as que mais se adequaram aos critérios.

Os aptâmeros utilizados possuem diferentes conformações estruturais mais estáveis energeticamente. Portanto, para o *docking* molecular foram utilizadas 5 conformações estruturais do D4 (a, b, c, d, e) e 4 conformações do R4 (f, g, h, i) (Figura 3).

Figura 3 - Estruturas *in silico* dos aptâmeros

Legenda: Imagem adaptada de Campos-Fernández (2022). **A, B, C** correspondem ao aptâmero D4: sequência, estruturas 2D mais estáveis (a, b, c, d, e) e estruturas 3D, respectivamente. **D, E, F** correspondem ao aptâmero R4: sequência, estruturas 2D mais estáveis (f, g, h, i) e estruturas 3D, respectivamente. Os retângulos amarelos nas estruturas 2D indicam os sítios de ligação das moléculas.

A seleção das proteínas e realização do *docking* molecular utilizando o servidor HDock, revelou a pontuação dos complexos aptâmero-proteína mais estáveis, sendo eles proteína NXPE2 com o aptâmero D4 na conformação C, proteína MUC6 com o aptâmero R4 na conformação I, ADAM30 e D4 na conformação E, e NXPE2 com R4 na conformação F (Tabela 3).

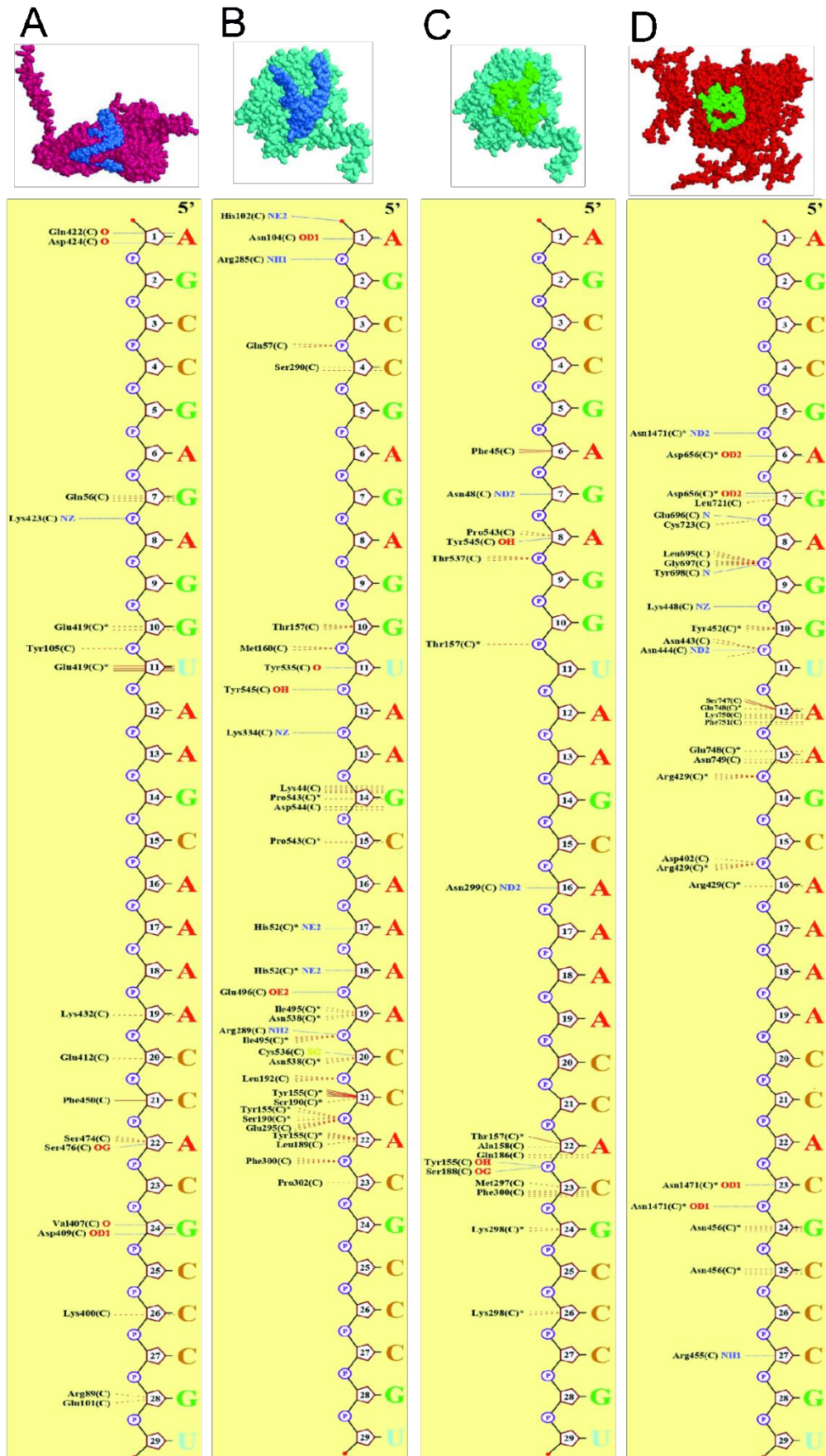
Tabela 3 - Pontuação de energia obtida no *docking* molecular entre as diferentes conformações dos aptâmeros D4 e R4 e as possíveis proteínas alvo

