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

ALINE DULCE PITT DA ROCHA OLIVEIRA

PONTOS QUÂNTICOS PARA A AVALIAÇÃO DE RECEPTORES DE TRANSFERRINA E FOLATO E O PERFIL DE L-FUCOSE EM CÉLULAS CANCERÍGENAS MAMÁRIAS HUMANAS

Recife

2018

ALINE DULCE PITT DA ROCHA OLIVEIRA

PONTOS QUÂNTICOS PARA A AVALIAÇÃO DE RECEPTORES DE TRANSFERRINA E FOLATO E O PERFIL DE L-FUCOSE EM CÉLULAS CANCERÍGENAS MAMÁRIAS HUMANAS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profª Drª Adriana Fontes
Co-orientadores: Prof. Dr. Luiz B. Carvalho Júnior; Prof. Dr. Paulo Euzébio Cabral Filho

Recife

2018

Catalogação na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Oliveira, Aline Dulce Pitt da Rocha
Pontos quânticos para avaliação de receptores de transferrina e folato e o perfil de L-Fucose em células cancerígenas / Aline Dulce Pitt da Rocha Oliveira. – 2018.

90 f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Adriana Fontes.
Coorientador: Prof. Dr. Luiz B. Carvalho Júnior.
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Euzébio Cabral Filho
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2018.
Inclui referências.

1. Mamas – Câncer. 2. Lectinas. I. Fontes, Adriana (Orientador). II. Carvalho Júnior, Luiz B. (Coorientador). III. Cabral Filho, Paulo Euzébio (Coorientador). IV. Título.

616.99465 CDD (22.ed.) UFPE/CB – 2018 - 412

ALINE DULCE PITT DA ROCHA OLIVEIRA

PONTOS QUÂNTICOS PARA A AVALIAÇÃO DE RECEPTORES DE TRANSFERRINA E FOLATO E O PERFIL DE L-FUCOSE EM CÉLULAS CANCERÍGENAS MAMÁRIAS HUMANAS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 27/02/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Profª Drª Dijanah Cota Machado
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Drª Denise Patrícia Lins de Azevedo Tenório
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Prof. Dr. Paulo Euzébio Cabral Filho
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Prof. Dr. Eduardo Beltrão
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Prof. Drª. Adriana Fontes
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus Jeová, minha força a cada dia.

À minha orientadora Adriana Fontes por toda a paciência e dedicação.

À minha mãe Alice que sempre foi minha base meu maior incentivo.

Ao meu namorado Italo pelo amor, apoio, cuidado, compreensão e atenção que sempre melhoram meu humor e meu dia.

À minha amiga Cybelle pelos 22 anos de amizade, companheirismo, brincadeiras, apoio, risadas e puxões de orelha.

Aos meus companheiros de laboratório Lara, Camila, Paulo, Carina, Bela, Duda, Ryan, Renan, Marília, Juan, Bruna, Natália, Alice, Cássia, Yago e todos os outros que me ajudaram direta ou indiretamente, de maneira grande ou pequena, mas foram fundamentais para este trabalho se concretizar.

A todos os meus amigos e família que se eu fosse citar por nome iria ficar exaustivo, mas que são presentes na minha vida.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

A todos que acreditam em mim até nos momentos que eu mesma chego a duvidar, e com palavras e ações me dão injeções de ânimo.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

(José de Alencar)

RESUMO

O câncer de mama é um dos principais tipos de câncer em mulheres. Apesar dos avanços atuais, alternativas diagnósticas e terapêuticas mais eficientes ainda são necessárias, as quais poderão ser alcançadas através de uma compreensão mais detalhada da biologia celular deste tipo de câncer. Perfis de carboidratos, bem como de receptores celulares, podem não só estar alterados no câncer, mas também estar relacionados a sua progressão, estágio, potencial de metástase e nível de invasividade. Assim, para uma investigação mais completa dos mecanismos envolvidos no câncer devem ser utilizadas ferramentas capazes de prover informações sobre a dinâmica e os aspectos celulares, as quais podem ser auxiliadas pelo uso de pontos quânticos (PQs). Esses nanocristais de semicondutores possuem uma excepcional resistência à fotodegradação e uma superfície ativa para conjugação a biomoléculas e podem então ser aplicados para fortalecer a compreensão sobre os papéis de receptores celulares e carboidratos no câncer. Nesse trabalho, primeiramente é apresentada uma revisão a respeito de estratégias para conjugar PQs a lectinas ou a carboidratos, bem como as principais aplicações dessas gliconanopartículas. Esse estudo foi publicado na revista BBA *General Subjects*. Posteriormente, biconjugados de PQs com *Ulex europaeus* (PQs-UEA I), transferrina (PQs-Tf) e ácido fólico (PQs-AF) foram preparados e aplicados para estudar a expressão de L-fucose e os perfis de receptores de transferrina (RTfs, um dos responsáveis pela internalização do ferro) e de folato (FRs, responsável pela captação do ácido fólico) em células de adenocarcinoma mamário e carcinoma ductal mamário. Para tanto, os PQs foram sintetizados e conjugados às biomoléculas e suas propriedades ópticas e físico-químicas foram avaliadas. Em seguida, as células foram analisadas através de microscopia confocal e citometria de fluxo. Os resultados de citometria de fluxo mostraram que as linhagens de mama estudadas apresentaram e internalizaram uma quantidade semelhante de RTfs. Todavia, a reciclagem de receptores decresceu da seguinte forma MDA-MB-231 > MCF7 > T47D, demonstrando correlação com o grau de agressividade relatado para cada linhagem. Os resultados de citometria de fluxo para PQs-UEA I indicaram que a linhagem MDA-MB-231, a qual é associada a um maior potencial metastático e invasivo, apresentou um maior nível de L-fucose exposta quando comparada a MCF7 e T47D. As micrografias corroboraram as análises citométricas. A marcação pelos PQs-UEA I foi membranar, já para PQs-Tf observou-se um padrão vesicular de endocitose. O conjugado de PQs-AF reconheceu especificamente FRs nas células, e sua expressão/internalização foi maior para às células HeLa (usada como

modelo) do que para T47D, e a linhagem MCF7 apresentou expressão/internalização extremamente baixa. A reciclagem de FRs não foi significativa para essas linhagens nas condições estudadas. A conjugação de PQs ao AF foi comprovada por espectroscopia de correlação por fluorescência. Assim concluímos que esses bioconjugados mostraram ser ferramentas específicas e promissoras para estudar perfis de receptores e carboidratos em células cancerígenas, permitindo comparações entre essas, contribuindo para a compreensão da biologia celular do câncer, o que é fundamental para se aprimorar o diagnóstico e as abordagens terapêuticas para esta doença.

Palavras-chave: Nanocristais de semicondutores. Câncer de mama. Transferrina. Ácido fólico. Lectinas. L-Fucose.

ABSTRACT

Breast cancer is one of the major types of cancer in women. Despite the current advances, more efficient diagnostic and therapeutic alternatives are still necessary, which can be achieved through a more detailed understanding of the cellular biology of this type of cancer. Carbohydrate profiles, as well as cell receptors, may not only be altered in cancer, but also be related to their progression, stage, potential for metastasis, and level of invasiveness. Thus, for a more complete investigation of the mechanisms involved in cancer, tools should be used to provide information about the dynamics and cellular aspects, which can be supported by using quantum dots (QDs). These semiconductor nanocrystals have exceptional photodegradation resistance and an active surface for conjugation to biomolecules and can then be applied to strengthen the understanding of the roles of cellular receptors and carbohydrates in cancer. In this work, we firstly present a review regarding strategies to conjugate QDs to lectins or carbohydrates, as well as the main applications of these glyconanoparticles. This study was published in the journal BBA General Subjects. Subsequently, bioconjugates of QDs with *Ulex europaeus* (QDs-UEA I), transferrin (QDs-Tf) and folic acid (QDs-FA) were prepared and applied to study L-fucose expression and transferrin receptor profiles, one of those responsible for iron internalization) and folate (FRs, responsible for the uptake of folic acid) in mammary adenocarcinoma cells and mammary ductal carcinoma. For that, the QDs were synthesized and conjugated to the biomolecules and their optical and physicochemical properties were evaluated. The cells lines were then incubated with the bioconjugates and analyzed by confocal microscopy and flow cytometry. Flow cytometry results showed that the breast lines studied presented and internalized a similar amount of TfRs. However, receptor recycling decreased as follows MDA-MB-231> MCF7> T47D, demonstrating correlation with the degree of aggressiveness reported for each. The flow cytometry results for QDs-UEA I indicated that the MDA-MB-231 cell line, which is associated with a greater metastatic and invasive potential, had a higher level of exposed L-fucose when compared to MCF7 and T47D. Confocal microscopy images corroborated the cytometric analysis. QDs-UEA I preferentially labelled membrane, whereas for QDs-Tf a vesicular pattern of endocytosis was observed. The QDs-FA conjugates specifically recognized FRs in cells, and their expression/internalization was greater for HeLa cells (used as a template) than for T47D, and the MCF7 line showed extremely low expression/internalization. The FR recycling was not significant for these strains under the conditions studied. The conjugation of QDs to FA was

confirmed by fluorescence correlation spectroscopy. Thus, we conclude that these bioconjugates have been shown to be specific and promising tools for studying receptor and carbohydrate profiles in cancer cells, allowing comparisons between them, contributing to the understanding of the cellular biology of cancer, which is fundamental to improve diagnosis and therapeutic approaches for this disease.

Keywords: semiconductor nanocrystals. breast cancer. transferrin. folic acid. Lectins. fucose.

LISTAS DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1 - Etapas moleculares fundamentais para o desenvolvimento e progressão molecular do câncer.....**21**

Figura 2 - Sistema de ductos e lóbulos mamários.....**22**

Figura 3 - Estrutura histológica de mama adulta normal. (A) Lóbulos mostrando os ácinos de uma mama adulta. (B) Ducto de uma mama adulta.....**22**

Figura 4 - Dupla camada celular observada nos lóbulos e ductos mamários corte frontal (A) e sagital (B).....**23**

Figura 5 - Esquema da formação do carcinoma ductal *in situ*.....**25**

Figura 6 - Esquema de formação do carcinoma lobular *in situ*.....**26**

Figura 7 - Carcinoma ductal invasivo em diferentes graus de diferenciação: Grau 1 – bem diferenciado (A), Grau 2 – moderadamente diferenciado (B) e Grau 3 – pouco diferenciado (C).....**27**

Figura 8 - Células MCF7 (A), T47D (B), MDA-MB-231 (C).....**29**

Figura 9 - Estrutura cristalográfica da transferrina sérica humana.....**31**

Figura 10 - Estrutura do receptor de transferrina.....**32**

Figura 11 - Ciclo da transferrina.....**33**

Figura 12 - Estrutura molecular do ácido fólico.....**35**

Figura 13 - Representação da internalização/reciclagem do receptor de ácido fólico.....**36**

Figura 14 - Esquema da entrega de cromóforos ou agentes terapêuticos nas células cancerígenas utilizando como alvo os receptores de ácido fólico reduzido.....**37**

Figura 15 - Resíduos de carboidratos expostos na superfície celular.....**38**

Figura 16 - (A) Tojo, planta da qual é extraída a *Ulex europeaus* e **(B)** sua estrutura.....**40**

Figura 17 - Representação esquemática mostrando a disposição das bandas energéticas para os sólidos semicondutores (a) e a relação do *band gap* (*Eg*) entre o *bulk* e PQs com suas correspondentes emissões (b)**.....42**

Figura 18 - Comparação entre espectros de absorção e de emissão de PQs e corante orgânico**.....43**

Figura 19 - Comparação entre a resistência à fotodegradação dos PQs (em vermelho) e corante orgânico Alexa flúor 488 (em verde)**.....44**

Figura 20 - Estrutura do agente estabilizante MSA**.....45**

Figura 21 - Estrutura de um PQ conjugado a uma biomolécula**.....45**

Figura 22 - Métodos de bioconjugação de PQs com biomoléculas**.....46**

MANUSCRITO PREPARADO COM INTENÇÃO DE SER SUBMETIDO PARA O INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES *"Quantum Dots to Investigate Transferrin Receptors and Fucose Profiles in a Comparative Study Among Breast Cancer Cell Lines"*

Figure 1 - (A) Optical characterization of CdTe QDs: absorption (dashed line) and emission (solid line) spectrum. (B) In black, red and blue: emission spectra of bare QDs; QDs-Tf and QDs-UEA I, respectively. Excitation at 488 nm**……..…….52**

Figure 2 - Flow cytometry histogram profiles for A and O RBCs (A and B, respectively) incubated with QDs-UEA I conjugates**…….....53**

