



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



RAFAELLA BEZERRA DE LIMA HENRIQUE

**INTERAÇÃO DE ESFEROIDES E MONOCAMADAS DE CÉLULAS DE CÂNCER
COM CONJUGADOS DE PONTOS QUÂNTICOS E GLICOSE**

Recife

2022

RAFAELLA BEZERRA DE LIMA HENRIQUE

**INTERAÇÃO DE ESFEROIDES E MONOCAMADAS DE CÉLULAS DE CÂNCER
COM CONJUGADOS DE PONTOS QUÂNTICOS E GLICOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas

Área de concentração: Biotecnologia e Bioinformática.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Fontes

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Euzébio Cabral Filho

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Henrique, Rafaella Bezerra de Lima

Interação de esferoides e monocamadas de células de câncer com conjugados de pontos quânticos e glicose / Rafaella Bezerra de Lima Henrique. - 2022.

71 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Fontes.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Euzébio Cabral Filho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2022.

Inclui referências.

1. Oncologia. 2. Câncer. 3. Nanotecnologia. I. Fontes, Adriana (orientadora). II. Cabral Filho, Paulo Euzébio (coorientador). III. Título.

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-075-2022

RAFAELLA BEZERRA DE LIMA HENRIQUE

**INTERAÇÃO DE ESFEROIDES E MONOCAMADAS DE CÉLULAS DE CÂNCER
COM CONJUGADOS DE PONTOS QUÂNTICOS E GLICOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 28/02/2022

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Adriana Fontes (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Cássia Regina Albuquerque da Cunha (Examinadora Externo)
Laboratório Federal de Defesa Agropecuária em Pernambuco - LFDA/PE

Dr. Wesley Félix de Oliveira (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Marluce, por todo amor, carinho, e, por sempre torcer pela minha felicidade. Agradeço também ao meu namorado, Augusto, por todo o apoio e companheirismo. Agradeço também a minha família e a família de Augusto, por sempre estarem presentes e torcendo por mim.

As minhas amigas que conheci na graduação, em especial Natália, Maria Aparecida, Élide e Danízia, que estão presentes na minha vida até hoje, e sempre proporcionaram momentos de muitas risadas e tornam os dias mais leves.

Aos meus amigos do NanoBio, em especial à Ana Livia, Rennan, Bela, Wesley, Bruno, Pedro, Sueden, pelo auxílio nos experimentos e também em palavras de incentivo em momentos difíceis.

À minha orientadora, Adriana Fontes, por toda a paciência que teve em me orientar desde o período da graduação até o mestrado. Ao meu co-orientador, Paulo Euzébio, pela dedicação e por sempre tirar um tempinho para ajudar no que precisar.

Também gostaria de fazer um agradecimento em especial para Isabela Andrade e Ana Livia, que me auxiliaram em muitos dos experimentos deste trabalho, e sem isso, estudo não seria possível. A todos eles, agradeço bastante a disponibilidade, a dedicação em ajudar a qualquer momento e a paciência.

À Universidade Federal de Pernambuco, pelos auxílios e aprendizados únicos ao longo da graduação e do mestrado. A universidade me abriu muitas portas, e sou muito grata por ter tido a oportunidade de estudar nesta universidade e poder continuar essa jornada num lugar tão acolhedor.

Às agências de fomento FACEPE e ao CNPq pelo apoio financeiro e incentivo a ciência.

RESUMO

O esferoide é um modelo biológico tridimensional que vem apresentando potencial para o estudo de interação com nanopartículas (NPs) por mimetizar o ambiente tumoral. Os pontos quânticos (PQs) são nanocristais de semicondutores que possuem emissão fluorescente fotoestável e superfície ativa para conjugação com moléculas de interesse biológico. Essas vantagens vêm transformando os PQs em nanossondas versáteis para o estudo da biologia celular do câncer. O efeito Warburg relata que as células de câncer podem apresentar uma maior captação de glicose devido ao uso da glicólise para produção energética, mesmo na presença de oxigênio. Assim, o desenvolvimento de modelos biológicos mais complexos como os esferoides e de gliconanossondas baseadas em PQs pode favorecer uma melhor compreensão dos processos biológicos envolvidos no câncer. Nesse contexto, essa dissertação objetivou desenvolver esferoides a partir da linhagem de adenocarcinoma cervical (HeLa) e estudar a interação de um novo conjugado de PQs-Glicose com esse modelo biológico e monocamadas celulares. Os esferoides foram preparados pelo método da gota suspensa, sendo testadas variações de densidade de células/mL, volume da gota e tempo de crescimento. Os esferoides foram monitorados por microscopia óptica. Os PQs de CdTe foram conjugados à glicose tiolada (GT) explorando a afinidade do grupo tiol da GT pela superfície semicondutora das NPs. Os PQs e conjugados foram caracterizados por espectroscopias de absorção e emissão. A conjugação foi avaliada por espectroscopia de correlação por fluorescência (FCS) e pela marcação citométrica de leveduras de *Candida albicans* revestidas com concanavalina A, explorando a afinidade lectina-carboidrato. O esferoide escolhido para o estudo foi o proveniente de 20.000 células/mL, gota de 30 μ L e 48 h de formação, por apresentar morfologia característica e preparação reprodutível, apresentando tamanho médio de ca. 260 μ m. Pelo FCS, o conjugado apresentou diâmetro hidrodinâmico cerca de 3,5 \times maior que os PQs, indicando que houve conjugação. O ensaio com *C. albicans* confirmou a conjugação, exibindo uma marcação de ca. 99%, reduzida em ca. 4 \times ao inibir os sítios da lectina com metil- α -D-manopiranosídeo. Uma marcação efetiva, com visualização de vesículas, foi observada nos esferoides e monocamadas por microscopia de fluorescência. Ademais, cerca de 38% das células HeLa cultivadas em monocamada captaram o conjugado em apenas 30 min de incubação. Portanto, foram desenvolvidos esferoides com características típicas e promissoras para ensaios com

NPs, bem como uma gliconanossonda fluorescente foi preparada, a qual apresentou potencial para ser aplicada em estudos biológicos associados ao câncer.

Palavras-chave: Cultivo 3D; Fluorescência; Células HeLa; Nanopartículas.

ABSTRACT

Spheroid is a three-dimensional biological model that has shown potential for the study of interaction with nanoparticles (NPs) by mimicking the tumor environment. Quantum dots (QDs) are semiconductor nanocrystals that have a photostable fluorescent emission and an active surface for conjugation with molecules of biological interest. These advantages have become QDs as versatile nanoprobe for cancer cell biology study. The Warburg effect reports that cancer cells can present a greater glucose uptake due to the use of glycolysis for energy production, even in the presence of oxygen. Thus, the development of more complex biological models such as spheroids and glyconanoprobes based on QDs may favor a better understanding of the biological processes involved in cancer. In this context, this dissertation aimed to develop spheroids from the cervical adenocarcinoma (HeLa) line and to study the interaction of a new conjugate of QDs-Glucose with this biological model and cell monolayers. The spheroids were prepared by the hanging drop method, testing variations in cell density/mL, drop volume, and growth time. The spheroids were monitored by light microscopy. CdTe QDs were conjugated to thiolated glucose (TG), exploring the affinity of the TG thiol group for the semiconductor surface of NPs. The QDs and conjugates were characterized by absorption and emission spectroscopy. The conjugation was evaluated by fluorescence correlation spectroscopy (FCS) and by cytometric labeling of *Candida albicans* yeasts coated with concanavalin A, exploring the lectin-carbohydrate affinity. The spheroid chosen for the study was formed from 20,000 cells/mL, a drop of 30 μ L, and 48 h of formation, due to its characteristic morphology and reproducible preparation; having average size of ca. 260 μ m. By FCS, the conjugate presented a hydrodynamic diameter about 3.5 \times greater than the QDs, indicating that there was conjugation. The *C. albicans* assay confirmed the conjugation, exhibiting a ca. 99%, reduced by ca. 4 \times after inhibiting the lectin sites with methyl- α -D-mannopyranoside. Effective labeling, with visualization of vesicles, was observed on spheroids and monolayers by fluorescence microscopy. Furthermore, about 38% of the HeLa cells, cultivated as a monolayer, internalized the conjugate after only 30 min of incubation only. Therefore, spheroids with typical and promising characteristics for assays with NPs were developed; and a fluorescent glyconanoprobe was prepared, which showed potential to be applied in biological studies associated with cancer.

Keywords: 3D culture; Fluorescence; HeLa cells; Nanoparticles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DA FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

- Figura 1 – A representação esquemática mostra a divisão do esferoide em regiões. Na região mais externa estão as células proliferativas. Em seguida tem uma região marcada por células quiescentes. Na região interna estão localizadas as células necróticas. A concentração de nutrientes e oxigênio (O_2) é maior na região mais externa (verde), e restos celulares e dióxido de carbono (CO_2) são encontrados em maior concentração na região central do esferoide (vermelho). O esferoide pode ser formado por uma única linhagem celular ou por uma co-cultura que inclui combinações de câncer e linhagens celulares normais, como fibroblastos. 20
- Figura 2 – Esquema ilustrativo da formação de um éxciton e posterior recombinação excitônica em um material semiconductor, h^+ representa o buraco gerado na banda de valência pela excitação do elétron e^- , $h\nu$ a energia de um fóton excitando o material semiconductor, h é a constante de Planck e ν é a frequência da luz. 26
- Figura 3 – Os pontos quânticos e o confinamento quântico: aparecimento de níveis discretos de energia e também há aumento do *bandgap* (E_g) com a redução do tamanho da nanopartícula. Representação para PQs de CdTe. BV = banda de valência e BC = banda de condução 27
- Figura 4 – Ilustração de espectros de absorção (em A) e emissão (em B) de PQs e corantes orgânicos. Os PQs podem ser excitados em vários comprimentos de onda, já os corantes convencionais necessitam de excitação em um comprimento de onda específico. 28
- Figura 5 – Resistência à fotodegradação dos PQs. Na primeira linha, vemos os antígenos nucleares marcados por PQs, em vermelho, e permanecendo fluorescentes ao longo do tempo, enquanto os os microtúbulos marcados pelo corante orgânico AlexaFluor, em verde, sofreram fotodegradação partir de 120 s. Na segunda linha, ocorre a inversão da coloração, os microtúbulos foram corados com PQs, em vermelho, e permanecem fluorescentes ao longo do tempo, enquanto os antígenos nucleares foram corados com o AlexaFluor, em verde e também sofreram fotodegradação a partir de 120 s. 29
- Figura 6 – A camada de passivação nos pontos quânticos (PQs) compostos por núcleo/casca, ou *core/shell*, otimiza a intensidade de fluorescência, com um estreitamento da largura à meia altura do espectro (FWHM). Quando a camada está ausente, os elétrons podem ocupar “armadilhas”, favorecendo outros decaimentos radiativos não excitônicos, interferindo, assim, na qualidade da fluorescência (intensidade e largura espectral). À direita, encontram-se ilustrações de espectros de emissão (linha preta contínua) e absorção (linha cinza pontilhada) exemplificando cada situação. 30

- Figura 7 – Esquema de um ponto quântico funcionalizado quimicamente como marcador fluorescente. 31
- Figura 8 – Representação da glicólise em uma célula normal e em uma célula de câncer. 35
À esquerda, a glicólise ocorre devido ao processo de hipóxia, e forma lactato e ATP em quantidades normais. À direita, a via de glicólise aeróbica ocorre e é usada em excesso, então acontece uma maior captação de glicose e produção de lactato, que fica armazenado no espaço extracelular do tumor, tal processo é chamado de efeito Warburg. ATP: trifosfato de adenosina.
- Figura 9 – Representação ilustrativa de transportadores da família GLUT e possíveis alterações em células de câncer epitelial, como: superexpressão dos GLUT-1 e GLUT-3, e surgimento de novos (GLUT-4 e GLUT-12). 37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^{18}F -FDG	Conjugado de 2-deoxi-D-glicose com ^{18}F radioativo
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
A549	Células de câncer de pulmão
AF	Ácido fólico
AMS	Ácido mercaptosuccínico
ATP	Trifosfato de adenosina
BC	Banda de condução
<i>Bulk</i>	Semicondutor macroscópico
BV	Banda de valência
CdSe	Seleneto de cádmio
CdTe	Telureto de cádmio
CO ₂	Dióxido de carbono
Con A	Concanavalina A
d	Diâmetro
D-GN	D-glicosamina
DLS	Espalhamento dinâmico da luz
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DRC	Sítio de reconhecimento de carboidratos
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EFM	Ensaio fluorescente em microplaca
Eg	<i>Bandgap</i>
EMT6	Células de câncer de glândula mamária murina
FBS	Soro fetal bovino
FCS	Espectroscopia de correlação de fluorescência
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
FWHM	Largura à meia altura

GLUTs	Transportadores de glicose
GT	1-Tiol- β -D-glicose
HeLa	Linhagem de câncer cervical
iRGD	Peptídeo RGD internalizante
KDa	Quilodaltons
MEC	Matriz extracelular
MCF-7	Câncer de mama humano
MCTS	Esferoides de tumores multicelulares
MTT	Ensaio colorimétrico
NaBH ₄	Borohidreto de sódio
NHS	<i>N</i> -Hidroxisuccinimida
NIR	<i>Near Infrared</i>
NOS-1	Células de câncer osteoblásticas
NP	Nanop�rticula
O ₂	Oxig�nio
OMS	Organiza�o Mundial da Saúde
OVCAR-3	Células de câncer de ovário
PBS	Tampão fosfato salino
PET	Tomografia por emissão de p�sitr�n
PQs	Pontos quânticos
T	Temperatura
TA	Temperatura ambiente
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

a_B	Raio de Bohr do semiconductor
k_B	Constante de Boltzmann
R	Raio hidrodinâmico
η	Viscosidade da água
τ_D	Tempo de difusão
ω_x	Raio lareral do volume focal
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICO	18
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1	ESFEROIDES: FUNDAMENTOS E INTERAÇÃO COM NPS INORGÂNICAS	19
3.2	PONTOS QUÂNTICOS	25
3.2.1	Fundamentos	25
3.2.2	Bioconjugação	31
3.3	Glicose no Câncer	33
3.4	Gliconanopartículas Baseadas em Pontos Quânticos e Glicose	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	ARTIGO EM PREPARAÇÃO	39
5	CONCLUSÃO	63
6	SÚMULA CURRICULAR	64
	REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

O câncer, assim como muitas doenças, é multifatorial e complexo. Embora grandes avanços tenham sido feitos no tratamento do câncer, nas últimas décadas, a recorrência e a metástase continuam sendo as principais causas de mortalidade de pacientes com essa doença (FAN et al., 2018; XU et al., 2018). Portanto, é importante o desenvolvimento de métodos de diagnóstico ainda mais sensíveis e específicos, bem como terapias direcionadas mais efetivas, para assim, aumentar o percentual de cura dos pacientes. Dessa forma, cada vez mais procura-se por técnicas e metodologias que ajudem a melhor estudar, detectar, diferenciar e compreender os diferentes mecanismos biológicos envolvidos nessa doença (ETRYCH et al., 2016).

Em geral, para os estudos de biologia celular e terapia relacionados ao câncer, a cultura bidimensional de células (2D), também conhecida como monocamada, é o modelo biológico mais utilizado. Porém, devido à complexidade e heterogeneidade dos tumores, o modelo de cultura em monocamada é limitado em mimetizar esse microambiente (JAMIESON; HARRISONB; CAMPBELL, 2019). Dessa forma, novos modelos biológicos *in vitro*, que melhor retratem a arquitetura dos tecidos *in vivo*, vêm sendo propostos, e foi esse contexto que levou ao desenvolvimento dos esferoides que são microestruturas celulares tridimensionais (3D). Os esferoides vêm demonstrando ser fisiologicamente mais representativos em vários estudos de mecanismos biológicos desde ensaios de toxicidade, expressão gênica e biologia celular do câncer (ELJE et al., 2020; YAMAWAKI et al., 2021), até pesquisas relacionadas ao desenvolvimento e a triagem de novas terapias antitumorais (JAIN et al., 2020).

A complexidade dos esferoides vem do fato de serem estruturas compostas de células com diferentes fenótipos, tais como células proliferativas, não proliferativas e necróticas, sendo então um modelo que apresenta maior semelhança à estrutura de tumores humanos *in vivo* (JAROCKYTE et al., 2017).

Em relação aos estudos de biologia do câncer, para a compreensão da interação entre biomoléculas em nível molecular e celular, bem como em organismos inteiros, se faz relevante não só o desenvolvimento de modelos de cultivo de células mais representativos, como os esferoides, mas também de ferramentas que permitam o monitoramento de diferentes eventos biológicos (ETRYCH et al., 2016). Sendo assim, as técnicas baseadas em fluorescência têm se sobressaído na avaliação de

eventos biológicos com elevada sensibilidade e especificidade bioquímica, através do uso de marcadores fluorescentes (SU et al., 2020; KALKAL et al., 2020).

Os pontos quânticos (PQs) constituem uma classe de marcadores fluorescentes que vêm recebendo considerável destaque nas Ciências da Vida. Os PQs são nanocristais de semicondutores, com tamanhos tipicamente entre 2 a 10 nm, que possuem propriedades físico-químicas singulares, apresentando intensa fluorescência sintonizável com o tamanho, excepcional resistência à fotodegradação e superfície ativa para a conjugação com uma variedade de moléculas, como por exemplo, lectinas, transferrina e ácido fólico, outras nanopartículas (NPs) e também superfícies (PEREIRA et al., 2019, CABRAL FILHO et al., 2016; KADIAN et al., 2020; DA SILVA et al., 2021). Os PQs vêm sendo explorados com sucesso no estudo da biologia celular do câncer utilizando células cultivadas em monocamadas, permitindo, por exemplo, estudar a expressão e internalização de receptores, e até mesmo sendo base para o desenvolvimento de nanossistemas multifuncionais com sinais ópticos e magnéticos (PEREIRA et al., 2019; CABRAL FILHO et al., 2018).

Dentre as moléculas de baixo peso molecular, a glicose é de particular interesse para o estudo do câncer e sua terapêutica e diagnóstico. Otto Warburg observou que as células de câncer podem apresentar uma maior captação da glicose (efeito Warburg), devido ao uso da glicólise aeróbica para produzir energia, contrastando com o que ocorre nas células saudáveis (FADAKA et al., 2017; MULLAPUDI et al., 2020). O efeito Warburg vem sendo explorado na tomografia por emissão de pósitron (PET), combinando um ^{18}F radioativo (^{18}F -FDG) com um análogo de glicose, a 2-deoxi-D-glicose. O ^{18}F -FDG é mais absorvido pelos tecidos tumorais, em relação aos saudáveis, e vem favorecendo um diagnóstico, estadiamento e monitoramento da terapia tumoral (GALLAMINI; ZWARTHOD; BORRA, 2014; REITER et al., 2020).

O diferencial metabolismo da glicose em células de câncer e a versatilidade dos PQs vêm estimulando o desenvolvimento de gliconanossondas baseadas nessas nanoestruturas e análogos de glicose para estudos da biologia do câncer (PEREIRA et al., 2022; GE et al., 2019). Há ainda, no entanto, muito o que se compreender sobre a relação da glicose com o câncer, uma vez que a captação desse carboidrato pode, por exemplo, depender (i) do tipo de análogo da glicose, (ii) da linhagem tumoral e (iii) até mesmo da atuação diferencial de diferentes transportadores de glicose (GLUTs),

que podem estar aumentados com relação ao número bem como tipo em células de câncer a fim de suprir a maior demanda por carboidratos (BARRON et al., 2016; KE et al., 2021; PAJAK et al., 2019). Assim, o desenvolvimento de novas nanossondas baseadas em PQs pode gerar interessantes ferramentas para ajudar a desvendar essa complexa interação das células de câncer com análogos de glicose, desde modelos mais simples a mais elaborados, tais como nos esferoides (KOHNHORST et al., 2017; KOLENC; QUINN, 2019).