	D4					R4			
	a	b	c	d	e	f	g	h	i
ADAM30	-334.06	-327.46	-330.29	-332.16	-346.68	-	-	-	-
VNN2	-333.21	-264.38	-319.56	-269.54	-290.27	-	-	-	-
DLGAP4	-239.45	-208.34	-242.67	-210.07	-229.56	-	-	-	-
HLA-DMB	-295.99	-281.88	-348.44	-310.39	-335.94	-313.18	-313.18	292.81	-299.01
NXPE2	-322.31	-292.23	-386.9	-321.99	-320.55	-320.72	-320.72	-286.01	-306.06
DNAH10OS	-	-	-	-	-	-301.9	-301.9	-299.61	-290.14
MUC6	-	-	-	-	-	-329.75	-329.75	-333.4	-358.67
TMPRSS13	-	-	-	-	-	-319.63	-319.63	-313.15	-335.54
WDR13	-	-	-	-	-	-318.08	-318.08	-309.18	-295

Legenda: Os valores em negrito representam as melhores pontuações.

Os 4 complexos com melhor pontuação apresentam vários tipos de interação entre os aminoácidos e nucleotídeos (Figura 4). Em A, está representado a interação do aptâmero **D4** na conformação **e** (molécula em azul) com a proteína **ADAM30** (molécula em roxo) e abaixo está a representação de suas interações. Em B, observamos o aptâmero **D4** na conformação **c** (azul) com a proteína **NXPE2** (azul claro) e suas interações. Em C, se encontra o aptâmero **R4** na conformação **f** (verde claro) com a proteína **NXPE2** (azul claro) e suas interações. Em D, está o aptâmero **R4** na conformação **i** (verde claro) com a proteína **MUC6** (vermelho).

Figura 4 - Representação dos melhores complexos aptâmero-proteína



Legenda: **A.** ADAM30-D4e, **B.** NXPE2-D4c, **C.** NXPE2-R4f, **D.** MUC6-R4i. As imagens dos complexos foram geradas pelo RasMol e a representação diagramática das interações pelo NUCPLOT. A estrutura em azul representa o aptâmero D4, e a estrutura verde claro, o aptâmero R4. Roxo representa a proteína ADAM30; azul claro, NXPE2 e vermelho, MUC6. As linhas pontilhadas azuis representam as ligações de hidrogênio e as vermelhas representam contatos não ligados.

As interações entre aptâmero-proteína foram identificadas pelo programa PLIP, sendo 20 ligações de hidrogênio e 2 pontes salinas entre o complexo ADAM30-D4e (Tabela 4), 27 ligações de hidrogênio, 1 interação do tipo empilhamento π , 2 interações cátion π e 7 pontes salinas entre o complexo NXPE2-D4c (Tabela 5). Para o complexo NXPE2-R4f as interações identificadas foram 16 ligações de hidrogênio (Tabela 6) e para o complexo MUC6-R4i, 25 ligações de hidrogênio e 7 pontes salinas (Tabela 7).