Figure 3 - Flow cytometry representative histograms: A – MCF7, B – MDA-MB-231, and C – T47D: (1) control; (2) QDs-Tf labeling and (3) cells exposed to QDs-Tf after the saturation of receptors with free Tf**…….....55**

Figure 4 - Confocal image showing endocytic vesicles in MCF7 due to the labeling by QDs-Tf (in red). In blue: nucleus stained by the Hoescht dye**……..56**

Figure 5 - Flow cytometry representative data: MCF7, MDA-MB-231, and T47D labeled by QDs-UEA I.**…….57**

Figure 6 - A) MCF7; B) MDA-MB-231 and C) T47D cells labeled with QDs-UEA I conjugates (in red). In blue: nucleus stained by the Hoescht dye**…….....58**

MANUSCRITO A SER TRADUZIDO COM A INTENÇÃO DE SER SUBMETIDO PARA A BBA GENERAL SUBJECTS "Conjugados de Pontos Quânticos Altamente Fluorescentes para Estudo de Receptores de Folato no Câncer de Mama"

Figura 1 - Caracterização óptica dos PQs e conjugados de PQ-AF (1:25). (A) Espectro de absorção (linha sólida) e emissão (linha tracejada) dos PQs. (B) Emissão dos PQs (linha preta) e conjugados (linha tracejada), λ_{exc} = 365 nm**.....69**

Figura 2 - Curvas de correlação obtidas por FCS de PQs (linha sólida) e do conjugado PQ-AF (linha tracejada) **.....70**

Figura 3 - Imagens de microscopia confocal de células HeLa marcadas por conjugados PQ-AF. A e B: células incubadas com conjugados PQ-AF antes e após o ensaio de saturação, respectivamente. Em verde: fluorescência do PQ-AF, em azul: núcleos corados pelo corante Hoechst. Barra de escala: 20 μm**.....71**

Figura 4 - Histogramas representativos de citometria de fluxo para células HeLa. Em (A) controle, (B) marcação por PQ-AF e (C) células marcadas com PQ-AF após a saturação de receptores com AF**.....72**

Figura 5 - Histogramas representativos de citometria de fluxo para células T47D (A) e MCF7 (B). A identificação (1) representa o controle; (2) marcação pelos conjugados PQ-AF e (3) células incubadas com os conjugados após a saturação dos receptores com AF**.....73**

Figure 6 - Imagens de microscopia confocal de células T47D marcadas por conjugados de PQ-AF. A e B: células incubadas com conjugados de PQ-AF antes e após o ensaio de saturação, respectivamente. Em verde: fluorescência dos conjugados, em azul: núcleos corados pelo corante Hoechst. Barra de escala: 20 μm**.....74**

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO PREPARADO COM INTENÇÃO DE SER SUBMETIDO PARA O INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES *"Quantum Dots to Investigate Transferrin Receptors and Fucose Profiles in a Comparative Study Among Breast Cancer Cell Lines"*

Table 1 - Average flow cytometry fluorescent labeling percentages for MCF7, MDA-MB-231, and T47D of control, labeling with QDs-Tf and after the saturation assays**……..……...……...…54**

Table 2 - Average flow cytometry fluorescent labeling percentages for MCF7, MDA-MB-231, and T47D of controls and labeling with QDs-UEA I**……...……56**

MANUSCRITO A SER TRADUZIDO COM A INTENÇÃO DE SER SUBMETIDO PARA A BBA GENERAL SUBJECTS "

"Conjugados de Pontos Quânticos Altamente Fluorescentes para Estudo de Receptores de Folato no Câncer de Mama"

Tabela 1 - Dados de FCS para PQs de CdTe e o conjugado PQ-AF: tempos de difusão e diâmetros hidrodinâmico**….....…….....70**

Tabela 2 - Porcentagens médias de marcação por citometria de fluxo para HeLa, T47D e MCF7 de controle e células incubadas com conjugados PQ-AF (antes e após o ensaio de saturação) **.....……...……..….....72**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

QDs	*Quantum dots*
UEA I	Aglutinina I de *Ulex europaeus*
Tf	Transferrina
RTf	Receptores de transferrina
AF	Ácido fólico
FR	Receptores de ácido fólico
ConA	Concanavalina A
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
UTDL	Unidade terminal ducto-lobular
CDIS	Carcinoma ductal *in situ*
CLIS	Carcinoma lobular *in situ*
CDI	Carcinoma ductal invasivo
EGF	Fator de crescimento epidérmico
TGF alpha	Fator de transformação alfa
Fe	Ferro
CRD	Domínio de reconhecimento de carboidrato
GlcNAc	N-acetilglucosamina
HPA	*Helix pomatia*
PHA-L	Leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris*
DSA	*Datura stramonium*
LSA	Aglutinina específica de Lectina
HCC	Carcinoma hepatocellular

MSA	Ácido mercaptossuccínico
EDC	Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
NHS	N-hidroxisuccimida
MTC	Triflato-cisteamina manose
PQ	Pontos quânticos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

1.1 OBJETIVOS.....19

1.1.1 Objetivo Geral.....19

1.1.2 Objetivos específicos.....19

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....20

2.1 CÂNCER.....20

2.2 ANATOMIA DA MAMA.....21

2.3 OS TUMORES DE MAMA.....24

2.3.1 Carcinoma.....24

2.3.1.1 Carcinoma Ductal *In situ* (CDIS).....24

2.3.1.2 Carcinoma Lobular *In situ* (CLIS).....25

2.3.1.3 Carcinoma Lobular Invasivo (Adenocarcinoma).....26

2.3.1.4 Carcinoma Ductal Invasivo (CDI).....26

2.4 CULTIVO CELULAR.....28

2.5 TRANSFERRINA E RECEPTORES DE TRANSFERRINA.....30

2.6 ÁCIDO FÓLICO.....34

2.7 CARBOIDRATOS E LECTINAS.....37

2.8 PONTOS QUÂNTICOS.....41

3 METODOLOGIA E RESULTADOS.....47

3.1 MANUSCRITO PREPARADO COM A INTENÇÃO DE SER SUBMETIDO PARA REVISTA *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES: "Quantum Dots to Investigate Transferrin Receptors and L-Fucose Profiles in a Comparative Study Among Breast Cancer Cell Lines."*.....47

3.2 MANUSCRITO A SER TRADUZIDO COM A INTENÇÃO DE SER SUBMETIDO PARA A BBA GENERAL SUBJECTS " Conjugados de Pontos Quânticos Altamente

Fluorescentes para Estudo de Receptores de Folato no Câncer de Mama”.....63

4 CONCLUSÃO 79

5 PERSPECTIVAS.....80

REFERÊNCIAS 81

ANEXO A - ARTIGO PUBLICADO NA BBA *GENERAL SUBJECTS*: “*Biomedical Applications of Glyconanoparticles Based on Quantum Dots*”.....90

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é um dos cânceres que mais afeta mulheres em todo o mundo (INCA, 2017). Essa doença é causada por uma alteração genética que faz a célula perder o controle sobre o seu ciclo celular passando a se dividir de maneira totalmente desordenada. A célula perde parcial ou totalmente as características relacionadas a tecidos normais, exibindo diversos graus de diferenciação e poder de invasão (metástase). Sabe-se que as células apresentam como constituintes de suas membranas vários tipos de proteínas, proteoglicanos, glicoproteínas e glicolipídios, que desempenham diversos tipos de funções para manutenção do metabolismo e da integridade celular. A literatura vem sugerindo correlações na expressão de alguns desses constituintes celulares com variados tipos de câncer, inclusive indicando que pode haver diferentes graus de expressão de acordo com o nível de diferenciação das células cancerígenas (SHARON & LIS, 2003; DISNEY & SEEBERGER, 2004; NIMRICHTER *et al*., 2004; ZACHARA AND HART, 2006; BLOMME *et al.,* 2009; MUKHOPADHYAY *et al.,* 2009).

Os carboidratos da superfície celular, por exemplo, desempenham um importante papel imunogênico contra os mecanismos de defesa do organismo que reconheceriam essas células cancerígenas como estranhas e iniciariam mecanismos imunológicos que levariam a sua eliminação. As mudanças que ocorrem nestes carboidratos geralmente estão relacionadas à nutrição, crescimento, proteção do tumor contra o sistema imunológico, além de migração, invasão e metástase (SHARON, 2008; SHARON & LIS, 2003; DISNEY & SEEBERGER, 2004). As lectinas são proteínas que conseguem se ligar de maneira específica e reversível a carboidratos. As lectinas podem ser utilizadas para revelar os carboidratos presentes na superfície celular (SHARON, 2008; BLOMME *et al.,* 2009; MUKHOPADHYAY *et al.,* 2009). Por outro lado, as proteínas transmembranares podem assumir uma outra função bastante importante para as células como a de receptores. Estes são os elos entre a absorção, a estocagem, a entrada e a utilização de nutrientes (como exemplo o ferro e ácido fólico para manutenção do metabolismo intracelular) no interior das células. Além disso, os receptores se relacionam com o controle do crescimento, função e divisão celular bem como à resistência a fármacos (YU *et al.*, 2017; KELEMAN, 2006; JEONG *et al.*, 2016; SHIMOSAKI, 2017). Assim, a quantificação desses receptores e carboidratos, o estudo de sua distribuição nas células e a sua correlação com o metabolismo celular podem dar informações cruciais a respeito do perfil de diferentes linhagens cancerígenas (SILVA & FAUSTINO, 2015). Dessa forma, estudos relacionados a carboidratos e receptores podem então agregar valor auxiliando

em técnicas de diagnósticos mais rápidos e sensíveis, no aprimoramento e personalização de terapias, bem como colaborar para a compreensão da biologia do câncer.

Técnicas baseadas em biologia molecular podem nos dar informações a respeito dos genes envolvidos no câncer, e até mesmo da sua expressão celular. Porém, a utilização de ferramentas que ultrapassem a barreira genômica pode complementar a compreensão do câncer com informações sobre o metabolismo e os mecanismos celulares envolvidos na patogênese da doença. Dentre essas ferramentas, estão as técnicas baseadas em fluorescência que além de apresentarem alta sensibilidade, podem fazer uso de sondas conjugadas a biomoléculas propiciando assim especificidade bioquímica a ensaios *in vivo* ou *in vitro* com sistemas biológicos vivos. Dentre os fluoróforos vêm se destacando os pontos quânticos (PQs) ou *quantum dots* (QDs). PQs são nanocristais fluorescentes de semicondutores que possuem propriedades ópticas únicas para a marcação biológica, como: (i) um largo espectro de absorção e estreito espectro de emissão (propiciando múltiplas marcações fluorescentes com uma única fonte de excitação); (ii) superfície ativa, que permite bioconjugação a uma grande variedade de biomoléculas e (iii) uma excepcional resistência à fotodegradação possibilitando o acompanhamento de eventos em tempo real (CHANDAN *et al.*, 2018; ALIVISATOS, 2005; SANTOS *et al.*, 2012).

