

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”

UNIGRANRIO

GIOVANNA MARQUES BRAGA

APTÂMEROS: INOVAÇÃO PARA O DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE PULMÃO

RIO DE JANEIRO

2025

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”
UNIGRANRIO

GIOVANNA MARQUES BRAGA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza
Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Mariana Caldas Waghbi
Coorientador: Aline Moreira

RIO DE JANEIRO
2025

GIOVANNA MARQUES BRAGA

APTÂMEROS: INOVAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DE CÂNCER DE PULMÃO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza
Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Mariana Caldas Waghabi

Coorientador: Aline Moreira

Aprovada em:

Barra da Tijuca, _____ de _____ de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Mariana Caldas Waghabi

Prof. Taiana Sousa Lopes da Silva

Prof. Maria Luiza Rios Santos

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força, proteção e por nunca permitir que eu desistisse, por sempre guiar meus passos.

À minha família, por sempre acreditarem no meu potencial. Aos meus pais, Stephanie Marques e Alexandre Braga, pelo encorajamento constante, apoio em cada etapa e pelo amor incondicional. À minha irmã mais nova, Gabriella, por me incentivar a ser alguém com que ela possa olhar com admiração. E ao meu avô, Almir Braga, cujo suporte e generosidade foram decisivos para que eu pudesse chegar até aqui.

À minha orientadora Mariana Waghabi e à minha coorientadora Aline Moreira, pela confiança depositada em mim e por todos os ensinamentos que foram fundamentais para a construção deste trabalho. Estendo meu agradecimento ao LAGABI, pela oportunidade de aprendizado e pelo ambiente acolhedor que tanto contribuiu para meu crescimento acadêmico e pessoal. Em especial, agradeço à Rayane Abreu e à Natássia Araújo, cuja dedicação e paciência foram essenciais ao longo de todo o processo.

Ao CNPQ e PIBIC, que permitiram a realização desse projeto.

Ao meu filho de quatro patas, Loki, pela sua companhia doce e tranquila que me trouxe conforto ao longo dessa jornada.

E à banca, por terem se disponibilizado a estarem aqui num momento tão especial. Obrigada!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo do ensaio de Cell-Selex	21
Figura 2: Morfologia das células A549 e BEAS2B observadas em microscópio invertido MOTIC de campo claro.	23
Figura 3: Gráfico avaliativo da replicação celular da linhagem A549 em 144 horas.	25
Figura 4: Metodologia do ensaio de genotipagem pelo método STR.	27
Figura 5: Caracterização morfológica das células A549 e BEAS-2B em suspensão por microscopia confocal no sistema de alto conteúdo (HCS).	28
Figura 6: Caracterização morfológica da linhagem A549 por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).	29
Figura 7: Caracterização morfológica da linhagem BEAS-2B por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).	30
Figura 8: Amplificação dos aptâmeros durante a primeira rodada de seleção positiva do CELL-SELEX.	31
Figura 9: Gel de eletroforese do PCR preparativo (F) do segundo e terceiro rounds do CELL-SELEX.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Genotipagem da linhagem A549 _____ 26

Tabela 2: Quantificação das concentrações de ssDNA obtidas em cada rodada do processo CELL-SELEX. _____ 33

SUMÁRIO

Sumário

1 INTRODUÇÃO	11
1.1. Epidemiologia	11
1.2. Diagnóstico	12
1.3 Aptâmeros	13
2 METODOLOGIA	17
2.1 Células tumorais	17
2.2 Manutenção das células em cultura	17
2.3 Genotipagem das células	17
2.4 Avaliação morfológica das células	18
2.4.1 Análise por microscopia de alto conteúdo (High Content Screening- HCS)	18
2.4.2 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	19
2.6 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)	21
2.7 Identificação de epítomos tumorais ligados aos aptâmeros selecionados	21
3 RESULTADOS	22
3.1 Crescimento celular	22
3.2 Teste de Genotipagem celular	25
3.3 Avaliação morfológica das células	27
3.4 Ensaio de CELL-SELEX	31
4 DISCUSSÃO	33
5 CONCLUSÃO	35
6 REFERÊNCIAS	37

APTÂMEROS: INOVAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DE CÂNCER DE PULMÃO

Giovanna Marques Braga ¹
Mariana Caldas Waghbi ²
Aline Moreira ²

RESUMO

O câncer de pulmão é considerado um dos mais incidentes mundialmente. No Brasil, conforme estimativas de 2023, é o terceiro mais comum em homens e o quarto em mulheres. Nos últimos anos, novas metodologias têm sido desenvolvidas a fim de aumentar a especificidade no diagnóstico de tumores e, entre as diferentes estratégias, destaca-se o uso de aptâmeros, pequenos oligonucleotídeos sintéticos de fita simples (DNA ou RNA) capazes de formar estruturas tridimensionais que permitem ligações específicas a um alvo molecular. No presente trabalho, foi utilizada a metodologia de CELL-SELEX para selecionar aptâmeros específicos para células tumorais de câncer de pulmão (linhagem A549), com exclusão via seleção negativa usando células não tumorais (BEAS-2B), garantindo alta especificidade. As células foram cultivadas em meios apropriados, e a identidade celular foi confirmada por genotipagem STR. Caracterizações morfológicas foram feitas por microscopia de alto conteúdo e microscopia eletrônica de varredura. Durante as rodadas de seleção, os aptâmeros ligados às células tumorais foram eluídos, e amplificados por PCR, incluindo incubação negativa para eliminar aptâmeros não específicos. Resultados indicam que o processo de enriquecimento dos aptâmeros está evoluindo satisfatoriamente, com aumento da especificidade e afinidade, validando a técnica e abrindo caminho para o desenvolvimento de kits diagnósticos baseados em aptâmeros para o câncer de pulmão. Em síntese, o trabalho evidencia a importância da integração entre biologia molecular e inovação tecnológica no enfrentamento do câncer de pulmão, destacando os aptâmeros como agentes promissores para diagnósticos mais rápidos e precisos, com impacto significativo na vida dos pacientes.

Palavras-chave: Aptâmeros. Diagnóstico. Câncer de pulmão. Cell-Selelex.

¹ Graduando(a) do curso de Biomedicina na Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO.

ABSTRACT

Lung cancer is considered one of the most incident cancers worldwide. In Brazil, according to 2023 estimates, it is the third most common cancer in men and the fourth in women. In recent years, new methodologies have been developed to increase specificity in tumor diagnosis, among which the use of aptamers stands out. Aptamers are small synthetic single-stranded oligonucleotides (DNA or RNA) capable of forming three-dimensional structures that allow specific binding to molecular targets. In the present work, the CELL-SELEX methodology was used to select aptamers specific for lung cancer tumor cells (A549 cell line), with exclusion via negative selection using non-tumor cells (BEAS-2B), ensuring high specificity. The cells were cultured in appropriate media, and cell identity was confirmed by STR genotyping. Morphological characterizations were performed using high-content microscopy and scanning electron microscopy. During the selection rounds, aptamers bound to tumor cells were eluted and amplified by PCR, including negative incubation to eliminate non-specific aptamers. Results indicate that the aptamer enrichment process is progressing satisfactorily, with increased specificity and affinity, validating the technique and paving the way for the development of aptamer-based diagnostic kits for lung cancer. In summary, the work highlights the importance of integrating molecular biology and technological innovation in combating lung cancer, emphasizing aptamers as promising agents for faster and more accurate diagnostics, with a significant impact on patients' lives.

Keywords: Aptamers. Diagnosis. Lung Cancer. Cell-Selex

1 INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia

O câncer é um dos maiores desafios da saúde pública e a segunda principal causa de morte globalmente, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares (Santos, 2023). Segundo estatísticas da GLOBOCAN 2020, cerca de 20 milhões de novos casos de câncer foram reportados, e 10 milhões de mortes foram associadas à doença. Estima-se que o número de novos casos aumente 60% nas próximas duas décadas. Em termos de incidência, os cânceres mais diagnosticados em todo o mundo foram de mama, com 2,26 milhões de casos (11,7% do total), seguido pelo câncer de pulmão, com 2,21 milhões (11,4%), e câncer de próstata, com 1,41 milhões (7,3%). Quanto à mortalidade, a principal causa de morte por câncer foi o câncer de pulmão, com 1,79 milhão de mortes (18% do total de mortes por câncer), seguido pelo câncer de fígado, com 830 mil mortes (8,3%), câncer de estômago, com 769 mil mortes (aproximadamente 7,7%), e câncer de mama, com 680 mil mortes (6,9%) (Sung, 2021).

Diante desse cenário, o câncer de pulmão aparece como sendo um dos mais incidentes no mundo e no Brasil. O tabagismo está associado a 80% das causas de morte por câncer de pulmão nos Estados Unidos da América e na França, 61% na Ásia e 41% na África (Islami et al., 2015). Apesar disso, existem outros fatores de risco com menos impacto na doença como a poluição ambiental, exposição a produtos químicos em determinadas profissões, a radiações, a sílica, a asbestos e arsênico (Marino et al., 2015). Os tumores pulmonares podem ser classificados, do ponto de vista patológico, em carcinoma de pequenas células (CPC) e carcinoma de não pequenas células (CNPC). Este último, que corresponde à maioria dos casos, é subdividido em três principais subtipos histológicos: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de grandes células. Entre eles, o adenocarcinoma é o mais frequente, representando cerca de 30 a 40% de todos os casos de câncer de pulmão, seguido pelo carcinoma de células escamosas (20 a 25%) e pelo carcinoma de grandes células (15 a 20%). Por sua vez, o carcinoma de pequenas células (CPC) corresponde a aproximadamente 20% dos casos. Trata-se de um subtipo altamente agressivo, que

geralmente se origina nas regiões centrais do pulmão e apresenta rápido crescimento e alto potencial metastático.