Tabela 4 - Interações entre as moléculas do complexo ADAM30-D4e geradas no PLIP

Ligações de hidrogênio	Resíduos	Amino ácidos	Distância H-A	Distância D-A	Ângulo do doador
1	56C	GLN	3.00	3.57	118.43
2	56C	GLN	2.64	3.59	163.67
3	89C	ARG	2.61	3.46	143.74
4	105C	TYR	2.19	3.13	162.33
5	105C	TYR	3.49	3.92	110.84
6	287C	ARG	3.06	4.03	167.36
7	400C	LYS	2.45	3.40	154.67
8	400C	LYS	3.26	4.06	138.69
9	409C	ASP	2.40	2.84	108.31
10	419C	GLU	2.63	3.53	161.76
11	419C	GLU	2.80	3.53	131.12
12	419C	GLU	2.79	3.49	128.24

Ligações de hidrogênio	Resíduos	Amino ácidos	Distância H-A	Distância D-A	Ângulo do doador
13	422C	GLN	2.78	3.47	127.48
14	424C	ASP	2.02	2.71	125.41
15	432C	LYS	2.78	3.65	142.71
16	432C	LYS	2.21	3.11	150.25
17	432C	LYS	2.64	3.46	141.29
18	474C	SER	3.00	3.57	118.86
19	476C	SER	2.36	3.23	148.78
20	476C	SER	3.69	4.02	102.67
Ponte Salina	Resíduo	Amino ácido	Distância	Grupo ligante	
1	409C	ASP	4.57	Guanidina	
2	423C	LYS	3.30	Fosfato	

Legenda: **H.** átomo de hidrogênio, **A.** átomo aceitante; **D.** átomo doador.

Tabela 5 - Interações entre as moléculas do complexo NXPE2-D4c geradas no PLIP

Ligações de hidrogênio	Resíduos	Amino ácidos	Distância H-A	Distância D-A	Ângulo do doador
1	41C	ASP	2.92	3.87	167.37
2	44C	LYS	2.66	3.65	163.37
3	48C	ASN	3.46	3.85	106.31
4	57C	GLN	2.73	3.20	109.66
5	104C	ASN	1.68	2.50	137.70

Ligações de hidrogênio	Resíduos	Amino ácidos	Distância H-A	Distância D-A	Ângulo do doador
6	104C	ASN	2.95	3.60	125.03
7	188C	SER	2.52	3.37	145.18
8	190C	SER	3.55	3.90	104.00
9	285C	ARG	3.37	3.89	114.71
10	285C	ARG	3.50	3.98	113.44
11	288C	HIS	3.35	3.98	125.24
12	290C	SER	3.22	3.99	136.80
13	290C	SER	2.64	3.10	108.74
14	290C	SER	3.37	4.10	133.87
15	291C	ASN	2.98	3.70	131.58
16	295C	GLU	1.40	2.36	169.83
17	300C	PHE	3.39	3.74	103.19
18	334C	LYS	3.05	3.45	106.24
19	495C	ILE	2.26	3.23	167.75
20	496C	GLU	2.98	3.39	105.93
21	496C	GLU	3.54	4.04	114.77
22	535C	TYR	1.79	2.23	104.04
23	537C	THR	2.74	3.41	125.60
24	538C	ASN	2.82	3.74	155.62
25	539C	ASN	3.51	3.95	109.79
26	544C	ASP	2.18	3.09	152.91

Ligações de hidrogênio	Resíduos	Amino ácidos	Distância H-A	Distância D-A		Ângulo do doador
27	545C	TYR	2.56	3.34		140.15
Interação empilhamento π	Resíduo	Amino ácido	Distancia	Ângulo	Desvio	Tipo de empilhamento
1	288C	HIS	3.98	21.66	1.05	P
Interação cátion π		Resíduo	Amino ácido	Distância	Desvio	Grupo ligante
1		44C	LYS	3.05	0.73	Aromático
2		378C	LYS	5.16	1.62	Aromático
Ponte salina		Resíduo	Amino ácido	Distância	Grupo ligante	
1		41C	ASP	4.44	Guanidina	
2		285C	ARG	2.84	Fosfato	
3		289C	ARG	3.19	Fosfato	
4		334C	LYS	3.74	Fosfato	
5		334C	LYS	4.63	Fosfato	
6		334C	LYS	5.30	Fosfato	
7		544C	ASP	5.23	Guanidina	

Legenda: **H.** átomo de hidrogênio, **A.** átomo aceitante; **D.** átomo doador, **P.** paralelo.