Dessa forma, nessa tese serão apresentados resultados relacionados ao desenvolvimento e aplicação de conjugados de PQs à *Ulex europaeus I* (UEA-I), à transferrina (Tf) e ao ácido fólico (AF) para se estudar, respectivamente, o perfil de expressão do carboidrato L-fucose, e dos receptores de Tf e de AF em células de adenocarcinoma mamário e carcinoma ductal invasivo. Essa escolha permitiu delinear comparações relacionadas a características de invasibilidade, bem como contrastar perfis associados com carcinoma ductal e epitelial. Além disso, será também apresentado uma revisão publicada na BBA *General Subjects,* a qual descreve os principais trabalhos da literatura relacionado PQs com lectinas e carboidratos, com ênfase no desenvolvimento desses conjugados e na sua aplicação em sistemas biológicos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Bioconjugar pontos quânticos com a transferrina, o ácido fólico e a lectina *Ulex europeaus I* e aplicá-los para avaliação da expressão de receptores e carboidratos em linhagens de células cancerígenas de mama humana.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar e caracterizar opticamente pontos quânticos de CdTe estabilizados com ácido mercaptosuccínico;
- Desenvolver o cultivo celular das linhagens de câncer de mama MCF7, MDA-MB-231 e T47D;
- Fazer uma prospecção na literatura sobre as estratégias para conjugar pontos quânticos a lectinas ou carboidratos, os principais bioconjugados já desenvolvidos e suas aplicações, compilar e discutir os dados em forma de um artigo de revisão;
- Bioconjugar os pontos quânticos à lectina *Ulex europeaus I*;
- Bioconjugar os pontos quânticos à proteína transferrina e a uma vitamina, o ácido fólico;
- Caracterizar os bioconjugados quanto a parâmetros físico-químicos e biológicos;
- Avaliar o perfil de L-fucose nas linhagens de células cancerígenas de mama utilizando os pontos quânticos conjugados à UEA I;
- Avaliar o perfil de receptores de transferrina e folato (e sua reciclagem) nas linhagens de células cancerígenas aplicando os bioconjugados de pontos quânticos desenvolvidos;
- Comparar o perfil de L-fucose e receptores entre as linhagens cancerígenas de mama investigadas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CÂNCER

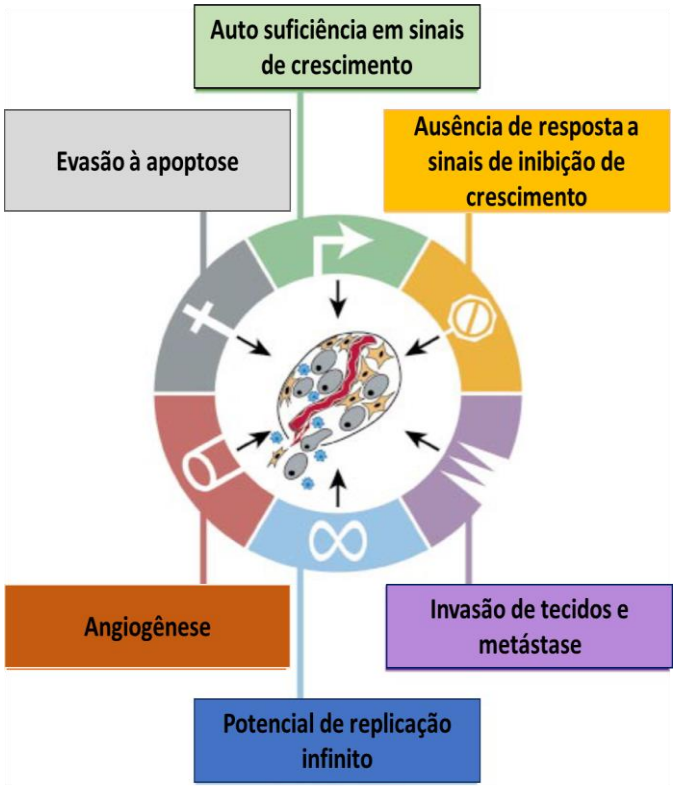
O câncer é definido atualmente como sendo um conjunto de doenças em que células de determinado tecido perdem o controle sobre o ciclo celular e passam a crescer de maneira descontrolada, persistente e excessiva, mesmo após o término do estímulo que provocou a alteração, permanecendo local ou se espalhando de maneira sistêmica (ABBAS, 2012). O câncer de mama é o mais comum entre as mulheres no mundo, e no Brasil é a segunda principal causa de óbitos, atrás apenas de doenças cardiovasculares, sendo estimados cerca de 59.960 novos casos para o ano de 2017 (dados: INCA, 2017). Os cânceres parecem ter uma grande relação com a hereditariedade. Além disso, a correlação com fatores ambientais mostrou-se evidente na maioria dos tumores, sugerindo que estes fatores estejam intimamente relacionados ao início e à progressão da doença (LUTGENDORF & SOOD, 2011).

Os tumores podem ser divididos em: (1) benigno, onde as características macro e microscópicas são semelhantes ao tecido normal, considerado inofensivo e com baixo risco de metástase e, (2) maligno, com lesões macro e microscópicas muito diferentes do tecido normal, com possibilidade de invasão do tecido adjacente e migração para locais mais distantes no organismo através da via sistêmica (metástase). Os componentes básicos da mama são o estroma e o parênquima. Anatomicamente, o estroma é o tecido que vai dar suporte nutritivo e sustentação ao tumor, já o parênquima será formado por células neoplásicas transformadas. Há uma grande diferença na distribuição de carboidratos e proteínas entre o parênquima e o estroma tumoral. Essas diferenças podem ser utilizadas para uma maior compreensão do metabolismo dessas células e da evolução da doença (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

O câncer se desenvolve através de um processo complexo, denominado carcinogênese. As bases moleculares do câncer se iniciam com mutações não letais. Uma única mutação não é suficiente para causar o câncer. Porém, o acúmulo de lesões genéticas em quatro classes de genes (os que regulam o crescimento celular, os supressores de tumor, os que comandam a apoptose e os de reparo celular) pode levar a atributos fenotípicos relacionados à malignidade. Essas múltiplas mutações se acumulam na célula, que ao se dividir, origina subclones com o DNA (ácido desoxirribonucleico) alterado. Essas mutações levam a um aumento da malignidade e do progresso tumoral com características tais como crescimento excessivo, invasibilidade local e metástase. Muitas vezes subclones tumorais também sofrem mutações, gerando linhagens heterogêneas de células para um mesmo tipo de tumor. Normalmente, as

bases moleculares do câncer se apoiam em seis pontos fundamentais para o desenvolvimento e progressão da doença. Estes pontos são: (1) insensibilidade aos sinais anticrescimento, (2) autossuficiência em sinais de crescimento, (3) evasão da apoptose, (4) angiogênese autossustentada, (5) invasão tecidual e metástase e, (6) potencial de replicação ilimitado. Estes principais pontos estão representados esquematicamente na Figura 1 (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Figura 1. Etapas moleculares fundamentais para o desenvolvimento e progressão molecular do câncer.

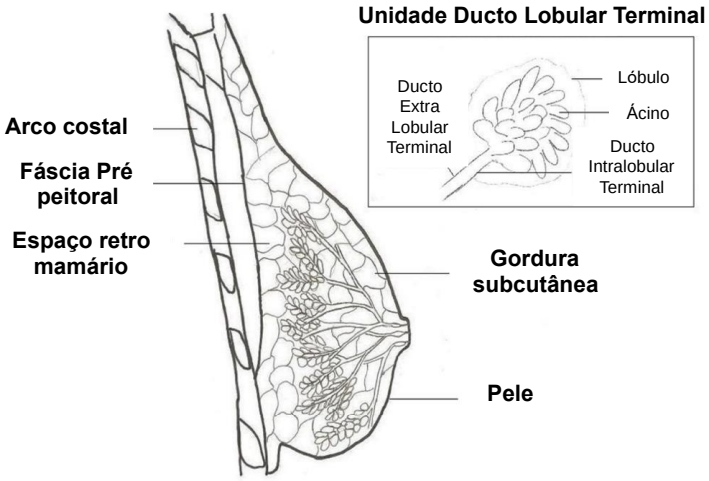


Fonte: Adaptada de HANANAH, 2011.

2.2 ANATOMIA DA MAMA

A mama normal é formada por um sistema de ductos e lóbulos (ou alvéolos). Cada mama é formada por 15 a 25 lóbulos de glândulas túbulo alveolares compostas, as quais se ramificam a partir do mamilo e se estendem radialmente no estroma fibrogorduroso, sendo o estroma composto de tecido conjuntivo de sustentação e tecido adiposo e, o parênquima composto dos ductos e lóbulos (sistema ducto lobular). Cada lóbulo é uma glândula individualizada, que possuem seu próprio ducto excretor emergindo no mamilo de maneira independente, conforme podemos observar na **Figura 2**.

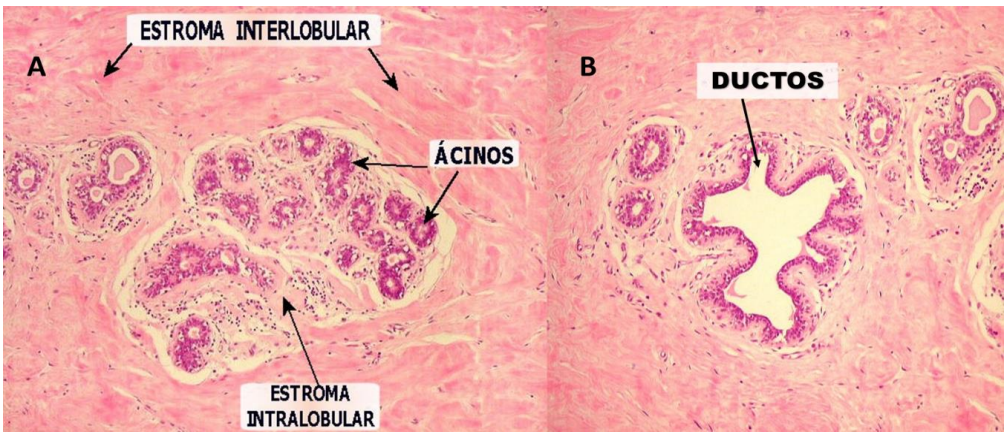
Figura 2. Sistema de ductos e lóbulos mamários.



Fonte: Adaptada de Hipermídia, acesso em 24/04/2017.

Um lóbulo é separado do outro através do estroma, conforme podemos observar na **Figura 3**. A mama é um órgão que não nasce completamente desenvolvido, sendo o completo desenvolvimento do parênquima alcançado apenas na puberdade. Antes desta fase, a glândula mamária é composta de porções dilatadas, os seios galactóforos, e várias ramificações desses seios, os ductos galactóforos. Na puberdade ocorre então o desenvolvimento das ramificações e o crescimento desse sistema ductal e, através do estímulo causado pelo aumento do hormônio estrógeno, na circulação, com consequente acúmulo de tecido adiposo e conjuntivo, aumentando o volume da mama (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

Figura 3. Fotomiografia da estrutura de mama adulta normal: (A) lóbulos mostrando os ácinos de uma mama adulta e (B) um ducto coletor.

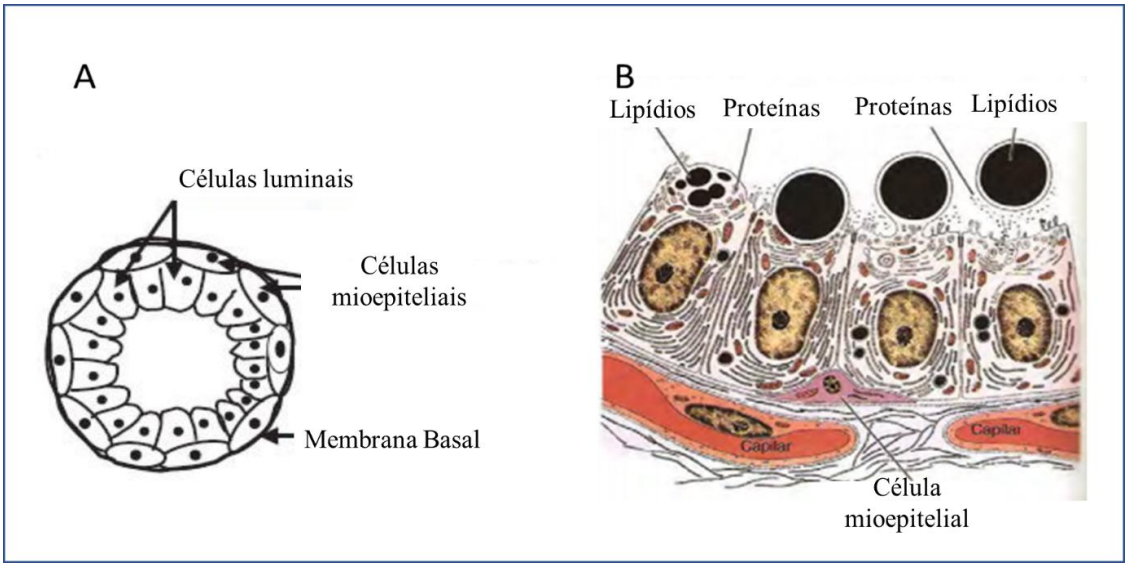


Fonte: Adaptada de http://anatpat.unicamp.br/lamgin21.html acesso em 25/04/2017.

Na mulher adulta, o lóbulo – a glândula – se desenvolve a partir das extremidades dos menores ductos. Então, um lóbulo consiste de várias unidades de ductos intralobulares, também conhecidas como a unidade terminal ducto-lobular (UTDL), que se unem para um ducto terminal, que drena para o sistema ductal interlobular. Quando a mama está em intensa atividade secretora – na lactação – os pequenos ductos coletores recebem o nome de ácinos. Estes se reúnem num ducto coletor, assim como ilustram as **Figuras 3A** e **3B**.

O estroma mamário é composto de uma porção adiposa, sendo que o volume difere conforme a época do desenvolvimento da mulher, e entre uma mulher e outra. Existe também o componente conjuntivo interlobular, composto de células de defesa, como linfócitos, plasmócitos e mastócitos (que irão dar um caráter imunológico ao colostro), e uma abundante rede de fibras reticulares, fibras de colágenos e capilares de aspecto frouxo. Já o estroma intralobular é mais denso, possuindo uma grande quantidade de matriz extracelular, composta principalmente de fibras colágenas de diferentes espessuras com menos células que o estroma interlobular, com predomínio de fibroblastos e fibrócitos (ABBAS, 2012).