Assim, esta dissertação apresenta não só o desenvolvimento de uma nova gliconanossonda fluorescente baseada em PQs e 1-Tiol- β -D-glicose, explorando a afinidade do tiol com a superfície semicondutora, como também a preparação de esferoides a partir de células de adenocarcinoma cervical (HeLa) e o estudo do perfil de marcação e captação desses conjugados em modelos de cultura em 2D e 3D. Esta dissertação traz também um manuscrito de revisão sobre fundamentos dos esferoides, seus métodos de preparação e suas aplicações em estudos envolvendo NPs inorgânicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver esferoides a partir da linhagem HeLa e estudar a interação de pontos quânticos (PQs) conjugados à glicose tiolada com esse modelo biológico tridimensional e monocamadas celulares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver esferoides a partir da linhagem imortalizada HeLa, monitorando sua formação por microscopia óptica;
- Sintetizar e caracterizar opticamente PQs de telureto de cádmio (CdTe);
- Desenvolver conjugados baseados em PQs e glicose tiolada (PQs-GT) e caracterizá-los opticamente;
- Avaliar a eficiência e a especificidade da conjugação desenvolvida;
- Estudar o perfil de interação dos PQs-GT com monocamadas celulares e esferoides por técnicas fluorescentes.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

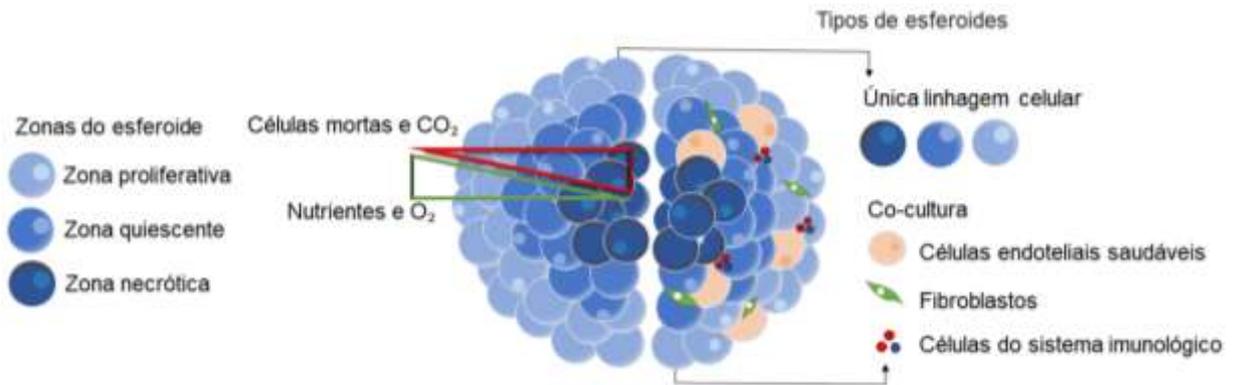
3.1 ESFEROIDES: FUNDAMENTOS E INTERAÇÃO COM NPS INORGÂNICAS

A cultura celular bidimensional (2D) é o modelo mais amplamente utilizado e bem estabelecido para estudar a biologia celular do câncer e prospectar novas terapias (CALEFFI et al., 2021). No entanto, é um modelo limitado em mimetizar a heterogeneidade e complexidade de sistemas biológicos *in vivo*, como tumores (FOGLIETTA et al., 2020). O câncer é uma doença multifatorial e de elevada complexidade que demanda o desenvolvimento de métodos de diagnóstico precoce e terapias direcionadas para aumentar o percentual de cura dos pacientes. Assim, há uma necessidade crescente de técnicas e metodologias que possam ajudar a melhor detectar, diferenciar e compreender os vários mecanismos envolvidos com esta doença (ETRYCH et al., 2016; MARTINELLI et al., 2019).

Os tumores sólidos não são uma massa indiferenciada de células. Eles têm regiões necróticas, áreas com células em estado quiescente (crescimento lento ou não) e regiões onde as células proliferam rapidamente. Assim, novos modelos biológicos *in vitro*, que melhor representam a arquitetura tecidual *in vivo*, têm sido propostos, levando ao desenvolvimento dos chamados esferoides de tumores multicelulares (MCTS), ou apenas esferoides, um tipo de cultura celular tridimensional (3D) (HAMILTON et al., 1998).

O esferoide possui três zonas distintas, divididas didaticamente em termos de disponibilidade de oxigênio e nutrientes, que são: (i) zona necrótica (área mais central), (ii) zona hipóxica ou quiescente (área intermediária) e (iii) zona proliferativa (área mais periférica), como mostrado na Figura 1. A disponibilidade de oxigênio e nutrientes aumenta da zona de necrose para a zona de proliferação. A falta de oxigênio e nutrientes leva à morte celular na zona necrótica. Por outro lado, essa falta de oxigênio e nutrientes na zona hipóxica ou quiescente é importante, pois estimula a produção de fatores de crescimento pelas células, que podem estimular a angiogênese (BARISAM et al., 2018; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 1 - A representação esquemática mostra a divisão do esferoide em regiões. Na região mais externa estão as células proliferativas. Em seguida tem uma região marcada por células quiescentes. Na região interna estão localizadas as células necróticas. A concentração de nutrientes e oxigênio (O_2) é maior na região mais externa (verde), e restos celulares e dióxido de carbono (CO_2) são encontrados em maior concentração na região central do esferoide (vermelho). O esferoide pode ser formado por uma única linhagem celular ou por uma co-cultura que inclui combinações de câncer e linhagens celulares normais, como fibroblastos.



Fonte: A autora (2022).

Além dos esferoides terem uma estrutura que imita melhor os tumores *in vivo*, eles também têm propriedades adicionais interessantes. Esferoides, por exemplo, têm maior estabilidade e longevidade de cultivo mais longa; podendo ser cultivados por até 3 semanas (DAI et al., 2016). Assim, este modelo é útil para determinar os efeitos a longo prazo de diferentes compostos nas respostas celulares. Além disso, o tempo de crescimento dos esferoides varia de acordo com o tipo de célula e as condições de cultivo, pois nem todos os métodos de formação de esferoides permitem a adição diária de nutrientes. Zanoni et al. (2016) denominaram o intervalo de tempo para o processo de formação como “tempo de esferoidização” (ZANONI et al., 2016). Observou-se que em geral os esferoides inicialmente crescem rápido, mas o crescimento é reduzido após incubação prolongada.

A presença de diferentes zonas, semelhantes ao tecido canceroso *in vivo*, é uma vantagem interessante dos esferoides sobre o modelo de cultura de células 2D. Além disso, essa microestrutura 3D favorece a expressão de componentes da matriz extracelular (MEC), bem como as interações entre célula-célula e célula-matriz (JAMIESON; HARRISON; CAMPBELL, 2015; DURYMANOV et al., 2019). Os esferoides foram considerados fisiologicamente mais representativos em vários estudos sobre mecanismos biológicos, ensaios de toxicidade, expressão gênica e

biologia de células cancerígenas, por exemplo (RYU; LEE; PARK, 2019; YAMAWAKI et al., 2021).

Outra propriedade interessante é que o tamanho dos esferoides pode variar de acordo com o número de células que são oferecidas. Existem, no entanto, na literatura tamanhos de esferoides mais apropriados para alguns tipos de estudos. Esferoides muito pequenos ($< 100 \mu\text{m}$) não possuem a complexidade dos tumores *in vivo* e a definição das zonas, por isso geralmente não são utilizados. Esferoides de cerca de $100 - 500 \mu\text{m}$ são ideais para estudos envolvendo troca de oxigênio, nutrientes, toxicidade e interação com NP. Enquanto esferoides maiores ($> 500 \mu\text{m}$) têm uma difusão limitada de oxigênio e nutrientes, e por esta razão, eles têm uma zona necrótica pronunciada, que não é tão confiável para mimetizar tecidos *in vivo* (ASTHANA; KISAALIT, 2012; IVANOV et al., 2014). Além disso, as células presentes nos esferoides podem secretar componentes da MEC, incluindo colágeno I, fibronectina e ácido hialurônico, o que pode trazer sofisticação a esse modelo biológico (JAMIESON; HARRISONB; CAMPBELL, 2019). Em particular, o colágeno I medeia a invasão e a quimiorresistência, enquanto a fibronectina contribui para a proliferação, sobrevivência e metástase celular, e o ácido hialurônico está envolvido no aumento da proliferação e migração de células cancerígenas (DUAN et al., 2014; TOPALOVSKI, BREKKEN, 2016; SATO et al., 2016). A principal fonte de MEC são fibroblastos associados ao câncer, portanto, modelos de co-cultura com esta linhagem de células resultam em esferoides ricos em componentes de MEC, mas esferoides com células tumorais únicas também são capazes de produzir constituintes de MEC (HAMILTON et al., 1998; NEUWIRT et al., 2020).

Dentre os sistemas 3D existentes, o MCTS apresenta-se como o modelo organotípico de câncer mais promissor. Pode ser preparado a partir de células tumorais isoladas ou em combinação com outros tipos de células (Figura 1), que são chamadas de co-cultura (BAAL et al., 2019). As técnicas de co-cultura são diversas e incluem combinações de linhagem cancerosa com células endoteliais normais, fibroblastos, bem como células do sistema imunológico, que permitem simular cada vez mais uma maior interação estroma-parênquima (FEDER-MENGUS, et al., 2018; LIU et al., 2020). Além disso, dependendo da linhagem celular utilizada, os esferoides podem ser mais frouxos ou mais compactos, isso porque algumas linhagens apresentam maior adesão célula-célula do que outras, isso foi observado, por

exemplo, no estudo de Jarockyte et al. (2018), no qual relataram que os esferoides da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 tinham uma morfologia mais compacta, enquanto os esferoides da linhagem de câncer de mama MCF-7 eram mais frouxos, mesmo quando ambos cultivados nas mesmas condições (Jarockyte et al., 2018).

Existem vários métodos para a formação de esferoides. Em geral, o tipo de preparação escolhido depende da linhagem celular, do objetivo do estudo e da necessidade de produção em larga escala (QUARTA et al., 2021). Os principais métodos usados para a preparação de esferoides são método da gota suspensa, matriz hidrogel, levitação magnética, sobreposição líquida, frasco giratório e baseado em chip microfluídico (ACHILLI, MEYER, MORGAN, 2012).

Dentre os métodos citados, o método da gota suspensa destaca-se por ser um método simples, efetivo e rápido. Tal técnica começa a partir de um cultivo de células em monocamada, no qual a suspensão celular é distribuída na forma de gotas no fundo da tampa de uma placa (que pode ser uma placa de Petri ou placa de 96 poços, por exemplo). Em seguida, o sistema é invertido, fazendo com que as gotas fiquem suspensas, e devido à ação simultânea da tensão superficial e da força gravitacional, células vão se agregar espontaneamente, formando esferoides. A placa de Petri, por exemplo, deve conter uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) no fundo do suporte para evitar a desidratação das gotículas (RYU; LEE; PARK, 2019; JØRGENSEN et al., 2014). No caso da placa de 96 poços, que geralmente é comercial e não aderente, as gotas são adicionadas aos poços, e a placa é invertida, suspendendo-as (JAROCKYTE et al., 2018). É possível modificar o tamanho do esferoide ajustando o volume da gota, a densidade da suspensão celular (células/mL) e o número de dias de cultivo.

Além da possibilidade de ajustar o tamanho do esferoide, este método apresenta outras vantagens, como baixo custo (exceto algumas placas comerciais de 96 poços), consumo reduzido de reagentes e reprodutibilidade de quase 100% para várias linhagens celulares (FOTY et al., 2011; KELM et al., 2003). Esse método, no entanto, também apresenta algumas desvantagens, como; (i) pode ocorrer evaporação rápida do meio de cultura, no caso de utilização da placa de Petri, por exemplo; e (ii) qualquer choque mecânico durante a manipulação pode quebrar os esferoides. Portanto, é um método limitado para a troca do meio de cultura, devido à dificuldade de aspirar o meio sem perturbar o esferoide (BRESLIN, O'DRISCOLL,

2013; HOWES, et al., 2014). Além disso, alguns estudos, como o de Achilli et al. (2012), relataram que este método não é adequado para produção em larga escala de esferoides, pois exigiria uma alta demanda do operador (ACHILLI et al., 2012). No entanto, Bartosh e Ylostalo (2014) afirmam que é possível produzir um grande número de esferoides usando pipetagem multicanal (BARTOSH, YLOSTALO, 2014).

Devido ao gradativo aperfeiçoamento das técnicas de produção de esferoides, tem-se observado um crescente interesse por este modelo pelo campo da nanobiotecnologia. Este sistema biológico tem sido considerado eficaz em fornecer informações sobre o comportamento biológico e interação de nanopartículas (NPs) sem o uso de modelos animais (LU, STENZEL, 2018). Dentre os nanomateriais, as NPs inorgânicas têm sido cada vez mais utilizadas em aplicações biomédicas. Essas NPs podem ser ferramentas valiosas para diagnóstico, terapia e compreensão de processos biológicos. A funcionalização das NPs com biomoléculas, por exemplo, pode torná-las mais específicas para serem utilizadas em estudos no câncer, tanto no diagnóstico como também para a administração de agentes terapêuticos (YANG et al., 2021). As NPs inorgânicas vêm se destacando por suas propriedades físico-químicas que podem ser ajustadas para potencializar sua aplicação (MCNAMARA, TOFAIL, AM, 2017).

Além disso, a forma, o tamanho, a carga superficial e a composição das NPs inorgânicas podem ser controladas e adaptadas durante sua síntese (NIKZAMIR, AKBARZADEH, PANAHI, 2021). Portanto, o uso de modelos celulares mais complexos, como esferoides, pode auxiliar no estudo do perfil de penetração dessas nanoestruturas em tumores, auxiliar na otimização de seu desempenho biológico e favorecer avanços mais rápidos nessa área.

A fluorescência vem também se mostrando uma ferramenta poderosa para mapear eventos biológicos em tempo real com alta resolução espacial (CAPONETTI et al., 2019). Assim, devido às singulares propriedades ópticas e físico-químicas dos nanocristais fluorescentes de semicondutores, também chamados de pontos quânticos (PQs) ou *quantum dots* (QDs), estudos associados à interação dessas NPs fluorescentes com esferoides também vêm sendo propostos (PEREIRA et al., 2019; JAROCKYTE et al., 2017).

Jarockyte et al. (2017) estudaram o acúmulo e distribuição de PQs de Seleneto de Cádmio passivados com Sulfeto de Zinco (CdSe/ZnS) em esferoides celulares das

linhagens de MCF-7 e de MDA-MB-231. Foi observado que os PQs de CdSe/ZnS não interferiram na formação de esferoide. Após 24 h de incubação dos PQs com o esferoide, os autores observaram uma penetração limitada dessas NPs de acordo com o tamanho do esferoide. Em esferoides maiores e mais frouxos (800 μm) ocorreu penetração de mais PQs até o núcleo. Já em esferoides menores e mais compactos (150 μm), os PQs foram encontrados somente na periferia. O estudo sugeriu um tamanho ideal para o esferoide de 150 μm para estudos de penetração com PQs.

Em outro estudo, Mangeolle et al. (2019) sintetizaram PQs de CdSe/CdS/ZnS e os conjugaram com ácido fólico (AF), para avaliar a citotoxicidade e captação em esferoides de duas linhagens de células tumorais. Os PQs foram funcionalizados com amina e conjugados ao AF, obtendo-se os conjugados PQs-FA desejados. A citotoxicidade dos PQs sozinhos e dos PQs-AF foi avaliada em monocamadas de células de câncer oral (KB) e carcinoma de pulmão (A459) usando ensaios colorimétricos (MTT), após 24 h de incubação. Os resultados mostraram que ambos os sistemas não alteraram a atividade metabólica das células KB e A549. As linhagens celulares foram selecionadas devido à superexpressão de receptores de folato nas células KB, enquanto as células A549 não possuem receptores de folato, servindo como controle negativo. Portanto, os esferoides foram preparados apenas a partir de células KB, com um diâmetro em torno de 500 μm . As células nos modelos 2D e 3D foram incubadas com PQs, com ou sem AF (ambos por 4 h), e analisadas por microscopia de fluorescência. Foi observado um aumento na captação dos nanossistemas PQs-AF pelas células quando comparados aos PQs sozinhos, indicando que essa internalização foi específica via receptores de AF. O perfil de penetração, no entanto, foi semelhante para ambos os sistemas, mostrando que PQs sozinhos e conjugados PQs-AF foram acumulados na zona mais externa dos esferoides, com profundidades de até 100 μm .

Esses estudos sugerem que o esferoide é um interessante modelo capaz de mimetizar o microambiente tumoral e os PQs se mostraram como uma interessante ferramenta fluorescente para estudar o perfil de interação de NPs com tumores *in vitro*. Dessa forma, é relevante que mais estudos envolvendo esferoides e PQs sejam desenvolvidos para um maior entendimento sobre esse modelo de cultura 3D, bem como para auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na biologia celular do câncer, de maneira mais fidedigna e completa.

3.2 PONTOS QUÂNTICOS

3.2.1 Fundamentos

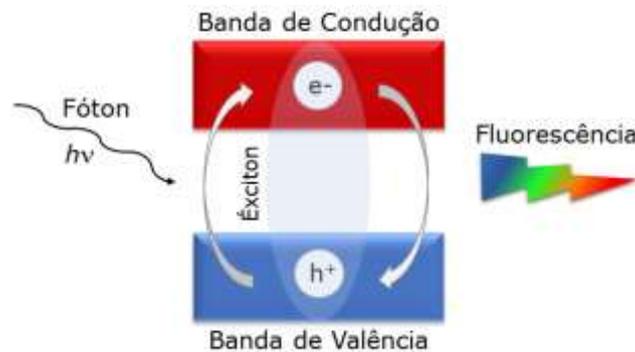
A nanotecnologia é uma das áreas de fronteira de pesquisa, envolve a manipulação em nanoescala de átomos e moléculas e é um dos campos das Ciências da Vida que mais vem propiciando avanços nessa área nas últimas décadas. Este campo emergente vem propondo o desenvolvimento de nanomateriais de nova geração, para diferentes fins, como diagnóstico, entrega de medicamentos, terapia genética, monitoramento de processos biológicos, entre outros (RESHMA; MOHANAN, 2019). Dentre esses nanomateriais, uma classe de material semiconductor vem se destacando, os chamados pontos quânticos (PQs). Esses nanocristais de semicondutores possuem tipicamente tamanhos de 2 a 10 nm e suas excepcionais propriedades ópticas vêm consolidando essas nanoestruturas como sondas fluorescentes importantes na área de pesquisa biomédica (FARZIN; ABDOOS, 2021).

De acordo com o tamanho e/ou a constituição química é possível sintonizar a fluorescência dos PQs em vários comprimentos de ondas, desde regiões próximas ao ultravioleta (UV), região do visível (400-700 nm), até o infravermelho próximo (*Near Infrared* – NIR) (SMITH; GAO; NIE, 2007).