Tabela 6 - Interações entre as moléculas do complexo NXPE2-R4f geradas no PLIP

Ligações de hidrogênio	Resíduos	Amino ácidos	Distância H-A	Distância D-A	Ângulo do doador
1	104C	ASN	3.38	3.87	113.30

Ligações de hidrogênio	Resíduos	Amino ácidos	Distância H-A	Distância D-A	Ângulo do doador
2	104C	ASN	2.80	3.52	131.42
3	155C	TYR	2.08	2.88	141.62
4	157C	THR	2.48	3.16	126.67
5	157C	THR	2.59	3.16	117.15
6	158C	ALA	3.14	3.95	139.86
7	188C	SER	1.56	2.51	164.16
8	291C	ASN	2.83	3.25	107.04
9	291C	ASN	1.81	2.27	105.39
10	297C	MET	2.81	3.26	109.54
11	298C	LYS	3.32	3.87	115.52
12	299C	ASN	2.45	2.89	107.01
13	299C	ASN	2.24	3.18	158.00
14	300C	PHE	2.80	3.72	155.92
15	545C	TYR	2.18	2.92	134.58
16	545C	TYR	2.35	2.92	116.86

Legenda: **H.** átomo de hidrogênio, **A.** átomo aceitante; **D.** átomo doador.

Tabela 7 - Interações entre as moléculas do complexo MUC6-R4i geradas no PLIP

Ligações de hidrogênio	Resíduos	Amino ácidos	Distância H-A	Distância D-A	Ângulo do doador
1	429C	ARG	3.42	3.92	113.46
2	431C	ASP	3.33	3.94	124.56

Ligações de hidrogênio	Resíduos	Amino ácidos	Distância H-A	Distância D-A	Ângulo do doador
3	443C	ASN	2.87	3.43	117.40
4	444C	ASN	2.12	2.97	142.93
5	446C	GLU	3.30	3.63	102.15
6	453C	LYS	2.72	3.37	125.66
7	454C	THR	2.91	3.59	128.45
8	455C	ARG	2.77	3.74	169.72
9	455C	ARG	1.43	2.33	150.13
10	456C	ASN	2.60	3.44	144.16
11	472C	SER	1.95	2.75	138.50
12	472C	SER	1.96	2.75	135.76
13	656C	ASP	2.60	3.55	161.63
14	695C	LEU	3.22	3.67	110.36
15	696C	GLU	2.21	2.87	122.67
16	697C	GLY	2.53	3.44	152.86
17	698C	TYR	1.25	2.24	177.59
18	720C	ARG	3.04	3.94	153.24
19	723C	CYS	2.81	3.50	127.69
20	748C	GLU	2.85	3.44	119.44
21	749C	ASN	2.74	3.28	114.63
22	750C	LYS	2.76	3.62	147.15
23	1471C	ASN	2.83	3.41	118.27

Ligações de hidrogênio	Resíduos	Amino ácidos	Distância H-A	Distância D-A	Ângulo do doador
24	1471C	ASN	2.42	3.31	149.76
25	1472C	GLN	3.19	3.97	137.55
Ponte salina	Resíduo	Amino ácido	Distância	Grupo ligante	
1	429C	ARG	5.37	Fosfato	
2	429C	ARG	3.78	Fosfato	
3	448C	LYS	3.56	Fosfato	
4	448C	LYS	4.50	Fosfato	
5	656C	ASP	3.91	Guanidina	
6	696C	GLU	4.77	Guanidina	
7	750C	LYS	5.26	Fosfato	

Legenda: **H.** átomo de hidrogênio, **A.** átomo aceitante; **D.** átomo doador.

5 DISCUSSÃO

Após precipitação e quantificação de proteínas da membrana de células tumorais da próstata ligantes aos aptâmeros D4 e R4, a análise dos dados adquiridos por espectrometria de massas mostrou 51 prováveis proteínas ligantes específicas aos aptâmeros, algumas presentes em somente um dos aptâmeros: D4 ou R4, mas outras proteínas apareceram como ligantes comuns dos dois aptâmeros estudados.

O estudo feito por *docking* molecular entre as diferentes conformações dos aptâmeros D4 e R4 e as possíveis proteínas alvo resultou em 3 prováveis proteínas alvo, MUC6 para o aptâmero R4, ADAM30 para o aptâmero D4 e NXPE2 como alvo em comum.

