

Aplicabilidade dos Aptâmeros de Oligonucleotídeos

Amanda G. da Silva & Adriana F. Neves

O campo tecnológico de aptâmeros apresenta crescimento devido à versatilidade destas moléculas conformacionais. Aptâmeros de ácido nucleicos são oligonucleotídeos que interagem com moléculas-alvo orgânicas ou inorgânicas e são utilizados em pesquisas biotecnológicas. O entendimento da seleção, características básicas e funcionais é fundamental para o desenvolvimento de novos materiais baseados nesses ligantes para uso na pesquisa e indústria biotecnológica. O presente trabalho aborda a tecnologia de aptâmeros de oligonucleotídeos nos aspectos teóricos e práticos. As abordagens pela química combinatória serão seguidas pela descrição das possíveis aplicações e finalmente a previsão conformacional das moléculas para avaliação como potencial aptâmero para um alvo.

Palavras-chave: *biotecnologia; oligonucleotídeos; química combinatória.*

The technology field of aptamers development shows growth due to versatility of these conformational nucleic acid molecules. Nucleic acid aptamers are oligonucleotides that interact with organic or inorganic target molecules and are used in biotechnological researches. The understanding of the selection, basic and functional characteristics is fundamental to develop new materials based on these potential ligands for use in biotechnological research and industry. The present work approaches the oligonucleotide aptamers technology in their theoretical and practical aspects. Approaches for combinatorial chemistry will be followed by the description of possible applications, and finally with conformational prediction of molecules to evaluation as a potential aptamer to a target.

Keywords: *biotechnology; oligonucleotide; combinatorial chemistry.*

Química Combinatória na Seleção de Aptâmeros

Baseada no princípio de produzir rapidamente muitos compostos químicos em pequena escala, a química combinatória é uma importante ferramenta desenvolvida por pesquisadores da indústria farmacêutica a fim de reduzir o tempo e os custos associados à produção de novos fármacos. Ela tem como característica a produção e pesquisa de grandes bibliotecas, para identificação de compostos e isolamento de moléculas funcionais¹. Os ácidos nucleicos são compostos atraentes para a química combinatória, pois formam estruturas terciárias bem definidas e podem ser amplificados por meio de síntese enzimática. Partindo do uso de bibliotecas combinatórias de oligonucleotídeos, o método SELEX (*Systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) permite a seleção, em larga escala, de ligantes específicos a uma molécula alvo. Estes ligantes que podem ser selecionados, *in vitro*, são oligonucleotídeos denominados aptâmeros².

Assim, os aptâmeros podem ser definidos como moléculas de DNA ou de RNA de fita simples que são selecionados para diferentes alvos, a partir de uma biblioteca de moléculas contendo sequências produzidas aleatoriamente³. A afinidade entre o aptâmero e o alvo pode ocorrer por interações entre compostos aromáticos e por pareamento de bases dos aptâmeros, interações de van der Waals, interações eletrostáticas entre grupos carregados ou ligações de hidrogênio⁴.

Além de tais interações, o aptâmero pode sofrer uma mudança conformacional adaptativa na presença do alvo. A capacidade de dobramento do aptâmero em uma estrutura tridimensional bem definida permite que este consiga circundar completamente substâncias pequenas, tais como íons, por meio de um sítio de ligação específico. Para compostos com alta massa molecular, como proteínas, diferentes estruturas da superfície do alvo podem estar envolvidas na interação com o aptâmero⁵.

VANTAGENS DA UTILIZAÇÃO DE APTÂMEROS

A capacidade de reconhecimento molecular dos

aptâmeros faz com sejam comparados aos anticorpos proteicos, utilizados nas rotinas de laboratórios clínicos para a detecção de doenças⁶. Os aptâmeros têm sido denominados como anticorpos de DNA, pois podem superar as desvantagens apresentadas pelas proteínas⁷, visto que apresentam uma ligação com maior especificidade e afinidade com o alvo e constantes de equilíbrio de dissociação (Kd) na faixa de nM a pM⁸.

Os anticorpos são produzidos contra proteínas imunogênicas, enquanto os aptâmeros podem ser selecionados contra uma ampla variedade de alvos, incluindo proteínas, íons ou células inteiras, sem nenhum risco de produzir uma resposta imune negativa². Assim, os aptâmeros possuem baixa imunogenicidade e toxicidade, uma vez que os ácidos nucleicos podem passar despercebidos pelo sistema imunológico humano como agentes estranhos⁸.

