

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

Beatriz Bilicki
Lara Bertolini Rodrigues de Oliveira

**CENÁRIO ATUAL DOS APTÂMEROS, SUA CONJUGAÇÃO COM MEIOS DE
CONTRASTES E PERSPECTIVAS PARA O FUTURO NA ONCOLOGIA**

São Paulo
2019

Beatriz Bilicki
Lara Bertolini Rodrigues de Oliveira

**CENÁRIO ATUAL DOS APTÂMEROS, SUA CONJUGAÇÃO COM MEIOS DE
CONTRASTES E PERSPECTIVAS PARA O FUTURO NA ONCOLOGIA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biomedicina do
Centro Universitário São Camilo, orientado
pelo Prof. Dr. Homero José de Farias e
Melo, como requisito parcial para obtenção
do título de biomédico.

São Paulo
2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Radrizzani

Bilicki, Beatriz

Cenário atual dos aptâmeros, sua conjugação com meios de contrastes e perspectivas para o futuro na oncologia / Beatriz Bilicki, Lara Bertolini Rodrigues de Oliveira. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2019.

74 p.

Orientação de Homero José de Farias e Melo.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2019.

1. Aptâmeros 2. Diagnóstico por imagem 3. Neoplasias I. Oliveira, Lara Bertolini Rodrigues de II. Melo, Homero José de Farias e III. Centro Universitário São Camilo IV. Título

CDD: 616.07548

Beatriz Bilicki
Lara Bertolini Rodrigues de Oliveira

**CENÁRIO ATUAL DOS APTÂMEROS, SUA CONJUGAÇÃO COM MEIOS DE
CONTRASTES E PERSPECTIVAS PARA O FUTURO NA ONCOLOGIA**

São Paulo, 21 de novembro de 2019

Professor Orientador: (Homero José de Farias e Melo)

Professor Examinador: (Fábio Mitsuo Lima)

São Paulo
2019

Dedicatória

“Eu, Beatriz Bilicki, dedico esse trabalho ao meu avô José Lopes de Oliveira (in memorian), com todo amor do mundo e gratidão, por ter me ensinado valores para toda a vida. E eu, Lara Bertolini Rodrigues de Oliveira, dedico aos meus pais Osmar Rodrigues de Oliveira e Valéria Bertolini Rodrigues de Oliveira, que com todo amor e carinho foram meus exemplos de dedicação, trabalho duro e segurança”.

Agradecimentos

Agradecemos aos nossos pais, que sempre foram as nossas maiores fontes de inspiração e força, e aos nossos irmãos, por acreditarem neste sonho a todo momento, e por sempre nos apoiarem nas adversidades desta jornada. Aos nossos amigos, muito obrigado pelo carinho, sem vocês com certeza teríamos enlouquecido, obrigada por serem tão companheiros em todos os momentos e por todo o incentivo dado.

Agradecemos todos nossos mestres, principalmente ao professor Homero José de Farias e Melo que fez toda a diferença neste ano, nos guiando para o melhor desenvolvimento possível deste trabalho tão importante em nossas vidas, que significa o encerramento de um árduo e gratificante ciclo e o início de nossas vidas profissionais.

A toda equipe de biomédicos e enfermagem da ressonância magnética do laboratório Hermes Pardini e a todos os profissionais que compartilharam seu conhecimento, agradecemos por todo apoio durante este ano, de descobertas, desafios e muita aprendizagem, com certeza vocês fizeram parte de nossas histórias e os levaremos em nossa memória e coração.

Aos nossos amigos da Liga Acadêmica de Imaginologia São Camilo, por termos acreditado uns nos outros e nos mantermos unidos durante esta etapa, também aos amigos da Bateria São Camilo por sempre trazerem alegria e descontração até nos momentos mais difíceis vividos durante estes anos dedicados à São Camilo.

Ao Centro Universitário São Camilo, e a coordenação do curso de Biomedicina, que ao longo de nossa formação profissional ofereceu um ambiente de estudo de excelência, agradável, e de oportunidades.

Por fim, agradecemos a nossa cumplicidade para entendermos uma à necessidade e tempo da outra, sem ela não conseguiríamos o resultado obtido neste trabalho de conclusão de curso.

“Você nunca achará o arco-íris, se você estiver olhando para baixo.” - Charles Chaplin

RESUMO

Os métodos para o diagnóstico oncológico englobam muitas técnicas da área médica, as quais tem como foco principal o rastreamento de doenças neoplásicas. A ressonância magnética (RM), a tomografia computadorizada (TC), a medicina nuclear que englobam técnicas com as imagens classificadas como imagens híbridas, tais como a tomografia por emissão de pósitrons (PET) e tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT), provaram ser técnicas de imagem altamente versátil e ótimas ferramentas de diagnóstico e terapia, as quais atualmente oferecem uma forma não invasiva e mais sensível de obter imagens de diversas áreas do corpo. Os métodos de imagem podem ajudar a estabelecer um diagnóstico e monitorar o curso da doença, por ser uma técnica útil para distinguir entre os tecidos patológicos e os tecidos normais. Entretanto, a detecção rotineira de RM, TC e medicina nuclear nem sempre consegue distinguir o tecido alterado e o tecido normal claramente na clínica. Segundo as estatísticas, quase 50% da detecção por RM precisa do auxílio de agentes de contraste para melhorar a resolução da imagem, estes agentes de contraste convencionais geralmente possuem uma falta de especificidade e podem causar toxicidade grave em áreas normais, assim também como os radiofármacos (RF), que são usados nas técnicas de imagem de MN, e possuem alta sensibilidade, mas falta de especificidade o que promove a distribuição dos RF para outras áreas do corpo que não são de interesse, podendo ocasionar, em muitas vezes, efeitos colaterais pela interação do RF com órgãos e outros tecidos que não são os analisados, podendo ocasionar desconforto ao paciente. Neste ponto que entram os aptâmeros, uma vez que esses podem se ligar a moléculas com alta especificidade e afinidade, e por essas propriedades chamam atenção, e tem sido investigado o seu possível emprego na área de diagnóstico por imagem para o diagnóstico e terapia. Durante este trabalho, por meio de uma revisão sistemática, analisamos, discutimos e sintetizamos as informações recentes acerca da aplicabilidade da conjugação dos aptâmeros com meios de contrastes para a RM e radiofármacos, para um diagnóstico preciso de neoplasias, seus tratamentos e perspectivas para o futuro.

Palavras chaves: Neoplasias. Aptâmeros. Diagnóstico por imagem.

ABSTRACT

The methods for cancer diagnosis encompass many medical techniques, which have as their main focus the screening of neoplastic diseases. Magnetic resonance imaging (MRI), computed tomography (CT), nuclear medicine encompassing techniques with images classified as hybrid images, such as positron emission tomography (PET) and single photon emission computed tomography (SPECT). , have proven to be highly versatile imaging techniques and great diagnostic and therapy tools, which currently offer a non-invasive and more sensitive way of imaging from various areas of the body. Imaging methods can help establish a diagnosis and monitor the course of the disease because it is a useful technique for distinguishing between pathological and normal tissues. However, routine MRI, CT and nuclear medicine detection cannot always distinguish altered tissue from normal tissue clearly in the clinic. According to statistics, nearly 50% of MRI detection needs the aid of contrast agents to improve image resolution, these conventional contrast agents often lack specificity and can cause severe toxicity in normal areas, as well as radiopharmaceuticals. (RF), which are used in NM imaging techniques, and have high sensitivity but lack of specificity, which promotes the distribution of RF to other areas of the body that are not of interest, and can often cause side effects. by the interaction of RF with organs and other tissues that are not analyzed, which may cause discomfort to the patient. At this point, aptamers come in, since they can bind to molecules with high specificity and affinity, and because of these properties draw attention, and their possible use in the area of diagnostic imaging for diagnosis and therapy has been investigated. During this work, through a systematic review, we analyzed, discussed and synthesized recent information about the applicability of the combination of aptamers with contrast media for MRI and radiopharmaceuticals, for an accurate diagnosis of neoplasms, their treatments and future prospects.

Keywords: Neoplasms. Aptamers. Imaging diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma de pesquisa com o cruzamento dos descritores.....	29
Figura 2 – Ligação de lipossomas, carregados com Gd, ao TNC	35
Figura 3 – Hibridização do aptâmero de adenosina com Dota-Gd	38
Figura 4 – Marcação de fatias tumorais de cérebros humanos	56
Figura 5 – Imagens de PET coronal de camundongos	60
Figura 6 – Imagens de PET, coronal de camundongos	62
Figura 7 – Imagem de SPECT planar estática	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados de biodistribuição animal.....	58
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Síntese dos artigos selecionados sobre a conjugação dos aptâmeros com o Gd	31
Quadro 2 – Síntese dos alvos e tropismo dos aptâmeros com Gd	37
Quadro 3 – Síntese dos artigos selecionados sobre a conjugação dos aptâmeros com o RF	46
Quadro 4 – Biodistribuição do ¹⁸ F-FB-Tenascina-C Aptamer a 0,5, 1 e 2 horas após a injeção.....	61

LISTA DE SIGLAS

^{99m}Tc	Tecnécio-99m;
Cell-SELEX ligands;	Cellular - systematic evolution of exponential enrichment ligands;
DOTA-Gd	Gadolínio-tetraazaciclododecanetetracético;
DNA	Ácido desoxirribonucleico;
EDDA	Ácido etilenodiamino-N,N'-diacético;
FISH	Fluorescent in situ hybridization;
GBCA	Agentes de contraste à base de gadolínio;
GBI-10m	GBI-10 modificado;
Gd	Gadolínio;
GmLs	Lipossomas modificados com GBI-10m;
HIV	Vírus da imunodeficiência humana;
INCA	Instituto Nacional de Câncer;
MN	Medicina Nuclear;
MSI	Microsatellite instability;
MUC 1	Mucina-1;
OMS	Organização Mundial da Saúde;
PCR	Reação em cadeia da polimerase;
PET-CT	Tomografia por Emissão de Pósitrons;
QS	Cordão de extinção;
RF	Radiofarmacos;
RM	Ressonância Magnética;

RNA	Ácido ribonucleico;
SELEX	Systematic evolution of ligands by exponencial enrichment;
SPIONs	Nanopartículas de óxido de ferro;
TC	Tomografía Computadorizada;
TMA	Tissue microarray;
TN-C	Tenascina-C.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 Métodos de diagnóstico oncológico por exames de imagem	21
3.2 Empregos dos meios de contrastes	22
3.3 Biologia molecular e como ela atua na oncologia	23
3.4 Aptâmeros, o que são?	24
3.5 Seleção de aptâmeros	26
4 METODOLOGIA	28
4.1 Revisão de literatura	28
4.2 Revisão sistemática	28
4.2.1 Seleção dos artigos	29
4.3 Leitura e análise críticas dos artigos	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Aptâmeros conjugados com gadolínio (Gd)	30
5.1.1 Produção e seleção dos aptâmeros	31
5.1.2 Conjugação dos aptâmeros ao gadolínio	34
5.1.3 Alvos dos aptâmeros e tropismo do conjugado no organismo	37
5.1.4 Resultados obtidos pelos autores e comparação entre os artigos	43
5.2 Aptâmeros conjugados com radiofármacos	45
5.2.1 Síntese dos artigos	47
5.2.2 Produção e Seleção dos aptâmeros	48
5.2.3 Conjugação dos aptâmeros	50
5.2.4 Alvos dos aptâmeros e tropismo do conjugado no organismo	53
5.2.5 Resultados obtidos pelos autores e comparação entre os artigos	55
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

Câncer ou neoplasia (*neo*= novo, *plasia*= formação) é o nome dado a um grupo de doenças que têm em comum o crescimento celular rápido e desordenado de forma agressiva, descontrolada e persistente, que ao invés de morrerem continuam crescendo e formando novas células anormais promovendo assim a formação de tumores, os quais podem invadir tecidos e órgãos, resultando em metástase (INCA, 2019; MALZYNER; CAPONERO, 2013; ABC DOCÂNCER, 2018).

Ele pode surgir em qualquer parte do corpo e essas regiões podem ser acometidas por tipos diferentes de tumores, mais ou menos agressivos, no entanto, existem alguns órgãos que são mais afetados do que outros, tais como pulmão, mama, colo do útero, próstata, colón e reto (intestino grosso), pele, estômago, esôfago, medula óssea (leucemias) e cavidade oral (boca). A nomenclatura de cada um desses tipos de câncer são classificados de acordo com a localização primária do tumor (INCA, 2019; KERSUL, 2014).

O câncer pode ocorrer a partir de uma mutação genética, onde temos uma ou mais alterações no ácido desoxirribonucleico (DNA) da célula, o qual passa a transmitir instruções erradas para a atividade celular, resultando em alterações em genes específicos denominados de proto-oncogenes, que a princípio são inativos em células normais, mas devido essas alterações podem ser ativados tornam-se oncogenes, responsáveis por transformar as células normais em células cancerosas, esse processo é chamado de carcinogênese ou oncogênese, o qual pode levar vários anos para que uma célula cancerosa prolifere-se o suficiente para formar um tumor visível (INCA, 2019; INCA, 2018).

Esse tipo de doença não possui uma causa única, e sim tipos de causas que estão relacionados a exposições de longa duração, sendo elas externas, como as presentes no meio ambiente em que estamos inseridos, ambiente social, cultural e estilo vida, e esses são fatores denominados cancerígenos ou carcinógenos. Outra possível causa são as internas que estão relacionadas com hormônios, condições imunológicas e mutações genéticas (INCA, 2019; MINAS GERAIS, 2013; KERSUL, 2014).

Os fatores genéticos são aqueles que tornam determinadas pessoas mais suscetíveis à ação dos agentes cancerígenos ambientais, isso ocorre, pois ambas as causas estão interligadas, o que explica porque algumas pessoas desenvolvem câncer e outras não, quando expostas a um mesmo carcinógeno (KERSUL, 2014; INCA, 2019).

Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) considera o câncer como um problema de saúde pública, tanto em países subdesenvolvidos quanto em países desenvolvidos (GUERRA, 2005; GONÇALVES; PADOVANI; POPIM, 2008).

Segundo estimativas da OMS para 2011, o câncer foi responsável por mais mortes do que todas as doenças cardíacas coronárias, e os dados divulgados sobre as transições demográficas e epidemiológica mostra a carga crescente de câncer nas próximas décadas, particularmente em países subdesenvolvidos que apresentam renda baixa e média, sendo nesses esperados mais de 20 milhões de novos casos de câncer por ano até 2025. Além disso, o câncer anualmente é responsável por mais de seis milhões de óbitos, o que representa cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo. Embora as maiores taxas de incidência de câncer sejam encontradas em países desenvolvidos, dos dez milhões de novos casos anuais de câncer cinco milhões e meio desses são diagnosticados nos países em desenvolvimento. A previsão para o ano de 2030 é de que haja aproximadamente 13,2 milhões de óbitos por câncer a nível mundial, um número significativamente maior do que os 7,6 milhões de óbitos ocorridos em 2008 (GUERRA, 2005; FERLAY *et al.*, 2010; FERLAY *et al.*, 2014).

Os métodos para o diagnóstico oncológico englobam diversos métodos da área médica, com foco preferencialmente no rastreamento de uma população que possui predisposição para doenças neoplásicas, com o intuito de descobrir de modo precoce a doença. Esse tipo de estratégia reduz a morbidade e aumenta a possibilidade de cura para alguns tipos de cânceres (HOFF; SABBAGA, 2016; INCA, 2018).

A detecção precoce pode ser realizada a partir da história clínica e exame físico detalhados, valorizando e avaliando os sintomas e/ou sinais clínicos que os pacientes apresentam, principalmente quando associados à presença de fatores de risco, e sempre que possível avaliando diretamente a área atingida procurando por

características que ajudem a direcionar o diagnóstico preciso e precoce, por meio de testes essenciais que são capazes de determinar a existência ou não de neoplasias, como os exames endoscópicos, a biópsia, citologia e os exames de diagnóstico por imagem (QUEIROGA; PERNAMBUCO, 2006; INCA, 2018).

Os métodos de diagnóstico por imagem possibilitam a visualização, localização e dimensões de uma massa anômala, ajudando a identificar anormalidades, determinando características da massa (sólida ou cística) e estabelecendo relações entre as estruturas circundantes, as quais podem ser importantes para direcionar uma possível cirurgia ou biópsia (AZEVEDO-MARQUES, 2001; ALVES; MICHELL, 2003).

É uma técnica não invasiva que, atualmente, possui caráter importante no diagnóstico e condução do tratamento de pacientes com câncer, por proporcionar a obtenção de informações tridimensionais, mostrando-se muito útil no estágio pré-operatório de neoplasias em geral permitindo o planejamento cirúrgico, especialmente para a preservação do tecido, podendo demonstrar a extensão da lesão, bem como afastar ou constatar a presença de lesão multifocal e/ou lesão multicêntrica (AZEVEDO-MARQUES, 2001; ALVES; MICHELL, 2003).

Recentemente, as técnicas de diagnóstico por imagem, chamaram a atenção devido ao bom desempenho dentro do diagnóstico, tratamento e acompanhamento do câncer, como por exemplo, a tomografia computadorizada (TC) que é utilizada para detectar câncer em muitas partes do corpo, tais como do cérebro, pulmões e partes do abdome (como as glândulas suprarrenais, os gânglios linfáticos, o fígado e o baço), e a medicina nuclear (MN), a qual vem sendo muito usada para determinar a atividade metabólica da massa cancerígena ou do linfonodo suspeitos, podendo identificar também diversos tipos de metástases (AZEVEDO-MARQUES, 2001; ALVES; MICHELL, 2003).