1.2. Diagnóstico

Atualmente, a base do diagnóstico do câncer de pulmão é realizada pela anamnese e pelo exame físico e a partir dos resultados, exames complementares podem ser solicitados. Dentre os exames complementares, destacam-se: exames de imageamento (Raio-X de tórax, Tomografia computadorizada (CT-Scan), Ressonância magnética (MRI-Scan), Tomografia por emissão de pósitrons (PET-Scan), biópsia por agulha fina, toraconcentese (punção do tórax com uma agulha ou cateter), no qual o fluido pleural é checado pela presença de células tumorais. Os exames complementares têm como principal objetivo avaliar em que estágio se encontra o tumor primário baseado em seu grau de proliferação e o grau de disseminação, além das funções orgânicas e a ocorrência de doenças paralelas (INCA, 2022)). É importante ressaltar a relevância destes exames para acompanhamento pós-tratamento para detecção de recidivas, controle da terapia e para rastreamento em casos de grupos de risco.

Muitos tumores podem ser detectados ou rastreados pela produção de substâncias ou moléculas, chamadas de marcadores tumorais, que podem ser dosadas como meio de diagnóstico e/ou prognóstico. De forma geral, alguns marcadores já apresentam valor clínico reconhecido, dentre eles destacam-se: 1) antígeno carcinoembrionário (tumores do trato gastrointestinal); 2) alfa-fetoproteína (tumores de fígado e embrionários); 3) Gonadotrofina coriônica (tumores embrionários e placentários); 4) tirocalcitonina (carcinoma medular de tireoide); 5) beta-microglobulina (mieloma múltiplo e linfoma maligno); 6) CA125 (carcinoma de ovário); 7) CA15-3 (carcinoma de mama); 8) CA19-9 (carcinoma de pâncreas, vias biliares e tubo digestivo); 9) CA72-4 (carcinoma de estômago e adenocarcinoma mucinoso de ovário); 10) HTG (carcinoma de tireoide); 11) PAP e PSA (carcinoma prostático); 12) TPA (carcinoma de bexiga) e 13) SCC (carcinoma epidermoide do colo uterino, cabeça, pescoço, esôfago e pulmão) (Sturgeon et al., 2009; Schiffman et al., 2015;

Tobin et al., 2015). No entanto, apesar de sua ampla utilização, a maioria desses marcadores apresenta baixa especificidade e sensibilidade, uma vez que seus níveis podem estar alterados também em condições benignas ou inflamatórias, ou ainda em diferentes tipos de neoplasias. Dessa forma, a busca por novos marcadores mais específicos é determinante para um diagnóstico de maior precisão.

Novas metodologias vêm sendo aplicadas na tentativa de melhorar o diagnóstico do câncer. A nanomedicina é um campo promissor na tentativa de cura para o câncer. Atualmente diversos carreadores de drogas em nanoescala estão em fase de triagem clínica (Fases I a III, a depender do estudo) e formulações são desenvolvidas com o uso de polímeros nanocarreadores contendo RNA de interferência ou associados a drogas tais como docetaxel, paclitaxel e cisplatina, todos com potencial terapêutico para tumores sólidos, próstata, mama e rim, respectivamente (Bourzac, 2012). Nas últimas décadas, novas ferramentas como aptâmeros têm sido propostas e desenvolvidas também com enfoque diagnóstico.

1.3 Aptâmeros

Aptâmeros são pequenos oligonucleotídeos de 20-80 bases sintéticos de fita simples (DNA ou RNA) que são capazes de se ligar com alta especificidade e afinidade a alvos moleculares específicos tais como pequenas moléculas, proteínas, ácidos nucleicos e células (Faria et al., 2002; Ulrich et al., 2002). As estruturas 3D assumidas pelos aptâmeros são responsáveis por esta ligação específica com o alvo (Kanwar et al., 2010; Kanwar et al., 2011). Os aptâmeros são identificados através de um processo de seleção *in vitro* chamado evolução sistemática de ligantes através de enriquecimento exponencial (SELEX) (Que-Gewirth et al., 2007). Os aptâmeros apresentam propriedades muito adequadas para diagnóstico *in vivo* e/ou aplicações terapêuticas. Além da alta especificidade e afinidade, são facilmente sintetizados, pouco imunogênicos e penetram facilmente nos tecidos (Pan et al., 2008). De fato, também conhecidos como anticorpos químicos ou sintéticos, os aptâmeros vêm competir com anticorpos monoclonais pois da mesma forma, desempenham a atividade de ligação específica e de alta afinidade com o alvo através da estrutura 3D.

A metodologia SELEX utilizada para a triagem de aptâmeros específicos a um determinado alvo, foi descrita originalmente por Ellington e Szostak (1990). Desde então, além do método clássico, tem sido amplamente empregada uma variação denominada Cell-SELEX, que consiste na seleção de aptâmeros diretamente em células inteiras. Essa abordagem é particularmente útil para a identificação de proteínas de superfície que se encontram superexpressas ou diferencialmente expressas em células tumorais (Ohuchi, 2012). O uso do Cell-SELEX apresenta vantagens relevantes, pois baseia-se na interação com moléculas de superfície em células vivas, as quais mantêm suas conformações nativas e, conseqüentemente, suas funções biológicas. A biblioteca inicial de aptâmeros utilizada nesse processo é composta por cerca de 10^{15} (ou mais) oligonucleotídeos randômicos, flanqueados por sequências curtas conhecidas que servem como regiões de ancoragem para amplificação (Kanwar et al., 2010).

A utilização de aptâmeros apresenta grande potencial na área clínica, pois eles constituem uma classe única de moléculas — maiores que as drogas baseadas em pequenas moléculas e, ao mesmo tempo, menores e mais simples que os anticorpos convencionais. Essa característica confere aos aptâmeros uma combinação singular de especificidade, estabilidade e versatilidade estrutural. Além disso, os aptâmeros possuem propriedades farmacocinéticas favoráveis, são não imunogênicos e podem ser facilmente modificados quimicamente ou conjugados a nanopartículas, agentes de imagem, siRNAs e fármacos terapêuticos (Huang et al., 2009). Devido a essas propriedades, são considerados promissores agentes diagnósticos e terapêuticos em diversas condições, incluindo câncer, HIV e outras doenças infecciosas e degenerativas (Bivalkar-Mehla et al., 2011).

A detecção de biomarcadores tumor-específicos é altamente relevante para avaliar alterações na expressão de proteínas ou genes associadas a tumores primários, tecidos metastáticos ou de origem incerta. Nesse contexto, os aptâmeros podem desempenhar papéis fundamentais tanto na identificação precoce de tumores quanto na neutralização de atividades biológicas associadas à progressão tumoral (Phillips et al., 2008).

Em células tumorais, os níveis de alguns marcadores de superfície podem aumentar, sofrer modificações, ou novos marcadores podem surgir na superfície celular. Tudo isso pode ser utilizado para diferenciar células saudáveis das tumorais (Germer et al., 2013). Os aptâmeros têm sido identificados como uma excelente ferramenta para diagnóstico, terapêutica, biologia química e para uso em pesquisa básica. Além disso, tais estruturas representam uma classe interessante na farmacêutica, por sua baixa imunogenicidade (Kanwar et al., 2011). A versatilidade do processo de seleção dos aptâmeros facilita a geração de estruturas que são capazes de se ligar a um amplo conjunto de alvos específicos, incluindo vários receptores de superfície celulares. Tais aptâmeros podem ser internalizados, podendo estimular vias de sinalização celular ou induzir apoptose (Ray, 2010).

Diversos ensaios clínicos envolvendo aptâmeros já foram registrados na plataforma ClinicalTrials.gov. Embora a maioria desses estudos esteja voltada para aplicações terapêuticas em degeneração macular, apenas um foi direcionado especificamente ao câncer de mama. Apesar disso, há um crescente interesse na aplicação dos aptâmeros em oncologia, devido à sua alta seletividade e especificidade molecular, bem como à capacidade de se conjugar a nanopartículas, fármacos e biocompostos, o que os torna candidatos ideais para estratégias teranósticas (Medley et al., 2011).

Inúmeras abordagens têm sido descritas quanto à atividade terapêutica dos aptâmeros, incluindo sua capacidade de induzir morte celular de forma específica em células tumorais (Rerole et al., 2011), além de propriedades imunomoduladoras, como a ativação da resposta imune inata em células sanguíneas (Avci-Adali et al., 2013), que podem ser exploradas em contextos terapêuticos inovadores. Estudos experimentais reforçam o potencial dos aptâmeros de RNA no tratamento de diferentes tipos de câncer. Entre eles, destacam-se o aptâmero OPN-R3, direcionado contra a molécula osteopontina e avaliado em modelos de câncer de mama (Mi et al., 2009); os aptâmeros CL4, E07 e A30, que reconhecem o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (Esposito et al., 2011); e o aptâmero Ad-A-p50, voltado à molécula NF- κ B, testado em modelos murinos de câncer de pulmão (Mi et al., 2008).