Existe uma variedade de composições desses nanocristais, consistindo-se principalmente de átomos dos grupos IIA-VIB, IIIA-VB ou IVA-VIB da antiga tabela periódica. PQs de CdTe, por exemplo, são formados por cádmio que pertence ao grupo IIA e telúrio que pertence ao grupo VIB (SOUSA et al., 2018).

Os materiais semicondutores são caracterizados por uma banda de valência (BV) de menor energia e uma banda de condução (BC) de maior energia. A BV está separada da BC por um *bandgap* (E_g) de energia (Figura 2). Para que os elétrons passem da BV para a BC, é necessário o fornecimento de energia (absorção) com valor igual ou maior que a E_g . Quando esses materiais recebem energia, por exemplo, na forma de fótons, os elétrons da BV vão ser excitados e passar para a BC, deixando um “buraco” na BV, gerando um par elétron-buraco ou éxciton, assim como mostra a Figura 2 (MICHALET, BENTOLILA, WEISS, 2008; BRUS, 1984).

Figura 2 – Esquema ilustrativo da formação de um éxciton e posterior recombinação excitônica em um material semiconductor, h^+ representa o “buraco” gerado na banda de valência pela excitação do elétron e^- , $h\nu$ a energia de um fóton excitando o material semiconductor onde h é a constante de Planck e ν é a frequência da luz.



Fonte: A autora (2022).

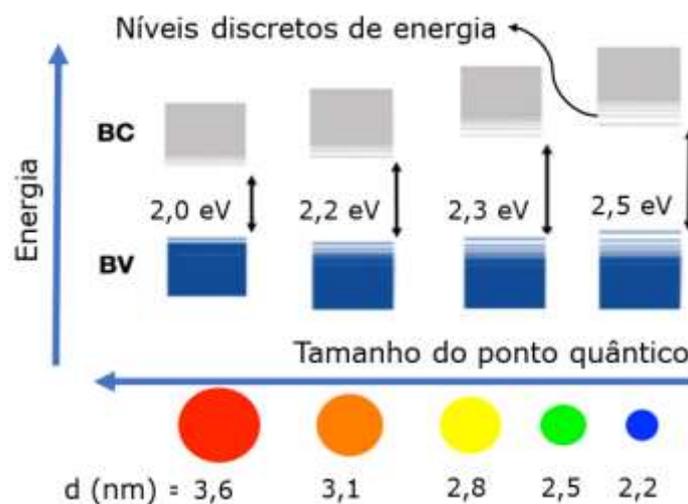
O éxciton formado vai retornar à BV depois de alguns nanossegundos e tal processo é chamado de recombinação excitônica. A recombinação dos elétrons excitados na BC com os buracos na BV dá origem à emissão fluorescente de materiais semicondutores sejam estes macroscópicos ou nanométricos. Porém, quando em nanoescala, esses nanocristais sofrem modificações em suas propriedades ópticas devido ao confinamento quântico.

No material semiconductor macroscópico (*bulk*), o elétron pode ocupar uma variedade de estados energéticos que estão distribuídos de modo contínuo. Quando uma das dimensões do material se torna fisicamente menor que o raio de Bohr (a_B) característico deste material, dizemos que essa estrutura se encontra em confinamento quântico (BRUS, 1984). O raio de Bohr está relacionado à distância elétron-buraco e é característico de cada semiconductor, por exemplo o seleneto de cádmio (CdSe) *bulk* apresenta um $a_B = 6$ nm, logo, apenas teremos um PQ de CdSe se o raio dessa NP for inferior a 6 nm (BENTOLILA; MICHALET; WEISS, 2008). Quando o confinamento quântico é tridimensional, ou seja, todas as dimensões do material são fisicamente menores que o a_B característico do semiconductor é que se tem os PQs.

O confinamento quântico torna possível controlar em que região do espectro eletromagnético um PQ irá emitir fluorescência através do controle do seu tamanho. Isto ocorre porque, quando o material semiconductor está em confinamento quântico, a energia E_g aumenta ou diminui de acordo com o tamanho da NP, para uma mesma

composição. Dessa forma, PQs de tamanhos menores, tem maior E_g e vão emitir em regiões mais próximas ao azul. Já os PQs de tamanhos maiores, possuem menor E_g e emitem fluorescência mais próxima do vermelho, como ilustrado na Figura 3. Isso ocorre porque o diâmetro (d) e o comprimento de onda (λ) da emissão são inversamente proporcionais ao E_g , como visto nas seguintes relações: E_g é proporcional a $1/d^2$ e E_g é proporcional a $1/\lambda$ (SANTOS; FARIAS; FONTES et al., 2008). O confinamento quântico também leva ao aparecimento de níveis discretos de energia no final da BV e início da BC, por isso os PQs também são chamados de átomos artificiais (Figura 3).

Figura 3 – Os pontos quânticos e o confinamento quântico: aparecimento de níveis discretos de energia e também há aumento do *bandgap* (E_g) com a redução do tamanho da nanopartícula. Representação para PQs de CdTe. BV = banda de valência e BC = banda de condução.

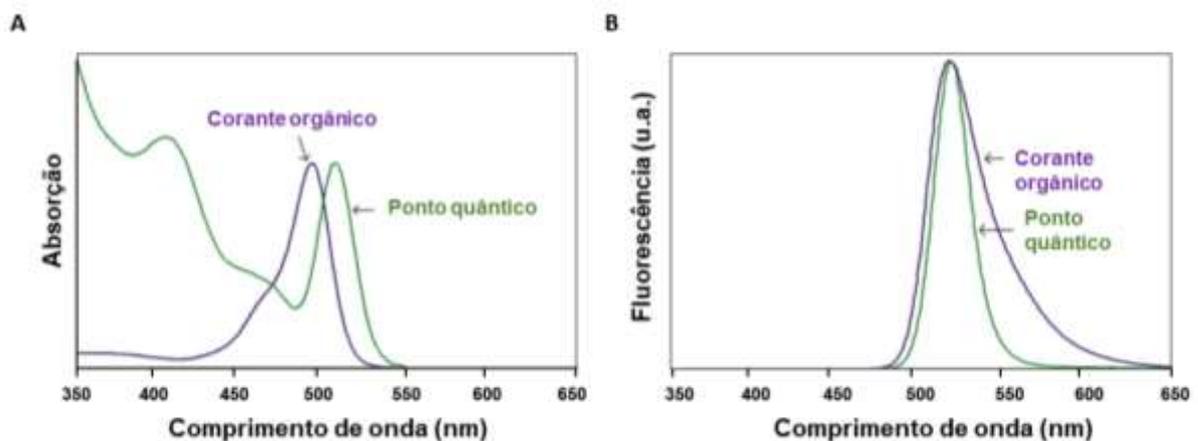


Fonte: Adaptada de PEREIRA et al. (2019).

A síntese coloidal dos PQs em geral envolve duas etapas: em uma primeira etapa, a nucleação, ocorre a injeção rápida de um precursor calcogênio, que pode ser telúrio ou selênio, em um balão contendo uma solução de um precursor, que pode ser cádmio ou zinco. À medida que a síntese acontece, os pontos iniciais de nucleação vão se formando e ocorre diminuição da velocidade de reação e também dos precursores, já que estes últimos estão sendo consumidos para formação dos nanocristais. Esta etapa inicial é determinante para o número total de PQs, e também de seu tamanho médio, visto que os núcleos pré-formados crescem de forma isolada, até o completo consumo dos reagentes precursores. Durante esse processo, as NPs

não conseguem se agregar umas às outras porque ficam suspensas, como um coloide, e isso é devido a presença de agentes estabilizantes (como o ácido mercaptosuccínico – AMS, empregado na síntese aquosa), que se desligam e ligam aos sistemas para permitir o crescimento das NPs, e impedem sua aglomeração e precipitação (MARTINS; TRINDADE, 2012).

Figura 4 – Ilustração de espectros de absorção (em A) e emissão (em B) de PQs e corantes orgânicos. Os PQs podem ser excitados em vários comprimentos de onda, já os corantes convencionais necessitam de excitação em um comprimento de onda específico.

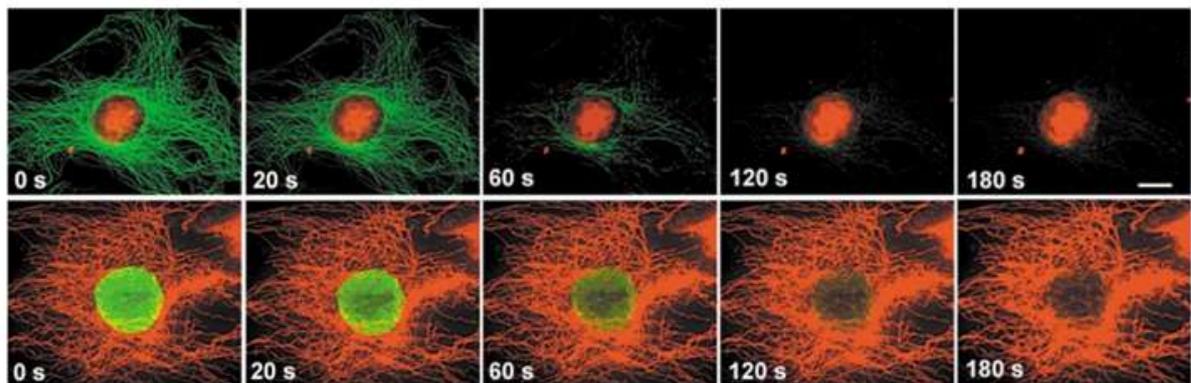


Fonte: Adaptada de SMITH (2004).

As vantajosas características dos PQs atraíram o interesse da comunidade científica em aplicar essas NPs como marcadores biológicos fluorescentes, principalmente quando são conjugados a biomoléculas de interesse biológico e médico, como lectinas, anticorpos e carboidratos por exemplo, e assim vêm sendo utilizados em uma grande variedade de estudos, tais como marcação de tecidos, avaliação da expressão e reciclagem de receptores bem como em biossensoriamento (SANTOS; FARIAS; FONTES, 2008; CUNHA et al., 2018; CABRAL FILHO et al., 2016; ANNIO et al., 2018; NASROLLAHI et al., 2020). As vantagens ópticas dos PQs em relação aos marcadores fluorescentes convencionais (principalmente os corantes orgânicos), vêm consolidando a versatilidade dessas NPs e incluem: (i) utilização de apenas uma única fonte de luz para excitação da emissão em diferentes regiões do espectro eletromagnético devido ao largo espectro de absorção dessas NPs; (ii) espectro de emissão estreito e simétrico em diferentes regiões do espectro, variando-se apenas o tamanho da partícula, assim como pode-se observar na Figura 4; (iii) excepcional resistência à fotodegradação, uma taxa 100 vezes menor é apresentada

pelos os corantes orgânicos convencionais (isso permite monitorar estudos biológicos por tempos prolongados como mostrado na Figura 5) e (iv) possuem superfície ativa, que possibilita a sua conjugação a moléculas ou até mesmo a outras NPs (WU et al., 2003; AN et al., 2018).

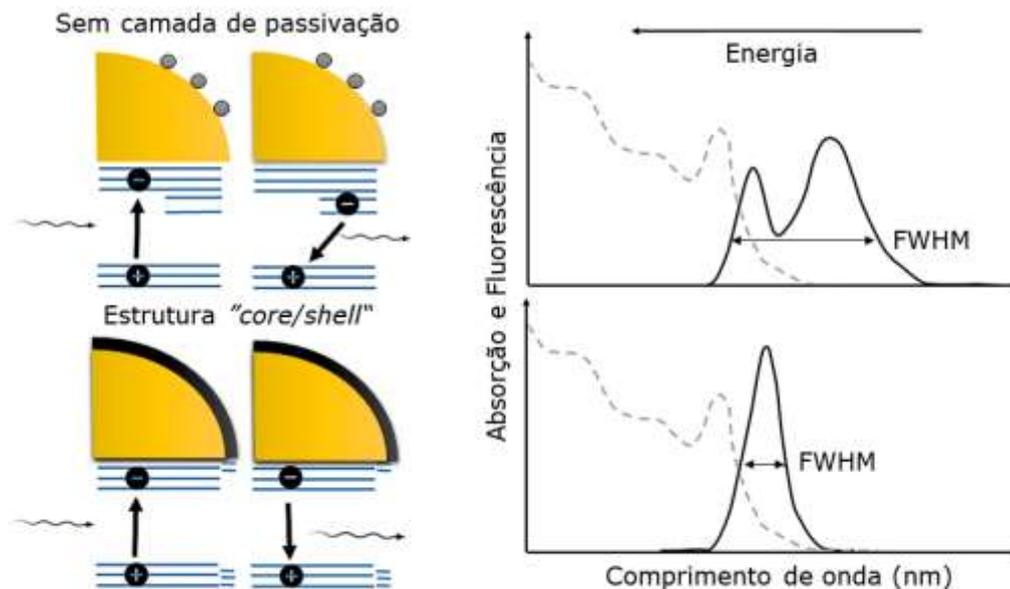
Figura 5 – Resistência à fotodegradação dos PQs. Na primeira linha, vemos os antígenos nucleares marcados por PQs, em vermelho, e permanecendo fluorescentes ao longo do tempo, enquanto os microtúbulos marcados pelo corante orgânico AlexaFluor, em verde, sofreram fotodegradação a partir de 120 s. Na segunda linha, ocorre a inversão da coloração, os microtúbulos foram corados com PQs, em vermelho, e permaneceram fluorescentes ao longo do tempo, enquanto os antígenos nucleares foram corados com o AlexaFluor, em verde, e também sofreram fotodegradação a partir de 120 s.



Fonte: Adaptada de WU et al. (2003).

A redução do volume da NP resulta em um aumento da relação área/volume, e a elevada área superficial aumenta a contribuição dos defeitos de superfície dos nanocristais (átomos da superfície do cristal que tem ligações não compartilhadas), o que resulta na diminuição da intensidade de fluorescência das NPs. Isso ocorre porque os defeitos levam à formação de níveis intermediários entre a BV e a BC, e ao invés do elétron ir diretamente da BC para a BV, ele pode ser capturado por níveis intermediários levando a um baixo sinal fluorescente, como pode ser observado na Figura 6.

Figura 6 – A camada de passivação nos pontos quânticos (PQs) compostos por núcleo/casca, ou *core/shell*, otimiza a intensidade de fluorescência, com um estreitamento da largura à meia altura do espectro (FWHM). Quando a camada está ausente, os elétrons podem ocupar “armadilhas”, favorecendo outros decaimentos radiativos não excitônicos, interferindo, assim, na qualidade da fluorescência (intensidade e largura espectral). À direita, encontram-se ilustrações de espectros de emissão (linha preta contínua) e absorção (linha cinza pontilhada) exemplificando cada situação.



Fonte: Adaptada de PEREIRA et al. (2021).

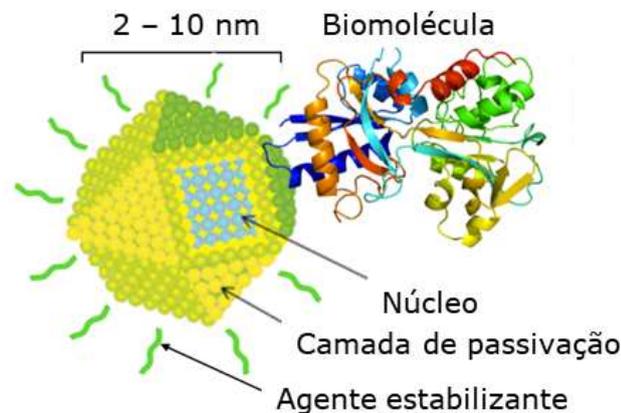
Uma maneira de contornar essa perda de intensidade de fluorescência é crescer uma "casca" (camada de passivação) de umas poucas camadas de átomos de um material semiconductor, em geral com um E_g maior que o do núcleo da NP. Esse processo da formação da "casca" é denominado passivação e as partículas resultantes apresentam uma estrutura física do tipo *core/shell* (núcleo/casca), que ajuda a reduzir os defeitos e aprimorar as propriedades fluorescentes; reduzindo a largura à meia altura (FWHM, do inglês *full width at half maximum*) dos espectros de emissão para valores em geral menores que 50 nm a depender da região espectral de emissão e otimizando a intensidade de fluorescência (Figura 6 (MARTINS; TRINDADE, 2012)). Nos PQs hidrofílicos, essa camada de passivação é construída com o auxílio dos agentes estabilizantes utilizados na síntese dessas NPs. Esses agentes: (i) ajudam a deixar o sistema coloidal estável, (ii) conferem grupos tiol para a formação da camada de passivação, (iii) atribuem carga para a NP e (iv) ainda conferem grupos funcionais (carboxílico ou amina) para ligação do PQ a moléculas ou

até mesmo outras NPs. Exemplos de agentes estabilizantes muito usados na síntese de PQs hidrofílicos são cisteamina, cisteína e AMS (MARTINS; TRINDADE, 2012; HONG et al., 2015; LIU et al., 2014; PEREIRA et al., 2019).

No final, o PQ apresenta uma nanoestrutura complexa (Figura 7) composta pelo: (i) núcleo da NP, que determina a região espectral da emissão; (ii) a camada de passivação, que determina a qualidade da emissão e, por fim, (iii) a camada orgânica, que é a camada mais externa, de agente estabilizante/funcionalizante, cuja importância é conferir estabilidade química, carga e o grau de funcionalidade da NP em relação à marcação do sistema biológico de interesse (MARTINS, TRINDADE, 2012; PEREIRA et al., 2016).

A superfície dos PQs, com seus agentes estabilizantes/funcionalizantes, permite uma interação química entre a NP e demais componentes que também possuam grupos funcionais.

Figura 7 – Esquema de um ponto quântico funcionalizado quimicamente como marcador fluorescente.



Fonte: Adaptada de PEREIRA et al. (2016).

3.2.2 Bioconjugação

Dentre os tipos de conjugação, destacam-se: (i) adsorção simples, baseada em interações eletrostáticas e/ou hidrofóbicas (Van der Waals) entre os PQs e os sistemas de interesse, também chamada de ligação não covalente; (ii) fixação direta de biomoléculas na superfície dos PQs por interações dativas, geralmente envolvendo a afinidade do grupo tiol pelo metal; (iii) associação dos PQs funcionalizados com moléculas de avidina, ou estreptavidina, com moléculas biotiniladas e (iv) ligação covalente, que pode ser entre grupos carboxílico-amina ou amina-amina, por exemplo e são mediados por agentes de acoplamento, como, respectivamente cloridrato de 1-

etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e *N*-Hidroxisuccinimida (NHS) e glutaraldeído (PEREIRA et al., 2019; CABRAL FILHO et al., 2016).

Dentre os tipos de bioconjugação citados, a fixação direta de moléculas na superfície dos PQs por interações dativas envolvendo grupo tiol e o metal vêm ganhando destaque por ser simples e não necessitar de agentes de acoplamento, tais como EDC/NHS, para sua efetivação. Elas, no entanto, podem ser sensíveis ao pH, oxidação e troca com moléculas semelhantes (ALIVISATOS et al., 2005; FOUBERT et al., 2016; HERMANSON, 2013).

A conjugação é um procedimento desafiador e é preciso que ela seja baseada em metodologias que preservem as propriedades ópticas dos PQs e as funcionalidades das biomoléculas associadas, e gerem um conjugado estável, livre de aglomerações e precipitações, e ainda que seja efetivo e específico (DÍAZ-GONZÁLEZ et al., 2020; PEREIRA et al., 2019).