O destaque dentro desse conjunto de técnicas é a ressonância magnética (RM) com o uso do gadolínio (Gd) para diferenciar lesões benignas de malignas, por causa da grande impregnação que ocorre nos cânceres na fase precoce, após a injeção do contraste paramagnético logo no primeiro e terceiro minuto após a injeção endovenosa do Gd (AZEVEDO-MARQUES, 2001; ALVES; MICHELL, 2003).

Os métodos utilizados durante os exames de imagem, incluindo a injeção de seus meios de contrastes, estão em constante renovação, atualizando-se com novas tecnologias que surgem ao redor do mundo, sempre com o objetivo de ajudar o diagnóstico e terapêutica dos pacientes. Como o possível emprego dos aptâmeros.

Os aptâmeros foram desenvolvidos no início da década de 1990 (GOMES *et al.*, 2012). São oligonucleotídeos modificados, identificados após ciclos interativos de seleção/amplificação através de um processo denominado *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* (SELEX), a partir de uma biblioteca de oligonucleotídeos aleatórios. Os aptâmeros, com grande frequência, são selecionados com sucesso para uma ampla gama de alvos, como proteínas, ácidos nucléicos, peptídeos, pequenas moléculas, células inteiras, e até mesmo marcadores tumorais com alta afinidade e especificidade, essas ferramentas baseadas em aptâmeros podendo ser projetadas para diagnóstico e/ou tratamento terapêutico de doenças oncológicas (MAYER, 2009; SYED; PERVAIZ, 2010; GOMES *et al.*, 2012).

2 OBJETIVOS

Avaliar a aplicação dos aptâmeros e sua conjugação com meios de contraste e radiofármacos para o diagnóstico e tratamentos mais eficientes e eficazes de neoplasias e seus tratamentos para o futuro, por meio de uma revisão sistemática na base de dados PubMed.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Métodos de diagnóstico oncológico por exames de imagem

Atualmente, a ressonância magnética (RM) é um método de diagnóstico por imagem muito bem estabelecido na prática clínica, e em contínuo desenvolvimento. A RM produz imagens em três dimensões de forma não invasiva, sem os riscos da radiação ionizante e com ótima resolução espacial e contrastada, permitindo uma avaliação tumoral bastante fidedigna. O estudo convencional dos tumores por RM avalia tanto características morfológicas e quantitativas, tais como tamanho, edema, necrose, contornos, quantidade de lesões e presença de metástases, quanto características qualitativas, como grau de realce pós-contraste. Há mais de 30 anos este método vem apresentando significativo progresso em diferentes áreas da medicina, especialmente em oncologia, incluindo distintas etapas do manejo oncológico, como detecção, caracterização, estadiamento, avaliação de resposta e seguimento pós-terapêutico. Atualmente, o principal foco das inovações está no alcance na evolução da resolução anatômica e, mais recentemente, no advento de métodos moleculares e funcionais (GONZÁLEZ HERNANDO *et al.*, 2010; HIGGINS; POMPER, 2011; GUIMARAES *et al.*, 2014).

Entre os exames de imagem, um que mais se destaca é a tomografia por emissão de pósitrons (PET), uma técnica da medicina nuclear (MN) que permite o mapeamento de diferentes substâncias químicas no organismo. A capacidade de detectar alterações funcionais, metabólicas e bioquímicas em órgãos ou tecidos, mesmo antes que alterações anatômicas se manifestem, é a característica fundamental das imagens diagnósticas da MN. O grande benefício do PET é a capacidade de medir as lesões, demonstrando a presença de alterações funcionais, permitindo, assim, o diagnóstico precoce do câncer para um tratamento mais eficaz e assertivo. Empregado, por exemplo, na oncologia o qual tem sido usado para distinguir processos malignos de benignos, no estadiamento, detecção de recidiva, avaliação precoce e tardia da resposta à terapia, na determinação do prognóstico e da mudança de conduta clínica de pacientes com diversos tipos de tumores malignos (CAMARGO, 2004; CAMARGO, 2005).

3.2 Empregos dos meios de contrastes

Na prática de RM são utilizados meios de contraste à base de quelatos do íon paramagnético gadolínio (Gd) (HAEN, 2001).

Os tipos de contraste à base de Gd que existem no mercado, atualmente, podem ser divididos em duas categorias, extracelular inespecífico e intracelular específico, sendo que a principal diferença está na molécula quelante que carrega o Gd. De modo geral, considera-se que os agentes de contraste à base de Gd são muito mais seguros que o contraste iodado utilizado na radiologia convencional e nos exames de tomografia computadorizada (TC); no entanto, existem complicações, as quais devem ser reconhecidas, para tratamento adequado e para orientação antes e após a realização do exame (ELIAS JUNIOR *et al.*, 2008).

Na medicina, o Gd é utilizado apenas na forma de soluções compostas para realce em exames de imagem. Quando estes agentes de contraste se tornaram disponíveis, no início da década de 1990, se acreditava não ser necessário o seu emprego na RM, pelo o alto contraste dos tecidos moles já fornecido pelo exame. Porém os meios de contraste a base de Gd encontraram seu lugar na prática clínica e atualmente entre as indicações clínicas do seu uso estão as aquisições de imagens tumorais (pré e pós-cirurgia), pré e pós-radioterapia, infecções, infarto, inflamações, lesões pós-traumáticas, pós cirurgia de disco intervertebral e angiografia contrastada (ELIAS JUNIOR *et al.*, 2008; WESTBROOK, 2016).

Já a MN é uma especialidade médica que lida com o uso de diversos radiofármacos, os quais fazem parte da rotina hospitalar sendo aplicados de forma controlada para exames de diagnóstico por imagem e radioterapia, destinadas para fins de diagnóstico e tratamento de diversas patologias. Trata-se, basicamente, de uma técnica que, além de não apresentar efeitos farmacológicos, pode ser considerada não invasiva e que permite avaliar a função e não só a morfologia do órgão, é uma técnica simples e que apenas requer administração de um RF de forma endovenosa, oral ou inalatória (DILWORTH; PARROT, 1998; RÊGO *et al.*, 2017).

RF são traçadores radioativos, ou seja, são substâncias emissoras de radiação, as quais são produzidas com elementos com funções diferentes: o

fármaco e o radionuclídeo, onde o fármaco dirige o radionuclídeo a um órgão específico ou processo, e o componente radionuclídeo pode ser detectado ou exercer sua função terapêutica (SOUSA, 2013; RÊGO *et al.*, 2017).

Atualmente são realizadas três terapias principais nos serviços de MN brasileiros, sendo eles para o tratamento do hipertireoidismo, do nódulo tóxico autônomo e das metástases de carcinomas diferenciados da tireoide com o radiofármaco Iodo-131; para o tratamento do neuroblastoma com MIBG-I-131, doses altas e repetidas tendem a reduzir os tumores e assim propiciando melhores resultados para o posterior tratamento cirúrgico; e o tratamento antiálgico em metástases ósseas com Samário-153, que é um emissor de radiações beta com afinidade por lesões osteogênicas, esse não apresenta efeito curativo ou influência na evolução da doença, mas melhoram a qualidade de vida do paciente (SOARES; FLOR, 2001).

Além das aplicações em MN, o uso de radiofármacos para tratamento introduz a possibilidade de diferentes aplicações terapêuticas como a iodoterapia, a radioimunoterapia, a terapia radionuclídica de receptores peptídicos, radiosinovectomia, terapia intravascular para prevenção de reestenose das artérias coronárias, a terapia radionuclídica transarterial, o tratamento de metástases ósseas, doenças benignas e mieloproliferativas (SANTOS; BOLOGNESI, 2014).

3.3 Biologia molecular e como ela atua na oncologia

A biologia molecular, atualmente, está em constante desenvolvimento e expansão, e com a utilização das técnicas moleculares, os eventos envolvidos no processo de carcinogênese têm sido gradativamente esclarecidos, resultando na geração de uma série de novas informações que vêm sendo absorvidas pelos oncologistas clínicos, influenciando suas condutas e tomada de decisões. Atualmente se tem identificado marcadores moleculares de grande valor para o prognóstico (PAES, 1995).

Alguns marcadores são reconhecidos como fatores prognósticos bastante característicos, como o status de receptores hormonais, marcadores de proliferação celular e produtos protéicos de genes supressores de tumor e oncogenes (ASCO, 1998).

Variantes genéticas são influenciadas por fatores biológicos e pelas circunstâncias a que são submetidos os indivíduos. A partir da análise de marcadores genéticos que apresentam certa frequência de alteração entre as populações, é apresentada variações, em virtude da ação diferencial de processos fundamentais, incluindo recombinações e mutações (SUNNUCKS; 2000; PAVARINHO; CHICOTE; BERTOLLO, 2015).

O desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR), que amplifica segmentos específicos de DNA, a aplicação de conjuntos de iniciadores evolutivamente conservados para PCR, a utilização dos *loci* de microssatélites hipervariáveis e o advento do sequenciamento de DNA de rotina de laboratórios foram os mais importantes. Essas inovações, com a evolução de análises precisas e relativamente simples de programas computacionais, permitiram que grande parte dos dados genéticos-moleculares pudesse ser explorada, revelando informações que, de outra maneira, seriam inalcançáveis (PAVARINHO; CHICOTE; BERTOLLO, 2015).

Em biologia molecular, podemos citar como destaques usados para o diagnóstico oncológico as técnicas de *fluorescent in situ hybridization* (FISH), *microsatellite instability* (MSI), *cDNA microarray*, *tissue microarray* (TMA), genes diferencialmente expressos, genes metilados, mutação nos genes de reparo, entre outros. E para um diagnóstico preciso são necessários marcadores específicos, seja o PCR, seja o FISH (SCHUELER, 2017).

3.4 Aptâmeros, o que são?

Aptâmeros são uma nova ferramenta nanotecnológica da biologia molecular aplicável em diversas áreas da pesquisa e médica, são constituídos de oligonucleotídeos que apresentam alta especificidade e afinidade para uma ampla série de moléculas alvo como proteínas, peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos, drogas, vitaminas, compostos orgânicos e inorgânicos, além disso apresenta características importantes para o desenvolvimento de novos diagnósticos e estratégias terapêuticas (YOU *et al.*, 2003; ELLINGTON; SZOSTAK, 1990; FERREIRA; MISSAILIDIS, 2007).

Os aptâmeros podem ser de ácido desoxirribonucleico (DNA) fita simples, ácido ribonucleico (RNA) ou bases modificadas contendo entre 50-100 bases. Eles são capazes de formar estruturas tridimensionais caracterizados por grampos, essa estrutura permite com que os aptâmeros se liguem a uma variedade de alvos, resultado de uma compatibilidade estrutural, empilhamento de anéis aromáticos, interações eletrostáticas e de Van de Waals, ligações de hidrogênio ou a combinação desses efeitos (FERREIRA; MISSAILIDIS, 2007; STOLTENBURG *et al.*, 2007).

Para demonstrar o potencial dos aptâmeros, a sua afinidade e especificidade é comparável a dos anticorpos monoclonais, pois são capazes de serem gerados para uma grande variedade de alvos, as quais incluindo compostos tóxicos, moléculas não imunogênicas, para as quais anticorpos não podem ser gerados. Além disso, os aptâmeros são de dez a cem vezes menores que os anticorpos e não são imunogênicos, característica importantes para o desenvolvimento de moléculas promissoras no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e diagnóstico, ressaltando ainda mais seu potencial perante os anticorpos monoclonais devido ao seu fácil desenvolvimento, flexibilidade de uso, facilidade para modificação química e produção *in vitro*, quais os anticorpos não podem ser gerados. (JAYASENA, 1999; MISSAILIDIS; HARDY, 2009).

Os aptâmeros apresentam ampla aplicação incluindo pesquisa básica na área médica e farmacêutica, no desenvolvimento de drogas em diagnóstico e terapia para uma diversa gama de doenças, desde o vírus da imunodeficiência humana (HIV), doenças tropicais, câncer e inflamação (SANTOS, 2014).

Esses pequenos ácidos nucleicos de cadeia simples são capazes de reconhecer moléculas alvos com alta especificidade e de transportar agentes terapêuticos, radioisótopos, diretamente para massas tumorais sólidas ou para células individuais, uma vez que apresentam penetração tecidual mais rápida, em comparação aos anticorpos monoclonais. Dessa forma, é possível observar que foram projetados para atuarem em uma ampla quantidade de alvos que vão desde a inibição de receptores e enzimas até a identificação de pequenas moléculas em aplicações de sensores e do desenvolvimento de terapêuticas direcionadas

concepção de novos agentes de diagnóstico e para a imagiologia (DENG *et al.*, 2001; FERREIRA; MISSAILIDIS, 2007).

3.5 Seleção de aptâmeros

A técnica mais utilizada para se obter os aptâmeros é a técnica SELEX, (do inglês *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*, onde os aptâmeros são selecionados a partir de uma vasta população de sequências aleatórias, através de abordagem combinatória (TUER; GOLD, 1990; FERREIRA; MISSAILIDIS, 2007).

A metodologia SELEX pode gerar oligonucleotídeos (aptâmeros) que são capazes de se ligar com alta afinidade e especificidade a alvos específicos, desde pequenas moléculas até proteínas complexas, usando ciclos de enriquecimento e amplificação. Durante o processo, um conjunto de ácido nucléico de cadeia simples (DNA, RNA ou ácidos nucleicos modificados) consistindo de 10 – 15 variantes de uma sequência aleatória de 50–100-nt é incubado com uma molécula alvo. Em seguida, as variantes com a atividade de ligação desejada são recuperadas, seguido por amplificação da biblioteca enriquecida por transcrição reversa - PCR. Empregando este produto de PCR enriquecido, o pool de cadeia simples é regenerada por remoção do molde de cadeia simples ou por *in vitro*-transcrição (para conjuntos de DNA ou RNA, respectivamente). Normalmente, esse processo é repetido por 20 rodadas para a identificação e seleção específica dos aptâmeros (OHUCHI, 2012; FERREIRA, 2013).

Embora SELEX seja tipicamente realizado usando moléculas alvo purificadas, células vivas inteiras são também empregáveis como alvos de seleção. Aptâmeros específicos de células podem ser empregados para a adesão específica de células alvo, as proteínas transmembranares da superfície celular seriam alvos mesmo quando as suas purificações em conformações nativas são difíceis. Schroeder *et al.* (2007) desenvolveram um microarranjo de células vivas empregando ligantes peptídicos e *microarray* de DNA (GUO *et al.*, 2005; GUO *et al.*, 2006; OHUCHI, 2012).

Para desenvolver sondas moleculares no diagnóstico e pesquisa básica, os aptâmeros que reconhecem certo tipo de célula de mamífero são ferramentas

promissoras. As linhas de células cancerígenas são um dos alvos mais extensivamente examinados para *Cell-SELEX*, e até agora, muitos aptâmeros contra variedades de tipos de células cancerígenas foram gerados, esses aptâmeros têm se mostrado úteis como sondas de câncer. O estudo de Shangguan *et al.* (2006) relata geração de uma série de aptâmeros de DNA como sondas moleculares para o estudo do câncer (ZHANG *et al.*, 2010; PHILLIPS *et al.*, 2008).

Avanços na estratégia *Cell-SELEX*, bem como os procedimentos de aplicação de aptâmeros de ligação celular, abririam uma porta para o desenvolvimento de novas tecnologias médicas e biológicas que atualmente não podem ser alcançadas (OHUCHI, 2012).

O *Cell-SELEX* pode ser aplicado para a geração de aptâmeros contra uma proteína alvo definida exibida em células vivas, variedades de proteínas transmembranares, incluindo receptores acoplados à proteína G, receptores quinases, canais e uma vasta série de importantes alvos para o desenvolvimento de fármacos e meios de contrastes específicos (OHUCHI, 2012).

4 METODOLOGIA

O conteúdo utilizado para esta revisão sistemática foi obtido através de uma pesquisa na base de dados Pubmed com as palavras chaves demonstradas no fluxograma a seguir. Os artigos foram lidos e selecionados de acordo com o seu tema e argumentos de forma sintetizada, sobre as informações mais recentes acerca da aplicação dos aptâmeros e sua conjugação com meios de contraste e radiofármacos, para diagnóstico mais eficiente e tratamentos mais eficazes de neoplasias.

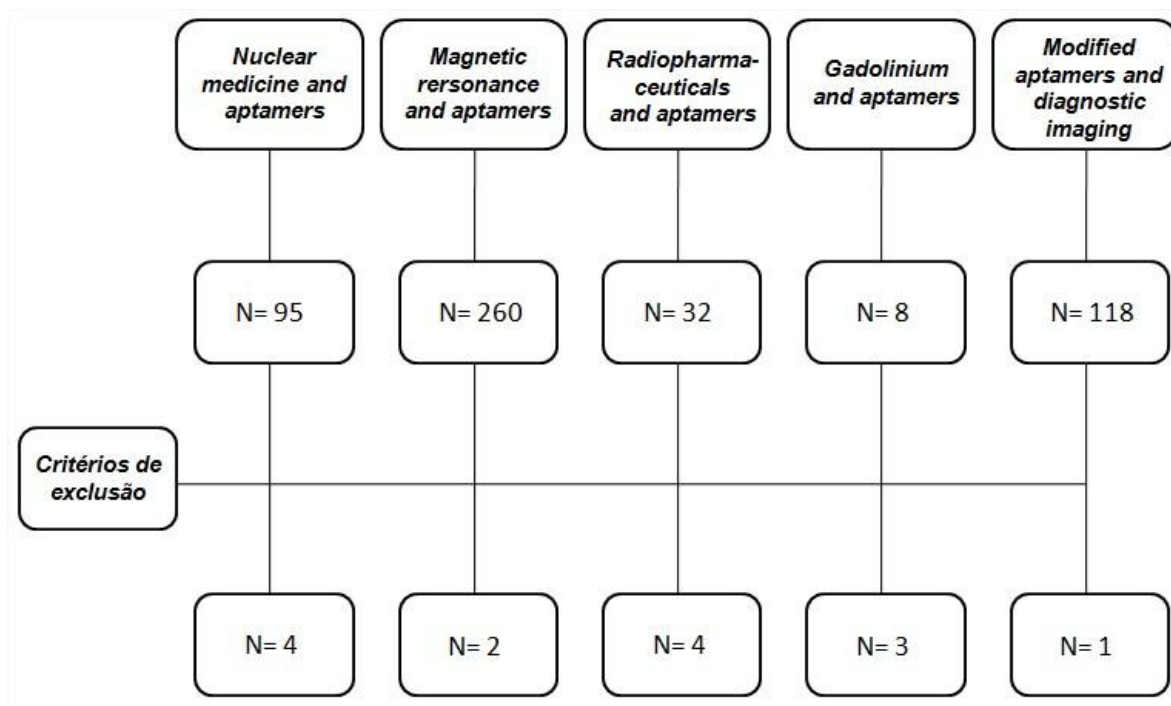
4.1 Revisão de literatura

A revisão de literatura foi realizada com base nos livros disponíveis no acervo da biblioteca do Centro Universitário São Camilo e em artigos disponíveis na base de dados PubMed com o diagnostic imaging and aptamers, o qual foi empregado em português e inglês.

