

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso Biomedicina

Camila de Oliveira Vieira

**ORIGAMI DE DNA: DA CRIAÇÃO DE FORMAS 2D À NANOROBÔS
PROGRAMÁVEIS**

São Paulo

2018

Camila de Oliveira Vieira

**ORIGAMI DE DNA: DA CRIAÇÃO DE FORMAS 2D À NANOROBÔS
PROGRAMÁVEIS**

São Paulo, 29 de novembro de 2018

Professor Orientador Fábio Mitsuo Lima

Professor Examinador Fredson Torres Silva

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Arlindo e Cristiana, que mantiveram a calma durante tempos turbulentos e me apoiaram a continuar até o fim, mesmo em momentos difíceis em que cogitei desistir. Deposito neles a minha admiração e respeito por compreenderem meus momentos de insegurança, nervosismo e tristeza que passei durante estes quatro anos de graduação.

Ao meu irmão, que ainda vai passar por todo este processo, espero servir de inspiração para sua nova etapa da vida que está a vir.

A todos os colegas que conheci no Centro Universitário São Camilo: Amanda, Rebeca, Tania, Millena, Juliana, Vinícius (e todos os outros que conheci durante estes quatro anos), agradeço a vocês por todo tempo passado juntos, seja estudando ou em momentos descontraídos. Espero que a nossa amizade continue mesmo com o passar dos anos.

Minhas colegas de infância, Amanda e Karina, que me aconselham e me divertem e sempre se mantiveram presentes apesar dos diferentes rumos que decidimos seguir.

Ao Henrique, que me conheceu na fase mais difícil da minha vida, mas nunca desistiu de mim.

Aos meus avós, Josefa, Olicio, que são exemplo de carinho e fé.

A todos meus familiares, que por algum motivo eu não estive próxima quanto eu gostaria.

À minha falecida avó, Maria, a quem servirá de inspiração para toda a minha vida.

VIEIRA, C. O **ORIGAMI DE DNA: DA CRIAÇÃO DE FORMAS 2D À NANOROBÔS PROGRAMÁVEIS**.35. Dissertação (Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina) Centro Universitário São Camilo / CUSC. São Paulo. 2018.

A molécula de DNA, por ser de fácil manipulação e modificação, inspirou a construção de nanoestruturas artificiais chamadas Origami de DNA, nas quais esta molécula é utilizada como matéria-prima principal. Esta técnica consiste na manipulação de uma fita única de DNA em formatos bidimensionais e tridimensionais, utilizando um esqueleto molde, sendo o mais utilizado o de bacteriófago M13, e os chamados “grampos”, que realizam ligações do tipo ligações de hidrogênio e mantem a estabilidade da estrutura. A produção de Origami de DNA encontra-se em fase de desenvolvimento, mas é possível visualizar sua aplicação em futuras terapias, como na oclusão de vasos de tumores pela liberação de trombina enviada por aptâmeros com afinidade à nucleolina diretamente em seu endotélio.

Palavras-Chave: Nanotecnologia. Nanorobôs. Origami de DNA. Aptâmeros..

VIEIRA, C. O. **DNA ORIGAMI: FROM THE CREATION OF 2D FORMS TO PROGRAMMABLE NANOROBOTS**.35. Dissertation (Term paper in Biomedicine) Centro Universitário São Camilo / CUSC. São Paulo. 2018.

The DNA molecule, being easy to manipulate and sustaining modification, inspired the construction of artificial nanostructures called DNA Origami, in which this molecule is used as the main material. This technique consists in manipulating a single DNA tape in two-dimensional and three-dimensional formats, using a main molecular template, being the most used the bacteriophage M13, and hydrogen bond “staples” to the tridimensional maintain conformation keep the structure stable. The production of DNA Origami is still in development, but it therapies in development, such as in the occlusion of tumor vessels by releasing thrombin direct into its endothelium, guided by aptamers with affinity with nucleolin.

Keywords: Nanotechnology. Nanorobots. DNA Origami. Aptamers.

Lista de Figuras

- Figura 1 – Imagem de raio-X capturada por Rosalind Franklin que permitiu a confirmação da forma helicoidal do DNA.....pág.11
- Figura 2– Cadeira polinucleotídica de DNA, demonstrando a ligação fosfodiéster no sentido 5'→3'pág.12
- Figura 3 – Conexão das bases purina (azul) e pirimidina (amarelo) por meio de pontes de hidrogênio.....pág.13
- Figura 4 – Modelo proposto por Seeman: Junções ramificadas de 4 fitas de DNA (A); dobro de cruzamentos entre fitas (B); triplo de cruzamentos entre fitas(C).....pág.16
- Figura 5 – Diferentes formas de origamis de DNA criadas por Rothemund.....pág. 17
- Figura 6 – Formação uma estrutura retangular bidimensional utilizando Origami de DNA.....pág.18
- Figura 7 – Design do mapa Chinês utilizando Origami de DNA. Esqueleto da estrutura representado em preto e grampos representados em diferentes cores.....pág.18
- Figura 8 – Representação da técnica de montagem fractal, formando uma estrutura com dimensões 8x8 composta por Origamis de DNA.....pág.20
- Figura 9 – Processo de criação da Imagem da Mona Lisa utilizando montagem fractal capturado por microscópio de força atômica.....pág.20
- Figura 10 – Etapas do método SELEX de seleção de aptâmeros.....pág.22
- Figura 11 – Síntese de aptâmeros e sua seleção.....pág.23
- Figura 12 – Estrutura 3D de aptâmeros ligados à nucleolina e trombina.....pág.24
- Figura 13 – Perspectiva de um Nanorrobô de DNA aberto, expondo sua carga útil.....pág.25
- Figura 14 – Design e caracterização do nanorrobô carregado com trombina em seu interior, sendo que I indica a configuração 2D do origami de DNA, II indica o origami de DNA carregado com trombinas em sua superfície e III o nanorrobô de DNA

fechado com trombinas em seu interior e aptâmeros em suas extremidades.....pág.27

Figura 15 – Ação de nanorobôs carregados com trombina em tumores induzidos em camundongos BALB/c nude.....pág.28

Figura 16 – Comparação do volume de tumores quando tratados com salina, trombina livre, nanorobô vazio, nanotubo não direcionado, nanotubo incapaz de abrir e nanorobô, respectivamente.....pág.29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1 O surgimento da Biologia Molecular.....	8
1.2 Estrutura molecular dos ácidos nucleicos	12
2. OBJETIVO	14
3. METODOLOGIA	15
4. DESENVOLVIMENTO	16
4.1 A origem do Origami de DNA.....	16
4.2 Aptâmeros.....	21
4.3 Origami de DNA tridimensional	25
4.4 Avanços e perspectivas	26
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31
6. REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

1.1 O surgimento da Biologia Molecular

O termo biologia molecular, proposto por Warren Weaver em 1938 em uma publicação na revista *Science*, foi descrito como fenômenos biológicos que são compreendidos pelo conhecimento da estrutura das moléculas e suas interações. Ao longo dos anos, este termo passou a se referir a pesquisas relacionadas aos genes. (WEAVER, 1970 apud SCHEID; FERRARI; DELIZOICOV, 2003)

Em 1953 foi publicado na revista *Nature* o trabalho de James Watson e Francis Crick, que descrevia uma estrutura helicoidal com duas cadeias de ácido desoxiribonucléico que se traçavam em um único eixo, sugerindo assim a estrutura molecular de ácidos nucleicos. Desta forma, percebeu-se a correlação entre estrutura e função, citada por Weaver. (SCHEID; FERRARI; DELIZOICOV, 2003)

Apesar desta correlação ocorrer somente em 1953, sabe-se que desde a década de 1880 já se tinha a ideia de que o núcleo das células poderia ser a sede da hereditariedade e que os cromossomos constituíam o material genético. Esta ideia não era senso comum entre a comunidade científica, que acreditava que as proteínas eram as únicas moléculas com complexidade estrutural para portar o material genético. (SCHEID; FERRARI; DELIZOICOV, 2003)

Em 1871, o fisiólogo e químico orgânico Friedrich Miescher citou pela primeira vez o que chamamos atualmente de DNA. Nesta publicação, havia a síntese de uma substância que ele chamou de nucleína, extraída de células purulentas. A nucleína, que então foi estudada por Miescher, foi considerada na época uma molécula simples demais para armazenar todo o material genético. (OLBY, 1994; MAYR, 1998; HAUSMANN, 2002).