Para avaliar se os PQs estão conjugados de maneira efetiva às biomoléculas, existem algumas técnicas e ferramentas de avaliação de conjugação, como: espectroscopia por correlação de fluorescência (FCS do inglês *Fluorescence Correlation Spectroscopy*), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*), dispersão/espalhamento dinâmico da luz (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*), o ensaio fluorescente em microplacas (EFM), eletroforese e análise de potencial zeta. Avaliações espectroscópicas de absorção UV-Vis e emissão algumas vezes também podem sugerir se houve conjugação. Vale ainda ressaltar que ensaios, envolvendo a interação com o sistema biológico, também são importantes para avaliar a conjugação e evitar falsos positivos ou negativos e podem envolver, por exemplo, inibição de sítios ativos da biomolécula conjugada aos PQs ou saturação de sítios nas células (BHATTACHARJEE et al., 2016; CRACIUN et al., 2021; DA SILVA et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2020, PEREIRA et al., 2022).

Assim como o DLS, o FCS, por exemplo, utiliza a determinação do tamanho hidrodinâmico para inferir sobre a conjugação. O FCS, no entanto, tem se mostrado mais sensível, especialmente considerando que PQs são NPs muito pequenas e podem também estarem associados com moléculas de poucos quilodaltons (KDa), tais como ácido fólico (AF) ou ácido fenilborônico (MONTEIRO et al., 2020a; MONTEIRO et al., 2020b). No FCS se utiliza da focalização do feixe de laser por uma

objetiva de alta abertura numérica em um microscópio confocal, o que limita o volume focal de detecção, sendo capaz de diferenciar a difusão de espécimes, como NPs, ainda que tenham tamanhos semelhantes (CRACIUN et al., 2021; DAWES; SOELLER; SCHOLPP, 2020).

Com as vantajosas propriedades dos PQs e a crescente proposta de novos métodos de preparação e avaliação de conjugados, os PQs vêm sendo cada vez mais utilizados em Ciências da Vida, alguns exemplos de aplicações dos PQs são: (i) aquisição de imagens *in vitro* e *in vivo*; (ii) biossensores ópticos, eletroquímicos e fotoeletroquímicos; (iii) ensaios bioanalíticos e (iv) e até mesmo para terapia fotodinâmica (WANG et al., 2019; YANG, ZHANG, SHEN, 2021; TRIANA et al., 2020). Além disso, esses nanocristais têm também se destacado no estudo da biologia celular do câncer, e vêm sendo explorados com sucesso, permitindo, por exemplo, estudar a expressão e internalização de receptores, tais como de transferrina e AF, em monocamadas e esferoides, e também a expressão de carboidratos como ácido siálico e manose/glicose (CABRAL FILHO et al., 2016; CARVALHO et al., 2019; MONTEIRO et al., 2020a; MANGEOLLE et al., 2019).

3.3 GLICOSE NO CÂNCER

Em todo o mundo, cerca de 19,3 milhões de novos casos de câncer e quase 10,0 milhões de mortes por essa doença ocorreram em 2020 (SUNG et al., 2021). A Organização Mundial da Saúde (OMS) alerta que, se as tendências atuais continuarem, o mundo verá um aumento superior a 100% nas mortes anuais por câncer nos próximos 40 anos – de cerca de 9 a 10 milhões de mortes em 2020 para cerca de 19 milhões de mortes em 2060 (WORLD HEALTH ORGANIZATION et al., 2020).

A propósito, o maior aumento (cerca de 81%) de novos casos ocorrerá em países de baixa e média renda, onde as taxas de sobrevivência são atualmente menores. Isso é o dobro (40%) dos novos casos de câncer que são esperados em países de alta renda, segundo dados da OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION et al., 2020).

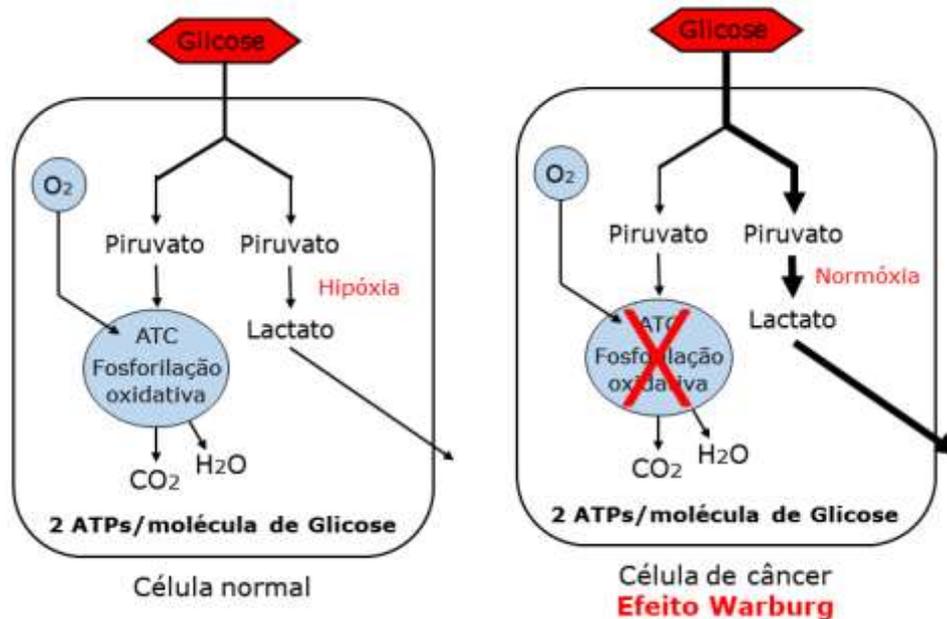
Embora grandes avanços tenham sido feitos no tratamento do câncer de uma forma geral, a recorrência e a metástase continuam sendo as principais causas de mortalidade em pacientes com essa doença (FAN et al., 2018; XU et al., 2018). Portanto, é importante o desenvolvimento de métodos de diagnóstico ainda mais

sensíveis e específicos, bem como terapias direcionadas mais efetivas, para assim, aumentar o percentual de cura dos pacientes. Além disso, é essencial que os pesquisadores busquem por fármacos mais acessíveis economicamente para os pacientes, visto que populações de baixa e média renda são acometidas duas vezes mais que as de alta renda. Dessa forma, cada vez mais é necessário a busca por tecnologias que ajudem a melhor compreender os complexos mecanismos biológicos envolvidos nessa doença (MOHAMMADI et al., 2022).

Um dos principais mecanismos biológicos envolvidos no câncer, é o processo de reprogramação metabólica, no qual as células de câncer se tornam dependentes de alguns nutrientes de uma forma diferente de quando estavam em condições normais. Tais fatores influenciam diretamente na demanda de energia, taxa de proliferação acelerada, capacidade de metástase e resistência a quimioterápicos (FAUBERT; SOLMONSON; DEBERARDINIS, et al., 2020).

O metabolismo tumoral começou a ser descrito em 1920, tendo um dos pioneiros Otto Warburg, que observou que as células de câncer podem apresentar uma maior captação de glicose (efeito Warburg), quando comparadas às normais (FADAKA et al., 2017; MULLAPUDI et al., 2020). Inicialmente, acreditava-se que tal efeito era desencadeado por mutações mitocondriais que impactavam o processo de fosforilação oxidativa, e as células de câncer faziam uso aumentado da glicólise aeróbica para suprir esses danos, porém hoje já se sabe que as células de câncer utilizam preferencialmente essa via mesmo em condições ricas em oxigênio e na presença de mitocôndrias funcionais (RASHEED, TARJAN, 2018; SCHMIDT, SCIACOVELLI, FREZZA, 2020). Dessa forma, as células de câncer fazem uso aumentado da glicólise aeróbica (pela via de conversão de glicose em piruvato, seguida de produção de lactato), com uma taxa de absorção de glicose de 10 a 40 vezes maior e uma produção de lactato que é 10 a 100 vezes mais rápida quando comparada as células normais (VAUPEL; MULTHOFF, 2021). Em contraste com células normais, que só produzem lactato sob condições de hipóxia (oxigênio insuficiente), por exemplo, durante exercícios extenuantes de músculo, e esse lactato produzido é prontamente enviado para os músculos; as células de câncer captam glicose em excesso, e por isso produzem lactato em excesso, em condições de normóxia (presença de oxigênio), que fica acumulado no espaço extracelular do tumor, como pode ser observado na Figura 8 (VAUPEL; MULTHOFF, 2021).

Figura 8 – Representação da glicólise em uma célula normal e em uma célula de câncer. À esquerda, a glicólise ocorre devido ao processo de hipóxia, e forma lactato e ATP em quantidades normais. À direita, a via de glicólise aeróbica ocorre e é usada em excesso, então acontece uma maior captação de glicose e produção de lactato, que fica armazenado no espaço extracelular do tumor, tal processo é chamado de efeito Warburg. ATP: trifosfato de adenosina, ATC: Ciclo do ácido tricarboxílico.



Fonte: Adaptada de VAUPEL; MULTHOFF (2021).

E tal mudança do metabolismo da glicólise, é adquirida muito cedo na carcinogênese, mesmo antes que as células tumorais sejam expostas às condições hipóxicas. Dessa forma, o fenótipo Warburg constitui uma assinatura metabólica de cerca de 70 – 80% dos cânceres humanos, que conduzem a proliferação sustentada do tumor, resistência e aceleram a progressão maligna (VAUPEL, SCHMIDBERGER, MAYER, 2019).

O efeito Warburg vem sendo explorado na clínica, por exemplo, na tomografia por emissão de pósitron (PET), que combina um análogo de glicose, a 2-deoxi-D-glicose, com ¹⁸F radioativo (¹⁸F-FDG), o qual é absorvido majoritariamente pelos tecidos tumorais, em relação aos saudáveis, favorecendo um diagnóstico, estadiamento e monitoramento da terapia tumoral (GALLAMINI; ZWARTHOED; BORRA, 2014; REITER et al., 2020).

O efeito Warburg, acaba desencadeando outros efeitos secundários nas células de câncer, como por exemplo o aumento da expressão dos transportadores de glicose (GLUTs), para suprir a maior demanda por esse carboidrato (BARRON et al., 2016). Os GLUTs podem atuar não somente na captação e transporte da glicose,

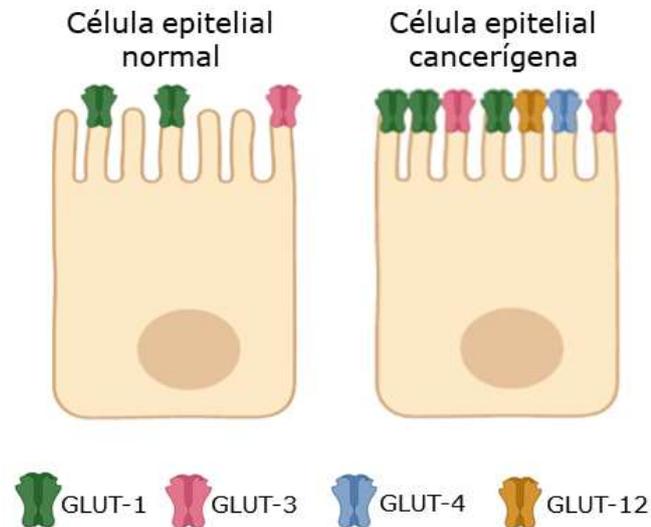
mas também de outros açúcares, como a frutose, podendo apresentar afinidade variável por cada um. A família dos transportadores GLUT, comporta diferentes subtipos que são divididos em 3 classes, de acordo com sua estrutura: Classe 1 (GLUTs 1–4, 14); Classe 2 (GLUTs 5, 7, 9 e 11) e Classe 3 (GLUTs 6, 8, 10, 12 e 13/HMIT) (BARRON et al., 2016; THORENS; MUECKLER, 2010).

O GLUT-1 é naturalmente encontrado em níveis altos, em condições normais, em praticamente todas as células. No entanto, pode ocorrer uma expressão anormal em células de câncer, em razão do aumento da quantidade de GLUTs expressos. Porém, não ocorre somente a superexpressão de um tipo particular de transportador que já está presente nas células normais, já que as células quando se transformam em cancerosas podem expressar GLUTs que não expressavam quando estavam saudáveis. Exemplo disso, são células epiteliais, que expressam naturalmente GLUT-1 e GLUT-3 quando estão saudáveis, mas só expressam GLUT-4 e GLUT-12 quando cancerosas, como pode ser observado na Figura 9 (BARRON et al., 2016).

Entretanto, achados na literatura, têm mostrado dados discordantes na expressão de GLUTs, em termos de quantidade e tipo. Enquanto Godoy et al. (2006) encontraram alta quantidade de GLUT-1 em células de câncer de mama, Kang et al. (2002) detectaram baixa quantidade de GLUT-1 e Ravazoula et al. (2003) correlacionaram a presença de GLUT-1 mais evidente nas células de câncer de mama de grau 2 ou 3 do que no grau 1.

De forma geral, a literatura vem reportando uma correlação entre GLUT-1 e a captação da glicose por células tumorais (GODOY et al., 2006; ZAMBRANO et al., 2019). Porém, estudos vêm indicando que alguns GLUTs podem atuar não somente na captação de glicose, mas também de outros carboidratos, como a frutose; podendo apresentar uma afinidade variável, dependendo também do tipo de câncer (BARRON et al., 2016; THORENS; MUECKLER, 2010a, 2010b). Nesse contexto, Wuest e colaboradores (2018) reportaram que o uso do ^{18}F -FDG tem sido limitado em cerca de 50% dos pacientes com câncer de mama, devido a uma menor expressão de GLUT-1, propondo então estudos com a linhagem tumoral de glândula mamária murina (EMT6) e ^{18}F radioativo combinado com análogos de frutose com uma possível alternativa ao ^{18}F -FDG. Os resultados de PET, em geral, indicaram uma alta captação de ^{18}F -frutose, porém instigaram mais estudos de qual transportador (GLUT-5 ou GLUT-2) teria um papel mais significativo nesse mecanismo.

Figura 9 – Representação ilustrativa de transportadores da família GLUT e possíveis alterações em células de câncer epitelial, como: superexpressão dos GLUT-1 e GLUT-3, e surgimento de novos (GLUT-4 e GLUT-12).



Fonte: A autora (2021).

Assim, surge a importância de estudar a internalização, via GLUTs, de diferentes análogos de glicose, até mesmo outros açúcares como a frutose, por diferentes tipos de linhagem de câncer de malignidade variável. Dessa forma, gliconanopartículas fluorescentes baseadas em PQs e derivados de glicose podem colaborar para elucidar melhor tais processos.

3.4 GLICONANOPARTÍCULAS BASEADAS EM PONTOS QUÂNTICOS E GLICOSE

Com as vantagens e versatilidades dos PQs, as gliconanopartículas fluorescentes baseadas nessas nanoestruturas vêm se tornando uma nova perspectiva na construção de plataformas para o estudo do câncer, expressão de GLUTs, internalização diferencial de glicose e seus análogos para alcançar avanços no diagnóstico e na terapia (ASHREE, WANG, CHAO, 2020).

Igawa et al (2014) avaliaram a captação de PQs de CdSe sintetizados por via hidrofóbica e conjugados a D-glicosamina (D-GN) por meio do agente de acoplamento EDC, em células de câncer osteoblásticas (NOS-1) cultivadas em monocamada. Observaram marcação na superfície das células e no citoplasma após 3 h de incubação com o conjugado.

Ranjbar-Navazi et al. (2018) prepararam PQs de InP/ZnS, também por via hidrofóbica, os quais foram conjugados com D-GN (e associados ou não ao AF),

utilizando os agentes de acoplamento EDC e NHS. Eles observaram que houve endocitose por células de câncer de ovário (OVCAR-3) e células neoplásicas de pulmão (A549), cultivadas em monocamada, através de técnicas de fluorescência (microscopia e citometria de fluxo), após incubar as nanossondas por 2 h.

Ge et al. (2019) sintetizaram PQs hidrofóbicos de Ag₂Se, conjugaram à D-GN também através dos agentes de acoplamento EDC e NHS, e incubaram os nanossistemas com a linhagem de células de câncer de mama humano MCF-7, cultivada em monocamada, por 4 h. Eles observaram que 93,9% das células foram marcadas por citometria de fluxo, a qual foi corroborada pela observação das células por microscopia de fluorescência.

No desenvolvimento de gliconanopartículas baseadas em PQs e glicose, em geral os PQs sintetizados por via hidrofóbica vêm sendo mais aplicados, porém possuem síntese laboriosa e necessitam de troca de ligantes para transformar as NPs em hidrofílicas, o que pode também levar a perdas de fluorescência consideráveis (PEREIRA et al., 2019).

Assim, até o momento, existem poucos estudos utilizando PQs conjugados a análogos de glicose, especialmente com foco no estudo celular, na internalização/captação e nas vias de acesso ao ambiente intracelular (BENITO-ALIFONSO et al., 2014; RANJBAR-NAVAZI et al., 2019). Dessa forma, é importante que novos estudos sejam desenvolvidos, utilizando diferentes análogos de glicose, uma vez que a captação desses carboidratos pode depender do tipo de análogo utilizado (BARRON et al., 2016; HAMILTON et al., 2021). Além disso, é relevante que tais nanossistemas sejam estudados frente a diferentes linhagens de câncer, com diferentes graus de malignidade, já que o perfil de captação pode variar de acordo com a linhagem utilizada (BARRON et al., 2016), e que sejam também investigados em modelos mais complexos como os esferoides, a fim de complementar os resultados com monocamadas celulares.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dessa dissertação estão apresentados na forma de artigo a ser submetido para publicação.

4.1 ARTIGO EM PREPARAÇÃO

Pontos Quânticos Funcionalizados com 1-Tiol- β -D-glicose como Novas Gliconanossondas Fluorescentes – Aplicações em Monocamadas e Esferoides de Células de Câncer

Resumo: O metabolismo energético diferenciado das células de câncer vem estimulando o desenvolvimento de novas gliconanossondas que possam ser aplicadas para melhor compreender a complexa interação biológica envolvida na captação de análogos de glicose, em nível celular, nessa doença. Neste trabalho, exploramos as singulares propriedades ópticas dos pontos quânticos (PQs) e sua funcionalização a um análogo de glicose, a 1-Tiol- β -D-glicose (GT), explorando a afinidade do grupo tiol pela superfície semicondutora dessas nanopartículas, para desenvolver um novo conjugado (PQs-GT). A efetividade da conjugação foi confirmada por espectroscopia de correlação por fluorescência (FCS) e marcação de leveduras de *Candida albicans* revestidas com concanavalina A, explorando a afinidade lectina-carboidrato. Ademais, esferoides de células HeLa foram preparados pelo método da gota suspensa, sendo testadas variações na densidade de células/mL, volume da gota e tempo de crescimento. Esses modelos biológicos vêm ganhando destaque por melhor mimetizar o microambiente tumoral. Os esferoides foram monitorados por microscopia óptica, e aquele obtido a partir de 20.000 células/mL, 30 μ L e 48 h de formação foi escolhido para o estudo, por apresentar morfologia característica e melhor reprodutibilidade na formação. A interação biológica das gliconanossondas foi então estudada com esferoides e monocamadas. A microscopia de fluorescência mostrou uma captação efetiva do conjugado PQs-GT, evidenciando uma marcação pelo citoplasma celular, com presença de pequenas vesículas, tanto nos esferoides como na monocamada, com apenas 30 min de incubação. O ensaio por citometria de fluxo revelou que ca. 38% das células HeLa,

cultivadas em monocamada, foram marcadas, indicando uma captação promissora para o curto período de incubação. Portanto, uma nova gliconanossonda fluorescente foi desenvolvida, por um método de conjugação prático e direto, a qual apresentou potencial de aplicação em estudos associados à biologia do câncer, tanto em modelos biológicos mais simples quanto em complexos, como os esferoides.