Figura 4. Dupla camada celular observada nos lóbulos e ductos mamários corte frontal (A) e sagital (B).



Fonte: Adaptada de DIMRI *et al*., 2005 e JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013.

Na mama normal, os ductos e os lóbulos são revestidos por dois tipos de células, assim como mostra a **Figura 4**. A camada mais externa ou basal é formada por células mioepiteliais, as quais têm morfologia variável, podendo ser arredondadas ou alongadas. Devido a sua capacidade contrátil, essas células ajudam na ejeção do leite durante a lactação. A camada mais interna de células é composta pelas células luminais do lóbulo, que são células colunares com capacidade de secreção e absorção de fluidos (JOHNSON & CUTLER, 2016).

2.3 OS TUMORES DE MAMA

Existem diversos tipos de alterações mamárias, sendo o câncer de mama mais comum entre os indivíduos do sexo feminino. As alterações na mama podem ter um caráter benigno, com alterações proliferativas nos ductos, ductos terminais e algumas vezes nos lóbulos mamários. Essas lesões estão frequentemente associadas a um aumento no risco de evolução para câncer, proporcionalmente à gravidade e atipia das alterações. Considera-se de baixo risco de evolução as lesões que apresentem apenas fibrose, alterações císticas, hiperplasia leve, características encontradas, por exemplo, no fibroadenoma mamário. Esse risco pode aumentar se houver hiperplasia moderada a florida, papilomatose ductal e adenose esclerosante (lesões intralobulares e proliferação de pequenos ductos e ácinos). Porém, se houver hiperplasias atípicas ductais ou lobulares e lesões proliferativas multifocais tem-se um alto risco de desenvolvimento do câncer (ABBAS, 2012; PLICHTA *et al*, 2018).

2.3.1 Carcinoma

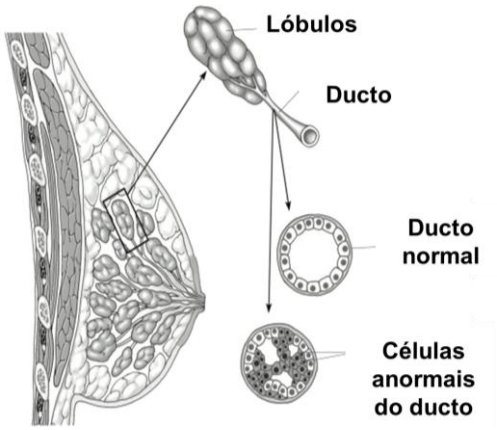
O carcinoma é uma das principais doenças da mama, e a distinção imediata dos casos de câncer mamário das muitas formas de doença benigna da mama é muito importante pela possibilidade de evolução da doença a curso de óbito. O diagnóstico dessa doença é difícil pois os critérios que definem a graduação do tumor são confusos e insuficientes (ABBAS, 2012). Os carcinomas são formados nas células epiteliais, e geralmente, são classificados de adenocarcinomas quando se iniciam no tecido glandular. Os cânceres de mama são classificados naqueles que não ultrapassaram o limite da membrana basal (não invasor ou *in situ*) e aqueles que já ultrapassaram tal limite (carcinoma invasivo ou invasor). Dentre os cânceres *in situ* temos o **carcinoma ductal *in situ* (CDIS)** e o **carcinoma lobular *in situ* (CLIS).** Já dentre os invasores podemos citar o **carcinoma ductal invasor** e o **carcinoma lobular invasor (ou adenocarcinoma)** (ABBAS, 2012).

2.3.1.1 Carcinoma Ductal *In Situ* (CDIS)

O CDIS é também conhecido como carcinoma intraductal e é considerado uma lesão pré-câncer, na qual as células se originam nos ductos terminais e espalham-se nos ductos mamários, mas ainda não invadiram o tecido mamário subjacente, apenas preencheram e envolveram os espaços, semelhantes a ductos. O CDIS está altamente relacionado à probabilidade de câncer invasivo, sendo que cerca de 20% de novos casos de câncer de mama

serão posteriores a lesões de carcinoma ductal *in situ*. Quase todas as mulheres diagnosticadas nessa etapa (CDIS) poderão ser curadas. O CDIS geralmente forma massas macroscopicamente visíveis, e possui microscopicamente uma ampla variedade de aparências, com células que se contorcem nos espaços dos ductos. Além disso, o CDIS está frequentemente associado à calcificação e necrose, mas sem alterar a arquitetura lobular subjacente porque está confinado à membrana basal, e não invade o estroma e os canais linfovasculares. A **Figura 5** ilustra em esquema a formação do CDIS.

Figura 5. Esquema da formação do carcinoma ductal *in situ*.

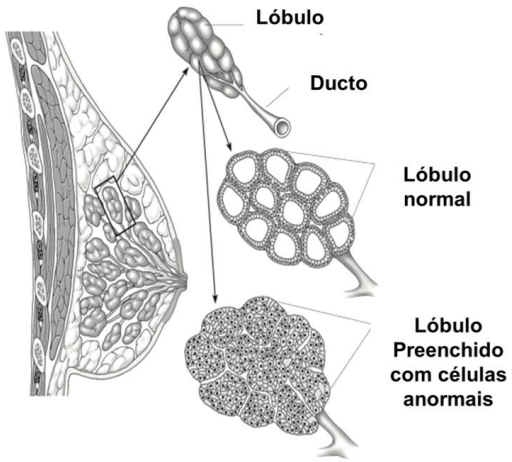


Fonte: Adaptada de http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-breast-cancer-types data de acesso em 28/03/2017.

2.3.1.2 Carcinoma Lobular *In Situ* (CLIS)

No carcinoma lobular *in situ*, as células tumorais crescem a partir das glândulas dos lóbulos mamários, mas não invadem através da parede do lóbulo. O CLIS, ao contrário do CDIS, se expande, porém não invade a arquitetura lobular subjacente nem o estroma e nem os canais linfovasculares, pois está confinado à membrana basal. Macroscopicamente ao contrário do CDIS, o CLIS não forma massas e raramente associa-se a calcificações. Por outro lado, microscopicamente apresenta células monomórficas, com núcleos arredondados suaves e apresentam grupos frouxamente coesos entre os ductos e os lóbulos. Aproximadamente um terço das mulheres diagnosticadas com CLIS desenvolverá carcinoma invasivo, e sendo assim, o CLIS é tanto um marcador para aumento de risco de câncer invasor como também, muitas vezes precussor direto de algum tipo de câncer. A **Figura 6** mostra o esquema de formação do CLIS e as características microscópicas encontradas nesse tipo de lesão (ABBAS, 2012).

Figura 6. Esquema de formação do carcinoma lobular *in situ*.



Fonte: Adaptada de http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tipos-de-cancer-de-mama/1382/34/_acesso em 28/11/2016.

2.3.1.3 Carcinoma Lobular Invasivo (Adenocarcinoma)

O carcinoma lobular invasivo possui células que se apresentam morfologicamente idênticas ao CLIS, e estão intimamente relacionadas a esse tipo de lesão. Microscopicamente no adenocarcinoma as células invadem o estroma de maneira individualizada, geralmente alinhadas em cordões ou correntes. Ocasionalmente circundam os ductos ou ácinos cancerosos ou normais, criando um padrão denominado olho de touro. Macroscopicamente o adenocarcinoma se apresenta geralmente como uma massa palpável, mas pode também apresentar um padrão difuso ou até mesmo ficar clinicamente ocultos. Os carcinomas lobulares invasivos metastatizam mais frequentemente que os carcinomas ductais, podendo se espalhar pelo líquido cefalorraquidiano (LCR), trato gastrointestinal, ovários, útero e medula óssea. O adenocarcinoma pode ser mais difícil de detectar por mamografia que o carcinoma ductal invasivo (ABBAS, 2012).

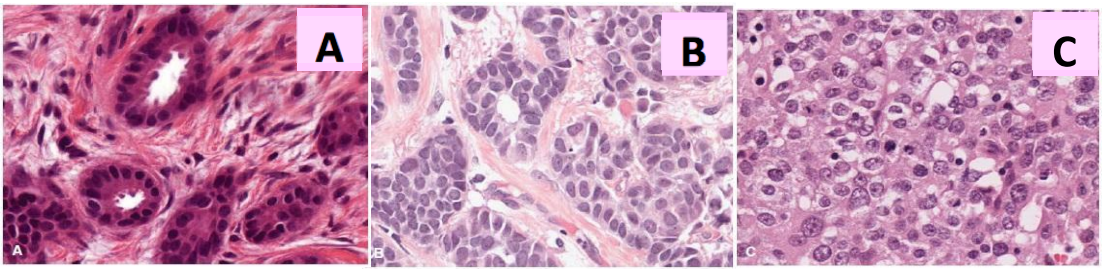
2.3.1.4 Carcinoma Ductal Invasivo (CDI)

O carcinoma ductal invasivo (CDI), tipo mais frequente de câncer de mama, representa um grupo heterogêneo de lesões que tem comportamento mais agressivo do que a maioria dos tipos especiais (carcinoma medular, carcinoma mucinoso, doença de Paget, etc). Em contraste com o carcinoma *in situ*, há invasão para outros locais, com a possibilidade de disseminação metastática. Porém, carcinomas *in situ* de ductos ou lóbulos mamários são fatores de risco para posterior desenvolvimento de CDI (ABBAS, 2012).

Macroscopicamente a lesão é retraída, infiltrando-se no parênquima mamário que a circunda, com uma consistência pétrea à palpação, com forma variável e coloração esbranquiçada ou acinzentada, com formações tubulares irradiando-se a partir do centro da lesão e tomando o espaço do tecido adiposo subjacente. Um carcinoma invasivo de mama pode variar de 1 a 3 cm de diâmetro. Microscopicamente o tumor é formado pela proliferação de elementos epiteliais com atipias acentuadas e atividade mitótica variável, com tendência a formar estruturas pseudo-glandulares ou semelhantes a ductos. As células têm um aspecto variável, enquanto umas são pequenas, com núcleo pequeno, regular e cromatina homogênea, outras se apresentam grandes, com núcleos irregulares e hipercromáticos, nucléolos evidentes e elevado índice mitótico (BOGLIOLO, 2016).

A avaliação dessas características histológicas como formação de túbulos, atipias nucleares e índice mitótico serve para graduar o CDI em: **G1** (bem diferenciado, cromatina regular e homogênea, arquitetura celular preservada e pouca diferenciação, menor risco para o paciente), **G2** (média diferenciação, já é possível observar maior proliferação celular e núcleos mais irregulares) e **G3** (pouco diferenciado, proliferação celular em grande quantidade comprometendo a qualidade dos tecidos ao redor, núcleos irregulares com cromatina heterogênea, perda de arquitetura celular com maior risco de morte para o paciente) (ABBAS, 2012). Na **Figura 7** é possível visualizar os diferentes graus de diferenciação de um carcinoma ductal invasivo.

Figura 7. Carcinoma ductal invasivo em diferentes graus de diferenciação: Grau 1 – bem diferenciado (A), Grau 2 – moderadamente diferenciado (B) e Grau 3 – pouco diferenciado (C).



Fonte: Adaptada de RUBIN & STRAYER, 2012.

Para o CDI, normalmente tem-se como primeiras manifestações clínicas o achado de uma massa palpável na mama, feito pela própria paciente. Com a evolução da doença, pode haver invasão local e metástase sistêmica (BOGLIOLO, 2016). O diagnóstico do CDI é feito

por exclusão, quando o tumor não atende as características classificatórias de outros tipos de carcinoma especiais, como carcinoma medular e tubular, entre outros (BOGLIOLO, 2016).

Para o diagnóstico dos tumores muitas vezes é necessário o corte da área da mama que contém esse tumor e, posteriormente, como mencionado acima, são utilizados critérios exclusivos para uma classificação dos tumores de uma maneira muitas vezes confusa, levando a uma classificação errônea. Com o objetivo de facilitar a manipulação, o estudo, e uma melhor compreensão dos diversos tipos de câncer, passou-se a ser empregado um sistema de banco de tumores. Essas técnicas de cultivo celular permitem a manutenção de linhagens tumorais imortalizadas para estudo por longos prazos (KAITTANIS *et al.*, 2014).

2.4 CULTIVO CELULAR

As técnicas de cultivo celular começaram a ser desenvolvidas no começo do século XX, com o objetivo de estudar o comportamento das células *in vitro* e em meio controlado. Então a cultura de células irá englobar uma série de técnicas que permitem a manutenção dessas células *in vitro*, porém, conservando suas propriedades fisiológicas, bioquímicas e genéticas. Os primeiros experimentos com cultura de células consistiam em fragmentação mecânica de tecidos em frascos contendo fluidos dos animais de onde esses tecidos eram provenientes (FRESHNEY, 1994).