No contexto do câncer de pulmão, estudos mais recentes demonstram o potencial diagnóstico e terapêutico dessa tecnologia. Aptâmeros selecionados contra a enzima HAT1 apresentaram alta afinidade e capacidade de reduzir a viabilidade celular e induzir apoptose em linhas de carcinoma pulmonar (Klett-Mingo et al., 2022). O aptâmero AP-9R, dirigido à proteína Annexina A2 (ANXA2), associada a células-tronco de câncer de pulmão, mostrou capacidade de suprimir propriedades de stemness e reduzir a expressão de ANXA2 in vitro e in vivo (Huang et al., 2022). Além disso, aptâmeros desenvolvidos para adenocarcinoma pulmonar têm sido aplicados com sucesso na detecção de células tumorais circulantes (CTCs) em amostras de sangue de pacientes (Yoon et al., 2015), demonstrando seu potencial translacional.

Nesse cenário, nosso grupo de pesquisa tem contribuído para o avanço dessa área ao desenvolver e caracterizar aptâmeros com potencial diagnóstico para tumores de mama e de ovário. No estudo “Aptamer-Based Recognition of Breast Tumor Cells: A New Era for Breast Cancer Diagnosis”, foram identificados aptâmeros capazes de reconhecer seletivamente células de câncer de mama, abrindo novas perspectivas para o diagnóstico precoce e o direcionamento terapêutico. De forma complementar, o trabalho “Next Generation of Ovarian Cancer Detection Using Aptamers” destacou aptâmeros com alta afinidade e especificidade para marcadores de superfície de células de câncer de ovário, demonstrando seu potencial como ferramentas não invasivas para detecção e monitoramento da doença.

Atualmente, o grupo avança para uma nova etapa de investigação, voltada à identificação de aptâmeros específicos para o câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC), utilizando a metodologia Cell-SELEX. Essa estratégia permite a seleção direta de aptâmeros em células tumorais vivas, preservando as conformações nativas das proteínas de superfície e aumentando a probabilidade de identificação de ligantes com relevância biológica e clínica.

Dessa forma, o objetivo desse projeto é estabelecer novos candidatos moleculares para o desenvolvimento de um kit de diagnóstico para câncer de pulmão baseado em aptâmeros tumor-específicos, obtidos por meio da técnica CELL-SELEX, seguido da identificação das sequências selecionadas por NGS e dos epítomos celulares aos quais esses aptâmeros se ligam.

2 METODOLOGIA

2.1 Células tumorais

Células de linhagem de tumor pulmonar A549 (do tipo tumoral de células não pequenas) foram cultivadas segundo protocolo da ATCC. Células não tumorais de pulmão da linhagem BEAS-2B foram utilizadas para os ensaios de seleção negativa de Cell-SELEX, para exclusão de moléculas ligantes compartilhados por células tumorais e não tumorais, gerando maior especificidade dos aptâmeros selecionados.

2.2 Manutenção das células em cultura

A linhagem celular A549, derivada de um adenocarcinoma pulmonar humano, foi cultivada em frascos de cultura de 25mm³ contendo 5 mL de meio RPMI 1640 completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina-estreptomicina. As células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, condições ideais para seu crescimento.

De forma complementar, a linhagem BEAS-2B, composta por células epiteliais brônquicas humanas imortalizadas não tumorais, foi empregada como controle para o modelo tumoral e seu cultivo foi realizado em meio BEGM (Bronchial Epithelial Cell Growth Medium), que contém fatores de crescimento e suplementos específicos para esse tipo celular. Assim como a A549, as células BEAS-2B foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, com trocas de meio a cada 48 horas, assegurando a manutenção da viabilidade e evitando o acúmulo de metabólitos tóxicos.

2.3 Genotipagem das células

A identidade da linhagem celular utilizada, foi confirmada por ensaios de genotipagem por análise de STR, utilizando o kit comercial GenePrint® 10 System (Lot: 204957) na Plataforma de Genotipagem e Análise de Fragmentos da Fiocruz ((RPT01D/VPPCB/FIOCRUZ). O kit é composto por reagentes para pré-amplificação, como o GenePrint® 10 5X Master Mix, que contém tampão de reação; GenePrint® 10 5X Primer Pair Mix, contendo os pares de primers marcados com fluoróforos; água livre de nucleases e o DNA controle 2800M (10 ng/ul), utilizado como controle positivo

da amplificação; GenePrint® 10 Allelic Ladder Mix, utilizada como referência alélica para fragmentos de DNA e Internal Lane Standard 600 (ILS600), utilizado como padrão interno de tamanho.

Para a montagem das reações de PCR, foi utilizada uma placa MicroAmp® nova, devidamente identificada e em um tubo estéril, foram adicionados os reagentes necessários conforme os volumes indicados pelo fabricante. A mistura de amplificação foi então vortexada, garantindo sua completa homogeneização, e posteriormente distribuída nos poços da placa. Em seguida, foi adicionado 10 ng do DNA controle a cada poço correspondente às amostras. Para o controle positivo de amplificação, 1,0 ul do tubo contendo o DNA controle 2800M foi transferido para um poço contendo a mistura de PCR. Já para o controle negativo, adicionou-se água livre de nucleases ou tampão TE-4 no lugar do DNA.

Após a adição de todos os componentes, a placa foi posicionada no termociclador, onde as amostras passaram pelo seguinte protocolo de ciclagem: 96 °C por 1 minuto; 30 ciclos de 94 °C por 10 segundos, 59 °C por 1 minuto e 72 °C por 30 segundos; depois 60 °C por 10 minutos e foram mantidas a 4 °C. Em seguida, as amostras foram preparadas com 1ul do Allelic Ladder Mix e desnaturadas à 95C por 3 minutos, e em seguida imediatamente levadas ao gelo pelo mesmo período. Por fim, para análise dos fragmentos amplificados, foi utilizado o equipamento Applied Biosystems® 3500/3500xL Genetic Analyzer, que é um analisador genético que utiliza de eletroforese capilar para obter informações sobre os perfis de STR.

2.4 Avaliação morfológica das células

2.4.1 Análise por microscopia de alto conteúdo (High Content Screening- HCS)

A microscopia de alto conteúdo (High-Content Screening-HCS) foi empregada para avaliação individual e comparativa das linhagens A549 e BEAS-2B, permitindo a visualização de dados morfológicos e funcionais de forma quantitativa e automatizada. Essa técnica da microscopia permite capturar imagens de alta resolução de forma automática, em células suspensas ou fixadas. Nesta análise foi utilizado o método confocal para visualização das linhagens, com as células em suspensão. O método

confocal permite gerar imagens por meio da captura de uma fina seção celular e da rejeição da luz fora de foco.

Para preparação das amostras, as células foram extraídas na quantidade desejada e centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos, à 4°C. Em seguida, foram fixadas em solução de PFA 4% (250 µl PFA 8% e 250 µl PBS 2x) a fim de evitar sua degradação. Após fixação, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 30µl, plaqueando 2 poços com 10µl cada (gota central). Não houve marcação celular pela implementação da metodologia *label-free*.

2.4.2 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A fim de complementar a caracterização morfológica das linhagens celulares A549 e BEAS-2B, foram obtidas imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com as células em suspensão. Essa técnica permite a visualização da ultraestrutura celular com alta resolução e profundidade de campo, possibilitando a observação detalhada da superfície das células. Este microscópio contém uma fonte que gera um feixe de elétrons que é disparado de forma contínua sobre a amostra durante o ensaio, realizando uma varredura em sua superfície. Dessa forma, através do detector presente no equipamento, é analisada a interação desses elétrons com a superfície, gerando imagens com alta definição da morfologia celular que está sendo estudada.

Para a preparação das amostras, as células foram inicialmente cultivadas até atingirem confluência adequada e em seguida, procedeu-se à fixação com glutaraldeído a 2,5%, etapa essencial para preservação da integridade morfológica. Em seguida, foram feitas três lavagens com PBS no material para retirar o excesso do fixador e para a pós-fixação foi utilizado o tetróxido de ósmio (1%), garantindo maior contraste e estabilidade às estruturas celulares. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol e a secagem realizada pelo processo de ponto crítico, que utiliza-se do dióxido de carbono a fim de preservar a integridade da estrutura da amostra. Por fim, foi realizada a etapa de metalização, em que o material foi posicionado sobre suportes metálicos (stubs), que foram metalizados com ouro na câmara de vácuo do equipamento, permitindo a análise das imagens pelo microscópio.

2.5 Cell-SELEX

A viabilidade das células foi avaliada por azul de Trypan antes do processo de seleção de aptâmeros. Células pulmonares tumorais (A549) e não tumorais controles (BEAS-2B) foram plaqueadas com aproximadamente 5×10^6 em placas de Petri de 25mm³ por 24 horas. Após confluência, as células tumorais foram incubadas com a biblioteca inicial com 10^{14} a 10^{16} sequências randômicas de aptâmeros (Trilink biotechnologies, EUA) por 1 hora a 37°C, para triagem e seleção dos aptâmeros que se ligam a moléculas presentes na superfície das células. Após lavagens sucessivas para exclusão dos aptâmeros não ligados, fracamente ligados ou ligados inespecificamente, os aptâmeros ligados foram eluídos e então amplificados por PCR com o conjunto de iniciadores. Em seguida, o produto amplificado foi purificado, seguindo as orientações do fabricante, em uma coluna de dessalinização NAP-5® (Cytiva LifeSciences®). Após obtenção dos aptâmeros ssDNA dessalinizados, um novo round de seleção positiva se inicia, utilizando-se aproximadamente 1µM de aptâmeros ssDNA do round anterior com as células tumorais. A partir do 3o round de seleção, foi realizada a incubação dos aptâmeros reconhecidos pela célula tumoral, com as células controle não tumorais, para eliminação de sequências de aptâmeros que possam reconhecer alvos em comum entre os dois tipos celulares. Sucessivas rodadas de seleção e amplificação resultarão no enriquecimento exponencial de aptâmeros específicos que finalmente serão submetidos ao sequenciamento e à avaliação dos parâmetros de afinidade e especificidade (Figura 1).