4.2 Revisão sistemática

O levantamento bibliográfico realizado contou com os descritores: nuclear medicine and aptamers; magnetic resonance and aptamers; radiopharmaceuticals and aptamers e gadolinium and aptamers, tanto em inglês quanto em português. As pesquisas foram realizadas na base de dados PubMed, de acordo com o fluxograma apresentado na figura 1, abaixo. Levou-se em consideração as publicações dos últimos dez anos, para um melhor aproveitamento e análise dos métodos e dados obtidos.

Figura 1 - Fluxograma de pesquisa com o cruzamento dos descritores



4.2.1 Seleção dos artigos

A partir dos 513 artigos obtidos por meio dos descritores e dos filtros anteriormente citados, foram aplicados os critérios de exclusão:

- Ausência de DOI (Digital object identifier);
- Artigos sem referências bibliográficas;
- Artigos em duplicata;
- Artigos sem acesso ao texto completo;
- Artigos que após a leitura e análise foram excluídos por não abordar o objeto de estudo.

Após todo esse processo, foram selecionados um total de 14 artigos.

4.3 Leitura e análise críticas dos artigos

Por fim, foram realizadas as classificações quantitativas e qualitativas do uso dos aptâmeros na oncologia, de forma a ponderar sobre a aplicabilidade da conjugação desses com meios de contrastes e radiofármacos para um diagnóstico preciso de neoplasias e seus tratamentos para o futuro.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desta revisão sistemática foram separados com o intuito de melhorar a compreensão e clareza sobre o assunto ao leitor, desse modo o conteúdo apresentado foi dividido em duas partes, sendo a primeira referente a conjugação de aptâmeros com gadolínio e a seguinte sobre a conjugação de aptâmeros com radiofármacos.

5.1 Aptâmeros conjugados com gadolínio (Gd)

Para uma visão geral acerca do tema, o Quadro 1 une os trabalhos que conjugam aptâmeros com o Gd e as informações de quais técnicas de seleção foram utilizadas para a construção de seus aptâmeros, a nomenclatura das sondas e quais técnicas de imagem aplicadas para a visualização de seus resultados.

Quadro 1: Síntese dos artigos selecionados sobre a conjugação dos aptâmeros com o Gd.

Autor	Ano	Título	Técnica de seleção	Nomenclatura da sonda	Técnica de imagem
Xu e Lu	2011	A smart magnetic resonance imaging contrast agent responsive to adenosine based on a DNA aptamer-conjugated gadolinium complex.	SELEX	Aptâmero de adenosina	Scanner de RM.
Bernard et al.	2012	Target binding improves relaxivity in aptamer-gadolinium conjugates	SELEX	SC-Gd (III), 15T SC-Gd (III) e 30T SC-Gd(III)	RM de alto campo (9,4T) e RM de baixo campo (1,5T)
Zhang et al.	2016	Preparation and In Vitro Evaluation of a MRI Contrast Agent Based	SELEX	GBI-10m	Microscopia de varredura a laser confocal e RM
Edogun et al.	2017	An Aptamer-based Sensor for Unchelated Gadolinium(III)	SELEX	Gd-aptâmero	RM
Röthlisberger et al.	2017	Nucleic Acid Aptamers: Emerging Applications in Medical Imaging, Nanotechnology, Neurosciences, and Drug Delivery	SELEX	Aptâmero antitrombina	RM, PET e SPECT
Zhang et al.	2018	Aptamer - TargetedMagnetic Resonance Imaging Contrast Agents and Their Applications	SELEX	Sondas para Ácido Fólico	RM

5.1.1 Produção e seleção dos aptâmeros

Como observado no quadro acima a técnica de seleção dos aptâmeros denominada SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*), foi unânime entre os autores que realizaram a destas moléculas com Gd, conforme nossas pesquisas.

Esta técnica se mostrou a de preferência pelos autores por ser reprodutível, de menor custo e altamente específica para os alvos que são selecionados, fazendo então com que criem aptâmeros de alta qualidade e objetividade.

Por esta técnica já ser de uso frequente entre os pesquisadores já existem protocolos pré estabelecidos e bibliotecas de aptâmeros já criados por ela, o que facilita a sua escolha em uma nova pesquisa.

Xu e Lu (2011) afirmam em seu trabalho que uma poderosa vantagem dessa técnica é que suas condições de seleção podem ser adaptadas para encontrar aptâmeros que possam interagir seletivamente com quase todos os alvos, incluindo íons metálicos e pequenas moléculas orgânicas. É que através deste processo, aptâmeros que ligam pequenas moléculas orgânicas, proteínas e células podem ser obtidos, tornando-os assim uma plataforma geral para sensores e agentes de contraste.

Já Bernard *et al.* (2012) dizem que SELEX pode ser usado para se fazer a seleção dos aptâmeros para alvos que variam de pequenas moléculas até proteínas e células inteiras. Bernard *et al.* (2012) seleciona as sequências de DNA SC, 15T SC e 30T SC por esta técnica.

Estes foram os aptâmeros selecionados por Bernard *et al.* (2012), com e sem espaçadores polyT:

- Aptâmero de trombina : 5'-NH₂-(CH₂)₆-GGT TGG TGT GGT TGG-3'
- Aptâmero de trombina com 15 espaçadores polyT: 5' -NH₂-(CH₂)₆-(T)₁₅ GGT TGG TGT GGT TGG-3'
- Aptâmero de trombina com 30 espaçadores polyT: 5'-NH₂-(CH₂)₆-(T)₃₀ GGT TGG TGT GGT TGG-3'

Em seu trabalho Edogun *et al.* (2017) apenas informa que o aptâmero que utilizam, (Gd-aptâmero), é uma molécula de DNA de fita simples de 44 bases com uma sequência específica de bases, e que também foi selecionado/isolado através do processo de evolução sistemática de ligantes pelo enriquecimento exponencial - SELEX.

Já Röthlisberger *et al.* (2017) vai além e diz que a versatilidade do protocolo de seleção e as altas afinidades de ligação, que esta técnica de seleção proporciona, impulsionaram os aptâmeros na vanguarda de inúmeras aplicações, incluindo, por exemplo, biossensor, proteômica, purificação e biotecnologia, terapias e diagnósticos.

Röthlisberger *et al.* (2017) também explica no decorrer do seu trabalho que durante o SELEX, grandes bibliotecas de oligonucleótidos (tipicamente 10^{14} - 10^{15} moléculas individuais) são desafiadas a ligar-se ao alvo pretendido e ciclos iterativos de ciclos de amplificação de seleção são utilizados para enriquecer as populações com espécies de ligação elevada, trazendo assim a alta afinidade da molécula ao seu ligante. E também concorda com Xu e Lu (2011) e Bernard *et al.* (2012), dizendo que, desde a invenção do protocolo SELEX no início dos anos 90, milhares de aptâmeros foram selecionados para alvos variando de pequenas moléculas a entidades maiores, como proteínas ou células, Röthlisberger *et al.* (2017) também nos traz a informação de que bancos de dados foram criados para canalizar esse crescimento exponencial de sequências aptaméricas e riqueza de informações.

Estes bancos de dados só puderam ser criados e obtiveram sucesso graças a reprodutibilidade fidedigna da técnica de seleção em questão.

Por fim, nesta parte de seleção dos aptâmeros, Zhang *et al.* (2018) concordam com os autores acima, dizendo que os aptâmeros podem ser selecionados para vários alvos moleculares que variam de pequenas moléculas, proteínas a ácidos nucléicos e até células ou tecidos.

Zhang *et al.* (2018) também citam subtipos da técnica SELEX, que foram criados para fazer a seleção de aptâmeros para células ou tecidos inteiros, e subtipos alguns superam alguns problemas da técnica SELEX típica, como ela ser mais demorada, os processos inovadores de SELEX citados por Zhang *et al.* (2018) são: SELEX de célula, SELEX cruzado e SELEX de tecido. E para superar o obstáculo que o processo SELEX típico é demorado, muitos métodos avançados foram inventados, como a eletroforese capilar SELEX, MonoLEX, SELEX microfluídica, SELEX com alternância.

5.1.2 Conjugação dos aptâmeros ao gadolínio

Ao fazermos o estudo detalhado dos artigos incluídos neste trabalho, percebemos que um dos maiores desafios para a fabricação de meios de contraste inteligentes, a base de aptâmeros, é a conjugação destas moléculas com o Gd, por diversos motivos, como por exemplo a instabilidade que moléculas de DNA e RNA possuem a serem manipuladas. Nesta sessão será abordado, resumidamente, as conclusões e os métodos que cada autor optou por ter, para se fazer a conjugação de seu aptâmero com o Gd, obtendo então suas sondas.

No trabalho de Xu e Lu (2011) é possível ver que os autores desenvolveram um método que utiliza a química do NHS para acoplar aptâmeros ao ácido gadolínio-tetraazaciclododecanetetracético (estrutura DOTA-Gd). A cadeia de Gd tem um grupo amina no final de 3' para permitir que ela se conjugue com DOTA-Gd.

Para confirmar o design mostrado em seu trabalho, Xu e Lu (2011) emparelharam 30 μM das cadeias de DNA em 50 mM de tampão Tris (pH 8,35) contendo 300 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 e 30 mM estreptavidina.

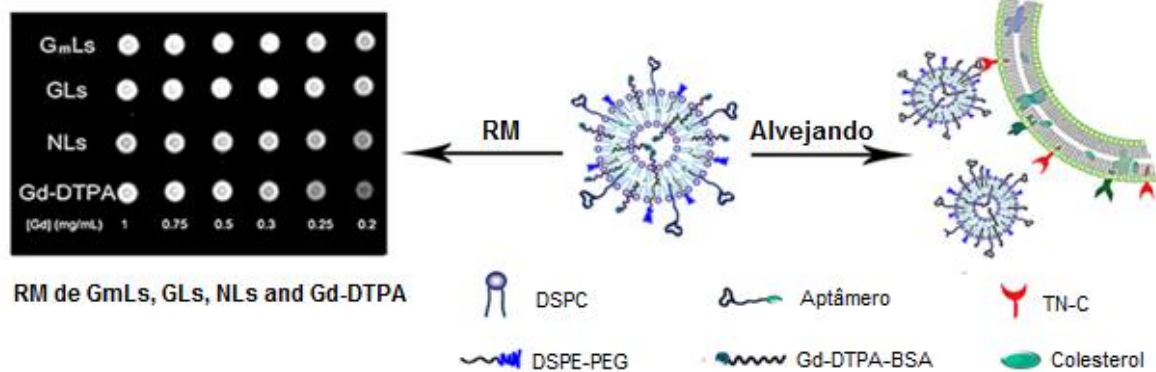
Bernard *et al.* (2012), nos traz a conclusão, para este ponto específico de conjugação, que estudos sobre o espaçamento entre quelantes e aptâmeros podem ser valiosos nos sistemas de aptâmero-alvo. Utilizam o exemplo que, as conformações que os aptâmeros alcançam na ligação ao alvo podem interferir diretamente na eficácia do Gd (III) quelado como um agente de relaxamento T1, e dizem que a adição de um espaçador entre o aptâmero e o quelante pode impedir essa interferência em tal situação. Em alguns sistemas, a conjugação do quelato pode alterar de forma prejudicial a interação aptâmero-alvo. Nesses casos, a inclusão de um espaçador pode ser necessária para manter a ligação entre o aptâmero e o alvo e, portanto, a capacidade de direcionamento do agente de contraste.

Portanto, a otimização de um determinado conjugado aptâmero-gadolínio (III) para uso como um agente de contraste alvo pode envolver necessariamente espaçadores de teste de várias composições e comprimentos para seus efeitos no desempenho, segundo Bernard *et al.* (2012).

Foi relatado por Zhang *et al.* (2016), que a incorporação de iso-nucleosídeos a aptâmeros aumenta a resistência dos aptâmeros à nuclease no sangue, devido à maior estabilidade conformacional que bloqueia o reconhecimento da nuclease. A afinidade dos aptâmeros para atingir a proteína a 37°C pode ser aumentada à medida que a mudança geral de conformação das formas de nucleosídeo for melhor complexa de aptâmero-proteína.

No relato de Zhang *et al.* (2016), o GBI-10 (sonda que os autores produziram) foi modificado com iso-nucleosídeos para aumentar a afinidade para TN-C (alvo do aptâmero) a 37°C e o GBI-10 modificado resultante (GBI-10m) foi utilizado como um ligante específico funcionalizado na superfície de lipossomas carregados com Gd, preparando Lipossomas modificados com GBI-10m (GmLs) para melhorar a especificidade para células tumorais com sobreexpressão de TNC, como mostrado na Figura 2.

Figura 2: Ligação de lipossomas, carregados com Gd, ao TNC



Fonte: Adaptado de Zhang *et al.*, 2016

Em resumo neste estudo de Zhang *et al.* (2016) os lipossomas carregados com gadolínio foram preparados incorporando lipídio paramagnético em lipossomas para adquirir uma alta relaxação à RM. O lipídio paramagnético Gd-DTPA-BSA foi sintetizado e introduzido na membrana de lipossomas.

Edogun *et al.* (2017) relatam que para adaptar o aptâmero a um sensor fluorescente, eles ligam um fluoróforo ao terminal 5' do filamento, que então foi hibridizado com um cordão de extinção (QS) através de 13 bases complementares. Os autores marcaram o QS com uma molécula de extinção escura no terminal 3'. Relatam que na ausência de Gd³⁺ (alvo do aptâmero), o sensor (sensor Gd), composto por uma razão molar de 1:2 de Gd-aptâmero e QS, respectivamente, terá

emissão mínima de fluorescência devido à transferência de energia do fluoróforo para o inibidor. A adição de Gd^{3+} aquoso irá deslocar o QS do Gd aptâmero, resultando em um aumento na emissão de fluorescência.

Röthlisberger *et al.* (2017) trouxeram em seu trabalho dois diferentes agentes de contraste alvos-específico, baseados para ponderações T1 e T2. O agente de contraste utilizado pelos autores para a ponderação T1 foi o Gd^{3+} , o complexo Gd-DOTA foi ligado (por química padrão de formação de ligação amida) à extremidade modificada com 3'-amino de um oligonucleótido de DNA concebido para ser parcialmente complementar ao aptâmero. Então, a parte aptamérica foi ligada à estreptavidina e libertou o oligonucleótido modificado com Gd-DOTA do complexo de estreptavidina grande por ligação ao alvo, segundo os autores. Já para a ponderação T2 foi usado nanopartículas de óxido de ferro (SPIONs), os SPIONs foram revestidos com dextrano reticulado que, por sua vez, podia ser funcionalizado com sequências de DNA modificadas com 3' ou 5' -tiol, que foram concebidas de modo a hibridizar com o aptâmero selecionado, conforme foi relatado.

Os autores Zhang *et al.* (2018) acreditam que, com o rápido progresso da nanotecnologia, os agentes de contraste nanoestruturados tornam-se ideais para aplicações biomédicas. Primeiro por eles serem mais fáceis de se sintetizar, de várias maneiras com tamanhos controlados, e em segundo lugar, pelos avanços nas técnicas de modificação de superfície dos nanomateriais que então podem melhorar eficientemente a biocompatibilidade, a estabilidade e a meia-vida do sangue *in vitro* e *in vivo*.

Os autores não relatam no trabalho um tipo de conjugação entre aptâmeros e meios de contraste para a RM, porém dizem que a segmentação passiva é o recurso principal para as estes agentes de contrastes se acumularem ou serem direcionados para a área de interesse. Relatam que a segmentação passiva foi principalmente alterada pelo tamanho hidrodinâmico dos agentes de contrastes. E os tumores sólidos mostraram o efeito de permeabilidade e retenção aprimorada (EPR) para estes agentes de contraste com um tamanho ótimo. Além disso, a carga de superfície e a hidrofobicidade poderiam afetar a segmentação passiva. Dos agentes de contraste. Com a superfície hidrofílica poderiam evitar o reconhecimento pelo sistema reticuloendotelial (RES) e prolongar o tempo de circulação; portanto,

haveria mais oportunidades para os agentes de contraste se acumularem no local do tumor e menos toxicidade para o organismo.

5.1.3 Alvos dos aptâmeros e tropismo do conjugado no organismo

Quadro 2: Síntese dos alvos e tropismo dos aptâmeros com o Gd.