Inicialmente a cultura primária é estabelecida a partir do crescimento de células, que se originaram através da extração do fragmento de tecido e posterior desagregação mecânica ou enzimática. Essas células são transferidas para um frasco de cultivo com o meio nutriente adequado, e algumas delas aderem-se ao fundo do mesmo e formam a primeira monocamada de células desse tecido *in vitro* (ALVES, CARRONDO & CRUZ, 2008).

Com o passar do tempo as células que possuem uma maior capacidade de proliferação irão prevalecer no frasco. Essas células além de possuírem uma maior capacidade de proliferação, guardam parte das características celulares do tecido que lhe deu origem, e por isso, são as linhagens muito utilizadas em pesquisa, porque podem se manter em cultura durante longos períodos, geralmente por até 80 passagens, e recebem o nome de **linhagens contínuas** (SEGERITZ & VALLIER, 2017).

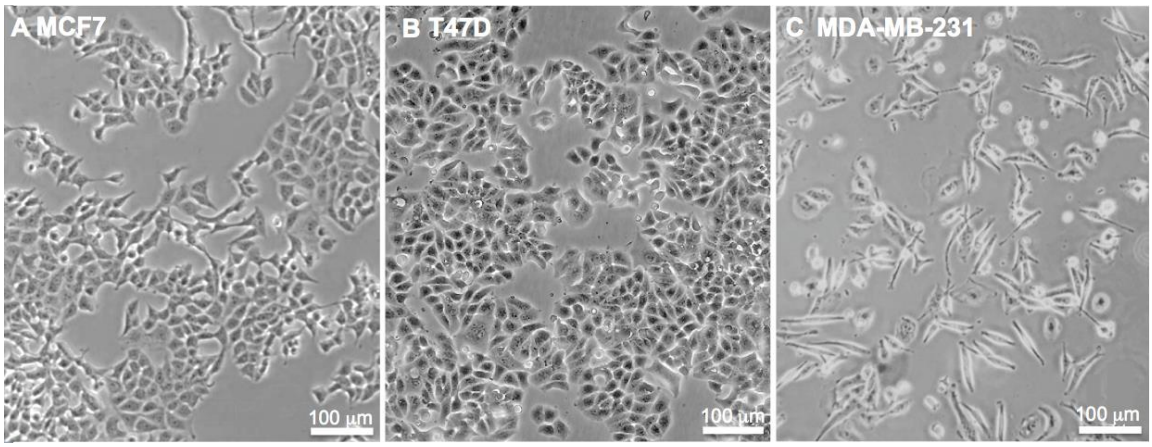
Quando as características genéticas das células são modificadas, ela perde o controle sobre o seu ciclo celular, se proliferando indefinidamente, passando a ser chamadas de **células transformadas.** As células podem ser transformadas em cultura através de substâncias

químicas, agentes físicos (como a luz ultravioleta) e vírus. Além disso, as células transformadas também podem ser obtidas diretamente do tumor do paciente que lhe deu origem. Um exemplo são as células HeLa, obtidas a partir de um tumor cervical uterino (MASTERS, 2002).

As linhagens celulares imortalizadas propõem um modelo experimental que facilita o estudo das características celulares, possibilitando o esclarecimento de diversos aspectos bioquímicos, biofísicos e metabólicos dos mais diversos tipos de câncer. Portanto, alguns trabalhos vêm se utilizando dessas células em cultura para o estudo de receptores e carboidratos, por exemplo (VOJTA *et al,* 2016).

As MCF7 (**Figura 8A**) são células epiteliais e aderentes humanas oriundas de glândula mamária de um adenocarcinoma em infiltrado num sítio metastático da infusão pleural de uma mulher caucasiana de 69 anos de idade (SOULE *et al.*, 1973). Como apresentado na seção 3.3.1.3, que descreve as características do adenocarcinoma mamário, a MCF7 mantém várias características das células de mama normais, incluindo a habilidade de processar estradiol através de receptores citoplasmáticos e capacidade de formar aglomerados celulares. Essas células expressam o antígeno sanguíneo O, receptores de estrógenos e são Rh^{+}. Além disso, expressam o oncogene WNT7B (PRATT & POLLAK, 1993; HUGUET *et al.*, 1994; TAKAHASHI & SUZUKI, 1993). É uma linhagem pouco invasiva (ZAJCHOWSKI *et al.*, 2001).

Figura 8. Células MCF7 (A), T47D (B) e MDA-MB-231 (C).



Fonte: Adaptada de (A) SIMS-MOURTADA *et al.* 2013, (B) https://www.atcc.org/~/media/Attachments/B/D/D/8/1975.ashx, acesso em 06/06/2017 (B) e (C) próprio autor.

As T47D (**Figura 8B**) são células epiteliais e aderentes humanas oriundas de glândula mamária de um carcinoma ductal invasivo, infiltrado em um sítio metastático da infusão pleural de uma mulher caucasiana de 54 anos (KEYDAR et al., 1979). Como descrito na seção 3.3.1.4, esse tipo de câncer costuma ter uma tendência de invasão para outros locais, e tem 3 graus de diferenciação. Assim como a MCF7, a T47D mantém algumas das características do tecido normal que lhe deu origem também expressando o oncogene WNT7B e receptores de estradiol. Expressa também receptores para glicocorticoides, receptores de progesterona, e prolactina e além disso, formam aglomerados celulares (HUGUET *et al.*, 1994; JUDGE & CHATTERTON, 1983; LAMP *et al.*, 1981; SHER *et al.*, 1981; KAWAMOTO *et al.*, 2011; ZAJCHOWSKI *et al.*, 2001).

A MDA-MB-231 (**Figura 8C**) são células epiteliais e aderentes humanas oriundas de glândula mamária de um adenocarcinoma grau 3 apresentado na seção 3.3.1.3 com infiltrado em um sítio metastático da infusão pleural de uma mulher caucasiana de 51 anos de idade (CRUCIGER, 1976). São células pouco diferenciadas e expressam o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de transformação alfa (TGF alpha) (SICILIANO *et al.*, 1979; CAILLEAU *et al.*, 1974; CALLEAU *et al.*, 1978; BATES *et al.*, 1990; DICKSTEIN *et al.*, 1993). A MDA-MB-231 é uma linhagem altamente agressiva e com grande potencial metastático não mantendo praticamente nenhuma característica do tecido de mama normal que lhe deu origem (ZAJCHOWSKI *et al.*, 2001).

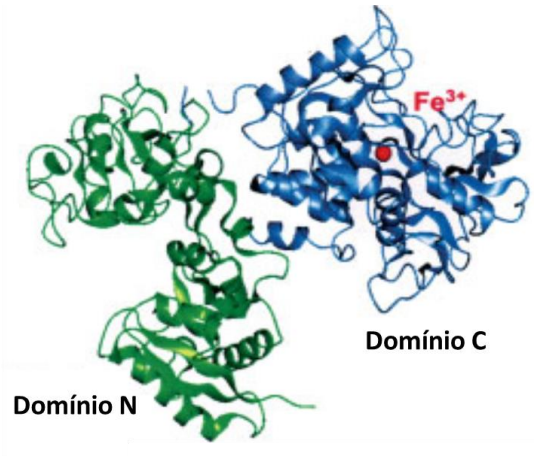
As linhagens celulares imortalizadas propõem um modelo experimental que facilita o estudo das características celulares, possibilitando o esclarecimento de diversos aspectos bioquímicos, biofísicos e metabólicos dos mais diversos tipos de câncer. Portanto, alguns trabalhos vêm se utilizando dessas células em cultura para o estudo de receptores e carboidratos, por exemplo (VOJTA *et al,* 2016).

2.5 TRANSFERRINA E RECEPTORES DE TRANSFERRINA

A transferrina é uma família de proteínas transportadoras de ferro, com geralmente uma única cadeia contendo 670-700 aminoácidos e peso molecular de 80 kDa, em sua maioria são proteínas acídicas com o pI em torno de 5,6 – 5,8. No sangue cerca de 30% dos sítios de transferrina estão ocupados com ferro. A estrutura da transferrina sérica humana é apresentada na **Figura 9**.

Muitas famílias de transferrinas têm sido descritas na literatura em diversos tipos de animais, e são encontradas no sangue dos mamíferos, e em outros fluidos, como bile, líquido amniótico, linfa, leite e lágrimas. O principal papel da transferrina é controlar os níveis de ferro livre por se ligar, sequestrar e transportar este íon. Ao mesmo tempo a transferrina mantém a disponibilidade do ferro impedindo que ele se precipite e se deposite como íon insolúvel em agregados de hidróxido férrico, o que levaria a efeitos tóxicos, como por exemplo, a produção de radicais livres. Além disso, a transferrina sérica é o elo entre os sítios de absorção, estocagem e utilização de ferro (GKOUVATSOS *et al*, 2012). A transferrina sérica possui dois sítios de ligação ao ferro dependentes de pH (domínios ou locais de ligação), que sofrem mudanças conformacionais ao se ligar o Fe^{3+}, e são cruciais para o reconhecimento da molécula de transferrina pelo seu receptor (EVANS *et al*, 2012).

Figura 9. Estrutura cristalográfica da transferrina sérica humana.



Fonte: Adaptado de LI & QIAN, 2002.

O receptor de transferrina (RTf) é encontrado geralmente em níveis de expressão basais nos mais diversos tipos de células, como hemácias, hepatócitos, células da tireoide, células intestinais, monócitos, células da barreira hematoencefálica, dentre outros tipos celulares (EVANS *et al*, 2012).

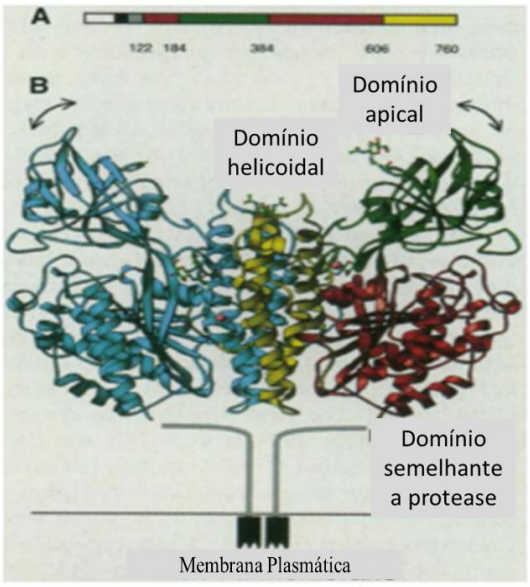
A literatura relata um aumento na expressão desses receptores em células malignas, o que pode ser explicado pelo aumento da necessidade de ferro para o crescimento dessas células, que tem o seu metabolismo acelerado. Esses receptores estão ligados à absorção do ferro, através do ciclo de endocitose/exocitose da transferrina (MIZUTANI *et al*, 2012).

O RTf é uma glicoproteína transmembrana homodimérica com 180 kDa, sendo 90 kDa de cada subunidade. Cada uma das subunidades do RTf é capaz de ligar a uma molécula

de transferrina. O RTf possui também um domínio citoplasmático, que é adicionado como uma modificação pós-traducional e está ligado à endocitose/exocitose do receptor. Além disso, outros resíduos adicionados no RTf estão relacionados ao transporte desses receptores à superfície da célula (EVANS *et al*, 2012).

O RTf controla todo o metabolismo celular do ferro através da mudança na disponibilidade desses receptores na superfície da célula, regulando assim a absorção do ferro. A ferritina também tem um papel importante, pois controla a quantidade de ferro que será sequestrada e armazenada no interior celular. Por sua vez, o gene que controla a expressão de RTf na membrana da célula é regulado pela concentração sérica de ferro. Em privação de ferro, há aumento de elementos responsivos ao ferro que sinalizam um aumento na expressão de RTf e uma diminuição na expressão de ferritina. Outro fator que controla a expressão da transferrina é o estado de proliferação celular. Células que estão se multiplicando geralmente aumentam a expressão dos receptores, enquanto células que não estão replicando mantém um número basal (HARMS & KAISER, 2015). Também foi identificado um outro receptor de transferrina, o RTf2, que possui grande similaridade estrutural com o RTf1. Porém o RTf2 tem uma afinidade menor pela transferrina que o RTf1, e seu mecanismo de regulação não é relacionado à concentração de ferro, mas à taxa de multiplicação celular (HARMS & KAISER, 2015). A **Figura 10** apresenta a estrutura do receptor de transferrina 1.