No final da década de 1880 havia um consenso entre a comunidade científica, que defendia que a existência da cromatina justificava todas as exigências para o armazenamento do material genético. Em 1930 descobriu-se que animais e plantas possuíam DNA e RNA em suas células, porém não se sabia ao certo suas funções. Sabe-se atualmente que a cromatina é um complexo de DNA enovelado às histonas encontrado dentro do núcleo da célula que constitui os cromossomos. (SCHEID; FERRARI; DELIZOICOV, 2003)

As bases nitrogenadas que compõem o DNA - conhecidas atualmente como citosina, guanina, adenina e timina - foram identificadas por Albrecht Kossel em 1927. Nos anos seguintes, a ideia que prevaleceu foi a que o DNA era uma molécula pequena, com estrutura longitudinal, composta por desoxirribose e fósforo, o que conectava as bases nitrogenadas citadas acima. Supunha-se que a informação genética era transportada por diferentes quantidades de cada base. Este modelo citado foi proposto por Phoebus Aaron Levene, que defendia que cada base nitrogenada possuía quantidades iguais dentro da molécula de DNA e que sua estrutura era muito simples, quebrando então o paradigma de que o material genético seria armazenado em moléculas complexas, como em proteínas. (OLBY, 1994; MAYR, 1998)

Em 1944, Erwin Schrodinger sugeriu em seu livro titulado “What is Life?” que os genes seriam formados por “cristais aperiódicos” e que estes eram compostos por arranjos de moléculas isômeras, que posteriormente seriam chamadas de nucleotídeos. Segundo Schrodinger, estes cristais aperiódicos formariam diversas sequências que codificariam as informações genéticas. (SCHRÖDINGER, 1997)

Nos anos seguintes desta publicação, formou-se o conceito de macromoléculas polimerizadas. Desta forma, passou-se a utilizar os métodos aplicados à grandes moléculas, às moléculas de DNA, como a absorção de luz e filtragem, e desta forma, descobriram que as moléculas de DNA eram maiores do que as suposições anteriores. (MAYR, 1998)

Um dos passos mais importantes para o conhecimento da estrutura do DNA ocorreu em 1949, com a descoberta de Erwin Chargaff.

Chargaff mediu as bases de DNA em quatro espécies: timo de *Bostaurus* (bezerros), baço de *Ovis Áries* (carneiro), *Saccharomyces cerevisiae* (fermento) e *Mycobacterium tuberculosis*. Com isto, concluiu que em qualquer uma destas espécies, a quantidade de adenina era semelhante à de timina e que a de citosina era semelhante à de guanina, refutando desta forma a suposição de Phoebus Aaron Levene, de que todas as bases possuem a mesma quantidade dentro da molécula de DNA. (OLBY, 1994)

Anos depois, três laboratórios iniciaram uma busca no entendimento da estrutura do DNA. Nestes laboratórios, pesquisadores como Linus Pauling, Maurice Wilkins e

seus colaboradores (entre eles, Rosalind Franklin), James Watson e Francis Crick trabalharam com o DNA e propuseram um modelo para a sua estrutura. (MAYR, 1998).

A busca se intensificou quando Linus Pauling enviou para seu filho em 1952, Peter Pauling, que trabalhava com Watson e Crick no mesmo laboratório, o esboço de seu artigo que sugeria que a estrutura de DNA seria tripla hélice. (COELHO et al., 2017;McGRAYNE, 1994)

Francis Crick havia trabalhado anteriormente com difração de raios X em moléculas dupla hélice e em 1951 passou a trabalhar com James Watson. Mesmo não sendo o projeto inicial dos dois pesquisadores, estes se aliaram para propor uma estrutura de DNA utilizando as informações que existiam sobre esta molécula até o momento. (FERREIRA, 2003)

Watson construiu, com o apoio de Crick, o primeiro modelo para a molécula de DNA. Por terem se baseado em informações erradas, a molécula possuía as bases nitrogenadas do lado de fora. Quando o chefe da universidade onde trabalhavam, Lawrence Bragg, tomou conhecimento desta suposição, os proibiu de continuar o projeto com o DNA, fazendo-os retornar aos seus projetos iniciais. (McGRAYNE, 1994; HAUSMANN, 2002)

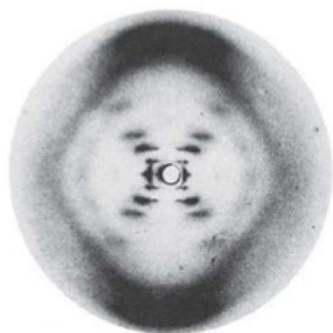
No ano de 1952, Rosalind Franklin era a única pesquisadora que mantinha como foco principal o estudo da molécula de DNA. (McGRAYNE, 1994 apud SCHEID; FERRARI; DELIZOICOV, 2003)

Com o auxílio de Maurice Wilkins, Franklin inferiu que a molécula de DNA era uma estrutura helicoidal, ao bombardear uma fita de DNA cristalizado com raios X, usando o padrão de difração de raio X. (ROBERTS, 1993, HAUSMANN, 2002)

Ainda que proibidos de retomar sua pesquisa, Watson e Crick continuaram a sua busca e se dispuseram a fazer o necessário para alcançar o objetivo de se elucidar a estrutura do DNA. Watson afirmava que seu projeto inicial era “a fachada perfeita para disfarçar seu persistente interesse no DNA” enquanto Crick dizia que “poderia ter sido proibido de trabalhar com o DNA, mas que ninguém na face da Terra poderia proibi-lo de pensar sobre ele”, o que demonstrava a mútua vontade de se

superar qualquer obstáculo para finalizar o trabalho. (FLECK, 1986 apud SCHEID; FERRARI; DELIZOICOV, 2003)

Figura 1 – Imagem de raios-X capturada por Rosalind Franklin que permitiu a confirmação da forma helicoidal do DNA.



Fonte: (WATSON et al., 2015)

Por conta de uma suposta publicação de Linus Pauling, Bragg autorizou que Watson e Crick retomassem sua pesquisa. O modelo de Linus Pauling, que supunha a estrutura α -hélice das proteínas, acabou servindo de referência para a retomada do trabalho dos dois pesquisadores. (McGRAYNE, 1994, HAUSMANN, 2002)

Watson e Crick decidiram então continuar a propor modelos para a molécula de DNA, porém, utilizando resultados de duas pesquisas: uma realizada por Erwin Chargaff e a outra por Rosalind Franklin e Maurice Wilkins, ambas citadas anteriormente. (ROBERTS, 1993, HAUSMANN, 2002).

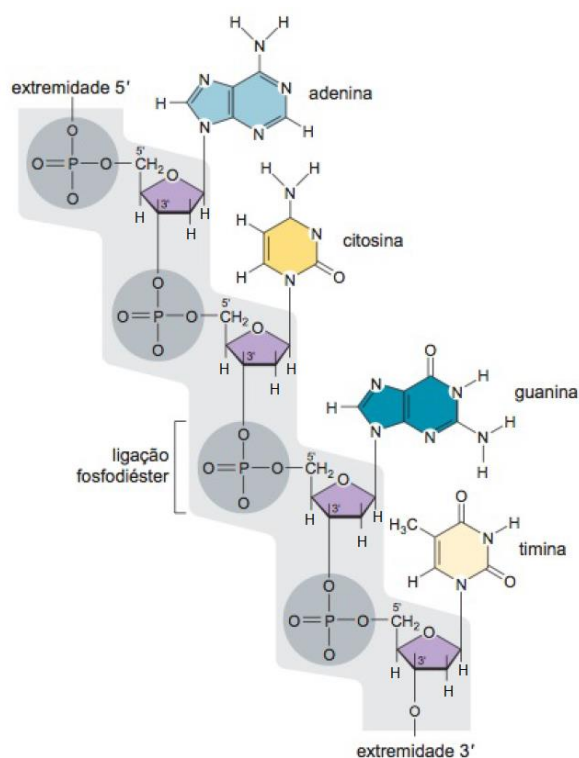
Em 25 de abril de 1953, Watson e Crick publicaram um artigo de apenas 900 palavras titulado “Estrutura molecular dos ácidos nucléicos” na revista *Nature*, que lhe renderam o Nobel de medicina em 1962. No mesmo ano, o comitê do Prêmio Nobel reconheceu a participação de Maurice Wilkins como importante membro do projeto. (SCHEID; FERRARI; DELIZOICOV, 2003)

A partir da história da descoberta da estrutura do DNA é possível concluir que os erros cometidos ao decorrer dos anos não foram um impedimento para continuar a busca pela estrutura da molécula dos seres vivos. Vemos como anos de trabalho de diversos pesquisadores foram fundamentais como material de construção do projeto que levou Watson e Crick receberem o Nobel em 1962.