Autor	Ano	Título	Alvos	Tropismo
Xu e Lu	2011	A smart magnetic resonance imaging contrast agent responsive to adenosine based on a DNA aptamer-conjugated gadolinium complex.	Adenosina	Não informado no trabalho
Bernard et al.	2012	Target binding improves relaxivity in aptamer-gadolinium conjugates	Trombina	Não informado no trabalho, por estar em fase experimental
Zhang et al.	2016	Preparation and In Vitro Evaluation of a MRI Contrast Agent Based	TN-C na superfície das linhas celulares de glioblastoma	TN-C sobre-expresso em células tumorais, glioblastoma
Edogun et al.	2017	An Aptamer-based Sensor for Unchelated Gadolinium(III)	Gd ³⁺ não ligado (tóxico)	Não possui tropismo pois é aplicado para soluções
Röthlisberger et al.	2017	Nucleic Acid Aptamers: Emerging Applications in Medical Imaging, Nanotechnology, Neurosciences, and Drug Delivery	Trombina	Não relatado no artigo.
Zhang et al.	2018	Aptamer - TargetedMagnetic Resonance Imaging Contrast Agents and Their Applications	Receptores de ácido fólico presente em diversas células tumorais	Não relatado no artigo.

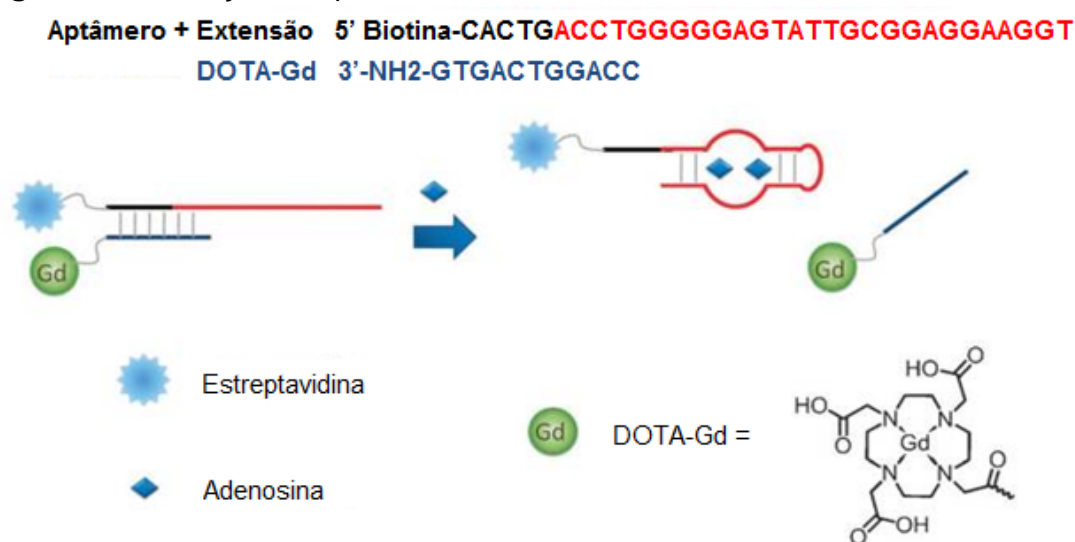
Nesta seção iremos ver e comentar sobre cada alvo escolhido pelos autores que conjugaram seus aptâmeros com Gd, ou que fizeram revisões deste tipo de conjugações. Para exemplificar o entendimento separamos no quadro a seguir cada alvo e tropismo dos conjugados.

Xu e Lu (2011) defendem que a chave para um projeto bem sucedido de agente de contraste inteligente, é que ele transforme a ligação do aptâmero ao seu alvo em uma mudança na relaxação à RM do composto contendo Gd. A alteração

da relaxação à RM do composto criado por estes autores afetará o efeito T1, que por sua vez afetará o sinal de RM.

Os autores escolheram o aptâmero de adenosina, por ser um aptâmero bem caracterizado, o que facilitaria o desenho do sistema. O sistema que os autores empregam em seu estudo consiste de uma fita de aptâmero de adenosina biotinilada estendida (aptâmero em vermelho e extensão em preto conforme a figura 3) que é hibridizada a uma fita de DNA contendo DOTA-Gd (em azul).

Figura 3: Hibridização do aptâmero de adenosina com DOTA-Gd.



Fonte: adaptado de Xu e Lu, 2011.

No trabalho é mostrado que a cadeia Gd tem um grupo amina no final de 3' para permitir que ela se conjugue com DOTA-Gd. Na ausência de adenosina, estas duas cadeias hibridizam e o tempo de correlação rotacional do composto de gadolínio é aumentado devido ao seu elevado peso molecular (~ 70 kDa). Na presença de adenosina, no entanto, o aptâmero desbridiza da cadeia Gd para se ligar à adenosina. A liberação da cadeia Gd acoplada a DOTA-Gd a partir do conjugado diminui o peso molecular do composto Gd a cerca de 4 kDa, como resultado, T1 aumenta, alterando de forma detectável o brilho do sinal de RM. O aumento de T1 leva a uma resposta de RM.

Neste trabalho Xu e Lu mostram que seu agente de contraste é altamente seletivo para adenosina e que também é compatível ao soro humano.

Na presença de soro humano existiu uma ligeira diminuição na mudança relativa de relaxação à RM e a afinidade de ligação, provavelmente devido à ligação não específica à Gd-DOTA por outras proteínas no soro (Xu e Lu, 2011), o que resulta numa diminuição da concentração efetiva do complexo disponível para interagir com a adenosina, porém apesar disso o conjugado foi testado medindo sua resposta na presença de 5 mM de citidina, guanina e uridina, e enquanto a adição de adenosina aumentou T1, a adição das mesmas concentração de citidina, guanina ou uridina não, indicando a alta seletividade deste agente de contraste.

Logo, podemos perceber então que o agente de contraste selecionado pelos autores teve sucesso para com o alvo, tendo uma alta seletividade e trazendo sinais visíveis para as imagens por RM.

Já Bernard *et al.* (2012) desenvolveram e conjugaram com Gd aptâmeros para trombina, no estudo os autores nos trazem a informação de que aptâmeros de trombina foram relatados pela primeira vez em 1992 e que estes são compostos por quinze nucleotídeos, sendo todos eles guanina e timina (5'-GGT TGG TGT GGT TGG-3'), este aptâmero se dobra em uma estrutura G-quadruplex interagindo com a-trombina, um alvo proteico prontamente disponível.

Em seus resultados Bernard *et al.* (2012) mostram que, o seu conjugado, SC-Gd (III), tem um realce de relaxação à RM maior do que um sistema de Gd (III) baseado em oligonucleotídeo complementar, que foi relatado ter um aumento de 16% no relaxamento de prótons em um estudo comparável. As alterações na relaxação à RM na ligação do aptâmero para com o alvo nesses sistemas demonstram mudanças observáveis *in vitro* quando fotografadas em campo baixo.

Os autores defendem que a incorporação de aptâmeros para alvos ligados à membrana (como proteínas ou lipídios), ou para alvos maiores que a trombina em conjugados aptâmero-gadolínio (III) poderiam resultar em melhorias ainda maiores na relaxação à RM, resultando em melhores imagens de RM, principalmente em imagens ponderadas em T1, que, segundo os autores, é a ponderação mais desejável para diagnósticos médicos.

Atualmente, o direcionamento da a-trombina pode ser útil para uma imagem precisa da RM dos processos de sangramento interno e de coagulação sanguínea,

mostrando então a importância e aplicabilidade que este aptâmero teria em diagnóstico por RM. Por exemplo, há interesse na RM de trombose coronária e embolia pulmonar, contornando os procedimentos convencionais, muito mais invasivos, de angiografia e angioscopia.

Zhang *et al.* (2016), em seu estudo, trazem um aptâmero com ligação específica para o TN-C existente na superfície das linhas celulares de glioblastomas. Também relataram que a afinidade de ligação de sua sonda (nomeada de GBI-10), na temperatura fisiológica foi de aproximadamente dez vezes menor do que a 4°C, se fazendo necessária a melhoria da afinidade do GBI-10 para TN-C a 37°C, a fim de torná-lo potencial na aplicação clínica, o que fizeram com sucesso, como demonstraram no estudo.

Foi relatado também por Zhang *et al.* (2016), que os lipossomas carregados com gadolínio aumentam o peso molecular relativo dos agentes de contraste, encurtam o valor de T1, aumentam a relaxação à RM e avançam na melhoria da eficácia de imagem por RM.

A sonda apresentada neste estudo de 2016 demonstrou reconhecer especificamente o TN-C sobre-expresso de células tumorais a 37°C e apresentavam perspectivas potenciais na aplicação clínica.

Edogun *et al.* (2017) nos traz um estudo diferente dos demais autores, enquanto na maioria dos trabalhos que estão nesta revisão falam de conjugados de aptâmeros com Gd para o diagnóstico precoce e específico de doenças. O trabalho de Edogun *et al.* (2017) nos traz um aptâmero para a detecção do íon livre aquoso de Gd³⁺ não ligado em soluções de agentes de contraste à base de gadolínio (GBCA), que então garante a segurança desta solução, já que Gd³⁺ não ligado é tóxico.

Segundo Edogun *et al.* (2017) a crescente importância da RM no diagnóstico clínico, resultou no rápido crescimento da pesquisa para o desenvolvimento de novos GBCAs. Que são moléculas administradas para melhorar a qualidade da imagem, e elas tipicamente têm a estrutura química de um íon de gadolínio trivalente (Gd³⁺) coordenado a um ligante polidentado.

Como mostrado no trabalho Gd^{3+} não ligado é tóxico e tem sido implicado no desenvolvimento de fibrose sistêmica nefrogênica em alguns pacientes com doenças renais, com base nisso os autores desenvolveram um sensor fluorescente baseado em aptâmeros para Gd^{3+} aquoso, para identificar soluções de GBCAs que contenham Gd^{3+} não ligado, podendo evitar que estas sejam administradas nos pacientes.

Segundo os resultados de Edogun *et al.* (2017) a presença de Gd^{3+} não ligado será traduzida em um aumento de fluorescência do sensor quando comparado com a solução “em branco”. Quando Gd^{3+} não ligado está presente, uma alteração que é perceptível mesmo em concentrações de Gd-DOTA abaixo de 5 mM é observada, ao utilizar de um sensor Gd baseado em aptâmeros, que os autores conseguiram observar um aumento na emissão de fluorescência proporcional à concentração presente da molécula tóxica.

Porém é mostrado no trabalho que existem duas desvantagens neste ensaio, que ocasionalmente podem restringir o uso deste aptâmero em condições experimentais. A primeira é que o sensor não é específico para Gd^{3+} , ele exibe uma resposta a outros íons lantanídeos, como Eu^{3+} e Tb^{3+} , no entanto, estes não são íons comumente encontrados em agentes de contraste ou sistemas biológicos segundo os autores e, portanto, sua interferência é mínima em GBCAs. O segundo ponto a ser observado é que em concentrações mais altas (acima de $\sim 10 \mu M$) de Gd^{3+} , uma diminuição gradual na emissão de fluorescência do sensor Gd é observada.

Neste trabalho Edogun *et al.* (2017) nos mostra a avaliação em fase inicial da pureza do agente de contraste à base de gadolínio, especificamente durante a síntese e formulação para experiências *in vitro*. Os autores reforçam que o sensor Gd baseado em aptâmeros facilitará o desenvolvimento de novos agentes de contraste, fornecendo um meio de detectar rapidamente a presença de concentrações sub-micromolares de Gd^{3+} não ligado em solução aquosa a pH ambiente. Além disso, como o sensor exibe reatividade cruzada com outros íons lantanídeos trivalentes, sua aplicação pode ser estendida a essas áreas de pesquisa.

Röthlisberger *et al.* (2017) em uma linha diferente de estudo mostram a conjugação de aptâmero antitrombina com dois sistemas diferentes para RM, além de também mostrarem breves revisões de outros aptâmeros utilizados na prática clínica, tanto para diagnóstico como para terapêutica.

Em seu trabalho Röthlisberger *et al.* (2017) nos diz que, a facilidade de modificação química em ambas as extremidades 3' e 5' combinada com a alta afinidade e seletividade alvo aumenta drasticamente o potencial dos aptâmeros para servir como agentes de imagem molecular, particularmente para RM, e que uma importante rota de pesquisa no campo da RM consiste no desenvolvimento de agentes de contraste inteligentes ou responsivos, que consistem em sistemas que induzem uma mudança no relaxamento magnético na presença de um estímulo bioquímico ou conjugados que vetoriam sondas de RM para seus alvos e locais pretendidos.

Os autores estudaram e nos trazem no artigo dois sistemas de contraste para RM, um baseado SPIONs, que altera o tempo de T2, trazendo diminuição do realce para estas sequências, e outro baseado no agente de contraste ponderado para T1, Gd³⁺. Ambos os sistemas conjugados com o mesmo aptâmero antitrombina.

Para o primeiro sistema mencionado os aptâmeros de antitrombina foram imobilizados em SPIONs revestidos de dextrana reticulados e após a ligação ao alvo da trombina, as nanopartículas reuniram-se em agregados maiores que levaram a uma diminuição nos valores de T2 (e assim redução do brilho das imagens de RM). Uma estratégia que é frequentemente preferida na imagem de RM ponderada em T2 segundo os autores.

Já para o sistema baseado em Gd, o aptâmero de antitrombina foi acoplado a um complexo Gd-DPTA (DPTA = ácido dietilenotriamino pentacético), e quando o bioconjugado aptâmero-Gd-DPTA foi incubado com trombina, puderam-se observar realces significativos de relaxação à RM devido à interação com o alvo, o que aumenta o tamanho do agente de contraste e concomitantemente o tempo de rotação rotacional.

O aptâmero descrito mostrou forte ligação com o alvo desejado ($K_d = 82$ e 460 nM para células endoteliais da aorta humana inflamadas fixas e livres, respectivamente).

Zhang *et al.* (2018) estudou aptâmeros para receptores de ácido fólico, que se encontram presentes em diversas células tumorais. O ácido fólico é uma vitamina baseada em proteína de baixo peso molecular, que pode se ligar ao receptor de folato com afinidade muito alta e mediar a endocitose mediada por receptor. O receptor de folato é um antígeno tumoral confirmado, que possui superexpressão em uma variedade de tumores.

Os autores nos trazem a informação que, até o momento, os conjugados de folato de outros agentes foram todos administrados com sucesso à células cancerígenas com expressão de receptores de folato.

Para RM, os resultados indicaram que agentes de contraste modificadas por folato poderiam melhorar significativamente a intensidade de imagem em tumores com expressão de receptores de folato. Agentes de contraste modificados com ácido fólico aumentaram o contraste entre a região do tumor e os tecidos normais em vários momentos, proporcionando janela de tempo longo para o exame de RM segundo os resultados demonstrados por (ZHANG *et al.*, 2018).

Devido à alta relação superfície-volume dos nanomateriais, doses reduzida de agentes de contraste para RM pode ser administrada, obtendo-se ainda com grande excelência de resolução as imagens de RM, para o alvo estudado, e com menos toxicidade, devido a administração de menores doses dos agentes de contraste, mostrando novamente mais um benefício da conjugação de aptâmeros com agentes de contraste (ZHANG *et al.*, 2018).

5.1.4 Resultados obtidos pelos autores e comparação entre os artigos

Os estudos demonstram que a ligação de aptâmeros ao alvo leva a uma relaxação à RM melhorada, com o conjugado único aptâmero-gadolínio (III) (BERNARD *et al.*, 2012). De acordo com Xu e Lu (2011) um grande desafio é o desenvolvimento de agentes de contraste inteligentes: agentes de contraste que induzem respostas de RM detectáveis na presença de alvos específicos.

Xu e Lu (2011) dizem que a chave para um projeto bem sucedido de agente de contraste inteligente é que ele transforme a ligação do aptâmero ao seu alvo em uma mudança na relaxação à RM do composto contendo Gd. A alteração da relaxação à RM desse composto afetará o T1, que por sua vez afetará o sinal de RM. Como é possível ver a grande maioria dos artigos relatados retratam alterações no tempo de T1 da RM, como a ponderação ideal para a utilização dos meios de contraste alvo-específicos a base de aptâmeros, conjugados com gadolínio.

Bernard *et al.* (2012) relatam que podem ser exploradas no futuro uma otimização dos sistemas de conjugados de aptâmero-gadolínio (III) com a obtenção de aprimoramentos mais relaxantes de particular interesse. A investigação de vários ligantes com diferentes rigidezes entre o DNA e as porções quelatadas também pode ser útil em estudos futuros (XU; LU, 2011). É observado nos estudos que a incorporação de aptâmeros para alvos ligados à membrana (como proteínas ou lipídios) ou para alvos maiores, em conjugados aptâmero-gadolínio (III) poderia resultar em melhorias ainda maiores na relaxação à RM.

Os estudos também nos mostram que a inclusão de um espaçador entre o aptâmero e o quelante pode ser necessária para manter a ligação entre o aptâmero e o seu alvo, porém são necessários mais estudos nesta vertente para a então confirmação da total necessidade da inclusão de um espaçador, pois também foi visto que há aptâmeros que não necessitam deste sistema para obter o resultado esperado de ligação com o alvo e realce na imagem.