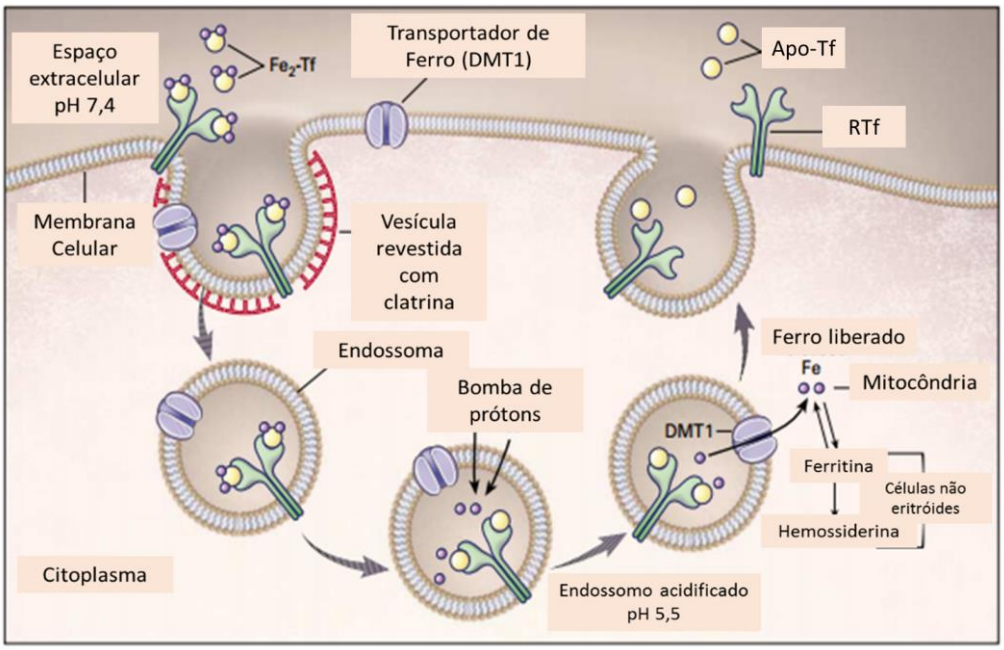
Figura 10. Estrutura do receptor de transferrina 1.



Fonte: Adaptada de Lawrence *et al.*, 1999.

Como já descrito anteriormente, cada transferrina pode se ligar a um ou dois íons Fe^{3+}. A transferrina então se liga ao receptor de transferrina na membrana celular, e após essa ligação, o complexo Fe-Tf-TfR é então internalizado numa vesícula endocítica. Já dentro do citoplasma uma bomba de prótons começa a acidificar essa vesícula, até que o pH fique menor que 5,5. Essa acidificação libera o Fe^{3+} da transferrina, sendo o ferro levado ao seu destino celular, através do transportador presente na membrana endocítica, o DMT1, seja para utilização imediata, ou para estocagem na forma de ferritina ou hemossiderina. Já o complexo transferrina-RTf é reciclado para a membrana, onde o pH neutro libera a transferrina do receptor para o plasma ou matriz extracelular, permitindo que sejam novamente utilizados em um novo ciclo de transferrina. A **Figura 11** ilustra o ciclo da transferrina (HARMS & KAISER, 2015).

Figura 11. Ciclo da transferrina.



Fonte: Adaptada de ANDREWS *et al.*, 1999.

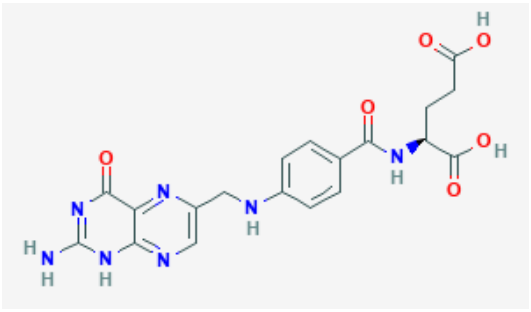
Na década de 80 iniciou-se o mapeamento dos genes de RTfs em células de tecidos humanos (epiderme basal, pâncreas endócrino, células pituitárias, hepatócitos e células de Kupfer) e com isso começou-se a relatar um aumento na quantidade desses receptores em vários tipos de câncer, como sarcomas, carcinomas e mesmo formas de câncer menos agressivas, como a doença de Hodgkin. Trabalhos associaram um aumento do número de receptores de RTf1 e RTf2 em tumores do sistema nervoso, inclusive relacionando a quantidade encontrada de receptores ao estadiamento desses tumores. Mostrou-se também um aumento do número de RTfs em carcinoma mamário invasivo (FAULK *et al.*, 1980;

GATTER *et al.,* 1983; INOUE *et al,*. 1993). Trabalhos posteriores também relataram aumento na quantidade desses receptores no câncer de pâncreas, glioblastoma e leucemia, inclusive, Cabral-Filho *et al*. (2016) utilizando conjugados de PQs compararam a quantidade de RTfs em células de tumores cerebrais, estabelecendo correlações com o grau de malignidade (CABRAL FILHO *et al.*, 2016; VOTH *et al.*, 2015; JEONG *et al.*, 2016; SHIMOSAKI, 2017). Esse aumento na quantidade de RTfs vem sendo associado ao aumento do metabolismo do ferro devido à alta taxa metabólica e de multiplicação de células cancerígenas, e geralmente estão associadas a uma grande quantidade de ferro no interior celular. Sendo o uso de quelantes de ferro apontado como forma de inibição do crescimento dessas células, mostrando a importância da entrada do ferro como um importante fator de progressão tumoral. Daniels *et al.* 2006, por exemplo, sugeriram o uso dos RTfs como porta de entrada para fármacos (DANIELS *et al.*, 2006). Há cerca de 30 anos foi publicado um dos primeiros trabalhos que indicou aumento de RTf em células cancerígenas mamárias (ELLIOT, 1983), e mais recentemente Marques *et al.* 2016, também pesquisou a expressão de RTfs em tumores de mama relacionando alterações em sua expressão através de biologia molecular (MARQUES *et al.*, 2016).

2.6 ÁCIDO FÓLICO

O ácido fólico (AF), também conhecido como vitamina B9 ou ácido pteroil-L-glutâmico, é um composto hidrossolúvel de 441 Da, com fórmula química $C_{19}H_{19}N_7O_6$, e estrutura molecular apresentada na **Figura 12**. Essa vitamina não é sintetizada pelo corpo humano, sendo principalmente absorvida através da ingestão de vegetais, grãos e carne animal. O AF é cofator em reações de transferências de carbono único, que levam à metilação da homocisteína em metionina, sendo fundamental para a síntese de nucleotídeos, DNA e RNA e, portanto, na proliferação e sobrevivência celular. Sua deficiência vem sendo relacionada à má formação do sistema nervoso (desmielinização de neurônios, polineurites, diminuição da memória), hematopoiético (anemia megaloblástica, deficiências vasculares), dentre outros (STOVER, 2012).

Figura 12. Estrutura molecular do ácido fólico.

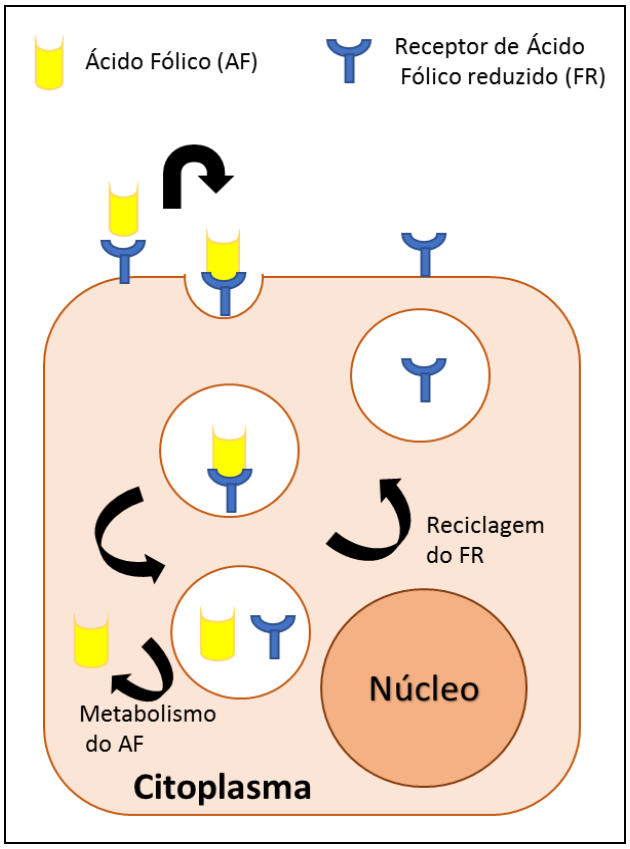


Fonte: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/folic_acid#section=Top, acesso em: 03/10/2017.

A entrada de AF em uma célula é dependente de proteínas carreadoras de AF e/ou receptores de AF reduzido (FR). O FR é uma glicoproteína ligadora de folato com peso molecular de 38 – 40 kDa, localização geralmente apical, e tem uma maior afinidade com o AF comparado com as proteínas carreadoras, que são encontradas amplamente distribuídas em tecidos embrionários. Esse sistema é saturável, e tem um número limitado de receptores disponíveis. AF se liga ao receptor e então, é endocitado para o citoplasma da célula. Após ser absorvido, o AF é convertido a poliglutamato de folato no citoplasma das células para que possa ser armazenado. O transporte de folato via receptor é unidirecional para o citoplasma e, após a entrada da molécula, os receptores são então reciclados e retornam à membrana da célula, conforme esquematizado na **Figura 13**. A quantidade de receptores de folato é então regulada tanto pela oferta quanto pela quantidade de folato armazenada no interior celular (WALTERS, 2013).

Aumentos na expressão de FRs em células e tecidos cancerígenas de ovário, mama, reto, pulmão, bexiga, rim e de nasofaringe quando comparadas a tecidos normais foram relatados na literatura. Inclusive foram reportados um aumento desses receptores em alguns cânceres nos estados iniciais, também em estados mais indiferenciados, sugerindo que podem ser suporte para um microambiente que permite o rápido e descontrolado crescimento tumoral observado nos tumores mais agressivos. Alguns trabalhos sugeriram também que o aumento na expressão dos FRs pode estar associado com a progressão do tumor (ROSS *et al.*, 1994, MIOTTI *et al.*, 1997; TOFFOLI *et al.*, 1997; WALTERS, 2013; YU *et al.*, 2017; KELEMAN, 2006, LEAMON, 1991).

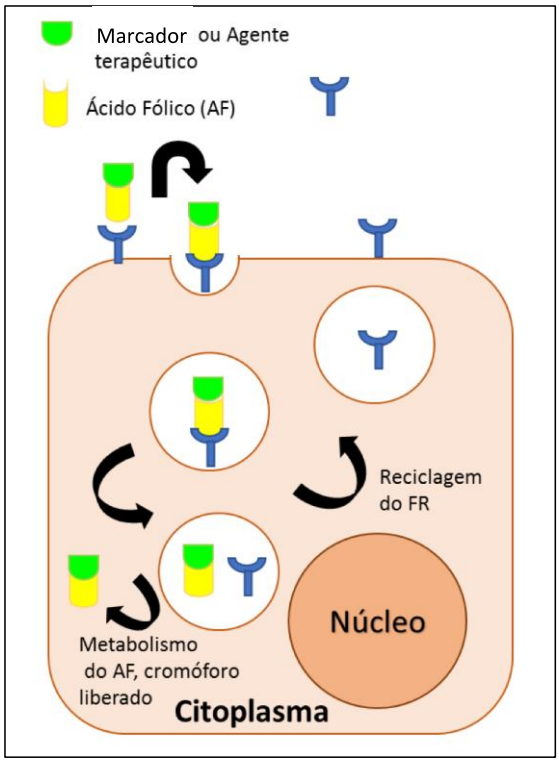
Figura 13. Representação da internalização/reciclagem do receptor de ácido fólico.



Fonte: o autor.

Atualmente alguns estudos vêm relacionando o aumento de FRs não só à progressão como ao risco de recorrência, estando presente em tumores que são triplo negativos para os marcadores usualmente utilizados na clínica (receptores estrógeno, progesterona e HER2) (MARCHALECK *et al.*, 2016; GINTER *et al.*, 2017; YU *et al.*, 2017, KUMAR *et al.*, 2017). Os FRs têm um baixo peso molecular e alto grau de especificidade e conseguem ativar o sistema imune (antigenicidade). Devido a esses fatores, a literatura vem apontando os FRs como alvos tanto para auxiliar no diagnóstico quanto para guiar terapias do câncer, bem como para compreensão da sua biologia. O mecanismo de endocitose envolvendo o metabolismo do AF é uma vantagem, pois permite tanto o uso de marcadores celulares, que indicarão a expressão/metabolismo dos FRs, quanto a entrega de agentes terapêuticos, como ilustrado na **Figura 14** (DU, 2011; GEZKE *et al.*, 2011; MOROSINI *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2015).