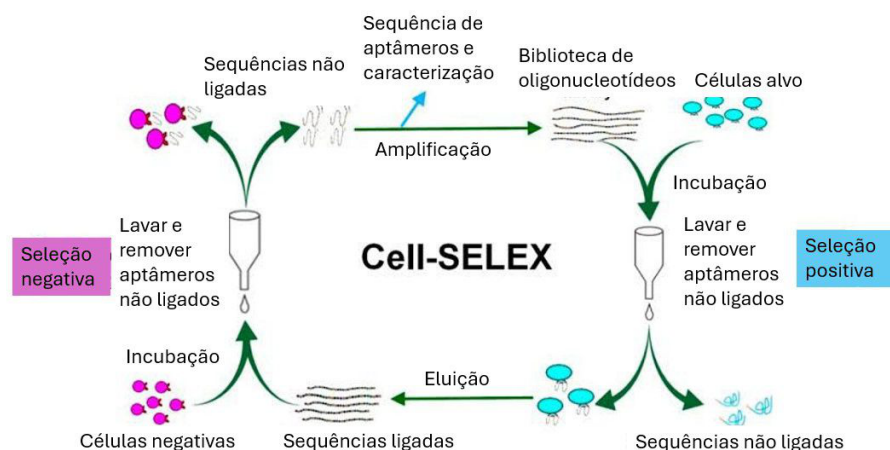


Figura 1: Esquema representativo do ensaio de Cell-SeleX

Esquema representativo das etapas das seleções positiva e negativa da técnica de Cell-SeleX empregada no estudo. Fonte: Adaptado de Chen et al., 2016.

2.6 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

Para a identificação das sequências de aptâmeros ssDNA selecionadas para as linhagens tumorais de pulmão, será realizado o sequenciamento de nova geração utilizando a plataforma Illumina®, através do sistema Miseq™ (Illumina®), disponível na Plataforma NGS da Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz (VPPCB/FIOCRUZ), lotada no Laboratório de Genômica Aplicada e Bioinovações (IOC / Fiocruz-RJ).

2.7 Identificação de epítomos tumorais ligados aos aptâmeros selecionados

Após a identificação dos aptâmeros específicos para as células tumorais de pulmão, será realizado o ensaio de Pulldown para obtenção do complexo aptâmero-biotina com a molécula a ser identificada. Células tumorais serão lisadas para obtenção de proteínas totais e destes 100 µg serão incubados com aptâmeros específicos, individuais e conjugados à biotina, seguindo protocolo desenvolvido pelo grupo de PullDown. O complexo será tripsinizado em solução para posterior identificação por espectrometria de massas, utilizando o equipamento Orbi-Trap da Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz (VPPCB/FIOCRUZ) RPT02A. Desta

forma será criado i) o banco de aptâmeros tumor- específico; ii) o banco de moléculas tumorais específicas que foram reconhecidas pelos aptâmeros.

3 RESULTADOS

Na etapa inicial do projeto, procedeu-se à padronização dos protocolos de cultivo celular da linhagem A549, com vistas à sua aplicação nos ensaios de CELL-SELEX. O objetivo principal consistiu em assegurar que todos os procedimentos fossem conduzidos em conformidade com as Boas Práticas de Laboratório (BPL) e normas de biossegurança, estabelecendo condições reprodutíveis e adequadas para os experimentos subsequentes.

Durante esse processo, foram desenvolvidas e consolidadas técnicas fundamentais, incluindo o preparo de meios de cultura RPMI 1640 (nas formas simples e completo), protocolos de descongelamento, manutenção e congelamento celular. As culturas celulares foram mantidas em estufa a 37°C e o monitoramento da morfologia celular e a manutenção da viabilidade foram garantidos por meio de tripsinização semanal, assegurando condições adequadas de crescimento das culturas celulares.

3.1 Crescimento celular

As células A549 foram plaqueadas na confluência de $400 \times 10^3/\text{ml}$ em garrafas de 25mm³. Ao longo de uma semana, observou-se um aumento significativo na densidade celular, atingindo aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células/mL. As células não tumorais BEAS-2B também foram plaqueadas na confluência de $400 \times 10^3/\text{ml}$ em garrafas de 25mm³. Ao longo de uma semana, também foi observado um aumento na densidade celular, atingindo aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/mL.

A tripsinização do cultivo celular é realizada, em média, uma vez por semana, quando as células atingem alta confluência (cerca de 90%). O processo é realizado utilizando a solução de tripsina-EDTA, que promove o desprendimento celular de forma controlada, permitindo a passagem para novos frascos. Essa etapa é essencial para a manutenção adequada das linhagens, prevenindo o supercrescimento.

As células de pulmão tumorais A549 e não tumorais BEAS2B foram observadas em microscopia invertida de campo claro (Figura 2). Células tumorais apresentam morfologia epitelial típica, com formas mistas, mas predominantemente alongadas ou levemente poligonal, aderidas e exibindo citoplasma hialino e homogêneo (Figura 2A, B e C). Os núcleos são arredondados e refringentes, geralmente localizados de forma central ou discretamente excêntrica. Em baixa densidade (Figura 2A), as células aparecem isoladas ou em pequenos agrupamentos, enquanto em maior confluência (Figura 2C) formam um tapete celular organizado. Observa-se em maior aumento (Figura 2B) a presença de células em divisão celular (setas brancas). Algumas células exibem prolongamentos citoplasmáticos finos e regiões citoplasmáticas mais densas, características associadas ao espreadimento e à atividade metabólica da linhagem (Figura 2C). Células não tumorais BEAS2B em confluência apresentam morfologia diferenciada, com menor tamanho e menos prolongamentos citoplasmáticos (Figura 2D).

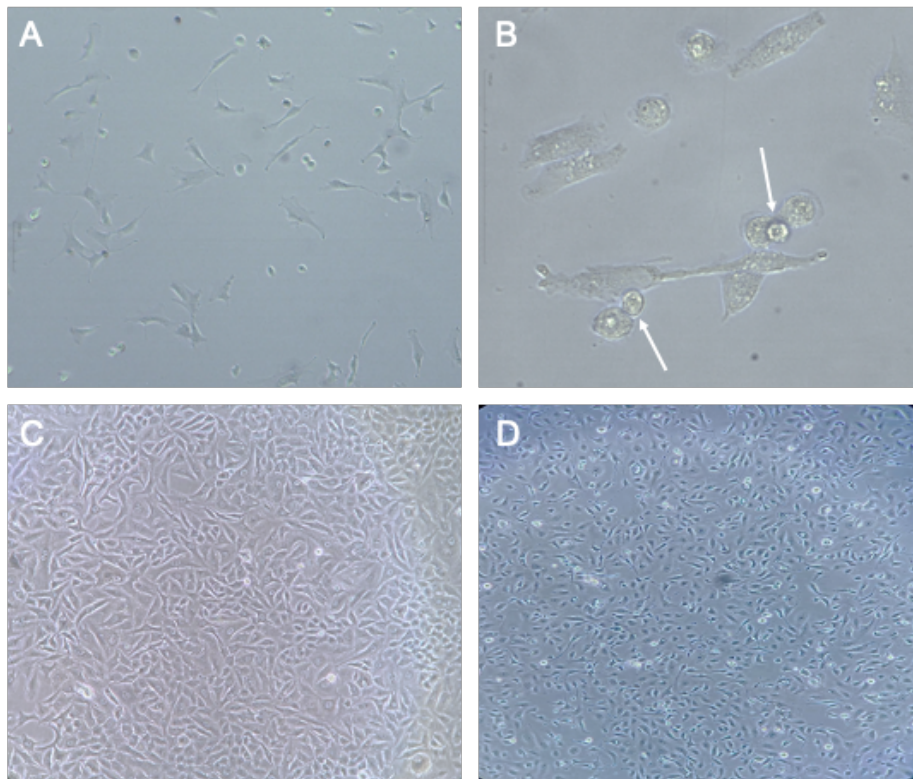


Figura 2: Morfologia das células A549 e BEAS2B observadas em microscópio invertido MOTIC de campo claro.

Células tumorais de pulmão A549 A-C. (A) Em baixa densidade, as células tumorais apresentam-se isoladas ou em pequenos agrupamentos, exibindo morfologia epitelial típica, predominantemente alongada ou levemente poligonal. (B) Em maior aumento, observam-se células tumorais em divisão

celular (setas brancas), que apresentam prolongamentos citoplasmáticos finos e regiões citoplasmáticas densas. (C) Em maior confluência, forma-se um tapete celular organizado. (D) células não tumorais de pulmão BEAS-2B em confluência. Fonte: Laboratório de Genômica Aplicada e Bioinovações - FIOCRUZ.