Outras propriedades destas moléculas de ácidos nucleicos estão em sua simples preparação que requer pouco tempo de fabricação, podendo ser quimicamente modificados para melhorar sua eficiência e reduzir sua degradação no ambiente celular e tecidual. Além disso, possuem estabilidade por serem moléculas termoestáveis, cuja conservação e transporte podem ocorrer em temperatura ambiente. Deste modo, estes ligantes apresentam grandes potenciais no desenvolvimento de ensaios rápidos e eficientes para diagnóstico, terapia, reconhecimento de patógenos e como biossensores^{9, 10}. Tais características contribuem para um baixo custo de produção, sendo este um importante diferencial para as indústrias farmacêuticas e biotecnológicas. A principal desvantagem dos aptâmeros é que eles podem ser atacados por nucleases celulares. No entanto, várias alterações químicas, tanto na estrutura do componente de açúcar quanto na base orgânica, podem torná-los resistentes à degradação por nucleases¹⁰.

Durante o processo de seleção e na pós-seleção, os aptâmeros podem ser quimicamente sintetizados pela Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR). A PCR é uma técnica enzimática de replicação, *in vitro*, de ácidos nucleicos, gerando resultados com alta sensibilidade e especificidade de amplificação de uma sequência. Após o desenvolvimento desta técnica por

Karry Mullis, vários benefícios posteriores foram sendo obtidos para estudos de expressão gênica, detecção de patógenos, criminalística e área forense, exames de vínculo genético, bem como no diagnóstico de doenças¹¹. Pelo potencial inovador da PCR, Karry Mullis foi laureado com o Prêmio Nobel em Química no ano de 1993 e variações da técnica original surgiram posteriormente para melhoria dos ensaios de amplificação de ácidos nucleicos, *in vitro*¹².

Dentre as variações da PCR, destaca-se a qPCR (*Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*), a qual detecta o produto de DNA que é amplificado após a cada ciclo de reação, em tempo real, utilizando diferentes tipos de fluorescência¹³. Por ser um sistema fechado, a qPCR melhorou significativamente a detecção e quantificação de ácidos nucleicos de vários alvos que podem estar presentes em alimentos, amostras contaminadas com vírus, na microbiologia, na oncologia e na imunologia humana e animal^{14, 15}. Outra variação dessa técnica é a apta-qPCR, a qual combina a sensibilidade da amplificação do ácido nucleico, com a seletividade dos aptâmeros¹⁶, permitindo avaliar o limite de detecção do alvo¹⁷ e até mesmo a estabilidade destas moléculas em amostras biológicas, a fim de caracterizar as suas propriedades farmacocinéticas¹⁸.

Diante do exposto, apesar do domínio no mercado global de medicamentos por parte dos anticorpos, o mercado de aptâmeros apresenta um crescimento contínuo e espera-se que faça grandes contribuições para a indústria teranóstica, termo proveniente da junção da terapia e do diagnóstico de doenças. Estima-se que em 2020, a indústria destas moléculas alcance rendimento de 244,93 milhões de dólares. Existem empresas baseadas em aptâmeros que estão ativamente engajadas em pesquisas de diagnóstico e terapêutica para comercializá-los globalmente. Estas empresas procuram atender várias necessidades teranósticas, já havendo alguns produtos baseados em aptâmeros disponíveis comercialmente, enquanto outros podem chegar ao mercado nos próximos 5 a 10 anos¹⁹.

Com estudos que demonstraram resultados potenciais de diagnóstico, várias metodologias empregando aptâmeros em tecnologias de “*point of care*” (POC) vêm

sendo desenvolvidas²⁰. Os aptâmeros foram utilizados em várias plataformas de diagnóstico no local de atendimento, incluindo ensaio de dot-blot, com sensores eletroquímicos, ensaios à base de fluorescência, com nanopartículas e testes de fluxo lateral. Além disso, a aplicação desta tecnologia não é limitada somente a doenças, mas possui ampla aplicação como em locais de poluentes ambientais, pesticidas e contaminantes de metais pesados²¹.