Figura 14. Esquema da entrega de cromóforos ou agentes terapêuticos nas células cancerígenas utilizando como alvo os receptores de ácido fólico reduzido.



Fonte: o autor.

Bwatanglang et al., 2016 utilizou PQs conjugados a fluoroacil para se estudar o metabolismo dessa droga antitumoral *in vitro* e *in vivo* (BWATANGLANG *et al*, 2016) Além disso, PQs conjugados ao AF incluídos ou não em sistemas poliméricos foram também avaliados como marcadores em células MCF7 e T47D por microscopia de fluorescência (PAN & FENG, 2009; GEZKE *et al*, 2011; SINGH *et al.*, 2015). Poucos trabalhos exploraram conjugados de PQs ao AF para o estudo de câncer, e essa pode ser uma ferramenta promissora na investigação do dessa doença.

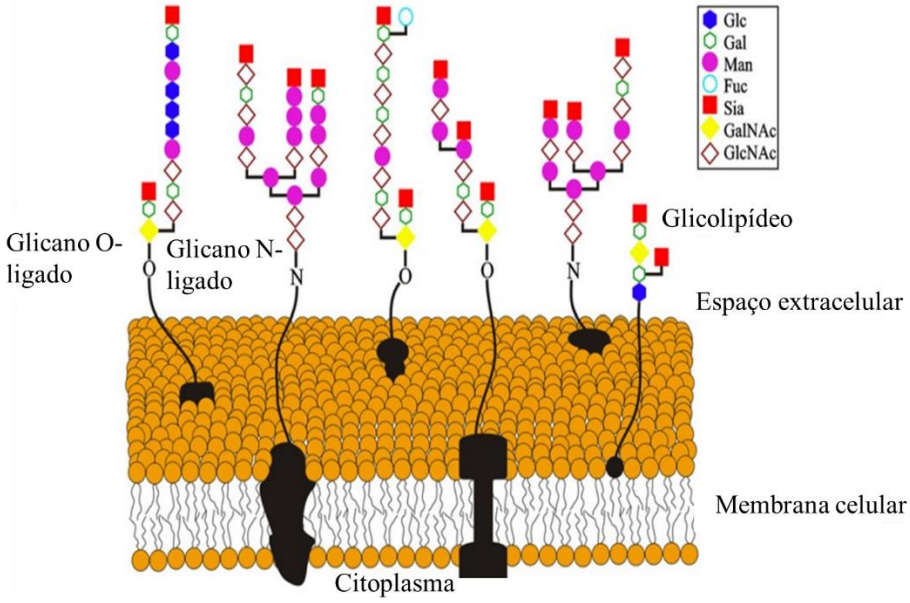
2.7 CARBOIDRATOS E LECTINAS

Os carboidratos ou glicanos são a classe mais abundante entre os compostos químicos encontrados nos seres vivos. Os carboidratos não têm uma estrutura monomérica fixa, mas por outro lado, o termo vem do fato de que os carboidratos mais simples são representados através da fórmula $(CH_2O)n$ ($n \geq 3$), sugerindo que estes são de alguma forma combinados com água. Devido a isso, os carboidratos também são conhecidos como hidratos de carbono. O genoma codifica enzimas que agem como glicosiltransferases e glicosidases nos glicanos,

e, a atividade dessas enzimas determinam os padrões de glicosilação dos glicolipídios e glicoproteínas (WU *et al*, 2009).

A maioria dos animais e plantas sintetizam e utilizam os carboidratos para armazenar energia e disponibilizá-la para as células, como por exemplo, a glicose, ao ser metabolizada pelas células é degradada a dióxido de carbono e água, liberando energia para a síntese de proteínas, movimentos e transportes celulares (WADE, 2013). Além disso, os carboidratos estão presentes em abundância na superfície das células tendo funções na sinalização celular, reconhecimento de moléculas e adesão. Estes carboidratos também estão envolvidos em muitas funções fisiológicas importantes, como desenvolvimento embrionário, diferenciação, crescimento, inibição por contato, reconhecimento célula-célula, sinalização celular, interação com patógenos, resposta imune, desenvolvimento de doenças, metástase, tráfego e localização intracelular e provem rigidez à membrana celular (SHARON, 2008; SHARON & LIS, 2003; DISNEY & SEEBERGER, 2004; NIMRICHTER *et al*., 2004; ZACHARA AND HART, 2006; BLOMME *et al.*, 2009; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2009). A diversidade de funções dos carboidratos nos seres vivos é resultante da habilidade de diferentes resíduos de açúcar se ligarem entre si, das características estruturais dessas moléculas e à presença ou ausência de ramificações (GORELIK *et al.*, 2001). A **Figura 15** ilustra vários carboidratos como glicose (Glc), galactose (Gal), Manose (Man), Fucose (Fuc), Ácido siálico (Sia), N-acetilgalactosamina (GalNac), N-acetilglicosamina (GlcNac) expostos na membrana celular através de glicoproteínas e glicolipídios.

Figura 15. Resíduos de carboidratos expostos na superfície celular.



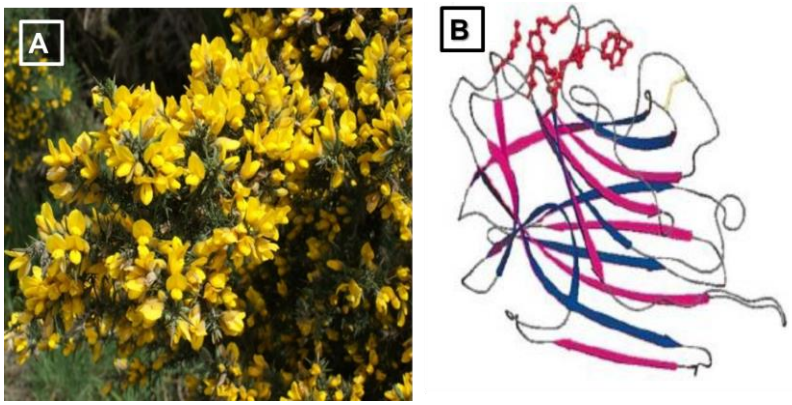
Fonte: Adaptada de GHAZARIAN *et al.*, 2011.

Estes carboidratos podem ser reconhecidos por anticorpos ou lectinas. As lectinas são proteínas que reconhecem e se ligam de maneira reversível a porções de carboidratos de glicoproteínas, glicolipídios e outras estruturas moleculares que possuam glicoestruturas (SINGH *et al,* 2008; GORELIK *et al.,* 2001; BIES *et al*., 2004). A palavra "lectina" vem do latim *legere*, que significa "escolher" ou "*selecionar"* (SHARON & LIS 2004), englobando todas as ligações específicas com carboidratos, independentemente do seu tipo ou fonte, fazendo uma alusão ao fato de que a ligação da lectina com o carboidrato que ela reconhece pode ser tão específica quanto uma ligação antígeno-anticorpo (SINGH *et al,* 2008). Ainda, de acordo com Boukaert *et al.* e Rabinovich, as lectinas podem se ligar a sequências de oligossacarídeos e carboidratos que estejam expostas nas membranas das células (BOUCKAERT *et al.*, 2005; RABINOVICH *et al*., 2007). Muitas lectinas possuem dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, o que as tornam capazes de aglutinar células e precipitar glicoconjugados (SINGH *et al,* 2008). As lectinas foram encontradas inicialmente em plantas e, posteriormente, foram identificadas inúmeras lectinas em microorganismos e animais. Em todas essas fontes, sua estrutura primária é semelhante, e demonstram capacidade de se ligar a carboidrato (SHARON & LIS 2007 & GORELIK *et al.*, 2001).

Após estudos da estrutura de lectinas de animais, chegou-se à conclusão que a habilidade de reconhecer e se ligar a carboidratos da maioria das lectinas é gerada por resíduos limitados de aminoácidos, conhecidos como domínio de reconhecimento ao carboidrato (CRD). O CRD reconhece os domínios terminais não redutores de glicoproteínas e glicolipídios da membrana celular, interagindo com lectinas através de pontes de hidrogênio propiciadas pela disponibilidade de um grande número de hidroxilas nos açúcares, que agem como doadores ou receptores de hidrogênio. Também participam da interação lectina-carboidrato, interações hidrofóbicas e forças de Van Der Walls (SHARON & LIS 2004; MODY *et al.*, 1995). A ligação entre a lectina e o carboidrato é tão específica que, muitas vezes, consegue distinguir isômeros de um mesmo carboidrato. Como exemplo podemos citar a lectina Concanavalina A (ConA), que se liga ao isômero α da glicose/manose, mas não ao isômero β desses mesmos carboidratos (SINGH *et al,* 2008).

A lectina obtida da fabácea *Ulex europaeus,* conhecida vulgarmente como tojo, *Ulex europeaus aglutinin* ou UEA I, se liga de maneira específica a resíduos de α-L-fucose. A UEA I é uma metaloproteína homodimérica, e cada uma de suas subunidades tem aproximadamente 27 kDa. Na **Figura 16** temos a planta da qual é extraída a UEA I (A) e a estrutura dessa proteína (B).

Figura 16. (A) Tojo, planta da qual é extraída a *Ulex europeaus* e **(B)** sua estrutura.



Fonte: Adaptada de AUDETTE *et al*., 2000 e também do site http://sernecportal.org/portal/taxa/index.php?taxon - acesso em 20.03.16.

Mudanças no perfil glicídico de células e tecidos tumorais muitas vezes provem da capacidade dessas células escaparem dos mecanismos regulatórios através de proteínas reguladoras do ciclo celular, aos quais as células estão sujeitas normalmente através da vigilância imunológica do organismo. As lectinas vêm se mostrando uma valiosa ferramenta para o estudo dos carboidratos expressos na superfície celular devido a sua alta estabilidade química, fácil utilização e alta especificidade no reconhecimento de carboidratos. Além disso, as lectinas são facilmente obtidas na natureza (SINGH *et al*, 2008). Devido a sua capacidade de interagir com carboidratos, as lectinas têm sido utilizadas como marcadores histoquímicos no estudo das modificações dos carboidratos de células tumorais, com o objetivo de diferenciar tecidos normais dos transformados através do perfil de carboidratos expresso no tecido estudado. O padrão alterado de glicosilação vem sendo utilizado com marcador para progressão de doença neoplásica (PINHO & REIS, 2015). Além disso, trabalhos sugerem que esse perfil glicídico pode ser utilizado como alvo para diagnóstico, estadiamento e terapia do câncer. Alguns artigos inclusive associam a presença de determinados carboidratos aberrantes com metástase tumoral (KARAVANI, 2014; ZHANG *et al.*, 2014; BOLIGAN, 2014; LI *et al.*, 2010).

Como as lectinas têm a capacidade de se ligar de maneira específica a carboidratos, vários trabalhos vêm utilizando lectinas para marcar sequências de carboidratos alteradas de células cancerígenas. Zanghelini *et al.* (2016), por exemplo, utilizou as lectinas WGA e ConA em um biossensor para detectar resíduos de carboidratos glicose/manose e N-acetilglucosamina (GlcNAc) em células de câncer de mama (MCF7 e T47D) (ZANGLELINI

et al., 2016). Thom *et al.* 2007 mostraram que a ligação das lectinas HPA (*Helix pomatia*), PHA-L (*Phaseolus vulgaris leucoagglutinin*) e UEA I eram fortemente relacionadas aos adenocarcinomas de pulmão (THOM *et al.*, 2007). He *et al.*, 2017 também utilizaram lectinas, a DAS (*Datura stramonium*) e LSA (*Lectin specific agglutinin*) para marcar sequências de carboidratos N-acetilglicosamina, N-acetilgactosamina e fucose em células de carcinoma hepatocelular (HCC) (He *et al.*, 2017). Galvão *et al.*, 2013 também utilizaram conjugados de PQs com UEA I e ConA com o objetivo de marcar glicose/manose e fucose em tecidos fixados de carcinoma ductal invasivo e fibroadenoma mamário, distinguindo seus padrões de glicosilação (GALVÃO *et al.*, 2013).