Palavras-chave: Cultivo 3D. Fluorescência. Células HeLa. Nanopartículas.

Introdução

A glicose é uma molécula de particular interesse no contexto do câncer. Otto Warburg observou que as células de câncer podem fazer uso preferencial da glicólise para produzir energia, mesmo na normóxia (efeito Warburg), contrastando com o que ocorre nas células saudáveis. Assim, as células de câncer podem passar a apresentar uma maior captação da glicose para suprir a demanda metabólica [1,2]. O efeito Warburg, inclusive, vem sendo explorado na tomografia por emissão de pósitron (PET), que combina o análogo de glicose, a 2-deoxi-D-glicose, com ^{18}F radioativo (^{18}F -FDG). Esse radiofármaco, em geral, é absorvido majoritariamente pelos tecidos tumorais, em relação aos saudáveis, e sua utilização no PET favorece o diagnóstico, estadiamento e monitoramento da terapia tumoral [3,4]. Além disso, para suprir essa maior demanda das células de câncer por glicose, pode ocorrer não só um aumento na quantidade como também no tipo de transportadores de glicose expressos (GLUTs) [5]. Assim, nota-se que o desenvolvimento de ferramentas que ajudem a melhor compreender a relação da glicose com o câncer pode colaborar para avanços na terapêutica e diagnóstico dessa doença.

Nesse contexto, as vantajosas propriedades físico-químicas dos pontos quânticos (PQs) – incluindo alto brilho, fotoestabilidade e superfície ativa para conjugação – podem ser exploradas na construção de gliconanossondas aptas a favorecer uma compreensão mais profunda e complementa dessa complexa interação do câncer com a glicose, em nível celular [6,7]. De fato, alguns estudos vêm propondo o desenvolvimento de nanossistemas baseados em PQs e o análogo D-glicosamina, preparados através de conjugação via carbodiimida, e aplicando-os em diferentes investigações relacionadas à biologia do câncer [8,9,10]. Há ainda, no entanto, muito o que se compreender sobre a captação da glicose pelas células de câncer. A internalização desse carboidrato pode, por exemplo, também ser influenciada pelo tipo de análogo bem como pela linhagem tumoral [5,11,12].

Atualmente, a cultura bidimensional de células é o modelo mais utilizado para o estudo da biologia celular e da terapêutica do câncer [13]. No entanto, devido à complexidade dos tumores, novos modelos biológicos *in vitro*, que melhor retratem a arquitetura do tecido tumoral *in vivo*, vêm sendo propostos [13,14]. Foi esse contexto que levou ao desenvolvimento dos chamados esferoides. Essas microestruturas tridimensionais vêm apresentando potencial para o estudo de interação biológica com nanopartículas (NPs) por melhor mimetizar o ambiente tumoral e vêm sendo utilizadas em várias aplicações, tais como envolvendo ensaios de toxicidade, expressão gênica, bem como biologia celular do câncer [15, 16].

Nesse âmbito, neste presente trabalho, explorando a afinidade do grupo tiol do análogo 1-Tiol- β -D-glicose pela superfície semicondutora dos PQs, propomos o desenvolvimento de uma nova gliconanosonda, que foi preparada através de um método de conjugação prático e direto. Até onde sabemos este é o primeiro estudo ao associar esse análogo aos PQs. A efetividade da conjugação foi confirmada utilizando espectroscopia de correlação de fluorescência (do inglês, *fluorescence correlation spectroscopy* – FCS), bem como um ensaio de interação com leveduras de *Candida albicans* revestidas com concanavalina A (Con A), que se baseou na afinidade da glicose pela lectina, por citometria de fluxo. Em seguida, a interação do conjugado PQs-GT foi estudada tanto em monocamadas como esferoides que foram desenvolvidos, e tiveram sua formação estudada, a partir da linhagem de adenocarcinoma cervical (HeLa).

Acreditamos que essas novas gliconanosondas fluorescentes baseadas em PQs e 1-Tiol- β -D-glicose, apresentam potencial para serem aplicadas na compreensão do complexo mecanismo de captação de análogos de glicose, em modelos 2D e 3D de cultivo celular, trazendo subsídios para o desenvolvimento de métodos terapêuticos e de diagnóstico mais aprimorados.

Procedimentos Experimentais

Cultivo Celular em Monocamada

As células HeLa de linhagem imortalizada (*American Type Culture Collection* – ATCC) foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium* - Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS - Gibco), 1% de estreptomicina e penicilina (Gibco) a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂, até atingir 80 – 90% de confluência.

Preparação dos Esferoides

A preparação dos esferoides foi baseada no método da gota suspensa e partiu do cultivo celular em monocamada. As células HeLa, a partir da terceira passagem após descongelamento, foram tripsinizadas e preparou-se suspensões com densidade de células/mL conhecida. As suspensões foram gotejadas na tampa de uma placa de Petri de acrílico (90 x 15 mm) para formação de esferoides, assim como ilustra a Figura 1A, enquanto na base da placa foi adicionado tampão fosfato salino 1× (PBS) para que as gotas não desidratassem, com base na adaptação do método de [17].

A placa de Petri de acrílico foi incubada a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ para que fossem formados os esferoides, nos quais as células se encontram em contato direto umas com as outras e com os componentes da matriz extracelular. Para o desenvolvimento dos esferoides testou-se pelo menos duas tentativas de cada variação, relacionadas a: (i) densidade de células (5.000, 7.500, 10.000 e 20.000 células/mL), (ii) volume da gota (10, 20, 30, 40 e 50 µL) e (iii) tempo de crescimento (24 a 96 h), como ilustra na Figura 1B.

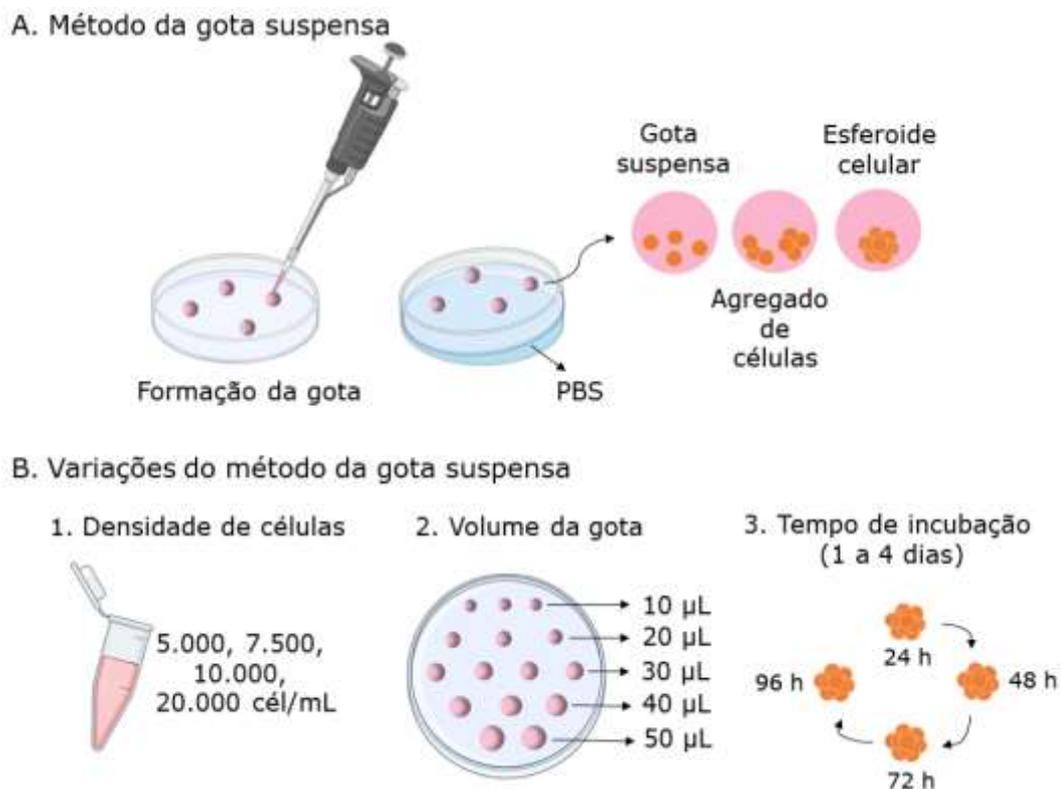


Figura 1 – (A) Representação das etapas envolvidas na preparação dos esferoides pelo método da gota suspensa. (B) Representação das variações do método da gota suspensa utilizadas neste estudo. A abreviação (cél/mL) corresponde a células/mL, PBS é tampão fosfato salino 1×.

Monitoramento dos Esferoides

Inicialmente a morfologia dos esferoides foi avaliada utilizando um microscópio invertido (*Micros, modelo Sundew*), na objetiva de 40×. Para essa avaliação, o PBS foi retirado da placa, esta foi invertida e as gotas dos esferoides foram observadas diretamente no microscópio. Os esferoides que apresentaram uma morfologia esférica e sem falhas seguiram para monitoramento de reprodutibilidade e crescimento.

O monitoramento da reprodutibilidade da formação dos esferoides foi realizado simultaneamente à análise da morfologia, observando-se quantos esferoides eram formados em relação ao total de gotas cultivadas na placa.

O monitoramento do crescimento dos esferoides foi realizado utilizando um microscópio invertido acoplado com fluorescência (*Leica, modelo DMI 4000B*), na objetiva de 20×. Para essa análise foi usada uma pipeta para capturar os esferoides da placa de Petri e esses foram transferidos para uma placa individual de poço único para microscopia invertida (SPL). Antes da análise, cada esferoide foi lavado 5 vezes com uma solução de PBS para retirar o meio de cultivo e quaisquer resíduos de células que não tenham se agregado ao esferoide. O tamanho médio dos esferoides foi estimado a partir de medidas de suas extremidades horizontal e vertical.

Síntese e Caracterização Óptica dos Pontos Quânticos

A síntese dos nanocristais de CdTe foi adaptada da metodologia descrita anteriormente por Cabral Filho et al., 2016 [18]. A preparação foi realizada em duas etapas. Na primeira, preparou-se uma solução aquosa a partir do precursor CdCl_2 (0,5 mmol) e do agente funcionalizante/estabilizante da reação, o ácido mercaptosuccínico (AMS, 0,6 mmol), em água ultrapura e pH > 10, elevado com NaOH (2 M). Na segunda, o telúrio (Te^0 , 0,1 mmol) foi reduzido a íons Te^{2-} usando borohidreto de sódio (NaBH_4 , 3 mmol) como o agente redutor, em pH elevado ajustado com NaOH (2 M), em uma atmosfera inerte saturada com nitrogênio a uma temperatura de aproximadamente 90 °C. Em seguida, a solução de Te^{2-} foi adicionada ao sistema Cd^{2+} /AMS e a reação prosseguiu sob agitação e aquecimento a 90 °C por aproximadamente 5 h. A razão molar foi de 5:1:6 (Cd:Te:AMS, respectivamente). Os reagentes utilizados na síntese foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Após a síntese, os PQs foram caracterizados opticamente por espectroscopia de absorção (UV-Vis 1800 - Shimadzu) e emissão (LS55 - Perkin Elmer, $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$).

Conjugação dos PQs com a Glicose Tiolada

Um análogo de glicose, a 1-Tiol- β -D-glicose (GT - Sigma-Aldrich – T6375), foi escolhido para realizar a conjugação com os PQs explorando-se a afinidade do grupo tiol dessa molécula pela superfície semicondutora das NPs, por meio de interações dativas [19]. Para isso, 200 μL de PQs (8,8 μM) tiveram seu pH ajustado para 5,5 pela adição de AMS (4,9% m/v). Em seguida, foi adicionada uma solução de 541,8 μL de GT (4 mg/mL) diluída em tampão citrato (pH 5,6), na proporção de 1:5000 (PQs:GT). Esse tampão foi utilizado para manter o pH do conjugado mais próximo do fisiológico na aplicação biológica, pois a solução de GT tem pH ca. 9,0, quando preparada em água. Após essas etapas, os conjugados PQs-GT permaneceram armazenados a 4 $^{\circ}\text{C}$ até o uso (após pelo menos 7 dias). Os nanossistemas foram caracterizados opticamente por espectroscopias de absorção e emissão, seguindo os procedimentos descritos na seção 2.4. Antes dos ensaios biológicos com *Candida albicans* e com as células HeLa, os conjugados PQs-GT foram purificados utilizando 3 ciclos de centrifugação a 775 $\times g$ por 3 min (MiniSpin, Eppendorf), utilizando tubo de ultrafiltração de 10 kDa (GE Healthcare), e ressuspensos em água ultrapura para a mesma concentração inicial. A purificação teve como objetivo retirar qualquer excesso de reagentes associados à síntese ou conjugação.

Avaliação da Conjugação

O sucesso na aplicação dos conjugados baseados em PQs exige etapas de avaliação da conjugação para a garantia da confiabilidade na obtenção de informações. Portanto, foram realizadas análises para confirmar a conjugação dos PQs-GT, utilizando espectroscopia de correlação por fluorescência (do inglês, *Fluorescence Correlation Spectroscopy* – FCS) e ensaio de interação biológica explorando a afinidade da lectina Con A pela glicose e por carboidratos da superfície de leveduras de *Candida albicans* [10] antes de partir para os estudos com monocamadas e esferoides de células de câncer.

Espectroscopia de Correlação por Fluorescência

A análise de FCS para os PQs e conjugados foi realizada em um microscópio confocal (LSM 780 - Carl Zeiss) usando uma objetiva de imersão em água 40x (NA = 1,0) [19,20]. A partir de pelo menos 10 curvas de correlação, obtidas por excitação em 514 nm, os tempos de difusão (τ_D) para cada amostra foram determinados e, em seguida, o raio hidrodinâmico (R) foi calculado pela equação a seguir:

$$R = \frac{4 k_B T \tau_D}{6 \pi \eta \omega_x^2} \quad \text{Eq. 1}$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura das amostras ($T \approx 303$ K), τ_D é o tempo de difusão, η é a viscosidade da água ($\eta = 7,98 \times 10^{-4}$ Pa·s) e ω_x é o raio lateral do volume focal (300 nm). O FCS permite a avaliação da conjugação por determinação de R e de τ_D , uma vez que se espera que os valores τ_D e R dos conjugados sejam maiores do que os dos PQs sozinhos [20, 21]. As análises de FCS foram expressas como média \pm erro padrão.

Interação do Conjugado com Leveduras de *Candida albicans*

Para o ensaio envolvendo *C. albicans*, fizemos uma adaptação de metodologia proposta por Pereira et al. 2021 [10], na qual as leveduras foram utilizadas como suporte biológico para avaliar a eficiência e especificidade do conjugado. Para tanto, as leveduras de *C. albicans* (*American Type Culture Collection*, ATCC 10231) foram semeadas em meio líquido Sabouraud Dextrose (NCM0147A - Neogen) por 24 h e em seguida uma suspensão de 1 mL de células foi lavada com 1 mL de solução salina (NaCl a 0,9%) a 775 xg (MiniSpin – Eppendorf) por 2 min. O precipitado foi então ressuspenso em 1,0 mL de solução salina e a densidade óptica da suspensão foi ajustada para aproximadamente 0,7 a 540 nm (Biotek μ Quant MQX200).

Em seguida, a suspensão celular (1,0 mL) foi incubada com 2,8 mg/mL de Con A, uma lectina extraída de *Canavalia ensiformis* que tem conhecida afinidade por α -D-manose/glicose, por 30 min sob agitação orbital (BioSan - Bio RS-24). A parede celular da *C. albicans* é rica em resíduos de glicose e manose que possibilitam a interação com a Con A. Cada monômero dessa lectina possui 1 sítio de reconhecimento de carboidratos (DRC) e, em geral, quando em pH fica próximo a 7,0, a Con A assume uma estrutura tetramérica, já entre pHs 5,0 – 7,0 apresenta-se como dímeros e tetrâmeros [22,23]. Assim, nas condições experimentais analisadas neste trabalho, a Con A apresentará no mínimo dois DRCs, podendo interagir por um deles

com a superfície da *C. albicans* e ainda possuir outro para interação com o conjugado de PQs-GT [24].

Após o período de incubação, o sistema *C. albicans*/Con A foi lavado e ressuspenso em 1 mL de solução salina. Depois, os PQs-GT – diluídos previamente em solução salina 5x – foram incubados com a suspensão de *C. albicans*/Con A, na proporção de 1:1 v/v (PQs-GT:*C. albicans*/ConA) por 15 min, em agitador orbital (BioSan - Bio RS-24), conforme ilustra a Figura 2A.

Adicionalmente, para avaliar a especificidade da interação entre *C. albicans*/ConA e os conjugados PQs-GT, foi realizada uma inibição dos sítios da lectina com metil- α -D-manopiranosídeo (Sigma-Aldrich), conforme ilustrado na Figura 2B. Para isso, 500 μ L da suspensão de *C. albicans*/ConA foi incubada com metil- α -D-manopiranosídeo, na concentração final de aproximadamente 0,4 mM desse carboidrato, durante 60 min à temperatura ambiente (TA, \sim 25 $^{\circ}$ C), em agitação orbital (BioSan - Bio RS-24). Em seguida, o sistema *C. albicans*/Con A/manopiranosídeo foi centrifugado (775 \times g, 2 min) e ressuspenso em 1,0 mL de solução salina e incubado com os conjugados PQs-GT, seguindo o mesmo procedimento e proporções utilizadas sem inibição. Em seguida, os sistemas *C. albicans*/Con A/PQs-GT (teste) e *C. albicans*/Con A/manopiranosídeo/PQs-GT (inibido) foram centrifugados (775 \times g, 60 s), ressuspenso em 200 μ L de solução salina e analisados em um citômetro de fluxo BD Accuri C6 (Becton Dickinson) com excitação em 488 nm e a emissão foi coletada utilizando o filtro *bandpass* (FL4 - 675/25 nm). Os ensaios foram realizados pelo menos em duplicata, o sistema *C. albicans*/ConA foi considerado como controle para delimitação da autofluorescência (células não marcadas pelo conjugado PQs-GT), e foram coletados 20.000 eventos (no *gate*) para cada sistema, sendo expressos como média \pm erro padrão.