Com o atual crescimento da RM no diagnóstico, um número crescente de novos agentes de contraste alvo-específicos está sendo continuamente projetados e testados (EDOGUNET *et al.*, 2017). Segundo Röthlisberger *et al.* (2017) não há dúvida de que os aptâmeros amadurecerão em agentes de imagem valiosos e inteligentes. Progressos tecnológicos, certamente melhorarão o sucesso comercial, atualmente limitado, dos aptâmeros no futuro próximo (Röthlisberger *et al.* (2017)

Ao analisarmos os estudos também vimos que infelizmente, uma desvantagem dos aptâmeros *in vivo* é sua meia-vida curta no sangue devido a degradação mediada por temperatura ou por nucleases. Para resolver este problema, foi visto que, uma solução é a modificação química estrutural, incluindo a substituição do backbone, das cadeias laterais, incorporação de nucleotídeos não

naturais ou finalização dos aptâmeros. Uma outra solução também percebida é a de ligação de aptâmeros com nanomateriais biocompatíveis, como nanopartículas, micelas, dendrímeros e assim por diante (ZHANG *et al.*, 2018).

Devido às diversas vantagens já mencionadas, que os aptâmeros possuem, eles são considerados pelos autores revisados nesta sessão como enormes potencias de agentes direcionadores em várias aplicações clínicas.

5.2 Aptâmeros conjugados com radiofármacos

A partir dos 127 artigos obtidos mediante a base de dados Pubmed com as palavras chaves *nuclear medicine and aptamers* e *radiopharmaceuticals and aptamers*, e após a empregar os critérios de exclusão, 8 artigos foram utilizados para esta revisão sistemática, os quais foram descritos na tabela abaixo.

Quadro 3: Síntese dos artigos selecionados sobre a conjugação dos aptâmeros com o RF.

Autores	Ano	Título do artigo	Técnica de seleção	Conjugação	Técnica de imagem
Gomes et al.	2012	^{99m} Tc-MAG3-Aptamer for Imaging Human Tumors Associated with High Level of Matrix Metalloprotease-9	Selex	Aptâmero conjugado com ^{99m} Tc + MAG3	Imagem in vitro, avaliando a intensidade da marcação e detectabilidade do radiofármaco
Varmira et al.	2013	An improved radiolabelled RNA aptamer molecule for HER2 imaging	Selex	Aptâmero conjugado com ^{99m} Tc + HYNIC + EDDA ou tricina	Imunofluorescência
Jacobson et al.	2017	PET Imaging of Tenascin-C with a Radiolabeled Single-Stranded DNA Aptamer	Não Informada	Conjugação de aptâmero + ^{99m} Tc	PET e SPECT
Almeida et al.	2017	APTAMER DELIVERY OF siRNA, RADIOPHARMACEUTICS AND chemotherapy agents IN CANCER	Selex	Conjugação de aptâmero + RF	PET e SPECT
Pascual et al.	2017	MUC1 aptamer-capped mesoporous silica nanoparticles for controlled 2 drug delivery and radio-imaging applications	Não Informado	Conjugação do aptâmero S1-apMUC1 + ^{99m} Tc	SPECT
Sicco et al.	2017	Derivatizations of Sgc8 - c aptamer to prepare metallic radiopharmaceuticals as imaging diagnostic agents: Syntheses, isolations and physicochemical characterizations	Selex	Conjugação de aptâmero Sgc8-c + DOTA, NOTA ou HYNIC	Imagem molecular
Farzin et al.	2018	Clinical aspects of radiolabeled aptamers in diagnostic nuclear medicine: A new class of targeted radiopharmaceuticals	Selex	Conjugação de aptâmero + RF	PET e SPECT
Hassanzadeh et al.	2018	Radiolabeling of Nucleic Acid Aptamers for Highly Sensitive Disease-Specific Molecular Imaging	Não informado	Conjugação de aptâmero + RF	PET e SPECT

5.2.1 Síntese dos artigos

Todos os artigos possuem como foco principal a utilização de aptâmeros e sua aplicabilidade dentro da área de imagiologia, tanto teórica quanto prática. Com o intuito de facilitar o entendimento ao leitor, neste tópico vamos fornecer uma breve síntese do artigo de cada um dos autores descritos no quadro acima.

Todos possuem familiaridade dentro do conteúdo abordado, sendo ele sempre o de desenvolver, relatar, descrever todos os processos envolvidos a aplicabilidade e versatilidade dos aptâmeros ou, até mesmo revisar a evolução dos aptâmeros na área de imagiologia.

Autores como Pascual *et al.* (2017), Varmira *et al.* (2013) e Gomes *et al.* (2012), optaram por desenvolver tipos de pesquisa similares que utilizam o mesmo tipo de radiofármaco, mas com diferentes tipos de desenvolvimento.

Pascual *et al.* (2017) trata sobre a mucina 1 (MUC1) que é uma proteína da superfície celular superexpressa em câncer de mama, para o qual foi produzido um aptâmero (S1-apMUC1) altamente específico, conjugado com ^{99m}Tc , o qual tem a habilidade de se ligar com a MUC1 na superfície celular.

O autor Varmira *et al.* (2013) demonstrou que a expressão do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) está aumentada em vários tipos de tumores humanos e utilizando de um aptâmero de RNA modificado com direcionamento específico para HER2 conjugado ^{99m}Tc , utilizando nicotinamida hidrazina (HYNIC) como quelante na presença de tricina ou ácido etilenodiamino-N,N'-diacético (EDDA) como co-ligando.

Já Gomes *et al.* (2012) relata que a metaloprotease de matriz humana 9 (hMMP9) está envolvida em muitos processos fisiológicos, como a remodelação tecidual e sua superexpressão em tumores promove a liberação de células cancerígenas, contribuindo para a metástase tumoral, e devido a esse fato é um marcador relevante de tumores malignos. Para o desenvolvimento do projeto eles selecionaram um aptâmero de RNA conjugado com ^{99m}Tc , que exibe uma forte afinidade para hMMP-9.

Sicco *et al.* (2017) aborda as modificações pós-SELEX de um aptâmero Sgc8-c o qual se liga à proteína tirosina quinase 7, para obter uma sonda de direcionamento molecular específica para diagnóstico e terapia *in vivo*, esse marcador também está expresso entre outros em câncer no de mama como o receptor 2 descrito por Varmira *et al.* (2013). O objetivo desse artigo é descrever os esforços sintéticos para preparar conjugados entre Sgc8-c e diferentes quelantes de íons metálicos como: derivado de 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10 ácido tetracético (DOTA), 2-benzil-1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético ácido (NOTA) e HYNICs quais foram covalentemente ligados na posição 5'-aptâmero produzindo.

Jackobison *et al.* (2017) também estuda uma glicoproteína expressa em tumores, a tenascina-C presente na matriz extracelular que é expressa pelos tecidos lesionados e por vários cânceros, o qual prediz crescimento tumoral, metástase e angiogênese, sugerindo a tenascina-C como um potencial alvo terapêutico.

Autores como Farzin *et al.* (2018), Hassanzadeh *et al.* (2018) e Almeida *et al.* (2017) tratam sobre revisões, sendo que o foco do dois primeiros autores é apresentar os avanços, desafios e estratégias para vincular os radiofármacos para diagnóstico baseado em aptâmeros modificados quimicamente para realizar imagens de PET e SPECT direcionadas ao aptâmero. Enquanto Almeida *et al.* (2017) exploramos o potencial dos aptâmeros como agentes de entrega e agentes de imagens de RM e PET.

5.2.2 Produção e Seleção dos aptâmeros

Dentre os artigos levantados, é possível observar que a técnica SELEX, desenvolvida em 1990, é a mais prevalente e utilizado para a seleção e preparação dos aptâmeros, a qual os autores como Gomes *et al.* (2012), Varmira *et al.* (2013), Almeida *et al.* (2017), Sicco *et al.* (2017) e Farzin *et al.* (2018) informam ter optado por obter aptâmeros específicos de grandes bibliotecas para desenvolver seus projetos.

Autores como Varmira *et al.* (2013), optou por relatar as alterações realizadas nos aptâmeros obtidos com o objetivo de melhorar a funcionalidade e especificidade desse complexo, o qual, neste caso, correspondia a sequência 5'-

AGCCGCGAGGGGAGGGGAUAGGGUAGGGCGCGGCU-3' com um peso molecular de 11 KD., com o intuito de aumentar a estabilidade do aptâmero contra a degradação enzimática, os átomos de 2-OH da porção ribose da pirimidina foram substituídos por 2-F pela resistência à nuclease e ligou-se um ligante alquila de 6-carbono à extremidade 5' enquanto que uma timidina invertida foi ligada a extremidade 3' do RNA.

De forma similar, Gomes *et al.* (2012) relatou também as modificações realizadas para melhorar a estabilidade do seu aptâmero de RNA contendo 36 nucleótidos de comprimento, 2'-fluoro, pirimidina ribonucleósidos, totalmente resistente à nucleases após a substituição de todos os resíduos de ribonucleósido de purina por análogos de 2'-O-metilo e foi conjugado com S-acetilmercaptoacetiltriglicina para fins de imagem.

Jacobson *et al.* (2017), também relata suas alterações na estrutura de aptâmeros com base em cálculos de energia mínima nas dobragens do aptâmero, resultando em uma cadeia de 6 carbonos e apenas 1 grupo amina primário na posição 5' para fins de conjugação

De todos os autores o único que relatou modificações pós SELEX foi Sicco *et al.* (2017).

De acordo com Hassanzadeh *et al.* (2018) e Farzin *et al.* (2018), esse tipo de abordagem relatadas pelos autores acima possui muitas vantagens, pois os aptâmeros possuem susceptibilidade à degradação endógena da nuclease *in vivo*, e as estratégias mais comuns adotadas para superar essa limitação são aumentar a estabilidade da nuclease pela incorporação de ácidos nucleicos não naturais, como ácidos nucleicos bloqueados, para isso a metodologia mais popular utilizada é a incorporação de grupos funcionais nas extremidades 5' ou 3' de aptâmeros, tais como tióis ou aminas, via reação de fosforamidita durante a síntese de aptâmeros.

Farzin *et al.* (2018), relata também que outro tipo de modificação na estrutura que pode ser adotada para melhorar a estabilidade é substituir as ligações fosfato de base (PO) com ligações fosforotioato (PS) contendo enxofre e, mais recentemente, ligações fosforoditioato. A substituição de ambos os átomos de oxigênio não ligantes por enxofre pode dar origem a uma ligação fosforoditioato,

assim essas substituições do PS2 melhoraram dramaticamente a afinidade de ligação ao alvo em ~ 1000 vezes. O autor refere também, que a substituição da ligação fosfodiéster oligonucleotídica com as ligações triazóis mostrou ser uma grande promessa. Estes análogos de triazol podem ser obtidos através da síntese automatizada de fosforamidite com blocos de dinucleósidos modificados ou a reação entre nucleósidos contendo azida e alcino.

Outro aspecto importante mencionado por Farzin *et al.* (2018) para melhorar a afinidade de ligação, é por meio de modificações nas bases. Por exemplo, a modificação de 5-BzdU (5- (N-benzilcarboxiamida) -2-desoxiuridina) do aptâmero AS1411 aumenta seletivamente a sua afinidade de direcionamento para células cancerígenas, enquanto que as células saudáveis não sofrem influência significativa.

5.2.3 Conjugação dos aptâmeros

Varmira *et al.* (2013), Gomes *et al.* (2012) e Pascual *et al.* (2017) realizaram seus estudos com o conjugação do aptâmero com ^{99m}Tc , pois de acordo com os autores essas sondas de aptâmeros marcadas com esse radionuclídeo específico mostra rápida taxa de acumulação no tumor, boa capacidade de direcionamento e rápida liberação do sangue.

Para o seu protocolo de conjugação, Varmira *et al.* (2013) relata o processo envolvido, o qual foi realizado primeiramente a conjugação do aptâmero mais HYNIC como quelante. Posteriormente a isso foi realizado a conjugação com o co-ligante com o intuito de completar o complexo molecular com a finalidade de estabilizar essa molécula e a tornar funcional na presença de tricina ou EDDA, os aptâmeros HYNIC-RNA foram marcados com ^{99m}Tc .

Segundo Hassanzadeh *et al.* (2018) o HYNIC é um dos mais úteis agentes quelantes utilizados na marcação de biomoléculas pelo ^{99m}Tc . O éster ativo de HYNIC é utilizado para conjugar com a biomolécula, por exemplo, nos grupos amino de resíduos de lisina em proteínas ou oligonucleótidos. A HYNIC é capaz de ocupar apenas dois locais da esfera de coordenação do tecnécio. Fazin *et al.* (2018) relata que esse quelante é eficiente para a marcação de biomoléculas pela ^{99m}Tc na

imagem molecular, embora a ligação de ^{99m}Tc à HYNIC seja muito estável em relação à dissociação, ela é suscetível à oxidação do ar.

Gomes *et al.* (2012), descreve um aptâmero radiomarcado com ^{99m}Tc mais MAG3, o qual segundo Farzin *et al.* (2018) e Hassanzadeh *et al.* (2018) é um dos mais atraentes quelantes de ^{99m}Tc para marcação de biomoléculas que forma radioligandos estáveis *in vivo* e *in vitro*, sem qualquer exigência de coligante. Esse quelante forma um único quelato estável com oxotacetato de ^{99m}Tc .

Hassanzadeh *et al.* (2018) descreve esse tipo de técnica para a radiomarcação com ^{99m}Tc , onde relata que atualmente, a maioria dos procedimentos de medicina nuclear diagnóstica tem o ^{99m}Tc envolvido, isso ocorre devido a suas características físicas desejáveis de meia-vida: 6,02 h, energia: 140,51 keV e emissão gama pura. Além disso, o ^{99m}Tc está prontamente disponível em um estado estéril, isento de pirogênio e isento de portadores, a partir de geradores de ^{99m}Tc . Por outro lado, a radiomarcação de aptâmeros na maioria das situações é um processo desafiador que requer síntese química adicional para conjugar aptâmeros a agentes quelantes, como MAG₃ o qual foi usado pelo autor Gomes *et al.* (2012), a HYNIC descritos por Varmira *et al.* (2013), e DOTA relatado por Sicco *et al.* (2017), todos esses quelantes possuem a capacidade de radioisótopos para ser anexado aos aptâmeros.

Existem dois métodos diferentes relatados pelo autor Hassanzadeh *et al.* (2018) de marcação de ^{99m}Tc para aptâmeros, sendo eles o método direto e o método indireto.

O método direto é descrito como uma radiomarcação com ^{99m}Tc sem qualquer agente quelante que se liga à biomolécula, o qual é mais favorável por causa da fácil e rápida preparação, menor custo e manipulação e redução da provável degradação.

Já o método indireto tem sua marcação de oligômeros utilizando de agente quelantes, a técnica é realizada utilizando uma estratégia semelhante à empregue para outros biológicos, tais como anticorpos e péptidos. Como o ^{99m}Tc é um isótopo de um metal, a molécula quelante precisa ser conectada por meio de um ligante para evitar impedimentos estéricos. As espécies de ^{99m}Tc em um estado de

oxidação mais baixo reagem quimicamente com um tipo diferente de agentes quelantes. O agente quelante geralmente doa pares isolados de elétrons para reduzir ^{99m}Tc para gerar ligações covalentes coordenadas. A aplicação de quelantes bifuncionais tais como alguns agentes quelantes como MAG_3 , DTPA e DOTA para oligonucleotídeos de radiomarcção com alguns radionuclídeos.

Já Sicco *et al.* (2017) empregou um outro tipo de abordagem similar à Varmira *et al.* (2013) pois ambos usam o HYNIC como quelante e comparam com outros tipos de quelantes para comparar suas propriedades e eficiência, no entanto Sicco *et al.* (2017) utiliza e compara mais dois quelantes distintos fora o HYNIC, DOTA e NOTA, os quais foram covalentemente ligados na posição 5'-aptâmero produzindo.

De acordo com Hassanzadeh *et al.* (2018) a conjugação com DOTA, o qual é um agente quelante macrocíclico bifuncional, liga-se a metais trivalentes tais como Índio (In^{3+}), Ítrio (Y^{3+}), e outros metais da série dos lantanídeos rapidamente sob condições moderadas permitem eficiência alta de radiomarcção a serem obtidas à temperatura ambiente em comparação com ligantes acíclicos.

Jackobison *et al.* (2017) optou por uma abordagem diferente dos demais autores abordados nesta revisão, ele utiliza e relata o aptâmero de tenascina-C o qual foi radiomarcado com ^{18}F e ^{64}Cu .

Ele descreve a radiomarcção com ^{18}F de um aptâmero de DNA de fita simples contendo 70 nucleotídeos (aptâmero de Tenascina-C) usando ^{18}F -SFB. Já para a radiomarcção com ^{64}Cu , foi relatada com decaimento β^- e emissão de pósitrons, além de poder ser produzido com atividade altamente específica usando um ciclotron médico. A meia-vida deste radionuclídeo de 12.7h permite a produção centralizada e a purificação para pesquisas e estudos clínicos de moléculas alvo, como peptídeos e aptâmeros.

Sicco *et al.*, (2017), também se diferencia dos demais autores por relatar e basear seus estudos na comparação entre agentes quelantes, para isso ele utilizou um aptâmero Sgc8-c modificado com 5'-Aminohexil (3 kDa, 5'- /AM/ ATC TAG GATA-3', Sgc8-c-NH₂) e relatou a otimização das preparações com derivados Sgc8-c, capazes de coordenar os radionuclídeos metálicos, em razão a isso

selecionou agentes quelantes derivados estruturais do DOTA e NOTA que são capazes de coordenar, por exemplo, com íons metálicos como Ga^{3+} , Zr^{4+} , Cu^{2+} , In^{3+} , Lu^{3+} , Y^{3+} ou Bi^{3+} . Fora esses quelantes eles também utiliza com a fração de HYNIC, que é capaz de coordenar, por exemplo, com íons metálicos como Tc^{5+} , ou Re^{5+} .

5.2.4 Alvos dos aptâmeros e tropismo do conjugado no organismo

Todos os autores que irão ser mencionados posteriormente possuem o mesmo foco de pesquisa, o qual está sempre voltado para a área de oncologia, e na utilização de aptâmeros e em como podem ser aplicados e seus comportamentos em ambientes tumorais distintos.