Foi conduzido um experimento adicional utilizando a linhagem celular A549, com o objetivo de avaliar a taxa de replicação celular ao longo de seis dias. O ensaio foi iniciado com um número conhecido de células, permitindo o acompanhamento do crescimento celular durante o período estabelecido. Para isso, 500.000 células foram plaqueadas em um frasco de cultura contendo 5 mL de meio RPMI 1640 completo. O frasco foi mantido em estufa a 37 °C, com 5% de CO₂, e após 48 horas foi realizada uma nova contagem celular, observando-se 1.115.000 células viáveis. A partir desses valores e utilizando a fórmula de crescimento exponencial:

$$n = \frac{\log \left(\frac{N}{N_0} \right)}{\log 2}$$

onde N₀ representa o número inicial de células e N o número final, foi possível determinar o número total de divisões celulares no intervalo avaliado. Entre o início do experimento e 48 horas de cultivo, ocorreram aproximadamente 1,99 divisões celulares, correspondendo a uma média de 0,99 divisões por dia.

Na contagem subsequente, realizada após 144 horas (seis dias), observou-se um total de 3,50 divisões, o que equivale a cerca de 0,88 divisões diárias. Embora tenha ocorrido uma leve redução na taxa de divisão celular, possivelmente associada ao aumento da confluência da cultura, os resultados indicam a manutenção de um ritmo de crescimento elevado e consistente, característico da fase logarítmica (Figura 3). Os resultados obtidos com o experimento demonstram, então, que a cultura celular está crescendo conforme o esperado, seguindo seu padrão exponencial que a permite praticamente duplicar-se em quantidade neste curto período.

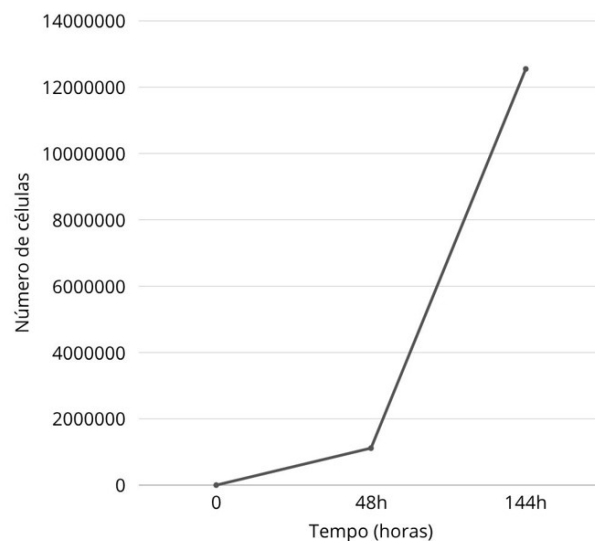


Figura 3: Gráfico avaliativo da replicação celular da linhagem A549 em 144 horas.

Curva de crescimento da linhagem A549 em 144 horas, onde atingiu a quantidade de $1,15 \times 10^6$ após contagem em 48h e $12,55 \times 10^6$ em 144h.

3.2 Teste de Genotipagem celular

Com o intuito de confirmar a identidade da linhagem celular utilizada, foi realizada a genotipagem por análise de STR. O perfil obtido apresentou 100% de similaridade com a linhagem A549 no banco de dados de referência (<http://www.dsmz.de/services/services-human-and-animal-cell-lines/online-str-analysis.html>);

<http://www.atcc.org/CulturesandProducts/CellBiology/STRProfileDatabase/tabid/174/Default.aspx>), confirmando de forma inequívoca a identidade celular e assegurando a confiabilidade dos experimentos subsequentes (Tabela 1 e Figura 4).

Tabela 1: Genotipagem da linhagem A549

Locus STR	Alelos
TH01	8, 9.3
D21S11	29, 29
D5S818	11,11
D13S317	11,11
D7S820	8, 11
D16S539	11, 12
CSF1PO	10, 12
Amelogenina	X, Y
vWA	14, 14
TPOX	8, 11

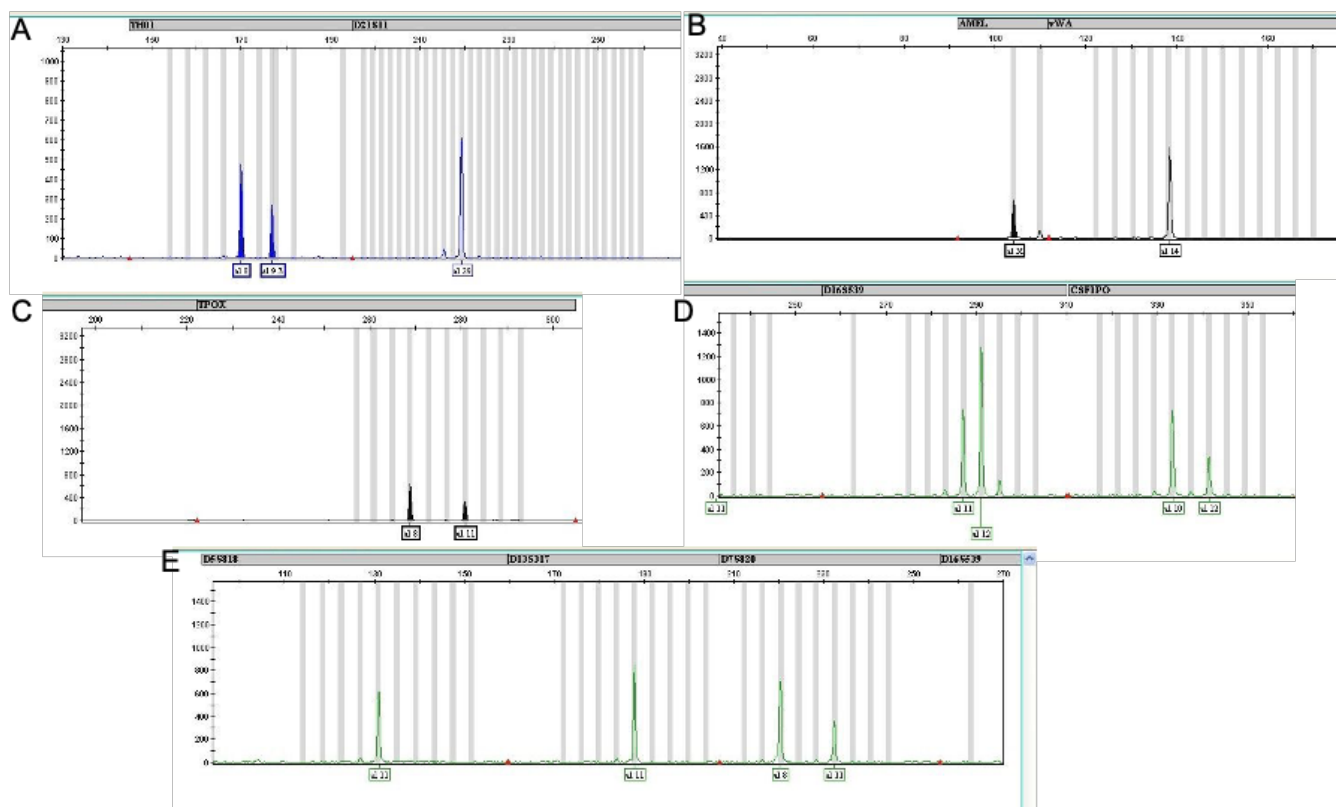


Figura 4: Metodologia do ensaio de genotipagem pelo método STR.

Perfil de STR obtido por eletroforese capilar, mostrando os picos correspondentes aos alelos amplificados em cada locus analisado: (A) TH01, D21S11, (B) AMEL, vWA, (C) TPOX, (D) D16S539, CSF1PO, (E) D5S818, D13S317, D7S820, D16S539.

3.3 Avaliação morfológica das células

A fim de complementar a caracterização morfológica das linhagens celulares A549 e BEAS-2B, foram conduzidas análises microscópicas com maior detalhamento, pelo uso da análise de alto conteúdo (HCS) e por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com as células em suspensão.

Células tumorais e não tumorais de pulmão em suspensão foram observadas por microscopia confocal pelo método de alto conteúdo (HCS) e apresentaram diferenças significativas (Figura 5). Células tumorais A549 (Figura 5A e B) apresentavam-se de tamanho maior quando comparadas com as não tumorais BEAS-2B (Figura 5C e D). Além disso, foi observado maior número de projeções membranares nas células A549.