1.2 Estrutura molecular dos ácidos nucléicos

Segundo Watson e Crick (1953), a estrutura do DNA apresenta duas cadeias em hélice enroladas em um eixo em comum. Cada cadeia possui grupos fosfodiéster que ligam grupos β -D-ribofuranose com terminações 3' e 5', onde as sequências dos átomos são dispostas em direções opostas. As bases nitrogenadas da estrutura de DNA encontram-se na parte de dentro da hélice e o fosfato do lado de fora. As duas cadeias são conectadas por bases de purina e pirimidina e o plano que as une à fibra é perpendicular ao eixo.

Figura 2 – Cadeira polinucleotídica de DNA, demonstrando a ligação fosfodiéster no sentido 5'→3'.

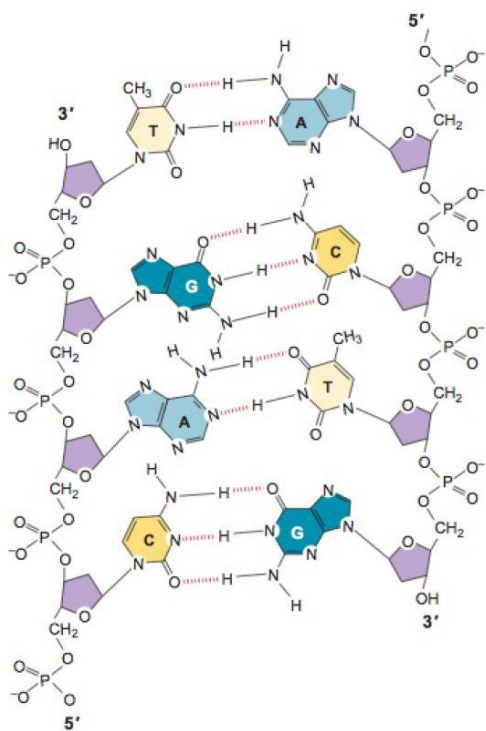


Fonte: (WATSON et al., 2015)

As bases são unidas aos pares por ligações de hidrogênio, sendo uma purina e a outra uma pirimidina. As pontes de hidrogênio se formam entre a posição 1 da purina e da posição 1 da pirimidina e entre a posição 6 da purina e 6 da pirimidina. Apenas pares específicos de purina e pirimidina podem se ligar. Os pares são:

adenina (purina) com timina (pirimidina) e guanina (purina) com citosina (pirimidina).
(WATSON; CRICK, 1953)

Figura 3 – Conexão das bases purina (azul) e pirimidina (amarelo) por meio de pontes de hidrogênio.



Fonte: (WATSON et al., 2015)

A sequência de bases em uma cadeia não é limitada e quando esta é determinada em uma das fitas, a sequência da fita complementar será determinada também.
(WATSON; CRICK, 1953)

2. OBJETIVO

Este estudo pretende reunir informações atuais sobre o emprego de moléculas de Origami de DNA guiadas por aptâmeros, que se mostraram um método inteligente de transporte *in vivo* de fármacos, proteínas ou quimioterápicos para locais específicos, inspirando o design de terapias futuras para o tratamento de cânceres diversos e outras enfermidades.

3. METODOLOGIA

A dissertação proposta é uma revisão bibliográfica descritiva, com abordagens teóricas sobre origamis de DNA, descrevendo sua estrutura e as últimas aplicações.

Foram utilizados artigos científicos sobre a temática acessados em bases de dados como Scielo, LILACS, MEDLINE e DeCS, havendo artigos publicados desde os anos 1950, usados para justificar o contexto histórico da biologia molecular e artigos dos últimos 20 anos, que fazem descrição da técnica de produção de origamis de DNA, aptâmeros e complementos.

Para a coleta de dados, seguiu-se a premissa de consulta de artigos relevantes ao assunto, leitura seletiva para o rastreio de dados pertinentes e o registro de informações extraídas destas fontes.

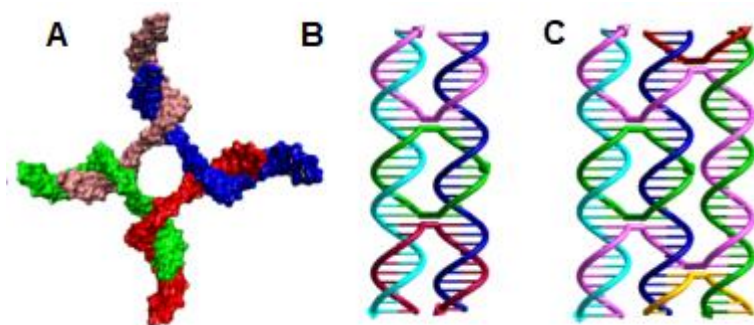
4. DESENVOLVIMENTO

4.1 A origem do Origami de DNA

Embora conhecida por codificar informações genéticas dos seres vivos, a molécula de DNA também é um excelente composto a ser manipulado. Esta estrutura foi escolhida como material para a criação de nanoestruturas dobráveis por conta de suas características que possibilitam a criação de formas geométricas únicas, como reconhecimento molecular, automontagem e por ser facilmente sintetizada. (ZADEGAN; NORTON, 2012)

A fabricação de nanoestruturas de DNA foi proposta pela primeira vez por Nadrian C. Seeman, inspirado pela Junção de Holliday, que ocorre durante a recombinação genética. Em seu artigo, Seeman aperfeiçoou as sequências de DNA de maneira que estas ficassem termodinamicamente estáveis através da inserção de junções em porções complementares às fitas de DNA a fim de formar cruzamentos entre as fitas e produziu estruturas de DNA com arranjos mais complexos e o dobro e o triplo de cruzamentos entre elas. (ZADEGAN; NORTON, 2012)

Figura 4 – Modelo proposto por Seeman: Junções ramificadas de 4 fitas de DNA (A); dobro de cruzamentos entre fitas (B); triplo de cruzamentos entre fitas(C).

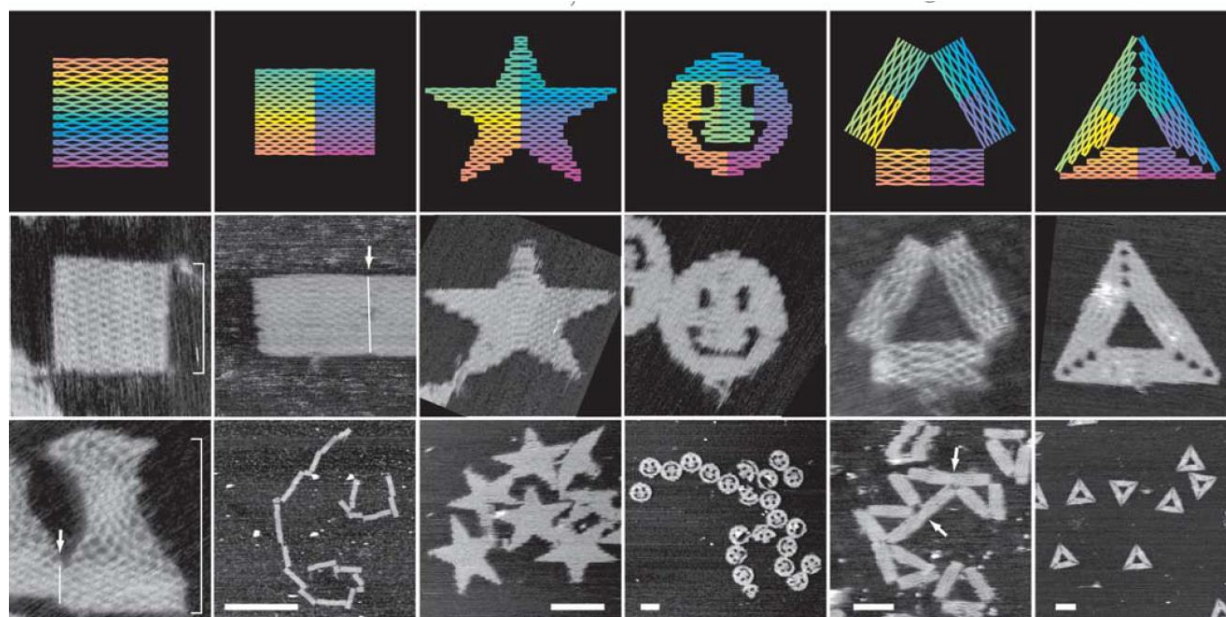


Fonte:(ZADEGAN; NORTON, 2012)