Iniciando em ordem cronológica, Gomes *et al.*, 2012), tem como alvo a metaloprotease de matriz humana 9 (hMMP9), a qual está envolvida em muitos processos fisiológicos, como a remodelação tecidual e, portanto tem sua superexpressão em tumores, e além disso promove a liberação de células cancerígenas, contribuindo para a metástase tumoral.

Ele é um marcador relevante de tumores malignos, por isso foi selecionada como principal alvo da pesquisa, para o qual foi produzido uma RNA aptâmero com forte afinidade para hMMP-9 ($K_d = 20 \text{ nM}$) e que discrimina outras MMPs humanas.

Varmira *et al.* (2013) trata sobre o receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2 /ErbB2), que é um membro das tirosinas quinases receptores de superfície celular que são altamente expressas em vários cânceres humanos, como os cânceres de ovário e de mama.

Atualmente, já é bem estabelecido a superexpressão de HER2 no câncer de mama e que isso está associado a um mal prognósticos, o qual relacionado com resistência à quimioterapia e fenótipos de tumor agressivos, em razão disso as diretrizes da Sociedade Americana de Oncologia Clínica recomendam a avaliação da expressão de HER2 para todos os cânceres de mama primários, seja no momento do diagnóstico ou no momento da recorrência, e esse marcador tumoral é usado como um alvo específico do tumor para terapia de câncer e imagem in vivo

Em decorrência disso, os autores optaram por produzir um aptâmero com alta afinidade e especificidade para esse receptor, com o intuito de melhorar a terapia e diagnóstico em paciente com esse tipo de expressão.

Mais recentemente, Jacobson *et al.* (2017) estudou e avaliou a tenascina-C, uma glicoproteína da matriz extracelular, que está minimamente expressa em tecido adulto saudável, expressa transitoriamente durante a lesão e remodelação tecidual. A presença dessa proteína sugere, que ela possui um papel fundamental no início e progressão do tumor, uma vez que a expressão de tenascina-C contribui para o microambiente tumoral com fatores de crescimento e aumento da sobrevivência celular, migração, proliferação e transdiferenciação de células tumorais. Além disso, sua expressão também afeta o tecido tumoral, aumentando o crescimento do tumor, a metástase, a angiogênese e a inibição da vigilância imunológica.

O conhecimento da concentração de tenascina-C pode ser útil para o diagnóstico de câncer e previsão de respostas tumorais a terapias, os quais podem incluir terapias experimentais direcionadas à tenascina-C.

Pascual *et al.* (2017) tratam sobre a MUC1 que é uma glicoproteína da mucina expressa na matriz extracelular pela maioria das células epiteliais glandulares e ductais, e por várias linhagens celulares hematopoiéticas.

A MUC1 é também altamente expressa pela maioria dos adenocarcinomas humanos, uma vez que é libertado na corrente sanguínea de pacientes com tal patologia, e a sua presença tem sido associada a um mau prognóstico clínico.

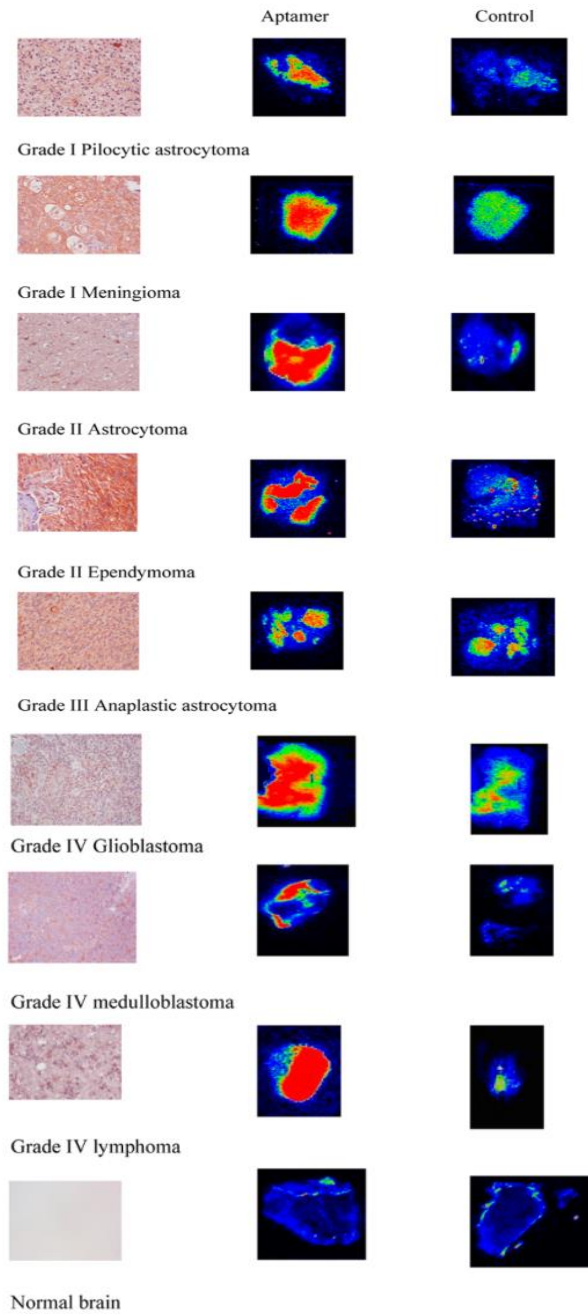
A MUC1 está presente no meio extracelular, sua estrutura alongada e padrões característicos de subglicosilação permitem que o núcleo proteico seja exposto em células cancerígenas, o que o torna um alvo adequado para abordagens de radioterapia imunoterapêutica direcionada. De acordo com isto, os aptâmeros MUC1 (que ligam os ligandos ao marcador tumoral da glicoproteína MUC1) foram funcionalizados com quelantes comercialmente disponíveis, marcados radioativamente com ^{99m}Tc e utilizados em estudos de biodistribuição e imagiologia em ratinhos portadores de tumor MCF-7 xenoenxertados.

5.2.5 Resultados obtidos pelos autores e comparação entre os artigos

Os resultados expressos por Gomes *et al.* (2012), demonstra que as MMPs são marcadores relevantes de malignidade tumoral, afirmação a qual foi relatada por eles por meio dos seus estudos sobre o aptâmero F3, o qual foi encurtado e modificado para gerar MAG₃-F3Bomf, uma sonda de imagem baseada em aptâmeros.

Com o MAG₃-F3Bomf foi possível detectar especificamente a proteína hMMP-9, em diferentes fatias de tumores humanos de diferentes tipos com ^{99m}Tc-MAG₃-F3Bomf, para comparação da sua especificidade e eficiência, foi realizado um procedimento de comparação do aptâmero com anticorpos, onde foi levado em consideração a expressão de MMP-9 presente em vários tumores humanos do sistema nervoso central e por meio de um ensaio de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo específico e o aptâmero ^{99m}Tc-MAG₃-F3Bomf anti-hMMP-9, foi observado que a reatividade citoplasmática forte em numerosas células tumorais nas fatias tumorais, desse modo foi possível observar a imunopositividade presente na matriz extracelular e nas células endoteliais dos vasos sanguíneos do ambiente tumoral. Esses resultados demonstraram que o aptâmero apresenta um maior grau de especificidade do que o anticorpo, como pode ser observado na figura 3, caracterizando como um sucesso os aptâmeros e com alta afinidade pela proteína hMMP-9.

Figura 4: Marcação de fatias tumorais de cérebros humanos



Fonte: Adaptado de Gomes *et al.*, 2012.

Nota: As secções foram divididas em 3 sendo as frações incubadas com $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-F3Bomf}$ aptâmero localizadas no centro e a sequência controle $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ à direita e comparadas com imunorreatividade de hMMP-9 à esquerda.⁷

Como possível ser observado na imagem, em todos os casos, a imunomarcagem para o hMMP-9 também foi claramente observada tanto no ambiente extracelular quanto nas células endoteliais. Além disso, é possível

observar que, o ^{99m}Tc -MAG₃-F3Bomf induziu um sinal forte nos tecidos (painel central), enquanto um sinal muito mais fraco foi registrado com a sequência de controle (painel direito). Nenhum sinal foi detectado com tecido cerebral saudável.

Os autores não conseguiram quantificar o sinal obtido pela imunomarcagem. No entanto, de acordo com a análise visual deles, foi informado que a expressão imuno-histoquímica de MMP-9 aumentou de um modo dependente ao do grau do tumor e da malignidade, o qual teorizam que o sinal imuno-histoquímico, ou seja, a intensidade de ligação se correlacionam aproximadamente com a quantidade de MMP-9. Portanto, qualquer que seja o tipo de tumor, foi observada uma boa concordância entre a fixação do anticorpo e a ligação do aptâmero F3Bomf radiomarcada.

Foi a primeira aplicação do aptâmero para a detecção do hMMP-9 e que, ainda, expressou alta especificidade a qual é capaz de melhorar a relação sinal-ruído em comparação com os inibidores de MMP de amplo espectro, o que leva a uma alta absorção em tecidos com expressão de MMP não patogênica. Os autores ainda enfatizam a necessidade de melhorias futuras para aumentar a sua retenção *in vivo*.

Varmira *et al.*, (2013) optou por dar continuidade a um estudo já realizado pelo autor, utilizando o mesmo aptâmero HYNIC-RNA dirigido a HER2 eficientemente radiomarcado com ^{99m}Tc , esse estudo foi realizado com o intuito de melhorar a estabilidade do aptâmero já existente e produzido pelos envolvidos, no entanto nesse artigo o aptâmero foi submetido a dois diferentes de co-ligantes para relatar que a variação dos co-ligandos para a marcação do aptâmero HYNIC-RNA com ^{99m}Tc resulta em diferenças significativas na biodistribuição do aptâmero marcado em tecidos de camundongos normais e portadores de tumor, principalmente em relação ao acúmulo de fígado e baço.

Ambos os tipos de complexos co-ligandos eram estáveis no soro humano às 4h, com uma estabilidade de mais de 90%. Porém, o co-ligando de EDDA proporciona melhor estabilidade *in vivo* do complexo marcado, resultando em menor absorção de radioatividade do estômago e da tireóide. Em comparação com a tricina, portanto, o co-ligante EDDA produz o padrão mais promissor de biodistribuição do complexo aptâmero de ^{99m}Tc -HYNIC-RNA, combinando um maior

grau de captação tumoral específica com depuração sanguínea mais rápida e menor captação no fígado e músculo, como pode ser observado na figura 4, também foi demonstrado baixos níveis de captação de radioatividade no estômago e glândulas salivares sugeriram que a liberação de ^{99m}Tc -pertecnato in vivo foi baixa para ambos os aptâmeros radiomarcados.

Estes dados mostraram uma maior estabilidade in vivo com EDDA do que com tricina nos complexos aptâmeros de ^{99m}Tc -HYNIC-RNA.

Tabela 1 : Dados de biodistribuição animal

Table 1. Biodistribution of ^{99m}Tc -HYNIC-RNA aptamer with tricine or co-ligands EDDA as in normal female NMRI at 1, 4 and 24 h after injection.

Organ	Tricine (%ID/g)			EDDA (%ID/g)		
	1 h	4 h	24 h	1 h	4 h	24 h
Blood	4.55 ± 1.9	0.94 ± 0.29	0.23 ± 0.09	0.48 ± 0.13	0.21 ± 0.03	0.08 ± 0.01
Heart	1.71 ± 0.83	0.6 ± 0.5	0.07 ± 0.05	0.29 ± 0.06	0.17 ± 0.08	0.12 ± 0.05
Lung	3.18 ± 1.2	0.75 ± 0.31	0.22 ± 0.04	0.46 ± 0.07	0.33 ± 0.21	0.16 ± 0.08
Salivary glands & Thyroid	1.67 ± 0.06	0.75 ± 0.22	0.21 ± 0.08	0.39 ± 0.05	0.32 ± 0.13	0.14 ± 0.03
Liver	15.65 ± 5.53	8.05 ± 4.52	1.37 ± 0.42	3.92 ± 0.02	1.89 ± 1.35	1.04 ± 0.48
Spleen	6.55 ± 2.54	2.67 ± 2.85	0.34 ± 0.11	0.84 ± 0.34	0.47 ± 0.3	0.16 ± 0.12
Kidney	16.75 ± 5.63	8.02 ± 2.14	2.5 ± 0.21	5.67 ± 3.04	3.18 ± 0.82	1.47 ± 0.2
Stomach	2.13 ± 0.81	0.64 ± 0.04	0.2 ± 0.09	0.37 ± 0.13	0.96 ± 0.605	0.12 ± 0.04
Muscle	0.95 ± 0.09	0.29 ± 0.17	0.12 ± 0.02	0.21 ± 0.05	0.18 ± 0.13	0.08 ± 0.03
Bone	3.19 ± 1.66	1.06 ± 0.4	0.29 ± 0.06	0.57 ± 0.00	0.37 ± 0.24	0.26 ± 0.09
Intestine	11.57 ± 3.97	32.18 ± 3.09	2.05 ± 0.99	4.96 ± 3.48	29.16 ± 10.27	0.54 ± 0.19

Fonte: Varmira *et al.* 2013.

Nota: A tabela acima sintetiza os dados de biodistribuição animal obtidos de 4 camundongos a 1, 4 e 24 h após a injeção com um dos dois tipos de aptâmeros de ^{99m}Tc -HYNIC-RNA mais co-ligandos.

O aptâmero de ^{99m}Tc -HYNIC-RNA era altamente estável em solução salina e soro normais. A depuração sanguínea rápida foi observada após a injeção do aptâmero ^{99m}Tc -HYNIC-RNA e a principal via de excreção foi pelo sistema hepatobiliar. Enquanto o aptâmero conjugado radiologicamente ligou-se especificamente ao receptor HER2 em células in vitro, não mostrou qualquer relação tumor-sangue ou tumor-tumoral significativa em camundongos.

Em comparação com a tricina, portanto, o co-ligante EDDA produz o padrão mais promissor de biodistribuição do complexo aptâmero de ^{99m}Tc -HYNIC-RNA, combinando um maior grau de captação tumoral específica com depuração sanguínea mais rápida e menor captação no fígado e músculo.

Esses resultados mostraram que o aptâmero de ^{99m}Tc -HYNIC-RNA com EDDA como co-ligante tem melhor capacidade de direcionamento de tumor para o receptor HER2, tornando-se uma ferramenta de imagem promissora para pacientes com cânceres expressando HER2.

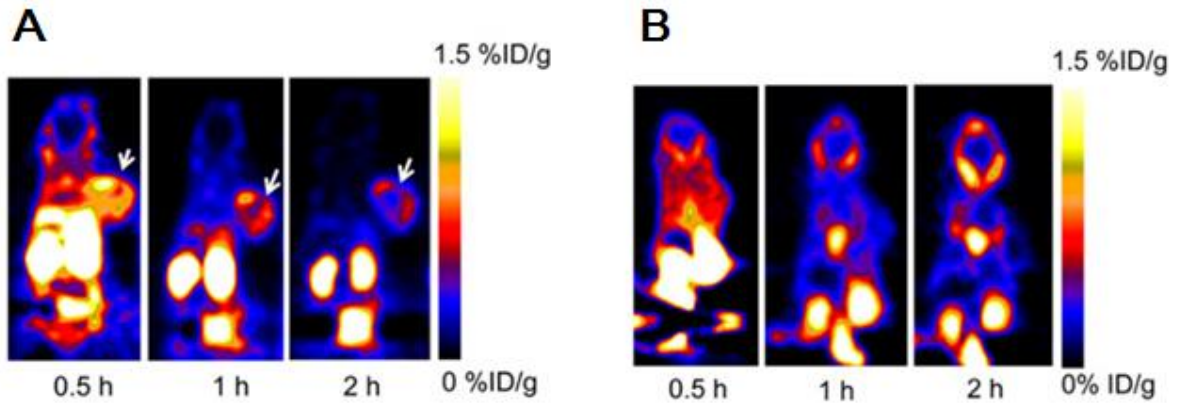
Jacobson *et al.* (2017) optaram por abordar sobre a tenascina-C, uma glicoproteína da matriz extracelular que é minimamente expressa em tecido adulto saudável, e está altamente expressa na neovasculatura e no estroma tumoral, e sua presença foi sugerida como tendo um papel fundamental no início e progressão do tumor.

Para esse estudo um aptâmero de tenascina-C foi radiomarcado com ^{64}Cu e ^{18}F , e foram utilizados estudos de imagem PET para a avaliação da captação do tumor e farmacocinética do aptâmero de tenascina-C, para que posteriormente fossem realizados em comparação com um aptâmero misturado inespecífico.

Para a avaliação *in vitro* da expressão de tenascina-C por diferentes tipos de tumor foi realizada uma coloração de imunofluorescência de seções de tumores. As seções foram feitas a partir de xenoinxertos de camundongos, gerados por injeção subcutânea de células de glioma U87MG e células de cancro do pulmão H460, e injeção ortotópica de células de cancro da mama MDA-MB-435 na glândula mamária. A coloração com anticorpo anti-tenascina-C mostrou claramente que os tumores U87MG e MDA-MB-435 eram positivos e corados de forma semelhante para a expressão de tenascina-C, enquanto que o tumor H460 era negativo.

Os estudos iniciais de PET foram realizados com o aptâmero de ^{18}F -FB-tenascina-C usando camundongos com tumores U87MG (tenascina-C positiva) e H460 (tenascina-C-negativa). O ^{18}F -FB-tenascina-C aptâmero no PET foi visualizado claramente os tumores tenascina-C-positivos, mas não os tumores tenascina-C-negativos.

Figura 5: Imagens de PET coronal de camundongos.