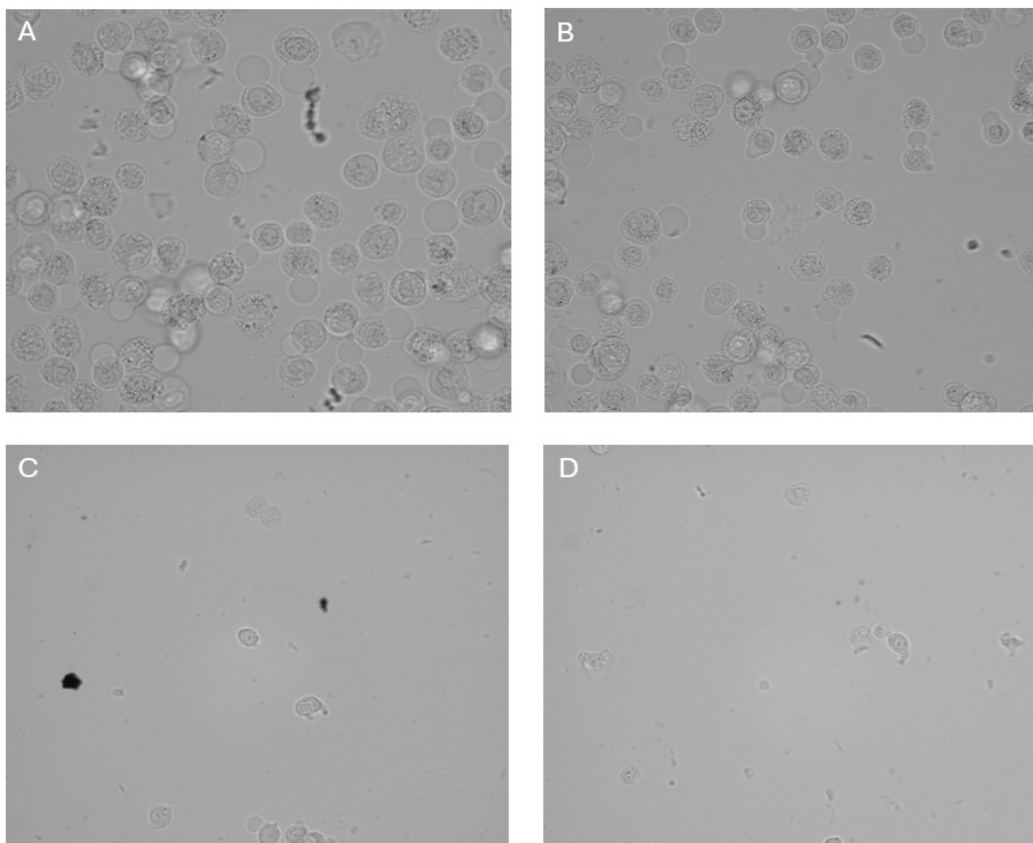


Figura 5: Caracterização morfológica das células A549 e BEAS-2B em suspensão por microscopia confocal no sistema de alto conteúdo (HCS).

(A–B) Células tumorais A549 em suspensão, apresentando maior tamanho celular e maior número de projeções membranares. (C–D) Células não tumorais BEAS-2B em suspensão, caracterizadas por menor tamanho e menor quantidade de projeções quando comparadas às A549.

A partir das imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura, em diferentes ampliações, foi possível visualizar maiores detalhes em relação às características morfológicas das linhagens celulares e suas diferenças. As células da linhagem A549 apresentaram morfologia epitelial poligonal, exibindo superfície irregular e rugosa e presença abundante de microvilosidades (Figura 6), características indicativas de alta atividade metabólica e secretora, condizente com a origem da linhagem. O tamanho celular é relativamente grande, com formato esférico (Figura 6A). Além disso, é possível observar “bolhas”, ou protuberâncias da membrana plasmática também conhecidas como bleb de membrana (Figura 6B, C e D). Esse fenômeno é comumente observado em situações de apoptose, mas também pode ser observado em outras funções não apoptóticas, como migração e divisão celular e secreção apócrina.

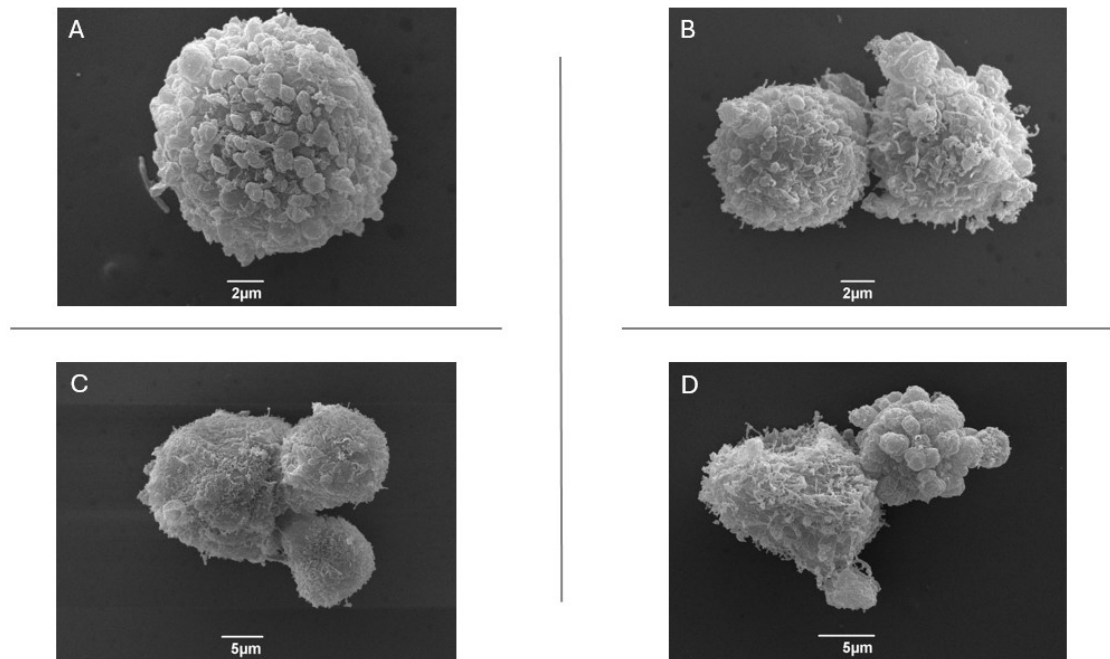


Figura 6: Caracterização morfológica da linhagem A549 por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

(A) Visão geral das células A549, evidenciando seu formato esférico, tamanho relativamente grande e morfologia epitelial poligonal. (B–D) Observa-se superfície celular irregular e rugosa, com abundância de microvilosidades distribuídas na membrana, além de protuberâncias da membrana plasmática (“blebs”).

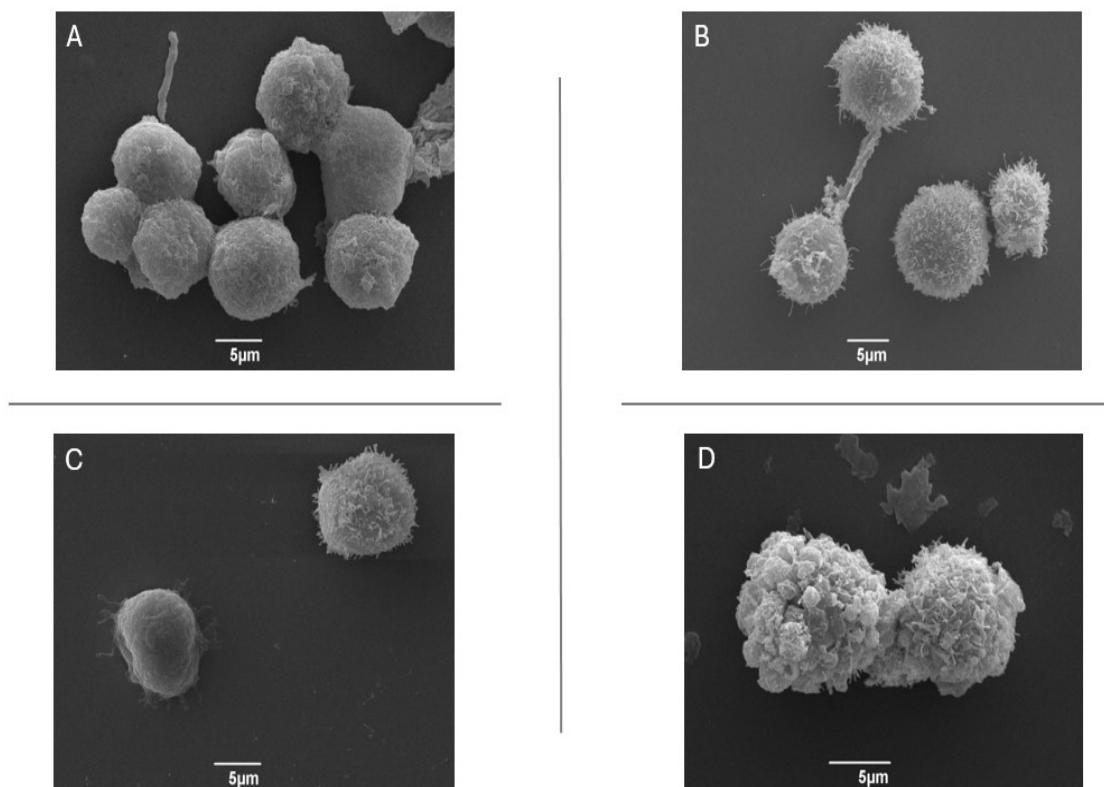


Figura 7: Caracterização morfológica da linhagem BEAS-2B por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

(A) Células BEAS-2B em suspensão exibindo morfologia epitelial regular, formato predominantemente esférico e menor tamanho celular em comparação à linhagem A549. A superfície apresenta menor irregularidade e rugosidade. (B, D) Observam-se pontes citoplasmáticas conectando células vizinhas, indicando interações intercelulares. (C) Visualizam-se microvilosidades finas distribuídas pela membrana, compatíveis com menores taxas proliferativas e secretoras quando comparadas às células A549.