Em relação à ação terapêutica, estudos sobre a ação dos aptâmeros contra diferentes doenças que acometem a saúde humana têm sido publicados²² e muitas destas moléculas estão em fases de triagens clínicas¹⁹. O medicamento Macugen foi o primeiro aptâmero aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA/Estados Unidos), tendo como alvo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF165) para tratamento da degeneração macular relacionada à idade (DMRI)²³. Esta é a principal causa de cegueira em pessoas com mais de 50 anos nos Estados Unidos, podendo ser ocasionada pelo crescimento de vasos sanguíneos que é estimulado pelo VEGF165. Assim, o aptâmero se liga ao VEGF165 inibindo sua ligação ao receptor de superfície de membrana, VEGFR1 ou VEGFR2²⁴.

PREDIÇÃO, *IN SILICO*, DE ESTRUTURAS CONFORMACIONAIS DE APTÂMEROS

O grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia Molecular da UFG/Regional Catalão (LaBioMol/UFG-RC) em parceria com o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Teranóstica e Nanobiotecnologia (INCT-TeraNano) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), e com financiamentos provenientes do CNPQ, FAPEG, CAPES e PPSUS tem desenvolvido estudos na linha de seleção e caracterização de aptâmeros ligantes a alvos celulares e moleculares voltados para doenças infecciosas como a dengue e mais recentemente zika. A partir destes estudos, Cnossen e colaboradores (2017) apresentaram potenciais aptâmeros ligantes a importantes regiões regulatórias do vírus da Dengue²⁵. Tais aptâmeros anti-dengue têm sido avaliados quanto à sua aplicação teranóstica para o controle e a prevenção da infecção viral, bem como no diagnóstico da doença.

Uma das formas de se avaliar os aptâmeros após seleção é baseada na sua conformação secundária que pode ser obtida por meio de *webservers*. Estas análises estruturais auxiliam na compreensão do reconhecimento molecular e interação do aptâmero com o alvo cujas predições das estruturas secundárias são obtidas a partir da energia livre da molécula²⁶. Dentre as conformações adquiridas, os *loops* e *hairpins* são as regiões com maiores probabilidades de interação com o alvo, pois como possuem as bases desemparelhadas apresentando maior flexibilidade, de forma a alterar a sua conformação para formar um “sítio” de ligação e circundar o ligante, ou para a formação de ligações de hidrogênio²⁷.

Na figura 1, estão apresentadas diferentes estruturas preditas de um mesmo aptâmero selecionado pelo grupo do LaBioMol/UFG-RC em diferentes condições iônicas e de temperatura. Para gerar estas estruturas, foram utilizados os *webserves* RNAComposer²⁸ e Mfold²⁹, os quais geraram estruturas tridimensionais e estruturas

secundárias, respectivamente. O Mfold foi utilizado por oferecer a predição estrutural com base na probabilidade de pareamento de bases da molécula e a análise da estabilidade é feita por meio da energia livre (ΔG), e de acordo com outros parâmetros, tais como a temperatura, a concentração dos íons magnésio e o sódio²⁹.

Estes dados demonstram que a variação da temperatura e a alteração de sais, tais como pela adição do íon Mg^{2+} , modificam as estruturas secundárias e terciárias da molécula, levando a alterações na estabilidade do aptâmero.

Com o aumento da temperatura de 25°C para 60°C nota-se uma alteração no tamanho do *loop* do aptâmero. A adição de magnésio reduziu ainda mais o *loop* promovendo a formação de uma estrutura mais rígida da molécula pelo aumento do ΔG , o que dificultaria o acesso e interação com o alvo nesta condição. As mudanças observadas na predição da estrutura secundária foram refletidas também nas estruturas tridimensionais.