Fonte: Adaptado de Jacobson *et al.* 2017

Nota: (A) Imagens de PET coronais representativas de ratinhos portadores de xenoinxerto U87MG subcutâneo injetado com ^{18}F -FT-tenascina-C aptâmero em pontos de tempo indicados. A seta branca indica tumor. (B) Imagens de PET coronal representativas de camundongos portadores de xenoinxerto H460 subcutâneo injetado com ^{18}F -FB-tenascina-C aptâmero em 30min e 1 e 2 h após a injeção. A seta branca indica o local do tumor.

Esse estudo de imagem PET *in vivo* mostraram que o aptâmero de tenascina-C marcado pode visualizar claramente tumores tenascina-C positiva, mas não-negativos. Parece que o aptâmero de tenascina-C não se acumula no tumor após a ligação inicial, provavelmente devido à sua depuração rápida, portanto, a marcação com isótopos de meia vida curta, como ^{18}F , é suficiente para a aplicação de imagem PET. A depuração rápida do aptâmero de tenascina-C do DNA pode ser uma das razões pelas quais a absorção absoluta do aptâmero no tumor é relativamente baixa, mas em contra partida, a depuração rápida também torna o aptâmero menos provável de sofrer degradação *in vivo* pela DNase. Outra possível razão para a captação relativamente baixa do tumor é que o alvo é extracelular e a sonda não é internalizada ou aprisionada dentro das células.

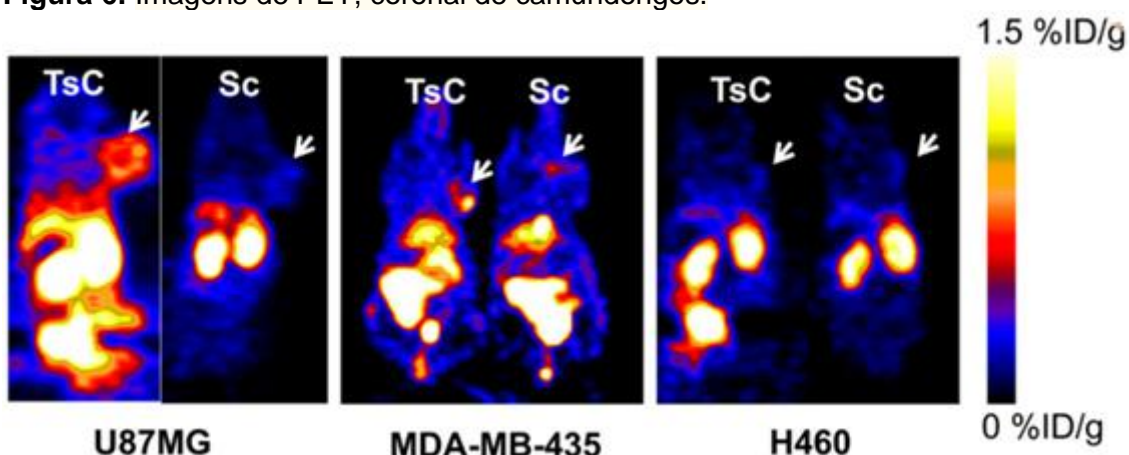
Quadro 4: Biodistribuição do ^{18}F -FB-Tenascina-C Aptamer a 0,5, 1 e 2 horas após a injeção.

ORGÃO	0.5 h	1 h	2 h
Vesícula Biliar	1.53 ± 0.46	2.08 ± 0.85	1.17 ± 0.24
Fígado	4.54 ± 0.87	0.62 ± 0.06	0.21 ± 0.04
Rim	48.98 ± 33.29	3.84 ± 0.48	1.12 ± 0.47
Tumor	0.97 ± 0.19	0.52 ± 0.08	0.42 ± 0.16
Músculo	0.31 ± 0.04	0.19 ± 0.01	0.08 ± 0.04
Sangue	1.20 ± 0.24	0.3 ± 0.05	0.07 ± 0.01

Fonte: Adaptado de Jacobson *et al.* 2017.

A comparação da captação do tumor entre o aptâmero de ^{18}F -FB-tenascina-C e o aptâmero de ^{18}F -FB-Sc mostrou diferenças significativas em todos os momentos analisados, com o aptâmero de ^{18}F -FB-Sc tendo uma captação tumoral muito maior do que Aptâmero de ^{18}F -FB-Sc. Para verificar a captação em vários órgãos e a especificidade do aptâmero, foram realizados estudos de biodistribuição e bloqueio. Os resultados da biodistribuição correlacionaram-se com as imagens de PET e mostraram captação no fígado, rins e tumor. Nenhuma absorção significativa foi encontrada nos ossos longos, sugerindo que não ocorreu desfluoração. Estas experiências também mostraram uma depuração mais rápida da atividade dos órgãos metabólicos.

Figura 6: Imagens de PET, coronal de camundongos.



Fonte: Adaptado de Jacobson *et al.* (2017)

Nota: Imagens de PET coronal de camundongos representativas de ^{64}Cu Ap-NOTA-tenascina-C aptâmero e ^{64}Cu -NOTA-Sc aptâmero em diferentes modelos tumorais (tenascina-C positiva [U87MG e MDA-MB-435] e tenascina-C-negativa [H460]) às 6 h após a injeção. As setas brancas representam localização do tumor.

Outra vantagem do aptâmero de tenascina-C é a sua baixa acumulação em órgãos não específicos (fígado e rins) mais cedo quanto 1 hora após a injeção. Entre os órgãos citados, o fígado é o de maior importância, uma vez que é alvo de muitos tipos de metástases e tem acumulação não específica relativamente alta de diferentes marcadores de PET. O aptâmero de tenascina-C quase não tem acúmulo no fígado, o que o torna útil para a visualização de metástases hepáticas. O acúmulo relativamente alto do traçador nos rins nos momentos iniciais pode estar relacionado aos grupos fosfodiéster carregados negativamente do oligonucleotídeo.

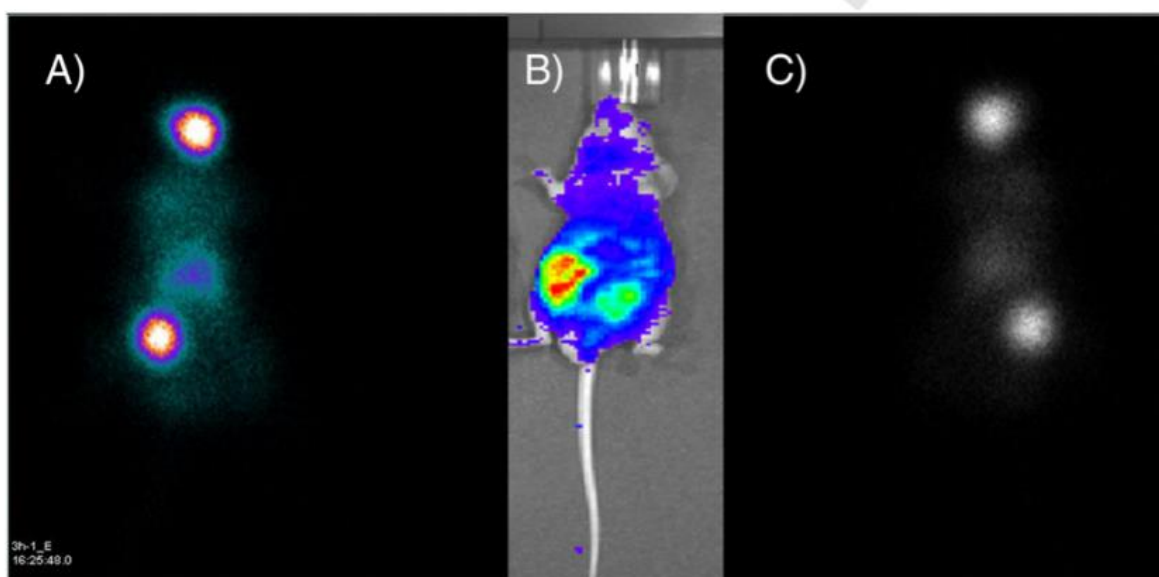
Esse aptâmero parece ser uma plataforma promissora para o desenvolvimento de agentes de imagem PET. O aptâmero de tenascina-C, marcado com ^{18}F ou ^{64}Cu , demonstrou propriedades apropriadas de contraste tumoral que sugerem utilidade para avaliação clínica da expressão da tenascina-C. No entanto, a marcação ^{18}F requer um melhor rendimento para tradução clínica. O conhecimento da expressão da tenascina-C pode ajudar os médicos a selecionar e monitorar terapias apropriadas, incluindo futuras terapias anti-tenascina-C.

No mesmo ano, Pascual *et al.* (2017) relatou seus estudos sobre a mucina 1 (MUC1), uma proteína da superfície celular superexpressa no câncer de mama, onde foi conjugado a nanopartícula de sílica mesoporosa conjugada com o aptâmero MUC1 como traçador radiomarcado para PET e SPECT. Eles relataram

que o ^{99m}Tc (S1-ap-MUC1-Tc) mostrou direcionamento significativo no modelo de camundongos portadores de tumor.

Essas nanopartículas S1-apMUC1 foram marcadas com ^{99m}Tc e sua capacidade de direcionamento foi estudada em camundongos Balb/c contendo MDA-MB-231. Imagens in vivo utilizando SPECT das regiões tumoral positiva para MUC1 apresentou sinais fortes devido o acúmulo de nanopartículas S1-apMUC1-Tc aos 90min após a injeção. Resultado que revelou que o acúmulo de nanopartículas de S1-apMUC1-Tc em tumores foi significativamente maior em comparação com a bioacumulação do aptâmero de MUC1 livre marcado com ^{99m}Tc .

Figura 7: Imagem de SPECT planar estática



Fonte: Pascual *et al.* 2017.

Nota: A) Imagem de SPECT planar estática do modelo de camundongos Balb/c MDA-MB-231 com tumor após a administração das nanopartículas de S1-apMUC1-Tc (3,7MBq / 0,2 ml) aos 90 min após injeção. B) imagens de bioluminescência de camundongos no dia 21 após a injeção intraventricular das células cancerosas MDA-MB-231 que revelam lesões tumorais. C) Imagem invertida de SPECT planar estática do modelo de murganho Balb/c MDA-MB-231 com tumor após a administração das nanopartículas de S1-apMUCI-Tc (3,7 MBq/0,2 mL) aos 90 minutos após a injeção.

O elevado acúmulo de S1-apMUC1-Tc no tumor foi sugerido como sendo em parte devido à interação do aptâmero de MUC1 nos MSNs funcionalizados com a glicoproteína MUC1 superexpressa nas células cancerosas MDA-MB-231. Isto sugere que S1-apMUC1-Tc é um potencial candidato para o diagnóstico de câncer por imagem. Além disso, imagens de SPECT de rins, fígado e tumor excisadas dos

camundongos tratados com S1-apMUC1-Tc após 120 minutos pós-injeção mostraram sinais fortes indicando acúmulo de nanopartículas de S1-apMUC1-Tc nesses órgãos.

O acúmulo no tumor foi notavelmente maior. Além disso, a absorção das nanopartículas S1-apMUC1-Tc pelos rins é uma característica desejável, uma vez que os materiais radioativos têm que ser excretados do corpo de forma rápida e eficiente. Outra característica marcante dos dados de biodistribuição é a baixa porcentagem de captação observada no fígado e no baço. Esta baixa captação para estes dois órgãos sugeriu que as nanopartículas S1-apMUC1-Tc foram capazes de evitar o sistema fagocítico mononuclear (MPS). Além disso foi demonstrado pela presença de radiação no sangue, que sugeriu que as nanopartículas têm uma certa afinidade por proteínas do sangue como a albumina e, conseqüentemente, uma circulação de longa duração, por esse fato temos sinal no coração.

Estes resultados obtidos por Pascual *et al.* (2017) demonstraram que os MSNs com marcadores radioativos MUC1 aptâmero oferecem um desempenho notável em termos de imagem em comparação com o uso do aptâmero ou MSNs sozinho.

Os autores Sicco *et al.* (2017), demonstraram um outro tipo de estudo o qual segue uma direção totalmente diferente dos demais autores mencionados anteriormente, eles relatam a otimização e preparação de derivados Sgc8-c, capazes de coordenar radionuclídeos metálicos, tais como os derivados estruturais do ácido DOTA e NOTA que são capazes de coordenar o Ga^{3+} , Zr^{4+} , Cu^{2+} , In^{3+} , Lu^{3+} , Y^{3+} ou Bi^{3+} , por exemplo. Fora esses, também foi estudado com o HYNIC, qual é capaz de coordenar o Tc^{5+} , ou Re^{5+} .

Nesse estudo, foi utilizado o como co-ligante DOTA, NOTA ou HYNIC como reagentes eletrofílicos, os quais demonstraram sua capacidade de coordenar diferentes íons metálicos para produzir novos radiofármacos e, de acordo com suas diferenças estruturais, permitem produzir alguns tipos de conjugados com diferentes propriedades físico-químicas, ou seja, lipofilicidade, estabilidade, solubilidade em água e, conseqüentemente, diferentes propriedades de biodistribuição.

O primeiro item a ser observado pelos autores foi que as razões molares dos reagentes variaram entre 1:2 e 1:200. Os resultados mostraram que os rendimentos aumentaram com a quantidade de eletrófilos, resultando as melhores condições, em todos os casos, onde a razão foi de 1:200. Em segundo lugar, foram observados os baixos rendimentos nos casos dos conjugados Sgc8-c-DOTA e Sgc8-c-HYNIC levaram os a analisar diferentes tempos de reação variando entre 0,5 a 24h. Os resultados mostraram claramente que o aumento do tempo de reação conduziu a menores rendimentos de produtos, resultando no melhor tempo de incubação de 2 horas.

Em terceiro lugar, foi relatada a tentativa de melhorar os rendimentos dos conjugados, analisamos diferentes solventes de reações, testando diferentes soluções tampão aquosas. A natureza e a força iônica do tampão, no qual ocorre a interação ligante do aptâmero, poderiam influenciar significativamente na ligação biológica. Neste caso foi observado que quando o tampão de bicarbonato de sódio foi trocado por tampão fosfato de sódio foi obtido um aumento nos rendimentos em todos os casos, especialmente para Sgc8-c-HYNIC. Por esta razão, sondamos misturas de ambos os tampões, descobrindo que volumes iguais de ambos os tampões produziram os melhores rendimentos dos conjugados desejados atingindo os maiores valores de 77% para Sgc8-c-DOTA 70% para Sgc8-c-NOTA e 48% para Sgc8-c-HYNIC.

Com base nos resultados obtidos, os autores teorizam que para futuras radiomarcações é muito importante começar a partir de uma amostra pura, devido a reações radiomarcadas adicionais que poderiam ser produzidas impurezas extras, transformando um produto final pobre.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base em suas características únicas e vantajosas em relação aos anticorpos, vários aptâmeros foram desenvolvidos como ferramentas versáteis para o diagnóstico por imagens devido a sua melhor penetração tecidual, baixa imunogenicidade, maior acúmulo no alvo, alta especificidade e afinidade, produção química mais simples, controlada e mais barata, desnaturação reversível, tamanho pequeno, baixa taxa de agregação e depuração sanguínea rápida para imagens in vivo. Esses fatores, corresponderam a muitos dos critérios solicitados para a sonda de imagem ideal.

Portanto os aptâmeros são, desde a sua descoberta na década de 90, uma tecnologia promissora, a qual é claro que ainda enfrenta vários desafios de desenvolvimento, as quais ainda não permitiram que eles fizessem uma transição bem-sucedida do laboratório à clínica, devido às suas propriedades farmacocinéticas, que são frequentemente afetadas pelo agente ao qual são acopladas para a entrega, a sua susceptibilidade às nucleases, que fazem com que seja necessário diversas modificações à função, a sua rápida filtração renal e rápida distribuição do compartimento plasmático para os tecidos.

No entanto, estudos pré-clínicos demonstraram que esse agente tem um futuro promissor, uma vez que muito flexíveis e fáceis de adaptarem, com várias modificações químicas disponíveis. Essas características permitem aplicações que antes não eram possíveis e prometem maiores avanços no futuro próximo, com a expansão do mercado de aptâmeros, impulsionada pela maior demanda e melhores terapias direcionadas para o campo de oncologia.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Carlos E. B. de *et al.* Aptamer delivery of siRNA, radiopharmaceutics and chemotherapy agents in cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 525, n. 2, p.334-342, Jun. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.03.086>. Disponível em: link. Acesso em: dia mês ano.

ALVARES, Beatriz Regina; MICHELL, Michael. O uso da ressonância magnética na investigação do câncer mamário. **Radiologia Brasileira**, São Paulo, v. 36, n. 6, p.373-378, nov./dez. 2003.

AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY (ASCO). 1997 Update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:793-5.

ATKINS, Peter William; JONES, Loretta. **Principles of chemistry - questioning modern life and the environment**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2001.

BERNARD, Elyse D. et al. Target binding improves relaxivity in aptamer–gadolinium conjugates. *Jbic Journal Of Biological Inorganic Chemistry*, [s.l.], v. 17, n. 8, p.1159-1175, 19 ago. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-012-0930-z>.

AZEVEDO-MARQUES, Paulo Mazzoncini de. DIAGNÓSTICO AUXILIADO POR COMPUTADOR NA RADIOLOGIA. *Radiol Bras*, São Paulo, v. 34, n. 5, p.285-293, 2001.

CAMARGO EE. O PET/CT na realidade brasileira de diagnóstico por imagem. *Rev Imagem* 2004;26(3): IV-VI.

CAMARGO, Edwaldo E. Experiência inicial com PET/CT. *Radiologia Brasileira*, [s.l.], v. 38, n. 1, fev. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-39842005000100001>.