A proteína MUC6 pertence a classe das mucinas, glicoproteínas que compõem o muco protetor da mucosa gástrica, contudo um aumento exacerbado na expressão dessas glicoproteínas e diminuição da resposta imunológica está associado a formação de tumores (Battista *et al.*, 2021). Mutações somáticas em MUC6 foram encontradas em casos de nefroblastoma (Liu *et al.*, 2022). Nos cânceres invasivos de estômago, pâncreas, ducto biliar e pulmão é encontrado uma diminuição da expressão da MUC6, podendo ser utilizada com um marcador de prognóstico (Yamanoi *et al.* 2022). Em relação ao CaP, o gene MUC6 foi encontrado em análises de pacientes com CaP com histórico familiar e CaP agressivo, e relacionado com risco aumentado para CaP agressivo (Schaid *et al.*, 2021).

ADAM30 pertence à família de desintegrinas e metaloproteases, proteínas transmembrana, algumas com função de clivar proteínas da superfície celular outras com função de proteínas de adesão ou receptores. Tais moléculas tem função no sistema nervoso e ADAM30 é considerada um potencial alvo terapêutico para doença de Alzheimer. Porém trata-se de uma molécula pouco estudada (Hsia *et al.*, 2019). As ADAM's também são relacionadas com progressão e crescimento tumoral em alguns tipos de câncer como câncer de mama, colorretal, gástrico, pancreático, renal, pulmonar e melanoma. (Ao *et al.*, 2022).

Apesar de não ter função definida (Pochitaloff *et al.*, 2022), a proteína NXPE2 é expressa uniformemente em células germinativas no testículo e tem uma maior expressão no epidídimo (Vandenbrouck *et al.*, 2020). Essa proteína é associada a doença de Chron, colite ulcerativa e doença inflamatória intestinal, além de estar sendo sugerida como indicador de câncer gástrico difuso de alto risco por promover proliferação e migração celular favorecendo a metástase (Kim *et al.*, 2020).

Os complexos proteína-ácido nucleico fazem parte de processos essenciais como a regulação gênica, transcrição, translação, reparo de DNA, replicação e recombinação. As interações eletrostáticas (pontes salinas) entre essas moléculas acontecem por pares de íons entre os grupamentos fosfato dos ácidos nucleicos e as cadeias laterais das proteínas. Em condições fisiológicas de pH, as cadeias laterais de arginina e lisina estão positivamente carregadas favorecendo interações eletrostáticas com os ácidos nucleicos negativamente carregados. Além disso, a arginina é mais propensa a formar ligações de hidrogênio do que a lisina. Ademais, pontes de hidrogênio entre arginina e guanina são as interações proteína-DNA/RNA consideradas mais comuns (Yu; Pettitt; Iwahara, 2020).

Interações cátion π entre anéis aromáticos dos nucleotídeos e as cadeias laterais de arginina e são mais estáveis e comuns do que com lisina (Yu; Pettitt; Iwahara, 2020). Essas interações também ocorrem com cadeias laterais parcialmente carregadas como asparagina ou glutamina, e são consideradas a fonte de reconhecimento da interação de proteínas com ligantes. Interações cátion π juntamente com as interações de empilhamento π e ligações de hidrogênio, são interações determinantes da ligação de proteínas ao ATP (Sathyapriya; Vishveshwara, 2004).

As cadeias laterais básicas apresentam importantes funções nas ligações de hidrogênio e nas interações eletrostáticas com os fosfatos da molécula de DNA. Porém as propriedades dinâmicas e de entropia dessas cadeias laterais ainda não foram muito estudadas e compreendidas. Portanto, o reconhecimento dos ácidos nucleicos pelas proteínas e suas diversas interações ainda não é completamente conhecido (Esadze *et al.* 2016; Nguyen *et al.* 2019).

Conhecer as interações entre os aptâmeros e seu(s) alvo(s) pode auxiliar na otimização qualitativa dessas interações em futuros estudos. Padroni *et al.* (2020) sugere que a otimização focada em interações do tipo ligação de hidrogênio e cátion π são mais efetivas e podem melhorar as funções de pontuação do *docking* molecular.

O resultado da espectrometria de massas revelou uma grande possibilidade de proteínas alvo para os aptâmeros, o que indica que pode ter ocorrido ligação inespecífica. Portanto, será importante validar a especificidade de ligação dos aptâmeros D4 e R4 e tentar otimizá-los, caso seja necessário. Assim, seria possível aprimorar sua atuação no reconhecimento de células tumorais circulantes (CTCs) de pacientes com CaP na plataforma diagnóstica desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa GEP-MMol e a possibilidade de utilizá-la futuramente para auxiliar o diagnóstico do CaP (Patente BR 10 2020 013625 9).