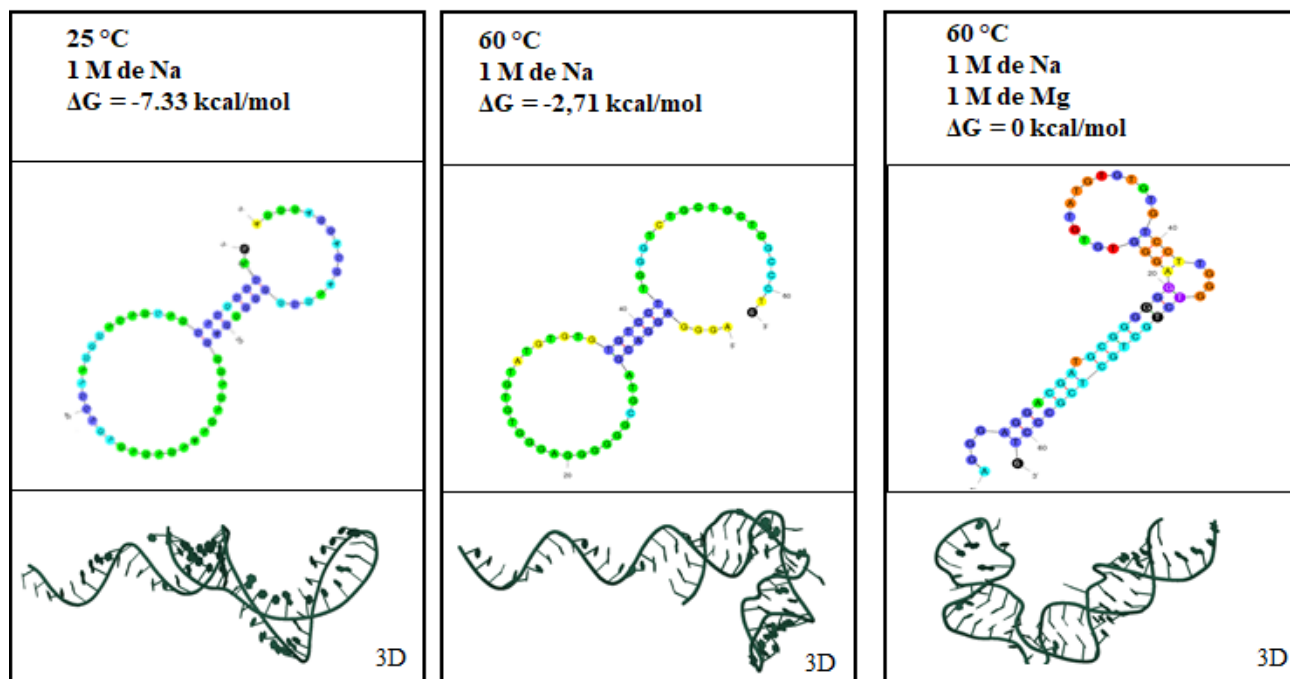


Figura 1: Predição das estruturas secundárias e terciárias de um aptâmero anti-dengue com diferentes condições de temperatura e concentração de Na^+ e Mg^{2+} .

Considerações Finais

Desde o desenvolvimento do método SELEX, a tecnologia de desenvolvimento de aptâmeros tem crescido expressivamente, visto que o método de seleção e caracterização destas moléculas teve melhorias significativas o que acarretou aplicações em diferentes áreas. Dessa forma, os aptâmeros podem levar à obtenção de plataformas biotecnológicas mais rápidas e baratas. Estas plataformas poderão ser facilmente adaptáveis em laboratórios ou a campo, permitindo uma vasta aplicação na teranóstica de diversas doenças que acometem a saúde animal, humana, na agroindústria, bem como no biossensoriamento na área ambiental.

Agradecimentos

As autoras agradecem as agências de fomento Capes, CNPq, Fapeg, Decit/SCTIE-PPSUS e INCT TeraNano-UFU para o desenvolvimento desta linha de pesquisa no Laboratório de Biologia Molecular da UFG/Regional Catalão.