CARMO, Fagner Santos do et al. Anti-MUC1 nano-aptamers for triple-negative breast cancer imaging by single-photon emission computed tomography in induced animals: initial considerations. **International Journal Of Nanomedicine**, [s.l.], v. 12, p.53-60, dez. 2016. Dove Medical Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s118482>.

CARRIÓ, I., & GONZALEZ, P. *Medicina nuclear: aplicaciones clínicas*. Barcelona: Masson (2003).

CHEN, Tao et al. Smart Multifunctional Nanostructure for Targeted Cancer Chemotherapy and Magnetic Resonance Imaging. **ACS Nano**, [s.l.], v. 5, n. 10, p.7866-7873, 21 set. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/nn202073m>.

DE HAEN C. Conception of the first magnetic resonance imaging contrast agents: a brief history. *Top Magn Reson Imaging*. 2001;12:221–30.

DENG, Qing *et al.* Retention and separation of adenosine and analogues by affinity chromatography with an aptamer stationary phase. *Anal. Analytical Chemistry*, [s.l.], v.73, n.22, p. 5415- 5421, Oct. 2001.

DILWORTH, J.R.; PARROT, S.J. The biomedical chemistry of technetium and rhenium. *Chem. Soc. Rev.*, v. 27, p. 43-55, 1998.

Edogun, O., Nguyen, N.H., & HALIM, M. Fluorescent single-stranded DNA-based assay for detecting unchelated gadolinium(III) ions in aqueous solution. *Anal.Bioanal.Chem.* 408 (15), 4121 - 4131 (2016).

EDOGUN, OSAFANMWEN *et al.* An Aptamer-based Sensor for Unchelated Gadolinium(III). *Journal Of Visualized Experiments*, [s.l.], n. 119, p.1-6, 9 jan. 2017. MyJove Corporation. <http://dx.doi.org/10.3791/55216>.

ELIAS JUNIOR, JORGE *et al.* Complications of intravenous use of gadolinium-based contrast agents for magnetic resonance imaging. *Radiologia Brasileira*, [s.l.], v. 41, n. 4, p.263-267, Aug. 2008. Fapunifesp (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-39842008000400013>.

ELLINGTON A. D., SZOSTAK J. W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, v. 346, p. 818-822, 1990.

FERLAY, JACQUES *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal Of Cancer*, [s.l.], v. 136, n. 5, p.359-386, 9 out. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29210>.

FERREIRA, CATIA S. M.; MISSAILIDIS, Sotiris. Aptamer-based therapeutics and their potential in radiopharmaceutical design. *Brazilian Archives Of Biology And Technology*, [s.l.], v. 50, n. , p.63-76, set. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-89132007000600008>.

FERREIRA, Iêda Mendes. **Desenvolvimento de aptâmeros específicos para aplicação como radiofármacos na identificação de bactérias**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais) - Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte, 2013.

GENTILE M, JUNGESTROM B, OLSEN KE, SODERKVIST P, WINGREN S. p53 and survival in early onset breast cancer: analysis of gene mutations, loss of heterozygosity and protein accumulation. *Eur J Cancer* 1999;35:1202-7.

GIJS, MARLIES *et al.* Aptamers as radiopharmaceuticals for nuclear imaging and therapy. *Nuclear Medicine And Biology*, [s.l.], v. 43, n. 4, p.253-271, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2015.09.005>.

GOMES, Sonia da Rocha *et al.* 99mTc-MAG3-Aptamer for Imaging Human Tumors Associated with High Level of Matrix Metalloprotease-9. *Bioconjugate Chemistry*, [s.l.], v. 23, n. 11, p.2192-2200, nov. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bc300146c>.

GONÇALVES, IVANA REGINA; PADOVANI, CARLOS; POPIM, REGINA CÉLIA. Caracterização epidemiológica e demográfica de homens com câncer de próstata. *Ciência & Saúde Coletiva*, [s.l.], v. 13, n. 4, p.1337-1342, ago. 2008. FapUNIFESP (SciELO).<http://dx.doi.org/10.1590/s1413-81232008000400031>.

GONZÁLEZ HERNANDO C, ESTEBAN L, CAÑAS T, et al. The role of magnetic resonance imaging in oncology. *Clin Transl Oncol*. 2010;12:606–13.

GUERRA, MAXIMILIANO RIBEIRO et al. Risk of cancer in Brazil: trends and more recent epidemiological studies. *Brazilian Journal of Cancerology*, Rio de Janeiro, v.51, n.3, p.227-234. Available at: http://www.inca.gov.br/rbc/n_51/v03/pdf/revisao1.pdf. Accessed on: 22 Aug. 2018.

GUIMARAES, MARCOS DUARTE et al. Functional magnetic resonance imaging in oncology: state of the art. *Radiologia Brasileira*, [s.l.], v. 47, n. 2, p.101-111, abr. 2014. FapUNIFESP (SciELO).<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-39842014000200013>.

GUO, Ketai et al. Aptamer-based capture molecules as a novel coating strategy to promote cell adhesion. *Journal Of Cellular And Molecular Medicine*, [s.l.], v. 9, n. 3, p.731-736, jul. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00503.x>.

GUO, Ke-tai et al. A New Technique for the Isolation and Surface Immobilization of Mesenchymal Stem Cells from Whole Bone Marrow Using High-Specific DNA Aptamers. *Stem Cells*, [s.l.], v. 24, n. 10, p.2220-2231, out. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2006-0015>.

HASSANZADEH, Leila; CHEN, Suxiang; VEEDU, Rakesh. Radiolabeling of Nucleic Acid Aptamers for Highly Sensitive Disease-Specific Molecular Imaging. **Pharmaceuticals**, [s.l.], v. 11, n. 4, 15 out. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ph11040106>.

HIGGINS LJ, POMPER MG. The evolution of imaging in cancer: current state and future challenges. *Semin Oncol*. 2011;38:3–15.

HOFF, Paulo Marcelo Gehm; SABBAGA, Jorge. *Oncologia*. In: MARTINS, Milton de Arruda *et al*. **Clínica médica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2016. p. 387-525.

INCA. **ABC do câncer**: abordagens básicas para o controle do câncer. 4. ed. Rio de Janeiro: Inca, 2018.

INCA. **O que é câncer?**. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em: 27 abr. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. O que causa o câncer? Disponível em: <https://www.inca.gov.br/>. Acesso em: 27 abr. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Como surge o câncer? Disponível em: <https://www.inca.gov.br/>. Acesso em: 27 abr. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Tipos de Câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/>>. Acesso em: 27 abr. 2019.

JACOBSON, O. et al. PET Imaging of Tenascin-C with a Radiolabeled Single-Stranded DNA Aptamer. *Journal Of Nuclear Medicine*, [s.l.], v. 56, n. 4, p.616-621, 19 fev. 2015. Society of Nuclear Medicine.<http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.114.149484>.

JAYASENA D. SUMEDHA. Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics. *Clinical Chemistry*, v. 45, p. 1628-1650, 1999.

KERSUL, Alessandra Pereira. ENFRENTAMENTO DO CÂNCER: RISCOS E AGRAVOS. 2014. 41 f. Monografia (Especialização) - Curso de Curso de Especialização em Atenção Básica em Saúde da Família, Universidade Federal de Minas Gerais, Campos Gerais, 2014.

LIU, Juewen; LU, Yi. Fast Colorimetric Sensing of Adenosine and Cocaine Based on a General Sensor Design Involving Aptamers and Nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*, [s.l.], v. 45, n. 1, p.90-94, jan. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200502589>.

MACHADO, BEATRIZ MENDONÇA et al. CASOS ONCOLÓGICOS NO MUNICÍPIO DE VALENÇA: UM ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO. *Saber Digital*, [S.l.], v. 10, n. 2, p. 27-42, fev. 2018. ISSN 1982-8373. Disponível em: <<http://revistas.faa.edu.br/index.php/SaberDigital/article/view/275>>. Acesso em: 22 ago. 2018.

MALZYNER, Artur; CAPONERO, Ricardo (Org.). **Câncer e Prevenção**. São Paulo: MG Editores, 2013.

MAYER, Günter. The Chemical Biology of Aptamers. *Angewandte Chemie International Edition*, [s.l.], v. 48, n. 15, p.2672-2689, 24 mar. 2009. Wiley.<http://dx.doi.org/10.1002/anie.200804643>.

MEADE, T. New magnetic resonance contrast agents as biochemical reporters. *Current Opinion In Neurobiology*, [s.l.], v. 13, n. 5, p.597-602, out. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2003.09.009>.

MISSAILIDIS & HARDY. Aptamers as inhibitors of target proteins. *Expert Opin. Ther. Patents*, v. 19, n° 8, p. 1-10, 2009.

MISSAILIDIS S. & PERKINS A. Aptamers as Novel Radiopharmaceuticals: Their Applications and Future Prospects in Diagnosis and Therapy. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, v. 22, número 4, 2007.

MISSAILIDIS, Sotiris; PERKINS, Alan. Update: Aptamers as Novel Radiopharmaceuticals. *Cancer Biotherapy And Radiopharmaceuticals*, [s.l.], v. 22, n. 4, p.453-468, ago. 2007. Mary Ann Liebert Inc.<http://dx.doi.org/10.1089/cbr.2007.357>.

NUTIU, Razvan; LI, Yingfu. Structure-Switching Signaling Aptamers. *Journal Of The American Chemical Society*, [s.l.], v. 125, n. 16, p.4771-4778, abr. 2003. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja028962o>.

OHUCHI, Shoji. Cell-SELEX Technology. *BioResearch Open Access*, [s.l.], v. 1, n. 6, p.265-272, dez. 2012. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/biores.2012.0253>.

PAES R. Marcadores prognósticos em neoplasias mamárias. In: Wakamatsu A, Simões AB, Kanamura CT, Pinto GA, Metze IL, Vassalo J, et al. *Manual de Imuno-histoquímica*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1995. p. 62-9.

PAVARINHO, ÉRIKA CRISTINA; CHICOTE, PATRÍCIA MATOS BISELLI; BERTOLLO, ENY MARIA GOLONI. Aplicação da Biologia Molecular em Genética de Populações. In: LIPAY, Monica V. N. et al. *Biologia Molecular: Métodos e Interpretação*. [s.i]: Gen, 2015. Cap. 13. p. 183-192.

PHILLIPS, Joseph A. et al. Applications of aptamers in cancer cell biology. *Analytica Chimica Acta*, [s.l.], v. 621, n. 2, p.101-108, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2008.05.031>.

PICHLER BJ, KOLB A, NÄGELE T, SCHLEMMER HP. PET/MRI: paving the way for the next generation of clinical multimodality imaging applications. *J Nucl Med*. 2010;51(3):333-6.

QUEIROGA, Ricardo C; PERNAMBUCO, Ana Paula. Esophageal Cancer: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Revista Brasileira de Cancerologia*, Rio de Janeiro, v. 52, n. 2, p.173-178, 2006.

REED W, HANNISDAL E, BOEHLER P, GUNDERSEN S, HOST H, NESLAND J. The prognostic value of p53 and c-erb b-2 immunostaining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* 2000; 88:804-13.

RÊGO, Renaly Ivyna de Araújo *et al.* Radiofármacos: uma breve revisão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, 2., 2017, Campina Grande/PB. **II CONBRACIS**. Campina Grande/PB: Poisson, 2016. v. 7, p. 1-8. Disponível em: <http://www.editorarealize.com.br/revistas/conbracis/trabalhos/TRABALHO_EV071_MD1_SA3_ID2237_15052017235140.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2018.

RÖTHLISBERGER, Pascal; GASSE, Cécile; HOLLENSTEIN, Marcel. Nucleic Acid Aptamers: Emerging Applications in Medical Imaging, Nanotechnology, Neurosciences, and Drug Delivery. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 18, n. 11, 16 nov. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18112430>.

SANTOS, C. A. C.; BOLOGNESI, L. Aplicações Terapêuticas em Medicina Nuclear. *Tekhne e Logos*, Botucatu, SP, v.5, n.2, Dezembro, 2014.

SANTOS, SARA ROBERTA DOS. AVALIAÇÃO DE APTÂMEROS MARCADOS COM ^{99m}Tc PARA IDENTIFICAÇÃO DE FOCOS INFECCIOSOS DE *Staphylococcus aureus*. 2014. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia das Radiações, Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte, 2014.

SCHROEDER, Hendrik et al. Generation of Live-Cell Microarrays by Means of DNA-Directed Immobilization of Specific Cell-Surface Ligands. *Angewandte Chemie International Edition*, [s.l.], v. 46, n. 22, p.4180-4183, 25 maio 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200604467>.

SCHUELER, PAULO. Desafios para a implementação do diagnóstico molecular como guia da conduta em oncologia. Friocruz, [s.l.], maio 2017.

MINAS GERAIS. Secretaria de Estado de Saúde de Minas gerais. **Situação do câncer em Minas Gerais e suas macrorregiões de saúde: estimativas de incidências e mortalidade para o ano 2013, válidas para 2014**: perfil da mortalidade: perfil da assistência na alta complexidade. Belo Horizonte: Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais, 2013. *E-book*. Disponível em: <https://docplayer.com.br/5355687-Situacao-do-cancer-em-minas-gerais-e-suas-macrorregioes-de-saude.html>. Acesso em: dia mês ano.

SERKOVA NJ, GARG K, BRADSHAW-PIERCE EL. Oncologic imaging endpoints for the assessment of therapy response. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2009;4:36–53.

SHANGGUAN, D. et al. Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [s.l.], v. 103, n. 32, p.11838-11843, 27 jul. 2006. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0602615103>.

SILVA, JM et al. TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE PÓSITRONS/ RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NA AVALIAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA. Universidade do Vale do Paraíba, [s.i.], p.1-6, out. 2016.

SOARES, F. A., & FLOR, R. D. *Medicina Nuclear*. Centro Federal de Educação Tecnológica de Santa Catarina - CEFET. Santa Catarina: Gráfica CEFET/SC (2001).

SOUSA, FRANCISCA PATRÍCIA BORGES. <https://pt.slideshare.net/PatrciaBorges3/radiofrmacos>. 2013. Disponível em: <<https://pt.slideshare.net/PatrciaBorges3/radiofrmacos>>. Acesso em: 22 ago. 2018.

STOLTENBURG R., REINEMANN C., STREHLITZ B. SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering*, v. 24, p. 381–403, 2007.

SUNNUCKS P. Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol Evol*. 2000;15:199-203.

SYED, Muhammad Ali; PERVAIZ, Saima. *Advances in Aptamers. Oligonucleotides*, [s.l.], v. 20, n. 5, p.215-224, out. 2010. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/oli.2010.0234>.

TELGSMANN, L., SPERLING, M., & KARST, U. Determination of gadolinium-based MRI contrast agents in biological and environmental samples: a review. *Anal. Chim. Acta.* 764, 1 - 16 (2013).

TUCUNDUVA, LUCIANA TOMANIK CARDOZO DE MELLO et al. Estudo da atitude e do conhecimento dos médicos não oncologistas em relação às medidas de prevenção e rastreamento do câncer. *Revista da Associação Médica Brasileira*, [s.l.], v. 50, n. 3, p.257-262, set. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-42302004000300030>.

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

VERSLYPE, C.; ROSMORDUC, O.; ROUGIER, P.. Hepatocellular carcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals Of Oncology*, [s.l.], v. 23, n. 7, p.41-48, 20 set. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mds225>.

VITOR, TAISE et al. PET/MRI: a novel hybrid imaging technique. Major clinical indications and preliminary experience in Brazil. *Einstein (São Paulo)*, [s.l.], v. 15, n. 1, p.115-118, mar. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1679-45082017md3793>.

WESTBROOK, CATHERINE. Agentes de contraste em RM. In: WESTBROOK, Catherine; ROTH, Carolyn Kaut; TALBOT, John. *Ressonância Magnética: Aplicações Práticas*. 4. ed. [s.i]: Gen, 2016. Cap. 11. p. 315-335.

XU, Weichen; LU, Yi. Label-Free Fluorescent Aptamer Sensor Based on Regulation of Malachite Green Fluorescence. *Analytical Chemistry*, [s.l.], v. 82, n. 2, p.574-578, 15 jan. 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac9018473>

XU, Weichen; LU, Yi. A smart magnetic resonance imaging contrast agent responsive to adenosine based on a DNA aptamer-conjugated gadolinium complex. *Chemical Communications*, [s.l.], v. 47, n. 17, p.4998, 2011. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c1cc10161g>

XU, JIEHUA et al. Molecular Recognition of Human Liver Cancer Cells Using DNA Aptamers Generated via Cell-SELEX. *Plos One*, [s.l.], p.1-11, may 4, 2015.

YOU K. M., LEE S. H., LEE B. S. Aptamers as Functional Nucleic Acids: In vitro Selection and Biotechnological Applications. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 8, p. 64-75, 2003.

ZHANG, Yunfei et al. Aptamers selected by cell-SELEX for application in cancer studies. *Bioanalysis*, [s.l.], v. 2, n. 5, p.907-918, maio 2010.Future Science, LTD. <http://dx.doi.org/10.4155/bio.10.46>.

ZHANG, Lan-xin et al. Preparation and In Vitro Evaluation of a MRI Contrast Agent Based on Aptamer-Modified Gadolinium-Loaded Liposomes for Tumor Targeting. **Aaps Pharmscitech**, [s.l.], v. 18, n. 5, p.1564-1571, 7 set. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-016-0600-5>.

ZHANG, Yajie et al. Aptamer-Targeted Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents and Their Applications. *Journal Of Nanoscience And Nanotechnology*, [s.l.], v. 18, n. 6, p.3759-3774, 1 jun. 2018. American Scientific Publishers.<http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2018.15226>.