As células BEAS-2B apresentaram morfologia epitelial regular, em que possuem um formato predominantemente esférico quando em suspensão e de menor tamanho quando comparadas à linhagem A549 (Figura 7). Além disso, também apresentam superfície celular menos irregular e rugosa (Figura 7A), embora apresente microvilosidades finas (Figura 7C); essas características estão associadas a menores taxas proliferativas e secretoras quando comparadas às células tumorais. Em algumas imagens é possível observar pontes citoplasmáticas que unem células vizinhas (Figura 7B e D), sugerindo interações intercelulares entre elas, mas sem o cenário de sobreposição excessiva que comumente ocorre em linhagens tumorais.

3.4 Ensaio de CELL-SELEX

Após a caracterização das células tumorais e não tumorais incluídas neste estudo, iniciou-se o processo de seleção dos aptâmeros pela metodologia CELL-SELEX. Na primeira rodada de seleção positiva, foi realizada a incubação das células tumorais A549 com a biblioteca inicial de aptâmeros. Os aptâmeros ligados foram eluídos e amplificados por PCR, testando-se diferentes números de ciclos de PCR (4, 6, 8, 10 e 12) para determinar a condição com melhor rendimento e especificidade. A análise em gel revelou bandas nítidas em todas as condições testadas; contudo, o ciclo 10 foi selecionado por apresentar o melhor equilíbrio entre intensidade de amplificação e ausência de produtos inespecíficos (Figura 8-gel da esquerda). Com esse parâmetro definido, procedeu-se ao PCR preparativo, utilizando apenas primer *forward* para amplificação da fita de ssDNA desejada. O produto amplificado apresentou o tamanho esperado de 86 nucleotídeos e quantidade suficiente para sua utilização na segunda rodada da seleção. (Figura 8-gel da direita).

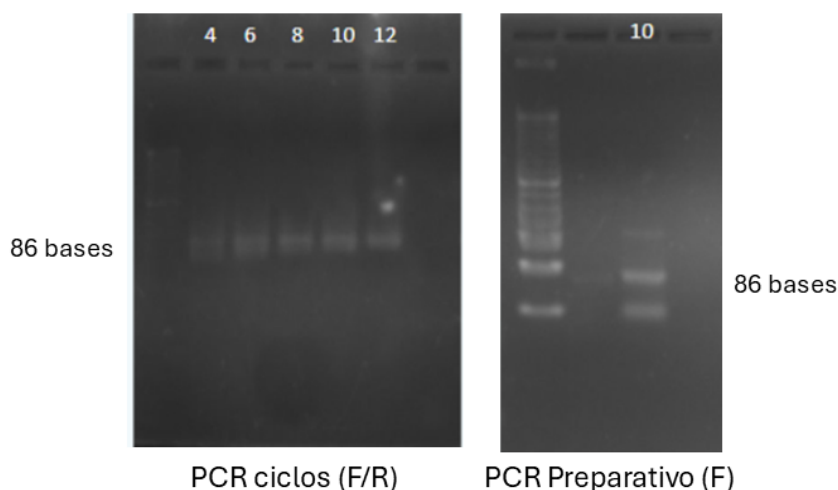


Figura 8: Amplificação dos aptâmeros durante a primeira rodada de seleção positiva do CELL-SELEX.

Gel da esquerda: avaliação de diferentes números de ciclos de PCR (4, 6, 8, 10 e 12 ciclos) para determinação da condição ideal de amplificação. Gel da direita: PCR preparativo realizado com primer *forward* para obtenção da fita simples (ssDNA) desejada.

Para as rodadas subsequentes, o protocolo foi mantido, ajustando-se regressivamente a proporção do número de células. Esses ajustes têm como objetivo promover o enriquecimento gradual de sequências com maior especificidade e afinidade pelas células-alvo, conduzindo à obtenção de um pool altamente seletivo ao final dos ciclos de seleção. A terceira rodada de seleção envolveu, além da etapa positiva, a realização da seleção negativa, utilizando células não tumorais (linhagem BEAS-2B) com o objetivo de remover sequências que se ligassem de forma inespecífica. Após a segunda rodada de seleção, foi observado, após PCR preparativo, o produto amplificado com tamanho esperado de 86 nucleotídeos e quantidade suficiente para sua utilização na terceira rodada de seleção (Figura 9-gel da esquerda). No terceiro round de seleção, após eliminação das sequências de aptâmeros que também reconhecem células não tumorais de pulmão, após PCR preparativo, foi observada perda na quantidade do produto amplificado, como esperado. No entanto, a banda observada em gel apresentava-se com tamanho esperado de 86 nucleotídeos e quantidade suficiente para sua utilização na quarta rodada de seleção (Figura 9-gel da direita).

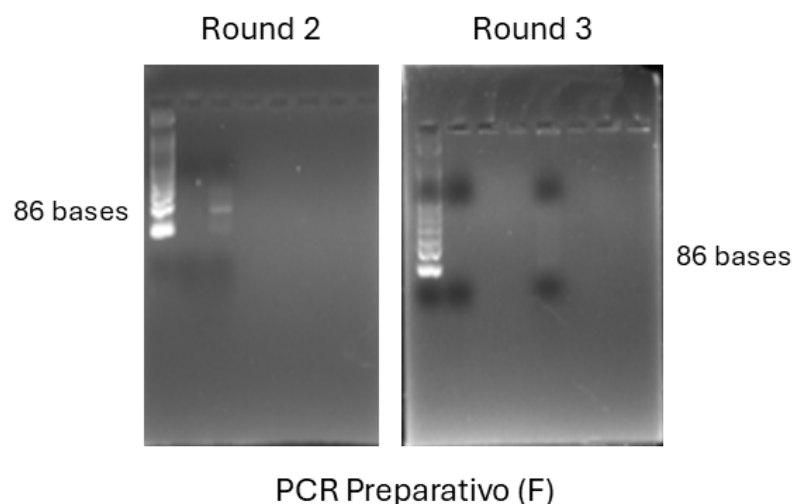


Figura 9: Gel de eletroforese do PCR preparativo (F) do segundo e terceiro rounds do CELL-SELEX.

Gel da esquerda: produto do PCR preparativo obtido após o segundo round de seleção positiva, apresentando banda única e nítida com tamanho esperado de aproximadamente 86 nucleotídeos, em quantidade adequada para prosseguir ao terceiro round. Gel da direita: produto do PCR preparativo referente ao terceiro round, realizado após a seleção negativa com células BEAS-2B para remoção de sequências inespecíficas. Observa-se redução na quantidade de DNA amplificado, como esperado para

essa etapa, porém mantendo banda com o tamanho correto (86 nucleotídeos), suficiente para continuidade no quarto round de seleção.

Tabela 2: Quantificação das concentrações de ssDNA obtidas em cada rodada do processo CELL-SELEX.

Dosagem (ng/ul)	R1	R2	R3	R4
Pré-coluna NAP-5	43	20.3	18.6	13.4
Pós-coluna NAP-5	20	25.4	17.4	17.0

Tabela apresentando a quantificação das concentrações de ssDNA recuperadas ao final de cada rodada do processo CELL-SELEX, determinadas através do sistema Qubit.

4 DISCUSSÃO

A padronização do cultivo da linhagem A549 representou um passo essencial para garantir a confiabilidade dos ensaios subsequentes de CELL-SELEX. O crescimento observado, com tempo de duplicação populacional entre 22 e 40 horas, está em conformidade com dados da ATCC (2024) e com descrições clássicas dessa linhagem epitelial derivada de adenocarcinoma pulmonar (Giard et al., 1973; Lieber et al., 1976). A autenticidade da cultura foi confirmada por genotipagem por STR, que apresentou 100% de similaridade com o perfil de referência, reforçando a importância do controle de identidade celular para a reprodutibilidade científica (Masters, 2002). Esses resultados asseguram que as células utilizadas mantiveram sua fisiologia, estado de proliferação, requisitos fundamentais para uma seleção eficiente de aptâmeros.

A caracterização morfológica por microscopia confocal de alto conteúdo e eletrônica de varredura complementou essas análises, evidenciando células com morfologia epitelial típica, formato alongado ou poligonal, boa aderência ao substrato e presença de lamelipódios e filopódios. Essas estruturas, associadas à dinâmica de superfície celular, ampliam o repertório de epítomos disponíveis para interação,

favorecendo a seleção de aptâmeros com afinidade para alvos nativos em membrana. A integridade estrutural observada após o preparo para MEV confirmou que as condições de cultivo foram apropriadas e que o modelo estável era adequado para o processo de seleção.

No início da metodologia CELL-SELEX, a otimização da etapa de amplificação do pool inicial de aptâmeros demonstrou eficiência na definição dos parâmetros experimentais. A comparação entre diferentes números de ciclos de PCR permitiu identificar o ciclo 10 como a condição ideal, por apresentar equilíbrio entre rendimento e especificidade. A obtenção de um produto único de 86 nucleotídeos, em concentração suficiente para o prosseguimento dos ciclos de seleção, estabeleceu uma base sólida para o enriquecimento subsequente de sequências candidatas. Até o momento, foram conduzidos quatro rounds de seleção, todos apresentando desempenho adequado e indicando que o processo de enriquecimento está evoluindo a contento, conforme esperado para essa metodologia.

O presente trabalho apresentou o desenvolvimento e a aplicação da técnica CELL-SELEX para a seleção de aptâmeros específicos voltados ao diagnóstico do câncer de pulmão, uma das neoplasias de maior impacto em mortalidade no mundo. A escolha dessa metodologia mostrou-se estratégica por permitir a obtenção de aptâmeros com alta afinidade e especificidade para alvos moleculares de superfície, características essenciais para aplicações diagnósticas. A utilização das linhagens A549 (tumoral) e BEAS-2B (não tumoral) possibilitou a realização de ciclos sucessivos de seleção positiva e negativa, reduzindo interações inespecíficas e permitindo o enriquecimento progressivo de aptâmeros seletivos.