Referências

1. Liu, R.; Li, X.; Lam, K. S. *Curr Opin Chem Biol.* **2017**, 38,117. Cross refer
2. Stoltenburg, R.; Reinemann, C.; Strehlitz, B. *Biomol. Eng.* **2007**, 24, 381. Cross refer
3. Teng, J.; Yuan, F.; Ye, Y.; Zheng, L.; Yao, L.; Xue, F.; Chen, W.; Li, B. *Front Microbiol.* **2016**, 7,1426. Cross refer
4. Cai, S.; Yan, J.; Xiong, H.; Liu, Y.; Peng, D.; Liu, Z *Analyst.***2018**, 143, 5317. Cross refer
5. Hermann, T.; Patel, D. *J. Science.* **2000**, 287, 820. Cross refer
6. Siddiqui, M. Z. *Indian J Pharm Sci.* **2010**, 72, 12. Cross refer
7. Han, K.; Liang, Z.; Zhou, N. *Sensors.* **2010**, 10, 4541. Cross refer
8. Song, K. M.; Lee, S.; Ban, C. *Sensors.***2012**, 12, 612. Cross refer
9. Zhang, Y.; Lai, B. S.; Juhas, M. *Molecules.* **2019**, 24, 941. Cross refer
10. Jayasena, S. D. *Clin Chem.* **1999**, 45, 1628. Cross refer
11. Maheaswari, R.; Kshirsagar, J. T.; Lavanya, N. *J Indian Soc Periodontol.* **2016**, 20, 128. Cross refer
12. Mullis, K. B. *Sci Am.* **1990**, 262, 56. Cross refer
13. Novais, C. M.; Pires-Alves, M.; Silva, F. F. *Biocologia Cienc. Desenvolv.* **2004**,10. Cross refer
14. Chen, P.; Huang, X. *J Comput Biol.* **2015**, 22, 988. Cross refer
15. Valones, M. A. A.; Guimarães, R. L.; Brandão, L. A. C.; Souza, P. R. E. De; Carvalho, A. De A. T.; Crovela, S. *Braz. J. Microbiol.* **2009**, 40, 1. Cross refer
16. Marangoni, K.; Neves, A. F.; Rocha, R. M.; Faria, P. R.; Alves, P. T.; Souza, A. G.; Fujimura, P. T.; Santos, F. A.; Araújo, T. G.; Ward, L. S.; Goulart, L. R. *Sci Rep.* **2015**, 15, 12090. Cross ref
17. Svobodová, M.; Skouridou, V.; Botero, M. L.; Jauset-Rubio, M.; Schubert, T.; Bashammakh, A. S.; El-Shahawi, M. S.; Alyoubi, A. O.; O'sullivan, C. K. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2016**, 4797, 1. Cross refer
18. Heiat M.; Ranjbar R.; Fasihi-Ramandi M.; Latifi A.M; Rasae M. *Mol. Cell. Probe.* **2016**, 30, 238. Cross refer
19. Kaur, H.; Bruno, J. G.; Kumar, A.; Sharma, T. K. *Theranostics.* **2018**, 8, 4016. Cross refer
20. Gopinath, S.C.B.; LakshmiPriya, T.; Chen, Y.; Phang, W.-M.; Hashim, U. *Biotechnol.* **2016**, 34, 198. Cross refer
21. Dhiman, A.; Kalra, P.; Bansal, V.; Bruno, J.; Sharma, T. *Sensor Actuat B-Chem,* **2017**, 246, 535. Cross refer
22. Zhou, J.; Bobbin, M. L.; Burnett, J. C.; Rossi, J. J. *Front Genet.* **2012**, 3,234. Cross refer
23. Ng, E. W.; Shima, D. T.; Calias, P.; Cunningham, E. T. Jr., Guyer, D. R.; Adamis, A, P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, 5, 123. Cross refer
24. Lee, J. H.; Canny, M. D.; De Erkenez, A.; Krilleke, D.; Ng, Y. S.; Shima, D. T.; Pardi, A.; Jucker, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**,102, 18902. Cross refer
25. Cnossen, E.J.; Silva, A. G.; Marangoni, K.; Arruda, R. A.; Souza, E. G.; Santos, F. A.; Fujimura, P. T.; Yokosawa, J.; Goulart, L. R.; Neves, A. F. *Future Med. Chem.* **2017**, 9, 541. Cross refer
26. Patel, D.J.; Suri, A. K. *Rev. Mol. Biotechnol.* 200, 74, 60. Cross refer
27. Chushak, Y.; Stone, M.O. *Nucleic Acids Res.* **2009**, 37. Cross refer
28. Antczak, M.; Popenda, M.; Zok, T.; Sarzynska, J.; Ratajczak, T.; Tomczyk, K.; Adamiak, R.W.; Szachniuk, M. *Acta Biochim. Pol.* **2016**, 63, 737. Cross refer
29. Zuker, M. *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 3406. Cross refer

Amanda G. da Silva^{1*} & Adriana F. Neves²

¹ Discente do Programa de Pós Graduação em Ciências Exatas e Tecnológicas Universidade Federal de Goiás, Unidade Acadêmica Especial de Física, Catalão-GO.

² Docente da Universidade Federal de Goiás, Unidade Acadêmica Especial de Biotecnologia, Catalão-GO.

* E-mail: amandagabrielle16@gmail.com