Em 2006, o professor de Ciência da Computação e Bioengenharia, Paul Rothemund, revolucionou o campo da nanotecnologia ao descrever um modo de criação de formas e padrões em nanoescala usando moléculas de DNA genômico de fita única do bacteriófago M13, dobrando-as em formas 2D utilizando “grampos”. Rothemund batizou este método de “Origami de DNA”.

Em seu artigo, Rothemund (2006) produziu seis formas diferentes utilizando fitas de DNA de aproximadamente 100 nm de diâmetro e 6 nm de resolução espacial. Entre estas formas, haviam quadrados, triângulos e estrelas com cinco pontas, demonstrando que estas moléculas podem assumir qualquer forma desejada.

Figura 5 – Diferentes formas de origamis de DNA criadas por Rothemund.

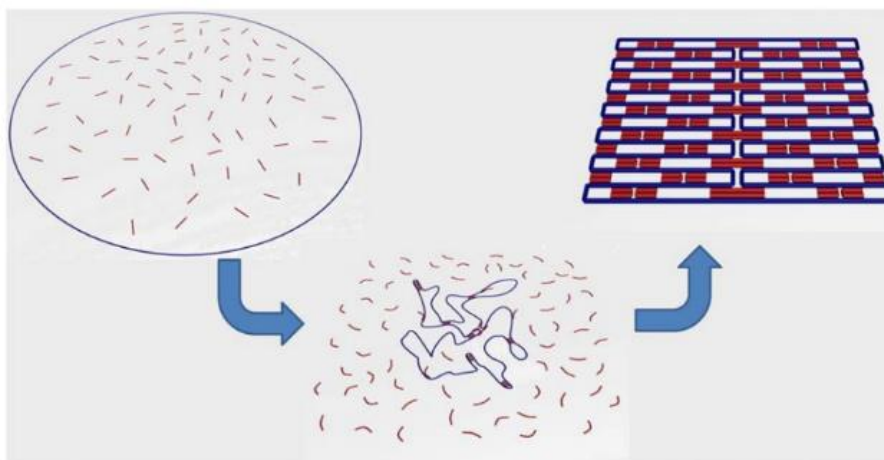


Fonte: (ROTHERMUND, 2006)

Para a criação da nanoestrutura, Rothemund (2006) utilizou o DNA circular genômico do bacteriófago M13 como o esqueleto da molécula. Junto a esta estrutura, adicionou cadeias menores e complementares ao ssDNA chamadas de “grampos” em excesso, que são fitas simples e curtas de DNA, projetadas para se ligarem em múltiplos locais da longa cadeia e fornecem suporte estrutural do origami de DNA, além de criar cruzamentos periódicos entre os dobramentos.

Uma vez que os grampos são preparados, a forma do origami de DNA desejada pode ser obtida simplesmente unindo-os com o esqueleto da estrutura em uma solução tamponada. As estruturas são aquecidas em alta concentração deste tampão, geralmente composto por ácido acético, EDTA e acetato de magnésio, a 90°C por até 10 minutos para desnaturar as fitas de DNA. São então resfriadas lentamente até alcançarem a temperatura ambiente em uma taxa de -1,0°C por minuto, utilizando um termociclador. (KUZUYA; KOMIYAMA, 2010)

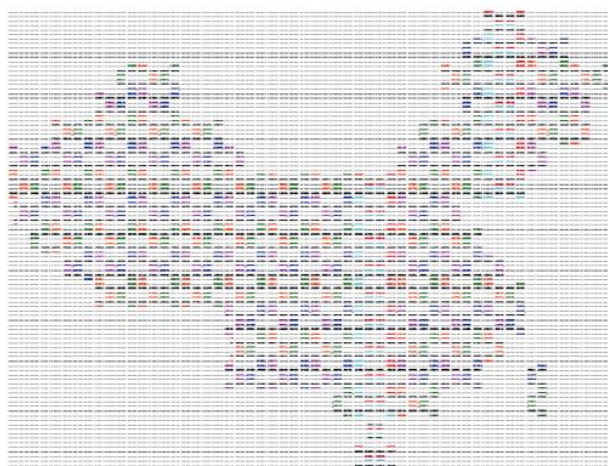
Figura 6 – Formação uma estrutura retangular bidimensional utilizando Origami de DNA.



Fonte: (NANGREAVE et al., 2010)

Após alguns meses da publicação de Rothemund, um grupo de chinês relatou a construção do mapa da China utilizando o método de origami de DNA. (QIAN et al., 2006)

Figura 7 – Design do mapa Chinês utilizando Origami de DNA. Esqueleto da estrutura representado em preto e grampos representados em diferentes cores.



Fonte: (QIAN et al., 2006)

Em 2008, o grupo Kjems lançou um software chamado Origami SARSE-DNA, que tinha como objetivo facilitar a projeção das estruturas que compunham a nanoestrutura. Este software fornecia um editor de dobramentos do esqueleto e dos grampos, atribuindo de forma automática a sequência a ser utilizada. Posteriormente, uma nova ferramenta foi lançada pelo grupo Shih, chamada CaDNAno. Em seu pacote, há três painéis: Slice, Path e Render, que permitem a escolha dos pontos na estrutura para se editar hélices, padrão de dobra dos grampos e verificar o modelo 3D em tempo real. Recentemente foi desenvolvido pelo grupo Dietz o software CanDo, uma ferramenta online gratuita e mais sofisticada, que permite a pré-visualização da estrutura do origami de DNA e fornece informações sobre as condições sob as quais este manterá sua estrutura. (ZADEGAN; NORTON, 2012; QIAN et al., 2006)

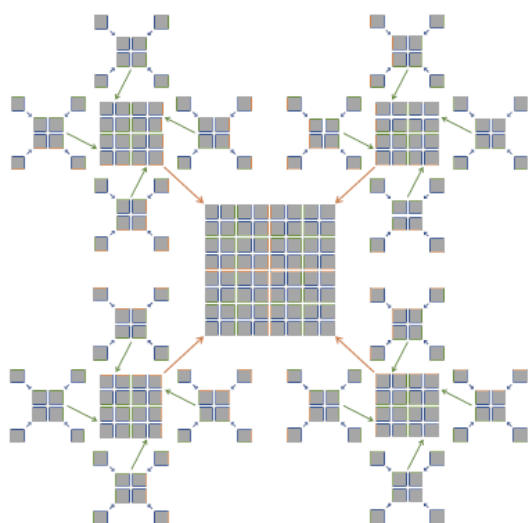
Em 2017, a equipe de Tikhomirov desenvolveu um software chamado FracTile Compiler capaz de capturar uma imagem, dividi-la em pequenas seções quadradas e determinar as sequências de DNA necessárias para se formar estes quadrados. Em seu artigo, utilizaram este software para montar um Origami de DNA que recriasse a imagem de Mona Lisa. (TIKHOMIROV; PETERSEN; QIAN, 2017)

Segundo Tikhomirov et al. (2017), Origamis de DNA são nanopartículas versáteis pois cada fita de DNA ocupa uma posição única na estrutura, funcionando como um pixel. O método se baseava em montar os quadrados em etapas, como pequenas regiões de quebra-cabeças e depois uni-las para formar o quebra cabeça completo. Cada peça era produzida em um tubo de ensaio próprio, totalizando 64 tubos com quadrados de dimensões 1x1. Desta forma, reduziria as interações falsas entre as peças iniciais, que poderiam ocorrer em qualquer etapa da montagem.