6 CONCLUSÃO

O estudo contribuiu para o avanço no conhecimento dos aptâmeros D4 e R4, ligantes das células tumorais da próstata, indicando suas possíveis proteínas alvo e a forma como essas proteínas interagem com os aptâmeros, através da purificação das proteínas alvo por aptaprecipitação, identificação por espectrometria de massas e análise *in silico* por *docking* molecular. Entretanto, as proteínas MUC6, ADAM30 e NXPE2 precisarão ser validadas e avaliadas, além de terem suas funções no CaP reveladas para que possam ser consideradas biomarcadores. A avaliação de especificidade de ligação dos aptâmeros também será importante para um melhor conhecimento da capacidade dessas moléculas se tornarem ferramentas diagnósticas e prognósticas.

7 REFERÊNCIAS

- ADASME, M. F. *et al.* PLIP 2021: Expanding the Scope of the Protein–Ligand Interaction Profiler to DNA and RNA. **Nucleic acids research**, v. 49, n. W1, p. W530-W534, 2021.
- AO, T.; MOCHIZUKI, S.; KAJIWARA Y. *et al.* Cancer-associated Fibroblasts at the Unfavorable Desmoplastic Stroma Promote Colorectal Cancer Aggressiveness: Potential role of ADAM9. **International Journal of Cancer**, v. 150, n. 10, p. 1706-1721, 2022.
- BANCROFT, E. K.; RAGHALLAIGH, H. N.; PAGE, E. C.; *et al.* Updates in Prostate Cancer Research and Screening in Men at Genetically Higher Risk. **Current Genetic Medicine Reports**, v. 9, n. 4, p. 47-58, 2021.
- BATTISTA, S.; AMBROSIO, M. R.; LIMARZI, F. *et al.* Molecular alterations in Gastric Preneoplastic Lesions and Early Gastric Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 6652, 2021.
- BERGENGREN, O; PEKALA, K. R.; MATSOUKAS K.; *et al.* 2022 Update on Prostate Cancer Epidemiology and Risk Factors – A Systematic Review. **European Urology**, v. 84, n. 2, p. 191-206, 2023.
- BING, T.; ZHANG, N.; SHANGGUAN, D. Cell-SELEX, an Effective Way to the Discovery of Biomarkers and Unexpected Molecular Events. **Advanced Biosystems**, v. 3, n. 12, p. 1–13, 2019.
- BLACKWELDER, R.; CHESSMAN, A. Prostate Cancer Screening: Shared Decision-Making for Screening and Treatment. **Primary Care - Clinics in Office Practice**, v. 46, n. 1, p. 149–155, 2019.
- CAMPOS-FERNÁNDEZ, E.. **Caracterização dos aptâmeros D4 e R4 como ferramentas teranósticas no câncer de próstata**. 2022. 166 f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2022. Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2022.5048>. Acesso em: 15 nov. 2023
- CAMPOS-FERNÁNDEZ, E.; BARCELOS, L. S.; SOUZA, A. G.; *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, 2020.
- ELLINGTON, A. D.; SZOSTAK, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. **Nature**, v. 346, n. 6287, p. 818–822, 1990.
- ESADZE, Alexandre *et al.* Changes in Conformational Dynamics of Basic Side Chains Upon Protein–DNA Association. **Nucleic acids research**, v. 44, n. 14, p. 6961-6970, 2016.
- FORLI, S.; HUEY, R.; PIQUE, M. E.; *et al.* Computational Protein-Ligand Docking and Virtual Drug Screening with Autodock Suite. **Nature Protocols**, v. 11, n. 5, p. 905-919, 2016.
- GOULART, L. R.; ALONSO-GOULART, V.; A.G. SOUZA, *et al.* Aptâmero modificado, sistema aptaimunológico, painel aptaimunológico, kit, método e uso no diagnóstico de câncer de próstata, BR 10 2020 013625 9, 2020.