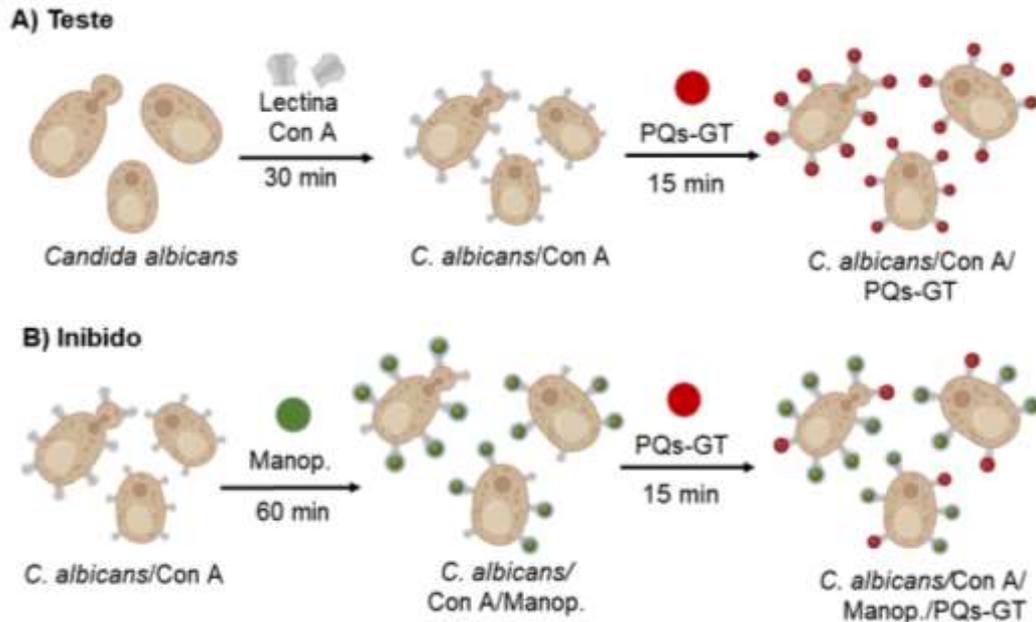


Figura 2 – Esquema ilustrativo das etapas envolvidas no ensaio de interação do conjugado PQs-GT com *C. albicans*. (A) Incubação da *C. albicans* com Con A e em seguida com o conjugado. (B) Incubação do sistema *C. albicans*/ConA com metil- α -D-manopiranosídeo (Manop.) para inibição dos sítios da Con A e em seguida com o conjugado. Con A = concanavalina A, PQs: pontos quânticos e GT: glicose tiolada. Adaptada de Pereira (2021).

Interação do Conjugado com Monocamadas e Esferoides de Células de Câncer

Os PQs-GT foram incubados com as células HeLa cultivadas em monocamada e em forma de esferoide para estudar o perfil de interação com os conjugados PQs-GT nesses dois modelos biológicos.

Para a análise da monocamada por microscopia de fluorescência, esperou-se as células HeLa atingirem 80 - 90% de confluência, para então serem tripsinizadas (Tripsina 0,25% - Gibco) e contadas em uma câmara de Neubauer. Cerca de 50.000 células/poço foram semeadas em poços de placas para microscópio invertido de 4 compartimentos (Greiner Bio-One – REF. 3516) e, em seguida permaneceram na incubadora a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 h para as células aderirem à placa. Após apresentarem alta confluência, foi realizada uma incubação prévia sob privação de glicose por 30 min, e em seguida as células foram incubadas com o conjugado PQs-GT na proporção 1:1 v:v (PQs-GT:PBS), por 30 min, também a 37 °C e 5% de CO₂.

Para o estudo com esferoides, os mesmos foram coletados da placa de Petri e transferidos para a placa de 4 compartimentos (Greiner Bio-One – REF. 3516), foram lavados 4x para retirar o meio de cultura e qualquer resquício de células que não

tenham sido aderidas ao esferoide. Posteriormente, foram incubados com os conjugados PQs-GT. Para os esferoides, também foi feita uma incubação prévia com privação de glicose por 30 min, e logo depois foi adicionado o conjugado. Para os esferoides foi usada uma proporção de 1:50 v:v (PQs-GT:PBS), por 30 min a 37 °C, 5% de CO₂. Foi utilizado inicialmente um volume menor de conjugado, pois o número inicial de células para formar o esferoide é menor do que a quantidade de células plaqueadas para monocamada.

Em ambos modelos biológicos, para os ensaios no microscópio de fluorescência convencional, após a incubação com os conjugados, os núcleos das células foram contracolorados com 300 µL o corante nuclear Hoescht (1.000 µg/mL) por 5 min a 37 °C. As células foram analisadas em microscópio de fluorescência (Leica, DMI 4000B) usando os filtros *bandpass* de 560/40 nm (excitação) e 645/75 nm (emissão). Foi também realizada microscopia de fluorescência confocal (Fluoview FV1000, Olympus) dos esferoides incubados com o conjugado PQs-GT. As amostras foram excitadas em 473 nm e a detecção foi tipo multiespectral na região de fluorescência do nanossistema (590 a 690 nm).

Para a avaliação da interação do sistema PQs-GT com monocamada por citometria de fluxo, após tripsinização cerca de 200.000 células foram semeadas em poços de placas de 24 poços (Nest Biotechnology - MPCC24E), e após 24 h, quando atingiram 90% de confluência, foram incubadas segundo o mesmo protocolo descrito acima para microscopia.

As células foram analisadas no citômetro de fluxo com excitação em 488 nm e a emissão foi coletada utilizando o filtro *bandpass* (FL4 - 675/25 nm). Os ensaios foram realizados pelo menos em duplicata, o sistema apenas com células HeLa foi considerado como controle para delimitação da autofluorescência (células não incubadas com o conjugado PQs-GT), e foram coletados 20.000 eventos (no *gate*) para cada sistema, sendo apresentados como média ± erro padrão.

Resultados e Discussão

Preparação dos Esferoides

Para que sejam formados esferoides, as células devem agregar-se umas às outras e compactar-se formando uma estrutura 3D única, com forma esferoidal, assim como é nomeado esse modelo biológico. Neste caso, é necessário impedir que haja

aderência das células à placa, para isso, o método da gota suspensa [17, 25] foi utilizado nesse trabalho.

O método da gota suspensa foi escolhido dentre os demais, por apresentar um consumo reduzido de reagentes, baixo custo e um controle satisfatório da formação a partir da densidade de células ofertada, volume da gota e dias de incubação [17].

A metodologia de análise direta da placa de Petri no microscópio invertido se mostrou simples e eficaz, possibilitando a observação das gotas cultivadas sem causar nenhuma interferência mecânica nos esferoides. De acordo com o estudo de Foty et al. [17], com 24 h de incubação já é possível ter um indicativo se as condições escolhidas vão favorecer ou não a formação dos esferoides. Assim, com esse tempo de incubação já foi possível eliminar algumas variações testadas.

De acordo com os resultados, a formação de esferoides a partir das gotas de 10 e 20 μL apresentou baixa reprodutibilidade (cerca de 16 e 34%, respectivamente), para as densidades de células testadas. Acreditamos que esse fato foi devido à pouca oferta de meio de cultura, que foi insuficiente para que essas gotas ficassem satisfatoriamente suspensas, dificultando a agregação das células. Nos casos em que os esferoides foram formados, a morfologia não foi típica esferoidal, assim como desejável. Para a gota de 40 μL também houve baixa reprodutibilidade (em torno de 5%), a qual pode ter acontecido por as gotas possuírem líquido demais, não favorecendo o contato entre as células para se agregarem e formar o esferoide. Na gota de 50 μL , observou-se uma situação ainda mais crítica, na qual houve até mesmo dificuldade ao inverter a gota na placa, pois devido a menor tensão superficial, a gota se espalhou, não favorecendo a agregação das células e, portanto, a formação do esferoide.

Acreditamos que o volume intermediário da gota, de 30 μL , apresentou uma boa relação entre a quantidade de meio de cultura e número de células, favorecendo a agregação celular para a formação do esferoide. Observou-se que houve formação de esferoides nas gotas de 30 μL a partir de todas as densidades celulares testadas (Figura 3), com reprodutibilidade satisfatória (cerca de 50%). As densidades de células de 5.000, 7.500, 10.000 e 20.000 células/mL também podem ser expressas em 150, 225, 300, e 600 células/gota respectivamente, para uma análise comparativa com a literatura.

Esse resultado corrobora com Zhao et al. 2019 [26] que também formaram esferoides compactos a partir da gota de 30 μL , de distintas linhagens de células de câncer (adenocarcinoma de mama MCF-7, MDA-MB-231 e fibrossarcoma HT1080) e com densidades celulares diferentes (250 a 6.000 células por gota).

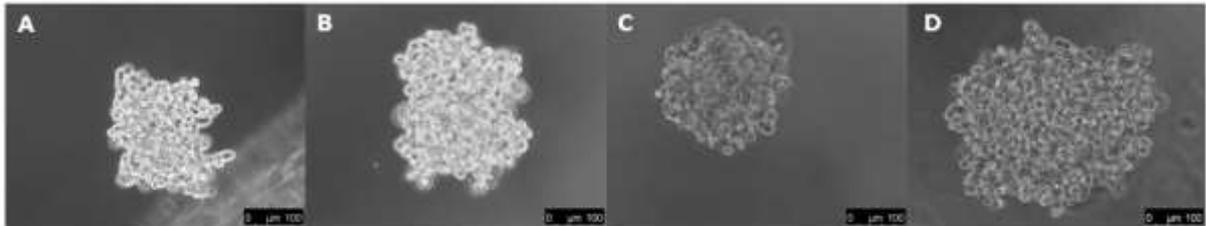


Figura 3 – Imagens representativas de microscopia óptica relativas à formação de esferoides para gota de 30 μL e 24 h de formação: (A) 5.000 células/mL (tamanho médio 220 μm); (B), 7.500 células/mL (tamanho médio 230 μm); (C) 10.000 células/mL (tamanho médio 240 μm) e (D) 20.000 células/mL (tamanho médio 330 μm). Barra de escala: 100 μm .

Dentre as variações provenientes da gota de 30 μL , a que apresentou maior taxa de reprodutibilidade (ca. 83%), foi a proveniente da densidade de células de 20.000 células/mL. A Figura 4 ilustra esferoides formados utilizando gota de 30 μL e 20.000 células/mL, no decorrer das 96 h de cultivo. A partir dessa variação foram formadas microestruturas compactas esferoidais de tamanho satisfatório (entre 150 – 450 μm) de acordo com a literatura [37], já com 48 h incubação, por isso essa variação foi escolhida para dar seguimento com os experimentos.

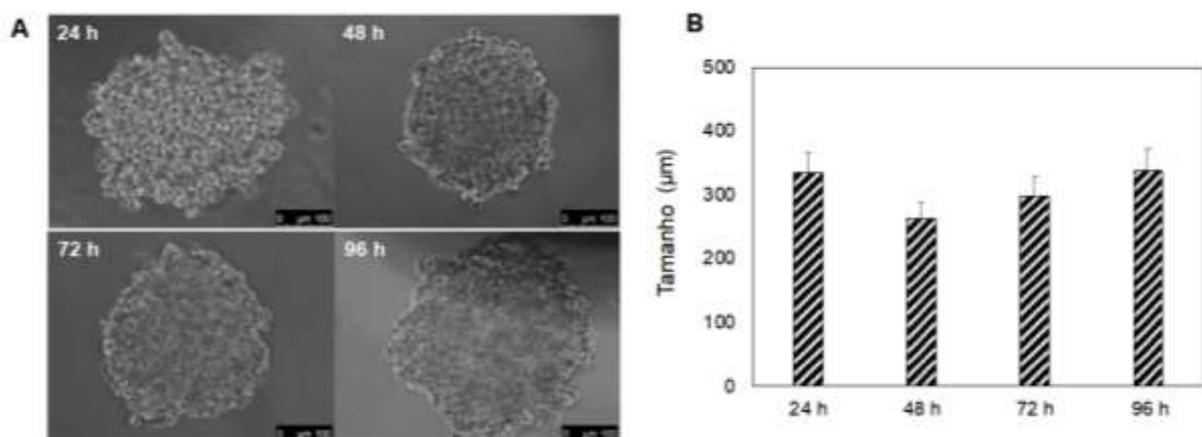


Figura 4 – (A) Imagens representativas de microscopia óptica relativas à formação de esferoides provenientes da gota de 30 μL com densidade celular de 20.000 células/mL, ao longo das 96 h de cultivo. Barra de escala: 100 μm . (B) Tamanho médio do esferoide proveniente da gota de 30 μL , com densidade de células de 20.000 células/mL, no decorrer do tempo de incubação de 96 h.

Foi observado que após 24 h de incubação o esferoide apresentou um tamanho médio maior que para 48 h (Figura 4B), apresentando-se um pouco frouxo. A diminuição do tamanho do esferoide para 48 h deve-se ao fato de que ocorreu o processo de compactação das células. Após esse tempo, o esferoide tendeu a aumentar proporcionalmente de tamanho, para 72 e 96 h.

Esse perfil está de acordo com Ware et al. [27] que prepararam esferoides de células de câncer pancreático humano (Panc-1) utilizando o método da gota suspensa, e mostrou que os esferoides apresentaram um tamanho maior nas primeiras 24 h de cultivo, apresentando-se frouxos, e tiveram uma diminuição de tamanho nos tempos de 48 h e 72 h devido ao processo de compactação, e a partir disso observaram um aumento de tamanho até 96 h, e ocorrendo depois uma estabilização.

Caracterização Óptica dos PQs e Conjugados PQs-GT

De acordo com as caracterizações ópticas, a suspensão aquosa de PQs apresentou um primeiro máximo de absorção em 620 nm (Figura 5A – linha tracejada). A partir do máximo de absorção foi estimado um diâmetro médio de aproximadamente 3,9 nm para essas NPs. Além disso, a partir do valor do primeiro máximo da absorção e do coeficiente de extinção molar, estimou-se uma concentração média de aproximadamente 8,8 μM para a suspensão de PQs [28, 29, 30]. Os PQs apresentaram uma emissão máxima a 650 nm e uma largura total a meia máxima (FWHM) de cerca de 65 nm (Figura 5A – linha sólida).

Após a conjugação com a GT, não foram observadas diferenças significativas no espectro de absorção. Em relação ao espectro de emissão (Figura 5B – linha tracejada), os conjugados apresentaram um máximo de emissão de fluorescência praticamente no mesmo comprimento de onda dos PQs, sem alteração no FWHM. Houve uma diminuição na intensidade da emissão de fluorescência para PQs-GT, mas esses nanossistemas continuaram ainda bastante fluorescentes, como ilustra o *inset* da Figura 5B. Esse perfil já foi também observado em conjugações envolvendo PQs de CdTe estabilizados com AMS e outras moléculas [6, 18].

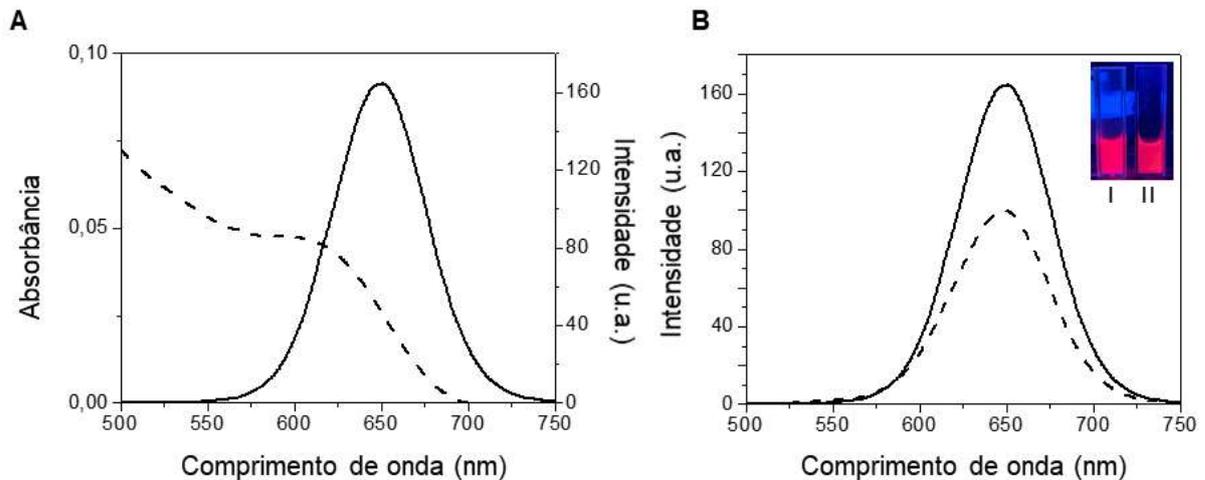


Figura 5 – Caracterização óptica dos PQs e PQs-GT. (A) Espectros de absorção (linha tracejada) e de emissão (linha sólida) dos PQs. (B) Espectros de emissão dos PQs (linha sólida, inserção I) e conjugados PQs-GT (linha tracejada, inserção II), $\lambda_{exc} = 405$ nm.

Avaliação da Conjugação

Análise por Espectroscopia de Correlação por Fluorescência (FCS)

A partir da média de 10 curvas de correlação por fluorescência, o tempo de difusão (τ_D) médio adquirido para os PQs foi em torno de 148 μ s, já para o conjugado PQs-GT, foi cerca de 571 μ s (Tabela 1). A partir de τ_D e da Eq. 1, diâmetros hidrodinâmicos de 3,7 e 14,1 nm foram obtidos, respectivamente, para PQs e PQs-GT. Conforme observado, a técnica FCS permitiu distinguir os nanossistemas, ainda que a conjugação tenha sido realizada com pequenas moléculas por ser uma técnica de alta sensibilidade [19, 20, 31]. O tamanho dos PQs encontrado pelo FCS está bem próximo do valor estimado a partir do espectro de absorção ($d = 3,9$ nm). Assim, os dados do FCS indicam que a glicose tiolada foi conjugada na superfície dos PQs.

Assim como no presente estudo, a técnica de FCS já se mostrou efetiva para avaliar conjugações envolvendo PQs de CdTe estabilizados com AMS e outras pequenas moléculas [19, 21,10]. Monteiro et al. [19], por exemplo, confirmaram a conjugação desses PQs com o ácido 3-mercaptopenilborônico usando FCS, enquanto Pereira et al. [10] também usaram essa técnica para sondar modificações na superfície desses PQs após associação com a D-glicosamina.

Tabela 1 – Tempos de difusão e diâmetros expressos como média \pm erro padrão obtidos por espectroscopia de correlação por fluorescência para os PQs e conjugados de PQs com glicose tiolada (PQs-GT).

Amostra	Tempo de difusão (μ s)	Diâmetro hidrodinâmico (nm)
PQs	148 \pm 14	3,7 \pm 0,4
PQs-GT	571 \pm 86	14,1 \pm 2,1

Avaliação da Conjugação com Leveduras de *Candida albicans*

A metodologia de avaliação da conjugação dos PQs à glicose tiolada por meio da interação da Con A (lectina ligada à superfície de *C. albicans*) com os conjugados, utilizando citometria de fluxo, se apresentou como uma ferramenta quantitativa e prática.

Os conjugados PQs-GT marcaram cerca de 98,9 \pm 0,3% das leveduras (*C. albicans*/Con A), conforme apresentado na Figura 6B (controle na Figura 6A). Essa marcação se deu, devido a existência de resíduos de carboidratos na superfície da *C. albicans* com os quais a Con A apresenta afinidade, a qual também permite interação com o conjugado *via* glicose [29].

Após a inibição prévia dos sítios da Con A com metil- α -D-manopiranosídeo no sistema *C. albicans*/Con A, com posterior adição dos conjugados PQs-GT (*C. albicans*/ConA/Manop. – Figura 6C), foi observada uma redução da marcação das leveduras para 20,9 \pm 8,1%. Essa redução observada pela citometria de fluxo reflete que o metil- α -D-manopiranosídeo interagiu com os DRCs da Con A, fazendo com que houvesse diminuição dos sítios dessa lectina disponíveis para o conjugado se ligar. Esses dados contribuem para comprovar que houve conjugação dos PQs à glicose tiolada, corroborando o FCS. Dessa forma, as avaliações da conjugação indicam que foram aqui desenvolvidos conjugados baseados em PQs e GT promissores para aplicação em estudos sobre a biologia do câncer. Além disso, as nanossondas mantiveram-se funcionais por pelo menos cerca de 40 dias, conforme avaliado pelo ensaio com leveduras de *C. albicans*.