A automontagem de nanoestruturas dependia de um método com regras idênticas para cada etapa, alterando apenas suas escadas. Um dos passos que exemplifica este requisito é o anelamento de multiestágio utilizado pela equipe de Tikhomirov, onde cada estágio de montagem possuía uma temperatura de anelamento suficientemente baixa para manter as estruturas do estágio anterior estáveis e altas o suficiente para impedir interações indesejadas no estágio atual. (TIKHOMIROV; PETERSEN; QIAN, 2017)

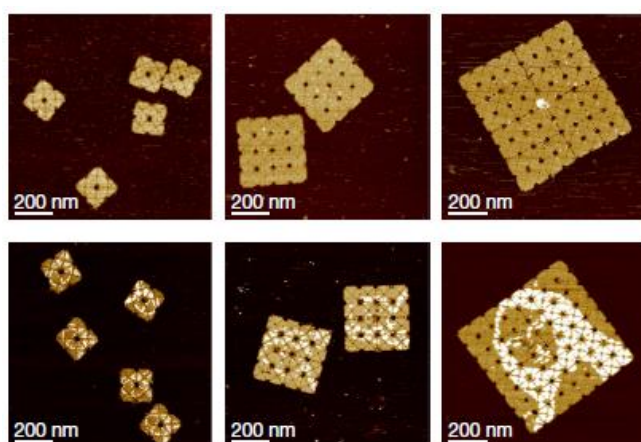
Os tubos, devidamente identificados, eram combinados de forma gradativa até que se obtivesse quatro tubos finais com dimensões de 4x4. A estrutura final possuía 64 vezes o tamanho da estrutura de Origami de DNA projetada por Rothemund em 2006 e a técnica foi chamada de “montagem fractal”. (TIKHOMIROV; PETERSEN; QIAN, 2017)

Figura 8 – Representação da técnica de montagem fractal, formando uma estrutura com dimensões 8x8 composta por Origamis de DNA.



Fonte: (TIKHOMIROV; PETERSEN; QIAN, 2017)

Figura 9 – Processo de criação da Imagem da Mona Lisa utilizando montagem fractal capturado por microscópio de força atômica.



Fonte: (TIKHOMIROV; PETERSEN; QIAN, 2017)

4.2 Aptâmeros

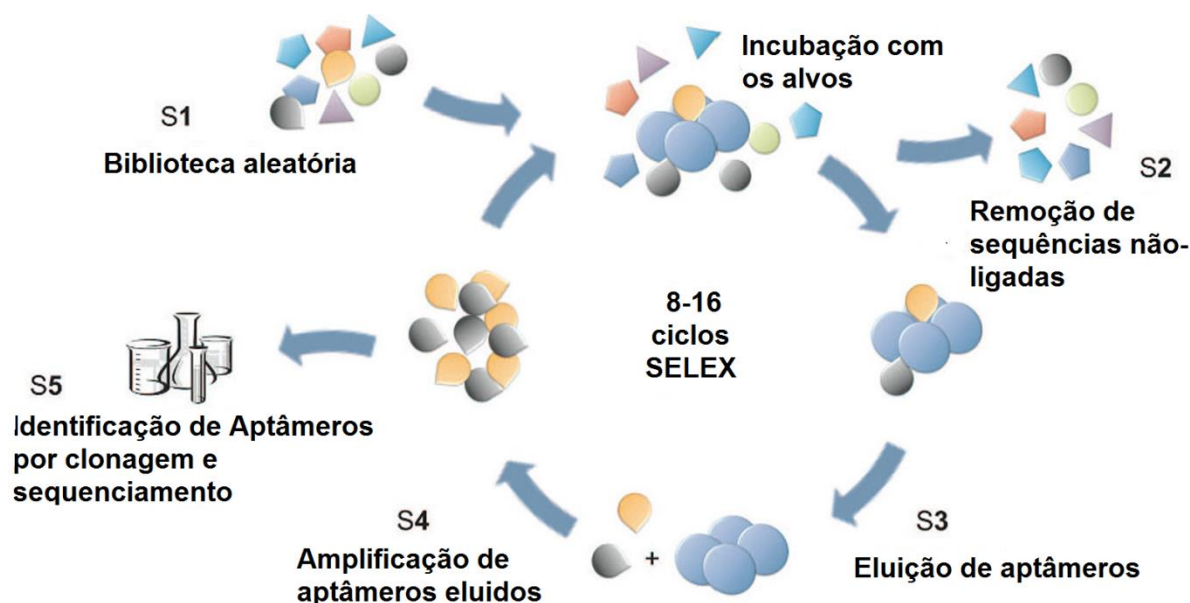
O termo aptâmero é originado da palavra latina “aptus”, que significa encaixe, e do termo de origem grega “meros”, que significa partes. Os aptâmeros são ácidos nucléicos que se dobram em uma estrutura tridimensional definida e possuem alta afinidade por uma molécula alvo específica, se ligando a ele com alta seletividade e alta especificidade. Esta habilidade é atribuída à sua estrutura que proporciona forças de ligação intermolecular com os seus alvos, como ligações de hidrogênio e forças de Van Der Waals. (GAWANDE et al., 2017; GODONOGA et al., 2016)

A maioria dos aptâmeros são formados por DNA ou RNA de cadeia simples. Estas moléculas são potencialmente adequadas para o uso em terapias farmacológicas pois fazem a liberação controlada de fármacos de maneira específica em tecidos ou células. (GAWANDE et al., 2017)

Estas moléculas colocaram em prática o antigo conceito de bala mágica, onde um determinado fármaco atinge o tecido desejado sem afetar as células saudáveis ao redor. A combinação de entrega direcionada e liberação de forma controlada são propriedades muito almejadas por aqueles que buscam tratamentos eficientes e com uma baixa dosagem do princípio ativo. Com isto, os fármacos são liberados durante um longo período de tempo e somente nas células de interesse. Desta forma, aptâmeros podem também identificar biomarcadores de células, podendo se ligar às proteínas, lipídeos, drogas e outras moléculas. (SEFAH et al., 2010)

Os aptâmeros são selecionados por meio do método denominado SELEX (Evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial) e se baseia na repetição sucessiva da ligação ao alvo e remoção de oligonucleotídeos que não se ligaram, seguindo sua eluição, amplificação e purificação dos que foram selecionados. (STOLTENBURG; REINEMANN, 2005)

Figura 10 – Etapas do método SELEX de seleção de aptâmeros.