Embora os resultados obtidos até o momento sejam promissores, destaca-se que a seleção de aptâmeros ainda está em fase inicial, devem ser necessários cerca de 12 rounds de seleção para obtenção de aptâmeros altamente específicos para as células A549. Além disso, ainda serão necessárias etapas subsequentes de validação, incluindo determinação de afinidade, especificidade, análise funcional e testes em amostras clínicas, para confirmar o desempenho diagnóstico das sequências identificadas. Fatores como heterogeneidade tumoral e presença de epítomos compartilhados entre células normais e neoplásicas continuam sendo desafios importantes a serem enfrentados (Keefe et al., 2010).

Ainda assim, os achados deste estudo reforçam o potencial dos aptâmeros como ferramentas versáteis na área de diagnóstico molecular. Em comparação a anticorpos tradicionais, aptâmeros apresentam vantagens como maior estabilidade, menor custo de produção, ausência de imunogenicidade e grande flexibilidade de modificação química (Song et al., 2008). Dessa forma, sua aplicação representa uma alternativa promissora para o desenvolvimento de biossensores e plataformas inovadoras voltadas à detecção precoce do câncer de pulmão, contribuindo para a construção de metodologias diagnósticas mais acessíveis, precisas e eficientes no contexto nacional.

Em síntese, este trabalho evidencia a importância da integração entre biologia celular, biologia molecular e tecnologias de seleção e identificação de ligantes, ressaltando o papel dos aptâmeros como agentes promissores no avanço de estratégias diagnósticas para o câncer de pulmão. Os resultados obtidos estabelecem bases robustas para estudos futuros, incluindo a validação funcional dos aptâmeros selecionados, a exploração de seu potencial terapêutico e sua aplicação em amostras clínicas, visando impacto positivo na detecção precoce, no prognóstico e na qualidade de vida dos pacientes.

5 CONCLUSÃO

Em conclusão, o desenvolvimento inicial da metodologia CELL-SELEX aplicado às linhagens A549 e BEAS-2B demonstrou resultados consistentes e promissores, sustentados pela caracterização morfológica, autenticidade celular confirmada e otimização eficiente das etapas de amplificação. A realização de quatro rounds de seleção, conduzidos com desempenho satisfatório, indica que o processo de enriquecimento de aptâmeros está evoluindo conforme esperado, estabelecendo bases sólidas para a identificação de sequências com afinidade elevada e especificidade para alvos tumorais. Somados aos avanços previstos com NGS e espectrometria de massas, esses achados reforçam o potencial dos aptâmeros como ferramentas inovadoras para o diagnóstico molecular do câncer de pulmão,

contribuindo para o desenvolvimento futuro de estratégias mais sensíveis, acessíveis e precisas voltadas à detecção precoce e ao aprimoramento da prática clínica.

6 REFERÊNCIAS

ATCC. A549 (CCL-185) human lung carcinoma cell line. Manassas, VA: ATCC, 2024. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/ccl-185>

Avci-Adali, Meltem et al. (2013) Absolute quantification of cell-bound DNA aptamers during SELEX. *Nucleic Acid Therapeutics*, v. 23, n. 2, p. 125–130. DOI: 10.1089/nat.2012.0406.

Bivalkar-Mehla S, Vakharia J, Mehla R, Abreha M, Kanwar JR, Tikoo A, et al. (2011). Viral RNA silencing suppressors (RSS): novel strategy of viruses to ablate the host RNA interference (RNAi) defense system. *Virus research* 155: 1-9.

Bourzac, Karen (2012). Nanotechnology: carrying drugs. *Nature*, London, v. 491, n. 7425, p. S58-S60. DOI: 10.1038/491s58a.

Ellington AD, Szostak JW (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346:818-822.

Esposito CL, Passaro D, Longobardo I, Condorelli G, Marotta P, Affuso A, et al. (2011). A neutralizing RNA aptamer against EGFR causes selective apoptotic cell death. *PloS one* 6: e24071.

Faria M, Ulrich H (2002). The use of synthetic oligonucleotides as protein inhibitors and anticancer drugs in cancer therapy: accomplishments and limitations. *Current cancer drug targets* 2: 355-368.

Germer K, Leonard M, Zhang X (2013). RNA aptamers and their therapeutic and diagnostic applications. *International journal of biochemistry and molecular biology* 4: 27-40.

GIARD, D. J. et al. (1973) Establishment and characterization of human carcinoma cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 51, n. 5, p. 1417-1423.

Huang YF, Shangguan D, Liu H, Phillips JA, Zhang X, Chen Y, et al. (2009). Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 10: 862-868.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). *Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>

Islami F, Torre LA, Jemal A (2015). Global trends of lung cancer mortality and smoking prevalence. *Translational lung cancer research* 4: 327-338.

Kanwar JR, Mohan RR, Kanwar RK, Roy K, Bawa R (2010). Applications of aptamers in nanodelivery systems in cancer, eye and inflammatory diseases. *Nanomedicine (Lond)* 5: 1435-1445.

Kanwar JR, Roy K, Kanwar RK (2011). Chimeric aptamers in cancer cell-targeted drug delivery. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 46: 459-477.

Keefe AD, Pai S, Ellington A (2010). Aptamers as therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 9: 537–550

Lieber M. et al (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *International Journal of Cancer*, v. 17, n. 1, p. 62-70.

Marino E, Caruso M, Campagna D, Polosa R (2015). Impact of air quality on lung health: myth or reality? *Therapeutic advances in chronic disease* 6: 286-298.

Masters JR (2002). HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature Reviews Cancer*, v. 2, p. 315–319. DOI: 10.1038/nrc775.

Medley CD, Bamrungsap S, Tan W, Smith JE (2011). Aptamer-conjugated nanoparticles for cancer cell detection. *Analytical chemistry* 83: 727-734.

Mi J, Zhang X, Rabbani ZN, Liu Y, Reddy SK, Su Z, et al.(2008). RNA aptamer-targeted inhibition of NF-kappa B suppresses non-small cell lung cancer resistance to doxorubicin. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16: 66-73.

Mi Z, Guo H, Russell MB, Liu Y, Sullenger BA, Kuo PC (2009). RNA aptamer blockade of osteopontin inhibits growth and metastasis of MDA-MB231 breast cancer cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17: 153-161.

Ohuchi S (2012). Cell-SELEX Technology. *BioResearch open access* 1: 265-272.

Pan W, Xin P, Clawson GA (2008). Minimal primer and primer-free SELEX protocols for selection of aptamers from random DNA libraries. *BioTechniques* 44: 351-360.

Phillips, Jonie A. et al. (2008) Applications of aptamers in cancer cell detection and diagnosis. *Analyst*, Cambridge, v. 134, n. 4, p. 577–584. DOI: 10.1039/b815720h.

Que-Gewirth NS, Sullenger BA (2007). Gene therapy progress and prospects: RNA aptamers. *Gene therapy* 14:283-291.

Ray PW, R.R. (2010). Aptamers for Targeted Drug Delivery. *Pharmaceuticals* 3: 1761-1778.

Rerole AL, Gobbo J, De Thonel A, Schmitt E, Pais de Barros JP, Hammann A, et al. (2011). Peptides and aptamers targeting HSP70: a novel approach for anticancer chemotherapy. *Cancer research* 71: 484-495.

Santos, Marcelo de Oliveira et al. (2023-2025). Estimated Cancer Incidence in Brazil. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 69, n. 1, e-213700, 2023. DOI: 10.32635/2176-9745.RBC.2023v69n1.3700

Schiffman JD, Fisher PG, Gibbs P (2015). Early detection of cancer: past, present, and future. *American Society of Clinical Oncology educational book / ASCO. American Society of Clinical Oncology. Meeting* 35: 57-65.

Song S, Wang L, Li J, Fan C, Zhao J (2008). Aptamer-based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27: 108–117.

Sturgeon CM, Lai LC, Duffy MJ (2009). Serum tumour markers: how to order and interpret them. *BMJ* 339:b3527.

Sung, H. et al. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209–249. DOI: 10.3322/caac.21660.

Tobin NP, Foukakis T, De Petris L, Bergh J (2015). The importance of molecular markers for diagnosis and selection of targeted treatments in patients with cancer. *Journal of Internal Medicine* 278(6): 545–570.

Ulrich H, Magdesian MH, Alves MJ, Colli W (2002). In vitro selection of RNA aptamers that bind to cell adhesion receptors of *Trypanosoma cruzi* and inhibit cell invasion. *The Journal of biological chemistry* 277: 20756-20762.

Wu YY, Hsieh IS, Tung CH, Weng CH, Wu JE, Yu JS, Hong TM, Chen YL (2022). A novel DNA aptamer targeting lung cancer stem cells exerts a therapeutic effect by binding and neutralizing Annexin A2. *Molecular Therapy – Nucleic Acids* 27: 956–968.

Zamay AS, Zamay GS, Dorozhkevich OV, Yoon JH et al. (2015). Aptamers selected to postoperative lung adenocarcinoma tissues as specific probes for circulating tumor cell detection. *Molecular Therapy – Nucleic Acids* 4: e234.