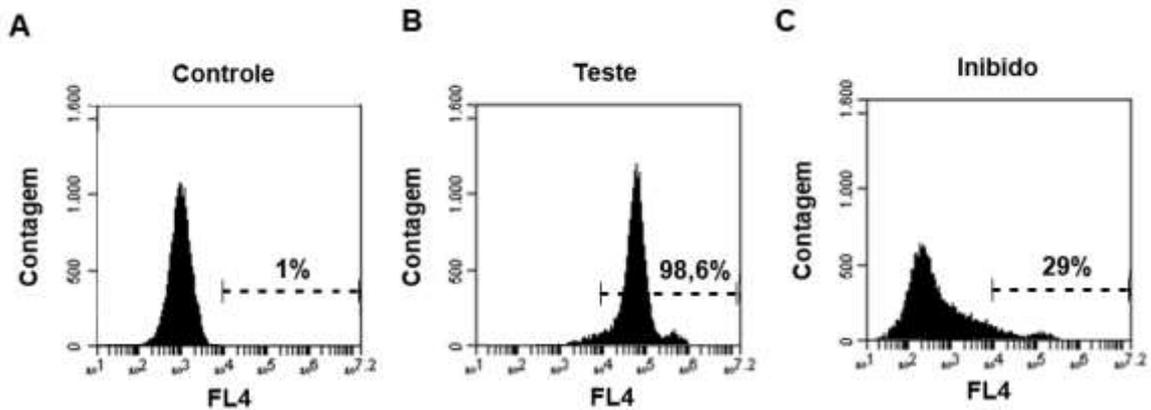


Figura 6 – Histogramas representativos de (A) *Candida albicans* revestida com a lectina Con A (*C. albicans*/Con A, controle), (B) *C. albicans*/Con A incubada com PQs-GT e (C) *C. albicans*/Con A previamente inibida com metil- α -D-manopiranosídeo e incubada com PQs-GT.

Interação do Conjugado com Monocamadas e Esferoides de Células de Câncer

De acordo com a análise de microscopia de fluorescência, as células HeLa cultivadas em monocamadas foram marcadas intracelularmente pelos conjugados PQs-GT (Figura 7A, fluorescentes no vermelho). O núcleo das células é mostrado em azul, marcado pelo corante fluorescente Hoechst (Figura 7A). O uso do marcador nuclear foi interessante para ajudar a inferir sobre a localização dos PQs-GT no interior celular. O resultado indica que uma incubação de 30 min já foi suficiente para ocorrer a captação do conjugado PQs-GT pelas células HeLa. Pontos vesiculares, pelo citoplasma e próximos ao núcleo, foram observados.

Ao analisar as células HeLa cultivadas em monocamada por citometria de fluxo, uma marcação em torno de $37,8\% \pm 7,4$ foi obtida, após apenas 30 min de incubação, como ilustra a Figura 7C (controle na Figura 7B), um tempo menor do que o encontrado na literatura, de 60 min a 4 h, para outras gliconanossondas baseadas em PQs [8,10].

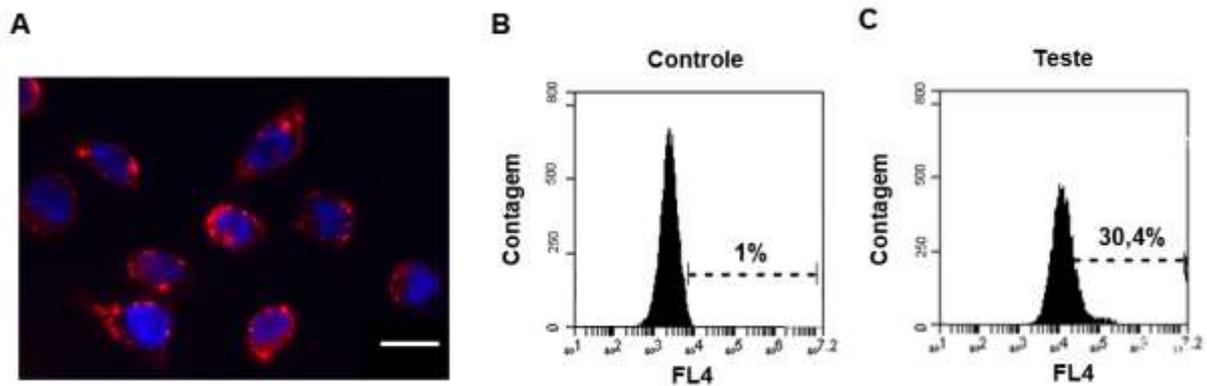


Figura 7 – Do lado esquerdo, marcação por microscopia de fluorescência de células HeLa. Em (A) são observados padrões de marcações fluorescentes vesiculares em vermelho dos conjugados PQs-GT. A fluorescência em azul indica os núcleos marcados pelo corante Hoechst. Barra de escala: 50 μ m. Do lado direito, histogramas representativos de citometria de fluxo de células HeLa. Em: (B) apenas células HeLa (controle) e (C) células HeLa marcadas por PQs-GT.

Devido ao esferoide ser um modelo tridimensional (3D), na microscopia de fluorescência convencional, que não faz seções ópticas, foram adquiridas imagens da microestrutura como um todo, utilizando o foco do microscópio em diferentes posições para melhor observar o perfil de marcação com o conjugado (Figuras 8A e 8B). Nessa análise, a marcação dos núcleos pelo corante Hoechst também ajudou a estudar a interação com o nanossistema. Assim, na Figura 8A se observa um perfil de marcação do esferoide bem delimitado na sua região central, enquanto na Figura 8B se visualiza um perfil de marcação bem delimitado na borda da microestrutura.

Nas Figuras 8C e 8D pode-se visualizar imagens adquiridas por microscopia confocal, que faz seções ópticas nos canais de aquisição de fluorescência. Na imagem de contraste de fase é possível observar células em outros planos focais, devido ao aspecto tridimensional do esferoide, com dimensões na faixa de 300 μ m. Nota-se que a morfologia das células tem um aspecto arredondado no esferoide, diferente da monocamada. A análise por microscopia confocal foi utilizada para observar a marcação pelo conjugado, buscando mais detalhes em nível celular, por isso aqui evitou-se ter interferências provenientes de marcações do núcleo. Pela Figura 8C, visualiza-se que há também marcação no citoplasma celular com alguns pontos vesiculares. Assim, pela análise do esferoide por meio da microscopia de fluorescência se conclui que ocorreu uma marcação efetiva dessa microestrutura pelo conjugado em 30 min de incubação.

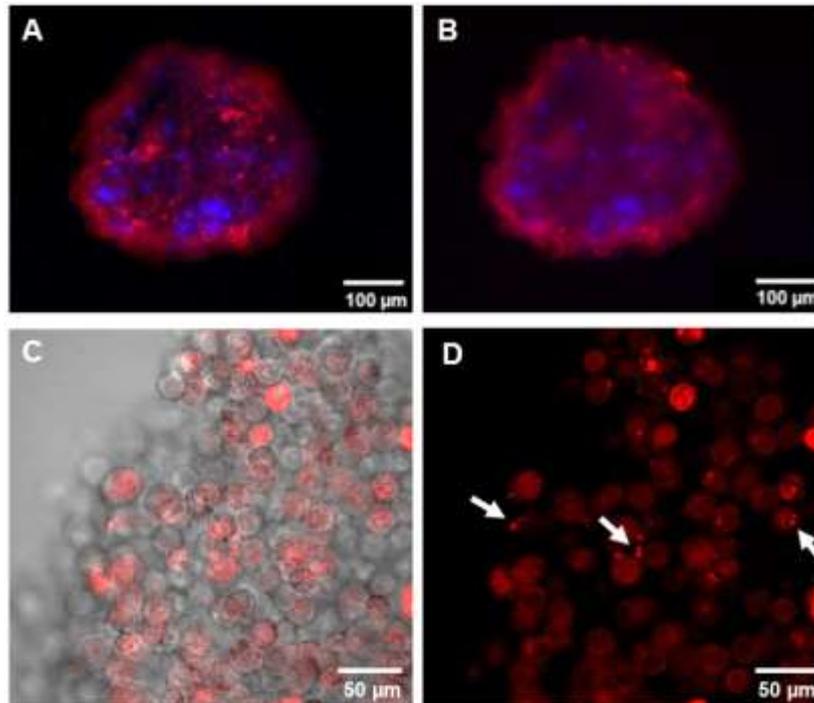


Figura 8 – Marcação do esferoide de HeLa pelos conjugados PQs-GT (em vermelho). Na parte superior, marcação por microscopia de fluorescência. Em: (A) marcação bem delimitada na região central do esferoide e (B) marcação bem delimitada na borda do esferoide. A fluorescência em azul do núcleo das células indica marcação pelo corante Hoechst. Barra de escala: 100 μm . Na parte inferior, marcação por microscopia fluorescência confocal. Em (C) superposição de imagem por contraste de fase e fluorescência e (D) Marcação de seção óptica fluorescente. Nas imagens de microscopia confocal é possível observar marcação no citoplasma com alguns pontos vesiculares. Barra de escala: 50 μm .

A linhagem de células HeLa é um dos modelos mais bem consolidados na literatura para estudos da biologia celular do câncer e vem sendo aplicada tanto como monocamadas quanto esferoides [18,32]. Nesse contexto, diferentes conjugados baseados em PQs, como o desenvolvido neste estudo, vêm sendo aplicados em investigações utilizando essa linhagem, e esses têm ajudado a elucidar a captação de diferentes moléculas essenciais ao metabolismo do câncer, tais como a transferrina e o ácido fólico [18,19,33].

Cabral Filho et al., conjugaram PQs à transferrina para estudar a expressão, internalização e reciclagem de receptores dessa molécula em linhagens de células de câncer, incluindo células HeLa cultivadas em monocamada [18]. Os autores observaram pequenas vesículas no citoplasma, após 60 min de incubação, assim como observado para o conjugado de PQs-GT no presente estudo.

Michalska et al., conjugaram PQs de $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ ao peptídeo RGD internalizante (iRGD), a fim de estudar o perfil de penetração desse nanossistema em monocamada e esferoides, e avaliar seu potencial como nanocarreador específico para células de câncer [34]. Nesse estudo, os esferoides de células HeLa, também preparados pela técnica da gota suspensa, apresentaram marcação no interior celular, visualizando-se pequenas vesículas, após 60 min de incubação, seguindo padrão semelhante à do nosso trabalho, após 30 min de interação. Na monocamada, a marcação seguiu também o mesmo perfil.

Uma vez que compreender a captação diferencial de análogos de glicose por células de câncer se faz relevante na busca por métodos diagnósticos e terapêuticos mais efetivos para essa doença, diferentes autores vêm propondo o desenvolvimento e aplicação de gliconanossondas baseadas em PQs, a fim de explorar as vantajosas propriedades ópticas dessas nanopartículas [8,9,10].

Ge et al. [10] prepararam conjugados constituídos por PQs de Ag_2Se (sintetizados por via hidrofóbica) e D-glicosamina, por ligação covalente utilizando carbodiimidias, e incubaram esses nanossistemas com células de câncer de mama MCF-7 por 4 h. Cerca de 94% das células foram marcadas na citometria de fluxo e um sinal fluorescente foi visualizado na região citoplasmática na microscopia. Pereira et al. 2021, também prepararam conjugados de PQs com D-glicosamina, via carbodiimidias. Os autores utilizaram PQs de CdTe preparados em meio aquoso, assim como no presente trabalho, e incubaram os conjugados com células HeLa por 60 min, obtendo uma marcação de ca. 97% [10]. Na microscopia, foram visualizadas vesículas no citoplasma e áreas mais densamente marcadas próximas ao núcleo.

Um padrão de captação semelhante ao desses conjugados também foi observado na microscopia de fluorescência no presente trabalho, e cerca de 38% das células foram marcadas na citometria de fluxo, utilizando, no entanto, apenas 30 min de incubação. Vale a pena mencionar que aqui foi também realizado um ensaio inicial com células de câncer de mama MDA-MB-231, cultivada em monocamada, a fim de prospectar sobre a captação de análogos de glicose por diferentes linhagens. Interessantemente, uma marcação de aproximadamente 90,5% foi obtida com o mesmo tempo de incubação, instigando novos estudos com o conjugado desenvolvido considerando variações nos tempos de incubações, análogos de glicose utilizados e também nas linhagens celulares. Dessa maneira, acreditamos que a nova

gliconanossonda baseada em PQs e GT desenvolvida nesse trabalho apresenta potencial para ser aplicada em estudos associados à biologia do câncer.

Há ainda poucos estudos reportados na literatura sobre a preparação, bem como aplicação, de conjugados baseados em PQs e análogos de glicose [8,9,10]. Com exceção de Pereira et al. 2022, os trabalhos empregam PQs sintetizados por via hidrofóbica que precisam de procedimentos adicionais para torna-los hidrofílicos permitindo sua aplicação biológica [8,10] Ademais, esses estudos, utilizaram essencialmente a ligação covalente por carbodiimidas entre PQs e D-glicosamina na preparação dos conjugados. Assim, até onde sabemos, o presente estudo é o primeiro a empregar um análogo de glicose que contém grupos tiol, e a explorar a afinidade direta desse grupo pela superfície semicondutora dos PQs, obtendo novas gliconanossondas por um procedimento simples, rápido e direto.

Conclusão

Foram preparados esferoides a partir de células HeLa com morfologia característica pela técnica da gota suspensa, a qual se mostrou efetiva, simples e de baixo custo. Ademais, assim como indicado pelas caracterizações da conjugação, a GT foi associada com efetividade à superfície dos PQs, sendo obtidos nanossistemas que exibiram estabilidade coloidal, alta fluorescência e mantiveram-se funcionais por pelo menos cerca de 40 dias. As análises por técnicas fluorescentes indicaram uma captação promissora do conjugado pelas células HeLa cultivadas em monocamada e também como esferoides, em apenas 30 min de incubação, sendo observada fluorescência proveniente do interior celular com visualização de vesículas. Portanto, nesse estudo, foram desenvolvidas novas gliconanossondas que se mostraram potenciais ferramentas para serem aplicadas tanto em modelos biológicos mais simples como em mais complexos, tais como os esferoides, visando estudos sobre a captação de análogos de glicose guiados por fluorescência, na busca de melhor compreender processos relacionados à biologia celular do câncer.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia (FACEPE);

Institutos Nacionais de Fotônica (INFo); Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC); Departamento de Bioquímica (UFPE).

Referências

1. FADAKA, A. et al. Biology of glucose metabolism in cancer cells. **Journal of Oncological Sciences**, v. 3, n. 2, p. 45–51, 2017.
2. MULLAPUDI, Sneha Sree et al. Potentiating anti-cancer chemotherapeutics and antimicrobials via sugar-mediated strategies. **Molecular Systems Design & Engineering**, v. 5, n. 4, p. 772-791, 2020.
3. GALLAMINI, Andrea; ZWARTHOD, Colette; BORRA, Anna. Positron emission tomography (PET) in oncology. **Cancers**, v. 6, n. 4, p. 1821-1889, 2014.
4. REITER, Russel J. et al. Melatonin inhibits Warburg-dependent cancer by redirecting glucose oxidation to the mitochondria: a mechanistic hypothesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 13, p. 2527-2542, 2020.
5. BARRON, C. C. et al. Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 65, n. 2, p. 124–139, 2016.
6. PEREIRA, Goreti et al. (Bio) conjugation strategies applied to fluorescent semiconductor quantum dots. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, p. 2536-2561, 2019.
7. FARZIN, Mohammad Ali; ABDOOS, Hassan. A critical review on quantum dots: From synthesis toward applications in electrochemical biosensors for determination of disease-related biomolecules. **Talanta**, v. 224, p. 121828, 2021.
8. GE, Xiao-Lei et al. Glucose-functionalized near-infrared Ag₂Se quantum dots with renal excretion ability for long-term in vivo tumor imaging. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, n. 38, p. 5782-5788, 2019.
9. RANJBAR-NAVAZI, Zahra et al. Cadmium-free quantum dot-based theranostics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 386-400, 2019.
10. PEREIRA, Marisa Isabela de Andrade. “Desenvolvimento de nanossondas bifuncionais baseadas em Pontos Quânticos para aplicações no estudo da biologia do câncer” Tese de doutorado (2022).

11. KE, H. et al. Cellular binding and uptake of fluorescent glucose analogs 2-NBDG and 6-NBDG occurs independent of membrane glucose transporters. **Biochimie**, v. 190, p. 1–11, 2021.
12. PAJAK, B. et al. 2-Deoxy-d-Glucose and Its Analogs: From Diagnostic to Therapeutic Agents. **International Journal of Molecular Sciences** **2020**, Vol. 21, v. 21, n. 234, 2019.
13. JENSEN, Caleb; TENG, Yong. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture? **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, n. 33, 2020.
14. GUNTI, Sreenivasulu et al. Organoid and spheroid tumor models: Techniques and applications. **Cancers**, v. 13, n. 4 874, 2021.
15. ANTONI, D. et al., Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 5517–5527, 2015.
16. TCHORYK, Aleksandra et al. Penetration and uptake of nanoparticles in 3D tumor spheroids. *Bioconjugate Chemistry*, v. 30, p. 1371-1384, 2019.
17. FOTY, Ramsey. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 51, p. e2720, 2011.
18. CABRAL FILHO, P. E. et al. CdTe quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1860, p. 28–35, 2016.
19. MONTEIRO, Camila AP et al. Quantum dots functionalized with 3-mercaptophenylboronic acids as novel nanoplatfoms to evaluate sialic acid content on cell membranes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 193, 111142, 2020.
20. DE THOMAZ, A. A. et al. Measurement of the Hydrodynamic Radius of Quantum Dots by Fluorescence Correlation Spectroscopy Excluding Blinking. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, p. 4294–4299, 2015.
21. CABRAL FILHO, Paulo E. et al. Blood group antigen studies using CdTe quantum dots and flow cytometry. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 4393-4404, 2015.

22. YAN, S. et al. Synthesis of water-soluble Ag₂Se QDs as a novel resonance Rayleigh scattering sensor for highly sensitive and selective ConA detection. **Analyst**, v. 139, p. 4210–4215, 2014.
23. YONZON, C. R. et al. A comparative analysis of localized and propagating surface plasmon resonance sensors: The binding of Concanavalin A to a monosaccharide functionalized self-assembled monolayer. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, p. 12669–12676, 2004.
24. CHATTERJEE, Anindya; MANDAL, Dipak K. Quaternary association and reactivation of dimeric concanavalin A. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 35, p. 103-109, 2005.
25. WEISWALD, Louis-Bastien; BELLET, Dominique; DANGLES-MARIE, Virginie. Spherical cancer models in tumor biology. **Neoplasia**, v. 17, p. 1-15, 2015.
26. ZHAO, Liang et al. A 3D printed hanging drop dropper for tumor spheroids analysis without recovery. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-14, 2019.
27. WARE, Matthew J. et al. Generation of homogenous three-dimensional pancreatic cancer cell spheroids using an improved hanging drop technique. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 22, p. 312-321, 2016.
28. DAGTEPE, Pinar et al. Quantized growth of CdTe quantum dots; observation of magic-sized CdTe quantum dots. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, p. 14977-14983, 2007.
29. TENÓRIO, Denise PLA et al. CdTe quantum dots conjugated to concanavalin A as potential fluorescent molecular probes for saccharides detection in *Candida albicans*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 142, p. 237-243, 2015.
30. YU, W. William et al. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. **Chemistry of Materials**, v. 15, p. 2854-2860, 2003.
31. PEREIRA, Maria IA et al. Hydrophilic quantum dots functionalized with Gd (III)-DO3A monoamide chelates as bright and effective T₁-weighted bimodal nanoprobe. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

32. MINAMIKAWA-TACHINO, Reiko et al. Time-lapse imaging of HeLa spheroids in soft agar culture provides virtual inner proliferative activity. **PloS One**, v. 15, e0231774, 2020.
33. MANGEOLLE, Tristan et al. The targeting ability of fluorescent quantum dots to the folate receptor rich tumors. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 26, p. 150-156, 2019.
34. MICHALSKA, Martyna et al. iRGD peptide as effective transporter of CuInZnxS2+x quantum dots into human cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 146, p. 9-18, 2016.
35. ULUSOY, Mehriban et al. Evaluation of CdTe/CdS/ZnS core/shell/shell quantum dot toxicity on three-dimensional spheroid cultures. **Toxicology Research**, v. 5, n. 1, p. 126-135, 2016.