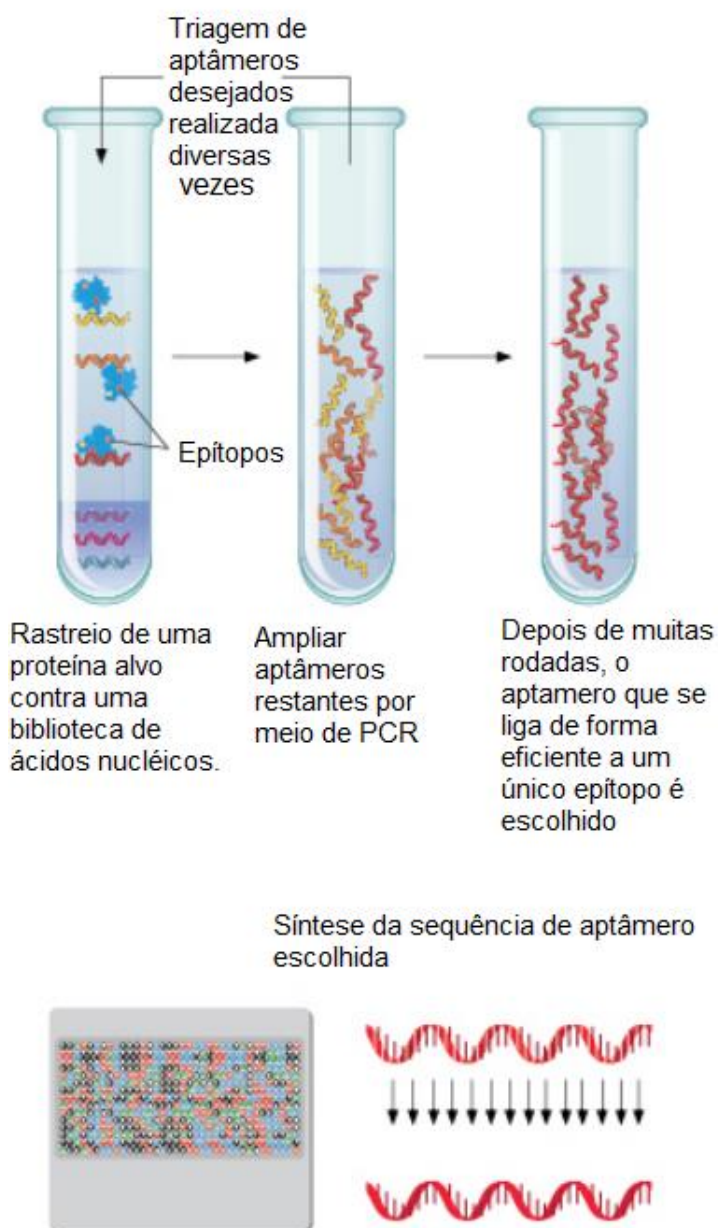


Fonte: (BLIND; BLANK, 2015)

In vitro, a seleção começa com uma biblioteca randomizada de ssDNA ou ssRNA flanqueadas com um primer fixo anelado a sítios para a amplificação enzimática. A biblioteca é incubada com o alvo molecular e os complexos aptâmero-alvo são separados de sequências que não se ligaram por métodos como o filtro de nitrocelulose, eletroforese em gel ou outros métodos. Os aptâmeros selecionados são eluídos e amplificados através do método de PCR. Este ciclo é repetido cerca de 8-16 vezes para que sejam selecionados apenas aptâmeros com alta afinidade pelo seu alvo. Os aptâmeros de interesse são então identificados através de clonagem gênica, sequenciamento de Sanger ou sequenciamento de nova geração. (BLIND; BLANK, 2015)

Geralmente são utilizados marcadores radioativos para quantificar a porção ligada e não ligada de oligonucleotídeos durante este processo. Este método é muito sensível, pois permite a detecção de baixas concentrações de DNA, porém, é necessário que seja feito dentro de um laboratório de isótopos, o que torna o método caro e prejudicial ao meio ambiente. Caso não seja viável a utilização de marcadores radioativos, pode-se utilizar a fluorescência como marcador destas partículas. (STOLTENBURG; REINEMANN, 2005)

Figura 11 – Seleção de aptâmeros e sua síntese.

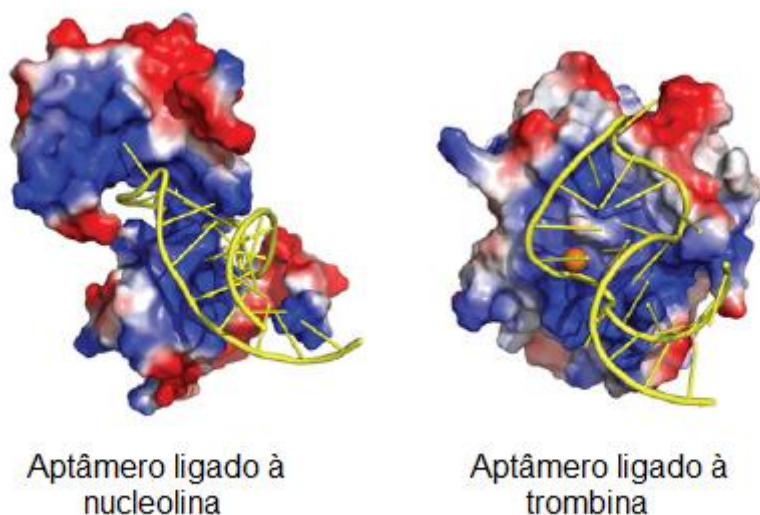


Fonte: (ANTIBODY ALTERNATIVES, 2016)

Aptâmeros possuem diversas vantagens sob os anticorpos, como a sua seleção *in vitro*, sem utilizar animais ou culturas celulares. Também possuem alta afinidade e especificidade quando comparados com os anticorpos monoclonais, porém, possuem uma menor sensibilidade e diversidade química quando comparados aos

anticorpos, que são à base de proteínas, o que diminui a sua versatilidade. (BLIND; BLANK, 2015; GAWANDE et al., 2017)

Figura 12 – Estrutura 3D de aptâmeros ligados à nucleolina e trombina.



Fonte: (PADLAN et al., 2014)

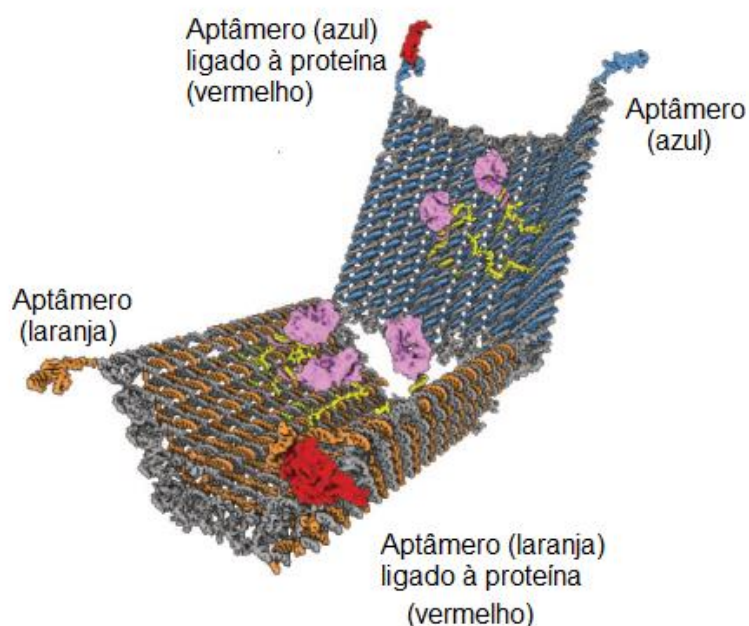
Schütze *et al.* (2011) analisaram a dinâmica de ligação de aptâmeros, rastreando sua frequência durante as etapas do processo SELEX. Foram identificados diferentes comportamentos: algumas sequências dominaram os ciclos de seleção precoce enquanto outras sequências apareceram apenas posteriormente, dominando os conjuntos que já estavam enriquecidos. Havia ainda sequências que aumentavam de forma contínua no decorrer do processo SELEX. Este experimento possibilitou a comparação individual dos aptâmeros por sua afinidade, comportamento de amplificação e competição pelos epítomos de ligação.

4.3 Origami de DNA tridimensional

Em 2009, Shawn Douglas, biofísico do Instituto Wyss de Harvard para Engenharia Inspirada em Biologia, aprimorou e expandiu o software criado pelo grupo Shih, criando então o conhecido caDNAno. Por meio deste software, Douglas e sua equipe construíram dispositivos feitos de Origami de DNA em forma de barril com 12 locais em seu interior capazes de armazenar cargas úteis e locais em seu exterior capazes de anexar aptâmeros, que agem no reconhecimento de moléculas alvo e que ativam a estrutura do Origami de DNA para que este se abra e libere a carga útil que há em seu interior. (DOUGLAS et al., 2009)

Em seu modelo, Douglas, Bachelet e Church (2012) utilizaram aptâmeros que sofrem mudanças induzidas ao se ligarem aos seus alvos: os aptâmeros são dispostos em lados opostos do nanorrobô de DNA, de forma que estes aptâmeros estejam acoplados à esta estrutura e se liguem entre si, fechando o nanorrobô. Quando estes aptâmeros reconhecem seu alvo, a ligação entre eles é dissociada e o nanorrobô sofre uma reconfiguração em sua estrutura e expõe seu interior, liberando sua carga útil.