HSIA, H.; TÛSHAUS, J.; BRUMMER, T. *et al.* Functions of ‘A disintegrin and metalloproteases (ADAMs)’ in the mammalian nervous system. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, p. 3055-3081, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2023: **Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf. Acesso em: 19 set. 2023.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH. Cancer Global cancer observatory: cancer today. Lyon, France, 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today>. Acesso em: 22 out. 2023.

KIM, S.; KIM, H.; PARK, J. *et al.* Identification of a Molecular Signature of Prognostic Subtypes in Diffuse-type Gastric Cancer. **Gastric Cancer**, v. 23, p. 473-482, 2020. LAFAGE-

KOHAAR, I.; PETROVICS, G.; SRIVASTAVA, S. A Rich Array of Prostate Cancer Molecular Biomarker: Opportunities and Challenges. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, p. 1813, 2019.

LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 10, p. 2778-2786, 2011.

LIU, B.; LIU, G.; ZHANG, B. *et al.* Tumor suppressive role of MUC6 in Wilms tumor via autophagy-dependent β -catenin degradation. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 756117, 2022.

LUSCOMBE, N. M.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. NUCPLOT: A Program to Generate Schematic Diagrams of Protein–Nucleic Acid Interactions. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 24, p. 4940-4945, 1997.

MAIMAITIYIMING, Y.; HONG, De F.; YANG, C.; *et al.* Novel insights into the role of aptamers in the fight against cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 145, n. 4, p. 797–810, 2019.

NGUYEN, D.; CHEN, C.; PETTITT, M. B.; *et al.* NMR Methods for Characterizing the Basic Side Chains of Proteins: Electrostatic Interactions, Hydrogen Bonds, and Conformational Dynamics. **Methods in enzymology**, v. 615, p. 285-332, 2019.

PADRONI, G.; PATWARDHAN, N. N.; SCHAPIRA, M. *et al.* Systematic Analysis of the Interactions Driving Small Molecule–RNA Recognition. **RSC Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 7, p. 802-813, 2020.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; *et al.* UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

POCHITALOFF, M.; GERBY, B.; BACCINI, V. *et al.* The CADM1 Tumor Suppressor Gene is a Major Candidate Gene in MDS with Deletion of the Long Arm of Chromosome 11. **Blood Advances**, v. 6, n. 2, p. 386-398, 2022.

SATHYAPRIYA, R.; VISHVESHWARA, S. Interaction of DNA with Clusters of Amino Acids in Proteins. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 14, p. 4109-4118, 2004.

SAYLE, R. A.; MILNER-WHITE, E. J. RASMOL: Biomolecular Graphics for All. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 20, n. 9, p. 374-376, 1995.

SCHAID, D. J.; MCDONNELL, S. K.; FITZGERLD, L. *et al.* Two-Stage Study of Familial Prostate Cancer by Whole-Exome Sequencing and Custom Capture Identifies 10 Novel Genes Associated with the Risk of Prostate Cancer. **European Urology**, v. 79, n. 3, p. 353-361, 2021.

SOUZA, A. G.; MARANGONI, K.; FUJIMURA, P. T.; *et al.* 3D Cell-SELEX: Development of RNA aptamers as molecular probes for PC-3 tumor cell line. **Experimental Cell Research**, v. 341, n. 2, p. 147–156, 2016.

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

VANDENBROUCK, Y.; PINEAU, C.; LANE, L. The Functionally Unannotated Proteome of Human Male Tissues: A Shared Resource to Uncover New Protein Functions Associated with Reproductive Biology. **Journal of proteome research**, v. 19, n. 12, p. 4782-4794, 2020.

YAMANOI, K.; FUJII, C.; KUMAZAWA, M. *et al.* MUC6 expression is a preferable prognostic marker for invasive mucinous adenocarcinoma of the lung. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 157, n. 6, p. 671-684, 2022.

YAN, Y.; ZHANG, D.; ZHOU, P.; *et al.* HDock: A Web Server for Protein–Protein and Protein–DNA/RNA Docking Based on a Hybrid Strategy. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W365-W373, 2017.

YU, B.; PETTITT, M.; IWAHARA, J. Dynamics of Ionic Interactions at Protein–Nucleic Acid Interfaces. **Accounts of Chemical Research**, v. 53, n. 9, p. 1802-1810, 2020.

YU, W.; ZHOU, L. Early Diagnosis of Prostate Cancer from the Perspective of Chinese Physicians. **Journal of Cancer**, v. 11, n. 11, p. 3264–3273, 2020.