5 Conclusão

- Foram desenvolvidos esferoides a partir de células HeLa, pela técnica da gota suspensa, com morfologia característica e preparação reprodutível, utilizando gota de 30 μ L, 20.000 células/mL e 48 h de incubação, os quais foram utilizados no estudo com o conjugado PQs-GT.
- Foi preparada uma nova gliconanossonda baseada na afinidade do grupo tiol da GT com a superfície semicondutora dos PQs e o conjugado exibiu estabilidade coloidal e alta fluorescência.
- As avaliações de conjugação realizadas por FCS e pela metodologia baseada no recobrimento da *C. albicans* com Con A e na afinidade lectina-carboidrato indicaram que houve uma conjugação efetiva entre PQs e a GT e os nanossistemas apresentaram especificidade.
- As células HeLa cultivadas em monocamada e os esferoides captaram de forma efetiva o conjugado PQs-GT em 30 min de incubação, apresentando-se intensamente marcadas.
- Dessa maneira, a nova gliconanossonda desenvolvida nesse trabalho, mostrou ser uma potencial ferramenta para ser aplicada em estudos de captação de análogos de glicose visando uma melhor compreensão de mecanismos associados à biologia celular do câncer, tanto em monocamadas celulares como em modelos mais complexos, como os esferoides. Como perspectiva, é relevante realizar mais estudos com técnicas fluorescentes complementares, envolvendo também outras linhagens celulares.

6 SÚMULA CURRICULAR

Principais atividades científicas e acadêmicas realizadas durante o mestrado:

1. Participação em Eventos:

- Western Blotting Webinar, Ouvinte, 2020.
- Princípios e aplicações de citometria de fluxo, Ouvinte, 2020.
- OSA Imaging and Applied Optics Congress, Ouvinte, 2020.
- OSA 2020 FiO + LS Conference, Ouvinte, 2020.
- III Workshop Entre Luzes e Cristais, Apresentação do trabalho intitulado de Aplicação de Pontos Quânticos em estudos com esferoides tumorais, 2020.
- Imunização por Vacinas: abordagem com o COVID-19, Ouvinte, 2021.
- I Congresso Nacional Multidisciplinar de COVID-19, Ouvinte 2021.
- 9º Workshop Teórico-Prático do INFABiC. Ouvinte, 2021.

2. Projetos de Pesquisa:

- Nanoplatasformas Multifuncionais Baseadas em Pontos Quânticos Para Estudo da Captação de Glicose em Células de Câncer. Situação: em andamento (FACEPE).
- Plataformas Ópticas Multifuncionais para Aplicações em Ciências da Vida. Situação: em andamento (CNPq), 2019-2021.

REFERÊNCIAS

- ALIVISATOS, A. Paul; GU, Weiwei; LARABELL, Carolyn. Quantum dots as cellular probes. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 7, p. 55-76, 2005.
- AN, Rui et al. Photostability and photodegradation processes in colloidal CsPbI₃ perovskite quantum dots. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 10, n. 45, p. 39222-39227, 2018.
- ANNIO, Giacomo et al. Sensitivity enhancement of forster resonance energy transfer immunoassays by multiple antibody conjugation on quantum dots. **Bioconjugate Chemistry**, v. 29, n. 6, p. 2082-2089, 2018.
- ASHREE, Jayshree; WANG, Qi; CHAO, Yimin. Glyco-functionalised quantum dots and their progress in cancer diagnosis and treatment. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, v. 14, n. 3, p. 365-377, 2020.
- ACHILLI, Toni-Marie; MEYER, Julia; MORGAN, Jeffrey R. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 12, n. 10, p. 1347-1360, 2012.
- ASTHANA, Amish; KISAALITA, William S. Microtissue size and hypoxia in HTS with 3D cultures. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 15-16, p. 810-817, 2012.
- BAAL, Nelli et al. In vitro spheroid model of placental vasculogenesis: does it work?. **Laboratory Investigation**, v. 89, n. 2, p. 152-163, 2009.
- BARISAM, Maryam et al. Prediction of necrotic core and hypoxic zone of multicellular spheroids in a microbioreactor with a U-shaped barrier. **Micromachines**, v. 9, n. 3, p. 94, 2018.
- BARRON, Carly C. et al. Facilitative glucose transporters: implications for cancer detection, prognosis and treatment. **Metabolism**, v. 65, n. 2, p. 124-139, 2016.
- BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential—what they are and what they are not?. *Journal of controlled release*, v. 235, p. 337-351, 2016.
- BENITO-ALIFONSO, David et al. Lactose as a “Trojan horse” for quantum dot cell transport. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 3, p. 810-814, 2014.
- BENTOLILA, Laurent A.; MICHALET, Xavier; WEISS, Shimon. Quantum optics: colloidal fluorescent semiconductor nanocrystals (quantum dots) in single-molecule detection and imaging. **Single Molecules and Nanotechnology**, p. 53-81, 2008.
- BRESLIN, Susan; O'DRISCOLL, Lorraine. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 5-6, p. 240-249, 2013.

BRUS, Louis E. Electron–electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state. **The Journal of chemical physics**, v. 80, n. 9, p. 4403-4409, 1984.

CABRAL FILHO, Paulo E. et al. Blood group antigen studies using CdTe quantum dots and flow cytometry. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 4393, 2015.

CABRAL FILHO, P. et al. CdTe quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1860, n. 1, p. 28-35, 2016.

CALEFFI, Juliana Trindade et al. Magnetic 3D cell culture: State of the art and current advances. **Life Sciences**, v. 286, p. 120028, 2021.

CARVALHO, Maria Eduarda T. et al. Evaluating the glyco-phenotype on breast cancer tissues with quantum dots-Cramoll lectin conjugates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 302-308, 2019.

CRACIUN, Ana-Maria et al. One-photon excited photoluminescence of gold nanospheres and its application in prostate specific antigen detection via fluorescence correlation spectroscopy (FCS). **Talanta**, v. 228, p. 122242, 2021.

CUNHA, Cássia RA et al. Quantum dot–Cramoll lectin as novel conjugates to glycobiology. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 178, p. 85-91, 2018.

DA SILVA, Abdênego Rodrigues et al. Quantum dots conjugated to lectins from *Schinus terebinthifolia* leaves (SteLL) and *Punica granatum* sarcotesta (PgTeL) as potential fluorescent nanotools for investigating *Cryptococcus neoformans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 192, p. 232-240, 2021.

DAI, Xingliang et al. 3D bioprinted glioma stem cells for brain tumor model and applications of drug susceptibility. **Biofabrication**, v. 8, n. 4, p. 045005, 2016.

DAWES, Michael L.; SOELLER, Christian; SCHOLPP, Steffen. Studying molecular interactions in the intact organism: fluorescence correlation spectroscopy in the living zebrafish embryo. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 154, n. 5, p. 507-519, 2020.

DÍAZ-GONZÁLEZ, María et al. Quantum dot bioconjugates for diagnostic applications. **Surface-modified Nanobiomaterials for Electrochemical and Biomedicine Applications**, p. 133-176, 2020.

DUAN, Wanxing et al. The activation of β 1-integrin by type I collagen coupling with the hedgehog pathway promotes the epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer. **Current Cancer Drug Targets**, v. 14, n. 5, p. 446-457, 2014.

DURYMANOV, Mikhail et al. Subcutaneous inoculation of 3D pancreatic cancer spheroids results in development of reproducible stroma-rich tumors. **Translational Oncology**, v. 12, n. 1, p. 180-189, 2019.

ESTEVE-TURRILLAS, Francesc A.; ABAD-FUENTES, Antonio. Applications of quantum dots as probes in immunosensing of small-sized analytes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, p. 12-29, 2013.

ETRYCH, Tomáš et al. Fluorescence optical imaging in anticancer drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 226, p. 168-181, 2016.

FADAKA, Adewale et al. Biology of glucose metabolism in cancer cells. **Journal of Oncological Sciences**, v. 3, n. 2, p. 45-51, 2017.

FAN, Shulin et al. Downregulation of the long non-coding RNA ZFAS1 is associated with cell proliferation, migration and invasion in breast cancer. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 5, p. 6405-6412, 2018.

FARZIN, Mohammad Ali; ABDOOS, Hassan. A critical review on quantum dots: From synthesis toward applications in electrochemical biosensors for determination of disease-related biomolecules. **Talanta**, v. 224, p. 121828, 2021.

FAUBERT, Brandon; SOLMONSON, Ashley; DEBERARDINIS, Ralph J. Metabolic reprogramming and cancer progression. **Science**, v. 368, n. 6487, 2020.

FEDER-MENGUS, Chantal et al. New dimensions in tumor immunology: what does 3D culture reveal?. **Trends In Molecular Medicine**, v. 14, n. 8, p. 333-340, 2008.

FOGLIETTA, Federica et al. Methodological aspects and pharmacological applications of three-dimensional cancer cell cultures and organoids. **Life Sciences**, v. 254, p. 117784, 2020.

FOUBERT, Astrid et al. Bioconjugation of quantum dots: Review & impact on future application. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 83, p. 31-48, 2016.

GALLAMINI, Andrea; ZWARTHOED, Colette; BORRA, Anna. Positron emission tomography (PET) in oncology. **Cancers**, v. 6, n. 4, p. 1821-1889, 2014.

GE, Xiao-Lei et al. Glucose-functionalized near-infrared Ag₂Se quantum dots with renal excretion ability for long-term in vivo tumor imaging. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, n. 38, p. 5782-5788, 2019.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HAMILTON, Gerhard. Multicellular spheroids as an in vitro tumor model. **Cancer Letters**, v. 131, n. 1, p. 29-34, 1998.

HERMANSON, Greg T. **Bioconjugate Techniques**. Academic press, 2013.

HONG, Zheng-Yuan et al. Clicking hydrazine and aldehyde: the way to labeling of viruses with quantum dots. **ACS nano**, v. 9, n. 12, p. 11750-11760, 2015.

HOWES, Amy L. et al. 3-Dimensional culture systems for anti-cancer compound profiling and high-throughput screening reveal increases in EGFR inhibitor-mediated cytotoxicity compared to monolayer culture systems. **PloS One**, v. 9, n. 9, p. e108283, 2014.

IGAWA, Kazunari et al. D-glucosamine conjugation accelerates the labeling efficiency of quantum dots in osteoblastic cells. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

IVANOV, Delyan P. et al. Multiplexing spheroid volume, resazurin and acid phosphatase viability assays for high-throughput screening of tumour spheroids and stem cell neurospheres. **PloS One**, v. 9, n. 8, p. e103817, 2014.

JAMIESON, Lauren E.; HARRISON, David James; CAMPBELL, C. J. Chemical analysis of multicellular tumour spheroids. **Analyst**, v. 140, n. 12, p. 3910-3920, 2015.

JAROCKYTE, Greta et al. 3D cellular spheroids as tools for understanding carboxylated quantum dot behavior in tumors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1862, n. 4, p. 914-923, 2018.

KELM, Jens M. et al. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, n. 2, p. 173-180, 2003.

LIU, Xiangming et al. Aqueous synthesis of thiol-capped CdTe quantum dots and its photoluminescence enhancement via room temperature treatment with alkyl chain diamines. **Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures**, v. 57, p. 56-62, 2014.

MANGEOLLE, Tristan et al. The targeting ability of fluorescent quantum dots to the folate receptor rich tumors. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 26, p. 150-156, 2019.

MARTINELLI, Chiara; PUCCI, Carlotta; CIOFANI, Gianni. Nanostructured carriers as innovative tools for cancer diagnosis and therapy. **APL Bioengineering**, v. 3, n. 1, p. 011502, 2019.

MARTINS, Manuel A.; TRINDADE, Tito. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Química Nova**, v. 35, p. 1434-1446, 2012.

MCNAMARA, Karrina; TOFAIL, Syed AM. Nanoparticles in biomedical applications. **Advances in Physics: X**, v. 2, n. 1, p. 54-88, 2017.

MICHALET, Xavier; BENTOLILA, Laurent A.; WEISS, Shimon. Molecular Imaging: Physics and Bioapplications of Quantum Dots.

MONTEIRO, Camila AP et al. Quantum dots functionalized with 3-mercaptophenylboronic acids as novel nanoplatfoms to evaluate sialic acid content on cell membranes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 193, p. 111142, 2020a.

MONTEIRO, Camila AP et al. Evaluating internalization and recycling of folate receptors in breast cancer cells using quantum dots. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 209, n. 111918, 2020b.

MOHAMMADI, Rashin et al. Fluorescence sensing and imaging with carbon-based quantum dots for early diagnosis of cancer: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, p. 114628, 2022.

MULLAPUDI, Sneha Sree et al. Potentiating anti-cancer chemotherapeutics and antimicrobials via sugar-mediated strategies. **Molecular Systems Design & Engineering**, v. 5, n. 4, p. 772-791, 2020.

NASROLLAHI, Fatemeh et al. Incorporation of graphene quantum dots, iron, and doxorubicin in/on ferritin nanocages for bimodal imaging and drug delivery. **Advanced Therapeutics**, v. 3, n. 3, p. 1900183, 2020.

NEUWIRT, Hannes et al. Cancer-associated fibroblasts promote prostate tumor growth and progression through upregulation of cholesterol and steroid biosynthesis. **Cell Communication and Signaling**, v. 18, n. 1, p. 1-18, 2020.

PEREIRA, Goreti et al. (Bio) conjugation strategies applied to fluorescent semiconductor quantum dots. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, p. 2536-2561, 2019.

PEREIRA, Maria IA et al. Hydrophilic quantum dots functionalized with Gd (III)-DO3A monoamide chelates as bright and effective T 1-weighted bimodal nanoprobos. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

RANJBAR-NAVAZI, Zahra et al. Doxorubicin-conjugated D-glucosamine-and folate-bi-functionalised InP/ZnS quantum dots for cancer cells imaging and therapy. **Journal of Drug Targeting**, v. 26, n. 3, p. 267-277, 2018.

RASHEED, Mohamed Rizwan Haroon Al; TARJAN, Gabor. Succinate dehydrogenase complex: an updated review. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 142, n. 12, p. 1564-1570, 2018.

REITER, Russel J. et al. Melatonin inhibits Warburg-dependent cancer by redirecting glucose oxidation to the mitochondria: a mechanistic hypothesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 13, p. 2527-2542, 2020.

RESHMA, V. G.; MOHANAN, P. V. Quantum dots: Applications and safety consequences. **Journal of Luminescence**, v. 205, p. 287-298, 2019.

RYU, Na-Eun; LEE, Soo-Hong; PARK, Hansoo. Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells. **Cells**, v. 8, n. 12, p. 1620, 2019.

SATO, Norihiro et al. Role of hyaluronan in pancreatic cancer biology and therapy: Once again in the spotlight. **Cancer Science**, v. 107, n. 5, p. 569-575, 2016.

SANTOS, Beate S.; FARIAS, Patrícia MA; FONTES, Adriana. Semiconductor quantum dots for biological applications. In: Handbook of Self Assembled Semiconductor Nanostructures for Novel Devices in Photonics and Electronics. **Elsevier**, 2008. p. 773-798.

SCHMIDT, Christina; SCIACOVELLI, Marco; FREZZA, Christian. Fumarate hydratase in cancer: A multifaceted tumour suppressor. In: Seminars in cell & developmental biology. **Academic Press**, 2020. p. 15-25.

SMITH, Andrew M.; GAO, Xiaohu; NIE, Shuming. Quantum dot nanocrystals for in vivo molecular and cellular imaging. **Photochemistry and Photobiology**, v. 80, n. 3, p. 377-385, 2004.

SOUSA, José CL et al. Synthesis and optical properties of water-soluble CdTe: Zn²⁺ quantum dots prepared by the one-pot approach. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, p. 2496-2501, 2018.

SOUZA, S. Lipossomas fusogênicos para entrega intracelular de pontos quânticos catiônicos hidrofílicos. Dissertação (Trabalho de conclusão de curso) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

SUNG, Hyuna et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

THORENS, Bernard; MUECKLER, Mike. Glucose transporters in the 21st Century. American **Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 298, n. 2, p. E141-E145, 2010.

TRIANA, Manuel A. et al. Quantum dot light-emitting diodes as light sources in photomedicine: photodynamic therapy and photobiomodulation. **Journal of Physics: Materials**, v. 3, n. 3, p. 032002, 2020.

TUNG, Yi-Chung et al. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a hanging drop array. **Analyst**, v. 136, n. 3, p. 473-478, 2011.

VAUPEL, Peter; MULTHOFF, Gabriele. Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. **The Journal of Physiology**, v. 599, n. 6, p. 1745-1757, 2021.

VAUPEL, Peter; SCHMIDBERGER, Heinz; MAYER, Arnulf. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. **International Journal of Radiation Biology**, v. 95, n. 7, p. 912-919, 2019.

VIANA, Osnir S. et al. Comparative study on the efficiency of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* using CdTe quantum dots, Zn (II) porphyrin and their conjugates as photosensitizers. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8893-8912, 2015.

WAGNER, Angela M. et al. Quantum dots in biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 94, p. 44-63, 2019.

WANG, Chongwen et al. Magnetic quantum dot based lateral flow assay biosensor for multiplex and sensitive detection of protein toxins in food samples. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 146, p. 111754, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. 2020.

WU, Xingyong et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 41-46, 2003.

XU, Yali et al. SULT1E1 inhibits cell proliferation and invasion by activating PPAR γ in breast cancer. **Journal of Cancer**, v. 9, n. 6, p. 1078, 2018.

YANG, Zhenyu et al. Mixed-quantum-dot solar cells. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2017.

YANG, Erli; ZHANG, Yuanjian; SHEN, Yanfei. Quantum dots for electrochemiluminescence bioanalysis-A review. **Analytica Chimica Acta**, p. 339140, 2021.

YANG, Muyue et al. The application of nanoparticles in cancer immunotherapy: Targeting tumor microenvironment. **Bioactive Materials**, v. 6, n. 7, p. 1973-1987, 2021.

YAMAWAKI, Kaoru et al. Integrative analyses of gene expression and chemosensitivity of patient-derived ovarian cancer spheroids link G6PD-driven redox metabolism to cisplatin chemoresistance. **Cancer Letters**, v. 521, p. 29-38, 2021.

ZAMBRANO, Angara et al. Glut 1 in cancer cells and the inhibitory action of resveratrol as a potential therapeutic strategy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 13, p. 3374, 2019.

ZANONI, Michele et al. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.