Figura 13 – Perspectiva de um Nanorrobô de DNA aberto, expondo sua carga útil.



Fonte: (DOUGLAS; BACHELET; CHURCH, 2012)

4.4 Avanços e perspectivas

Uma das principais funções atraentes do DNA é sua biocompatibilidade, que permitiu a construção de nanopartículas que abrigam cargas terapêuticas, corantes fluorescentes, fármacos antitumorais e outras substâncias. Este controle deliberado sobre a entrada e destino de nanomoléculas estimula a criação de vias de distribuição de moléculas mais eficientes. (BUILDING NANOSCALE STRUCTURES WITH DNA, 2017)

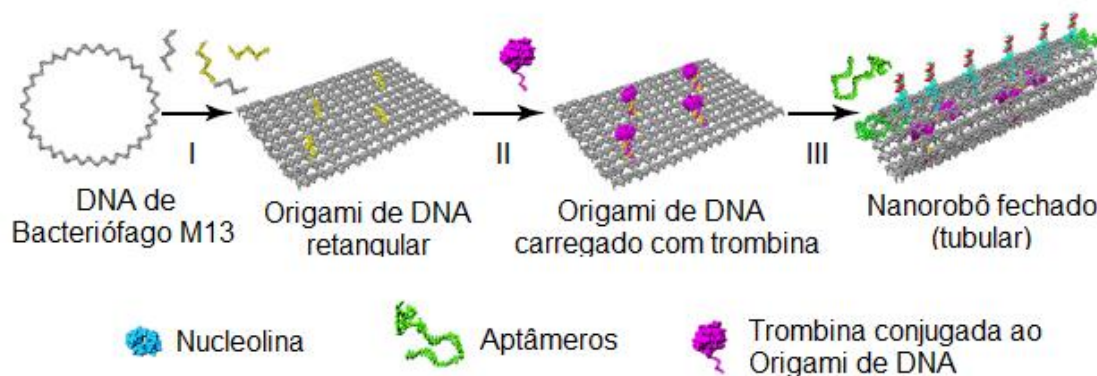
Origamis de DNA podem ser utilizados para produzir nanorobôs programáveis, capazes de responder em presença de sinais moleculares específicos. Com os avanços em biotecnologia, os aptâmeros passaram a serem utilizados em conjunto com tecnologias moleculares programáveis. Por compartilharem a mesma composição (fitas de DNA), origamis de DNA e aptâmeros podem ser facilmente vinculados, formando dispositivos capazes de detectar biomarcadores de doenças e desenvolver respostas específicas baseando-se em sua presença. (GODONOGA et al., 2016)

Aptâmeros, neste caso, servem tanto como direcionamento do origami de DNA para alvos específicos como servem também como gatilho para a abertura de sua mecânica. Desta forma, o origami de DNA pode ser programado para transportar diversas cargas de interesse para regiões específicas. (GODONOGA et al., 2016)

Em 2018, um grupo de pesquisadores em Beijing desenvolveram nanorobôs com direcionamento feito por aptâmeros. O experimento foi realizado *in vivo*, onde foi injetado intravenosamente a nanotecnologia em camundongos, com o objetivo de induzir necrose tumoral através de trombose intravascular.

O nanorobô citado por Li et al. (2018) possui um aptâmero de DNA em sua região externa que se liga à nucleolina, que é expressa em células endoteliais associadas à tumores. No interior do nanorobô citado, há trombina, que ao ser exposta no local desejado, provoca a coagulação. Este aptâmero serve tanto para o direcionamento do nanorobô como um gatilho molecular para a abertura de sua mecânica.

Figura 14 – Design e caracterização do nanorobô carregado com trombina em seu interior, sendo que I indica a configuração 2D do origami de DNA, II indica o origami de DNA carregado com trombinas em sua superfície e III o nanorobô de DNA fechado com trombinas em seu interior e aptâmeros em suas extremidades.



Fonte: (LI et al., 2018)

Segundo Li et al. (2018), os nanorobôs com direcionamento feito por aptâmeros injetados intravenosamente entregaram a trombina em vasos sanguíneos relacionados à tumores, induzindo coagulação e trombose intravascular, que resultou em necrose e inibição de crescimento do tumor. Esta estratégia de privação de nutrientes e oxigênio na região tumoral é capaz de induzir a morte celular dentro de poucas horas, sendo uma boa estratégia para o combate ao câncer, pois há pouco risco de se desenvolver resistência ao tratamento e pode ser usada para vários tipos de câncer, pois o tipo de vascularização permanece semelhante.

A trombina regula a agregação plaquetária, ativando plaquetas e converte fibrinogênio em fibrina. Esta molécula, quando administrada de forma livre, induz a coagulação de forma indiscriminada. Com o desenvolvimento de um nanorobô de DNA, foi possível proteger a molécula de trombina, de forma que esta seja exposta apenas em vasos tumorais, protegendo os tecidos saudáveis de seus efeitos. (MACHADO; SILVA; CARVALHO, 2004; LI et al., 2018)

Segundo Li et al. (2018), foi realizado um experimento *in vivo*, que analisava os nanorobôs através de fluorescência, onde foram injetadas células de câncer de mama humano nas mamas de camundongos BALB/c nude. Após o desenvolvimento de tumores de aproximadamente 10mm^3 , foram injetados os nanorobôs de DNA. Os nanorobôs se acumularam de forma progressiva no tumor, tendo ligação máxima dentro de 8 horas após a injeção. Fizeram a comparação entre nanorobôs com direcionamento feito pelos aptâmeros e nanorobôs sem este direcionamento. Foi possível observar que o nanorobô que possuía o direcionamento conseguia se ligar até sete vezes mais ao tumor quando comparado com os sem direcionamento, após 8 horas da injeção. Com isto, provaram que estes aptâmeros eram capazes de localizar células endoteliais tumorais *in vivo*.

Figura 15 – Ação de nanorobôs carregados com trombina em tumores induzidos em camundongos BALB/c nude.



Fonte: (LI et al., 2018)

Analisaram a distribuição dos nanorobôs sem direcionamento por aptâmeros após a sua injeção, e observaram que as estruturas de DNA se acumulavam no fígado, presumindo que foram fagocitados. Com o tempo, a fluorescência no fígado caía, sugerindo que estas estruturas que não foram aprisionadas pelo tumor foram degradadas. Após 24 horas, observou-se que a fluorescência que havia nos órgãos e no tumor estudado haviam caído, mostrando a eficácia na degradação do material. (LI et al., 2018)

Na segunda fase do experimento, avaliaram se o nanorobô iria expor a trombina em vasos associados à tumores. Visualizaram que, após a administração do nanorobô,

os vasos na região do tumor sofreram oclusão dentro de 24 horas. Isto foi evidenciado por meio de um anticorpo específico CD41, que se liga na superfície de plaquetas ativas. Dentro de 48 horas observou-se trombose avançada e em 72 horas, trombos densos em todos os vasos tumorais dos camundongos. Não havia trombose em camundongos onde foram administrados nanorobôs vazios, salina, nanorobôs sem direcionamento por aptâmeros e trombina livre, por até 72 horas. Observou-se após 72 horas que a trombose formada pelos nanorobôs era específica em vasos tumorais. Não se observou mudanças nos parâmetros da coagulação do sangue nos camundongos após o tratamento com nanorobôs. Provou-se também que nanorobôs são imunologicamente inertes, pois não impactaram na concentração de citocinas. (LI et al., 2018)

Figura 16 – Comparação do volume de tumores quando tratados com salina, trombina livre, nanorobô vazio, nanotubo não direcionado, nanotubo incapaz de abrir e nanorobô, respectivamente.



Fonte: (LI et al., 2018)

Desta forma, Li et al. (2018) desenvolveram um sistema para entrega inteligente de trombina *in vivo* em vasos sanguíneos associados a tumores e que se mostrou altamente eficiente na limitação sanguínea na região e inibição de crescimento tumoral, quando comparado com salina, trombina livre, nanorobô vazio, nanotubo não direcionado e nanotubo incapaz de se abrir e nanorobô. O nanorobô

se mostrou eficiente no reconhecimento de nucleolina e foi capaz de exercer mudanças conformacionais em sua estrutura que possibilitaram a exposição de trombina em vasos tumorais, mostrando-se altamente útil em possíveis tratamentos para o câncer.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desde o Nobel de Watson e Crick em 1962, a molécula de DNA se mostrou mais que uma molécula essencial para os seres vivos. Esta molécula se mostrou útil em aplicações não biológicas, desde a criação de estruturas 2D, como os “*smiles*” de DNA criados por Rothemund até uma estrutura capaz de direcionar substâncias em regiões específicas em um organismo, a fim de ter um efeito benéfico para tratamento de doenças.

Estudos sobre interações entre moléculas de DNA e sua capacidade de ser modelada de maneira desejada possibilitou o desenvolvimento do Origami de DNA, que se mostrou promissor desde sua criação em 2006. Esta nanotecnologia amadurece de forma rápida e se mostra eficiente em estudos que avaliam o seu uso no direcionamento de substâncias em alvos específicos.

A associação de aptâmeros e Origamis de DNA demonstram que estamos próximos de alcançar o conceito de bala mágica autuada por Paul Ehrlich. Avaliando os resultados obtidos por Li et al. utilizando nanorobôs guiados por aptâmeros para o controle de tumores é possível visualizar como estas moléculas foram efetivas para o controle do crescimento de tumores e que, por serem feitos por moléculas de DNA, eram facilmente degradadas pelo fígado, não deixando compostos residuais e reduzindo os efeitos colaterais.

Através dos anos é possível visualizar que diversas áreas passaram a ter interesse pela molécula de DNA, não só médicos, biólogos e biomédicos, mas também engenheiros de computação e outros.

Promissora desde sua descoberta, a molécula de DNA ainda há de ser muito estudada e manipulada, pois além de armazenar nosso código genético, servirá como grande aliada para o tratamento de diversas doenças.

6. REFERÊNCIAS

- ANTIBODY ALTERNATIVES. The Scientist, jul. 2017. Disponível em: <<https://www.the-scientist.com/features/antibody-alternatives-34125>>. Acesso em: 12 out. 2018.
- BLIND, Michael; BLANK, Michael. Aptamer Selection Technology and Recent Advances. Molecular Therapy—nucleic Acids. Munich, p. 1-7. jan. 2015.
- BUILDING NANOSCALE STRUCTURES WITH DNA. The Scientist, jul. 2017. Disponível em: <<https://www.the-scientist.com/features/building-nanoscale-structures-with-dna-31234>>. Acesso em: 12 out. 2018.
- COELHO, Augusto V et al. Histórias da Química. Curitiba: Appris Editora, 2017.
- DELIZOICOV, D. et al. Sociogênese do conhecimento e pesquisa em ensino: contribuições a partir do referencial fleckiano. Caderno Brasileiro de Ensino de Física, Florianópolis, v. 19, p. 52-69, 2002. FERREIRA, R. Watson & Crick: a história da descoberta da estrutura do DNA. São Paulo: Odysseus, 2003
- DOUGLAS, S. M.; BACHELET, I.; CHURCH, G. M.. A Logic-Gated Nanorobot for Targeted Transport of Molecular Payloads. **Science**, [s.l.], v. 335, n. 6070, p.831-834, 16 fev. 2012. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1214081>.
- DOUGLAS, Shawn M. et al. Rapid prototyping of 3D DNA-origami shapes with caDNAno. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 37, n. 15, p.5001-5006, 16 jun. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkp436>.
- FERREIRA, R. Watson & Crick: a história da descoberta da estrutura do DNA. São Paulo: Odysseus, 2003.
- FLECK, L. La génesis y el desarrollo de un hecho científico. Tradução de Luis Meana. Madrid: Alianza Editorial, 1986.
- GAWANDE, Bharat N. et al. Selection of DNA aptamers with two modified bases. Pnas, Boston, v. 11, n. 114, p.2898-2903, fev. 2017.
- GODONOGA, Maia et al. A DNA aptamer recognising a malaria protein biomarker can function as part of a DNA origami assembly. Scientific Reports, v. 6, n. 1, p.1-12, 19 fev. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep21266>.

HAUSMANN, R. História da biologia molecular. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2002.

KUZUYA, Akinori; KOMIYAMA, Makoto. DNA origami: Fold, stick, and beyond. *Nanoscale*, v. 2, n. 3, p.310-322, 2010. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b9nr00246d>.

LI, Suping et al. A DNA nanorobot functions as a cancer therapeutic in response to a molecular trigger in vivo. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 3, p.258-264, 12 fev. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.4071>.

MAYR, E. O desenvolvimento do pensamento biológico: diversidade, evolução e herança. Tradução de Ivo Martinazzo. Brasília: UnB, 1998

McGRAYNE, S. B. Mulheres que ganharam o Prêmio Nobel em Ciências. São Paulo: Marco Zero, 1994

NANGREAVE, Jeanette et al. DNA origami: a history and current perspective. *Current Opinion In Chemical Biology*, v. 14, n. 5, p.608-615, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.06.182>.

OLBY, R. The path to the Double Helix: the discovery of DNA. New York: Dover Publications, 1994

PADLAN, C. S. et al. An RNA aptamer possessing a novel monovalent cation-mediated fold inhibits lysozyme catalysis by inhibiting the binding of long natural substrates. **Rna**, [s.l.], v. 20, n. 4, p.447-461, 25 fev. 2014. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.043034.113>.

QIAN, Lulu et al. Analogic China map constructed by DNA. *Chinese Science Bulletin*, v. 51, n. 24, p.2973-2976, dez. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11434-006-2223-9>.

ROBERTS, R. M. Descobertas acidentais em ciências. São Paulo: Papirus, 1993.

ROTHEMUND, Paul W. K..Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, v. 440, n. 7082, p.297-302, mar. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04586>.

SCHEID, N. M. J., DELIZOICOV, D.; FERRARI, N. A proposição do modelo de DNA: um exemplo de como a História da Ciência pode contribuir para o ensino de genética. In: ENCONTRO NACIONAL DE PESQUISA EM EDUCAÇÃO EM CIÊNCIAS, 4, 2003, Bauru. Atas... Bauru: Associação Brasileira de Pesquisadores em Educação em Ciências, 2003. 1 CD-ROM.

SCHEID, Neusa Maria John; FERRARI, Nadir; DELIZOICOV, Demétrio. A CONSTRUÇÃO COLETIVA DO CONHECIMENTO CIENTÍFICO SOBRE A ESTRUTURA DO DNA. *Ciência & Educação*, Bauru, v. 11, n. 2, p.223-233, nov. 2003.

SCHRÖDINGER, E. O que é vida? O aspecto físico da célula viva seguido de mente e matéria e fragmentos autobiográficos. Tradução de Jesus de Paula Assis e Vera YukieKu wajima de Paula Assis. 4. ed., São Paulo: Unesp, 1997.

SCHÜTZE, Tatjana et al. Probing the SELEX Process with Next-Generation Sequencing. *Plos One*, v. 6, n. 12, p.1-10, 29 dez. 2011. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0029604>.

SEFAH, Kwame et al. Development of DNA aptamers using Cell-SELEX. *Nature Protocols*, v. 5, n. 6, p.1169-1185, jun. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2010.66>.

Stoltenburg, Regina & Reinemann, Christine & Strehlitz, Beate. (2005). FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 383. 83-91. 10.1007/s00216-005-3388-9.

TIKHOMIROV, Grigory; PETERSEN, Philip; QIAN, Lulu. Fractal assembly of micrometre-scale DNA origami arrays with arbitrary patterns. **Nature**, [s.l.], v. 552, n. 7683, p.67-71, 6 dez. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature24655>.

WATSON, J.d.; CRICK, F.h.c.. MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS. *Nature Publishing Group*, Cambridge, v. 171, n. 4856, p.737-738, abr. 1953.

WEAVER, W. Molecular biology: origins of the term. *Science*, Washington, v. 170, p. 581-582, 1970.

ZADEGAN, Reza M.; NORTON, Michael L.. Structural DNA Nanotechnology: From Design to Applications. International Journal Of Molecular Sciences, v. 13, n. 6, p.7149-7162, 11 jun. 2012. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms13067149>.