2.8 PONTOS QUÂNTICOS

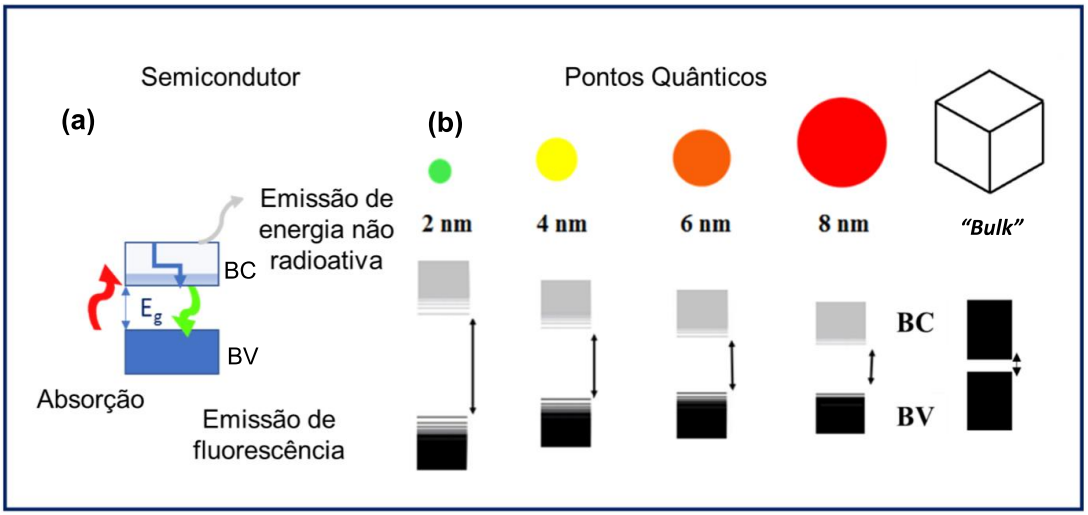
Pontos quânticos (PQs) também conhecidos como *Quantum dots* (QDs), são nanocristais de semicondutores, usualmente com diâmetros de 2 a 10 nm (1 nm = 10^{-9} m), com uma centena ou até mesmo milhares de átomos em confinamento quântico tridimensional. Esse regime de confinamento quântico confere aos PQs propriedades únicas quando comparados ao mesmo material em escala macroscópica, conhecido como "*bulk*" (BUHRO & COLVIN, 2003).

Os PQs podem ser sintetizados a partir de combinações de elementos presentes nos grupos 12 – 16 a 13 – 15 e 14 – 16 da tabela periódica. Anteriormente, quando a tabela periódica era dividida em famílias, esses elementos eram conhecidos como II-VI, III-V e IV-VI. Alguns exemplos dessas nanopartículas de semicondutores são: CdTe e PbS (II-VI); InP (III-V) e SnTe (IV-VI).

Os materiais semicondutores (tais como os PQs) são constituídos por uma banda de condução (BC), uma banda de valência (BV) e um *band gap* E_g de energia intermediária entre materiais isolantes e condutores, sendo então possível o deslocamento de elétrons da BV para BC utilizando radiação eletromagnética no visível a temperatura ambiente, conferindo assim as propriedades únicas dos PQs (**Figura 17a**). Para que os elétrons passem da BV para a BC é necessário que se doe uma energia maior ou igual a da E_g.. Após a excitação dos elétrons (e^-) e sua promoção para a BC, cria-se uma "lacuna" na BV (h^+) formando um éxciton (par elétron-lacuna, o qual tem uma forte interação Coulombiana). Quando há a recombinação do éxciton, há emissão de uma energia característica (fluorescência – **Figura 17a**).

Esse processo ocorre tanto no material semicondutor nanométrico como no "*bulk*". Porém, no *bulk* os níveis energéticos são distribuídos de maneira contínua. Essa condição muda na escala nanométrica, quando pelo menos uma das dimensões do material semicondutor é menor que o seu raio de Bohr (distância típica entre o e^- e seu h^+, os quais estão sob atração eletrostática). Nessa situação o material está sob o regime de confinamento quântico e há uma redistribuição dos seus níveis de energia. Se limitarmos as três dimensões do material de modo que fiquem em confinamento quântico tridimensional, teremos desdobramentos de novos níveis de energia, conhecidos como níveis discretos (**Figura 17b**). Nessa situação em que temos regime de confinamento quântico de maneira tridimensional em um semicondutor é que temos os PQs. Assim, quando a partícula for menor que o raio de Bohr característico de um determinado semicondutor, ela está sob efeito de confinamento quântico, e temos os chamados PQs. Por exemplo, o raio de Bohr do CdTe é de 7,5 nm, ou seja, quando a partícula de CdTe tiver um tamanho menor que 7,5 nm então ela é chamada de PQ (SANTOS et al., 2008; LIU & YU, 2009; BUHRO & COLVIN, 2003).

Figura 17. Representação esquemática mostrando a disposição das bandas energéticas para os sólidos semicondutores (a) e a relação do *band gap* (*Eg*) entre o *bulk* e PQs com suas correspondentes emissões (b). Legenda: BC – Banda de condução, BV – Banda de Valência.



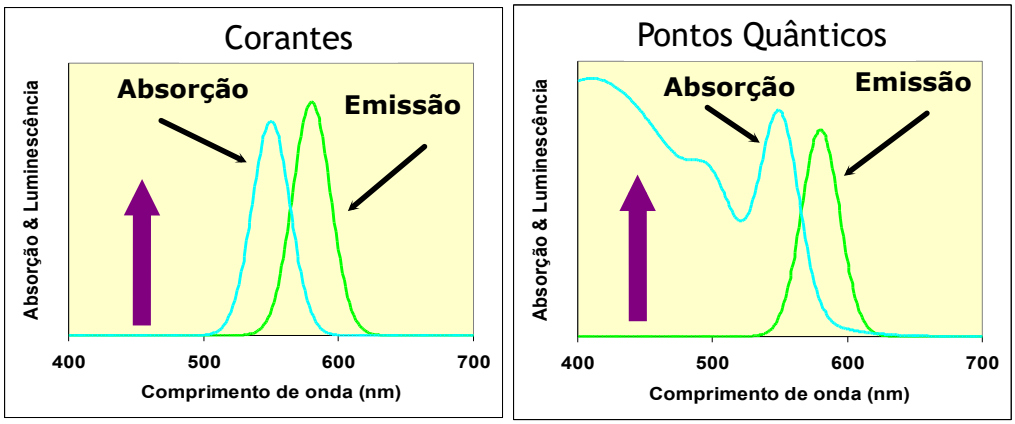
Fonte: o autor.

Em confinamento quântico, considerando um nanocristal feito de um mesmo material, o tamanho da partícula se correlaciona ao *Eg*. Sendo assim, pode-se controlar a região do espectro eletromagnético em que o PQ irá emitir apenas variando o tamanho da partícula (**Figura 17b**). Partículas maiores terão um menor *Eg* e irão emitir mais para a região do vermelho. Já partículas menores, terão um *Eg* maior e irão emitir em comprimentos de

ondas menores, ou seja, que com maior energia, por isso mais próximos da região do azul do espectro eletromagnético (SANTOS *et al.*, 2008).

Os PQs, devido a suas características ópticas especiais passaram a ser amplamente utilizados como marcadores biológicos fluorescentes, pois possuem várias propriedades e vantagens que os colocam a frente dos corantes orgânicos empregados tradicionalmente. Esses nanocristais possuem um largo espectro de absorção e um estreito espectro de emissão (Figura 18). Essa característica faz com que os PQs sejam versáteis, pois uma única fonte de luz pode ser usada para excitar uma grande variedade de tamanhos/cores de PQs. Além disso, pode-se mudar a emissão dos PQs apenas por variar o tamanho da partícula, ao contrário dos corantes orgânicos que tem uma banda de fluorescência mais estreita. A **Figura 18** mostra a comparação do espectro de absorção e emissão de corantes orgânicos e PQs (ALIVISATOS & YIN, 2005).

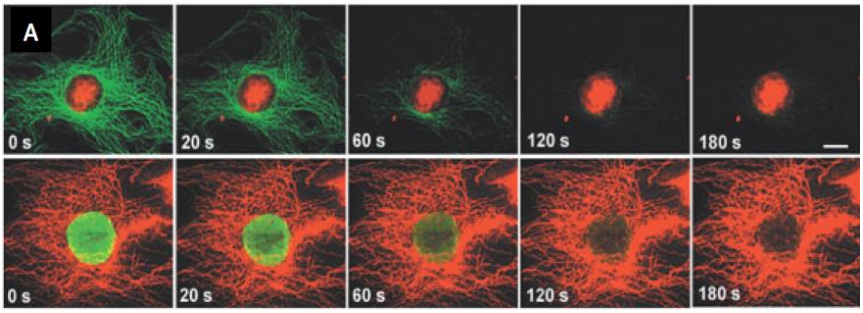
Figura 18. Comparação entre espectros de absorção e de emissão de PQs e corante orgânico.



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

Outra vantagem dos PQs quando comparados aos corantes orgânicos convencionais é a baixa fotodegradação (cerca de 100 vezes menor), permitindo que as imagens possam ser adquiridas com o máximo de intensidade de fluorescência, possibilitando que processos celulares sejam observados ao longo de um intervalo de tempo. Os PQs têm também uma superfície ativa, que permite sua conjugação às mais diversas biomoléculas. A **Figura 19** mostra a comparação de fotodegradação dos PQs aos corantes orgânicos. Além disso, os QDs são eletrodensos e permitem sua localização celular através de microscopia eletrônica de transmissão.

F**igura 19.** Comparação entre a resistência à fotodegradação dos PQs (em vermelho) e corante orgânico Alexa flúor 488 (em verde),

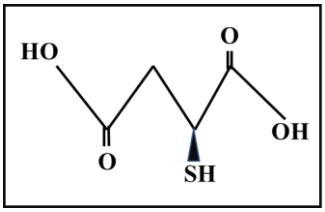


Fonte: ALIVISATOS, 2004

A literatura descreve dois tipos de abordagem para a síntese de PQs: *bottom-up* e *top-down*. Na abordagem *bottom-up* (mais utilizada para a síntese de PQs para aplicação biológica), os nanocristais são preparados em sínteses químicas, nas quais os átomos são adicionados e centros de nucleação são formados até que o núcleo (*core*) do nanocristal atinge o tamanho desejado. Geralmente, as nanopartículas crescem a partir de precussores dissolvidos em uma solução contendo um estabilizante. O estabilizante tem como objetivo manter as partículas dispersas em suspensão enquanto os centros de nucleação são formados, controlando o tamanho inicial e evitando que haja aglomeração das partículas. Existem rotas hidrofílicas e hidrofóbicas para esse tipo de síntese e muitos fatores podem influenciar diretamente o crescimento da nanopartícula, como temperatura, concentração de agentes precussores, tempo, pH e tipo de estabilizante. Os PQs produzidos em sínteses hidrofílicas são compatíveis com utilização em sistemas biológicos (FONTES *et al.*, 2012).

Os agentes estabilizantes empregados na síntese aquosa são geralmente moléculas orgânicas que contém tanto um grupamento tiol (-SH) quanto grupos amina ($-NH_2$) e/ou carboxílico (-COOH). Sendo assim, esses compostos contendo grupos tióis também: (i) ajudam a compor a camada de passivação, (uma monocamada de átomos que envolve o núcleo do nanocristal, reduzindo assim os defeitos de superfície que surgem na formação da nanopartícula) e (ii) conferem cargas positivas ou negativas aos PQs. Os grupamentos amina e carboxílico desses agentes estabilizantes agem ainda como grupos funcionais, intermediando a conjugação dos PQs a diversos tipos de moléculas, como por exemplo anticorpos, carboidratos e outras proteínas, que vão conferir especificidade para um alvo biológico, (TADA *et al.*, 2007). Por causa disso, os agentes estabilizantes também podem ser considerados agentes funcionalizantes. Um agente estabilizante bastante utilizado, o ácido mercaptossuccínico (MSA), tem sua estrutura ilustrada na **Figura 20** (HERMANSON, 2008).

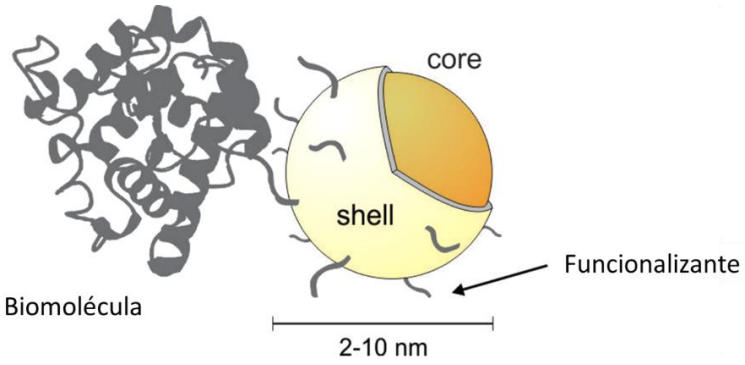
Figura 20. Estrutura do agente estabilizante MSA.



Fonte: O autor.

Após todas as etapas a nanopartícula final é composta de um núcleo (*core*), que determina o comprimento de onda no qual o PQ irá emitir, uma camada de passivação (*shell*) que determinar a qualidade da fluorescência dessa nanopartícula e uma camada funcionalizante, a qual serão ligadas moléculas que vão conferir a funcionalidade biológicas ao PQ. A **Figura 21** ilustra a estrutura completa desse nanocristal.

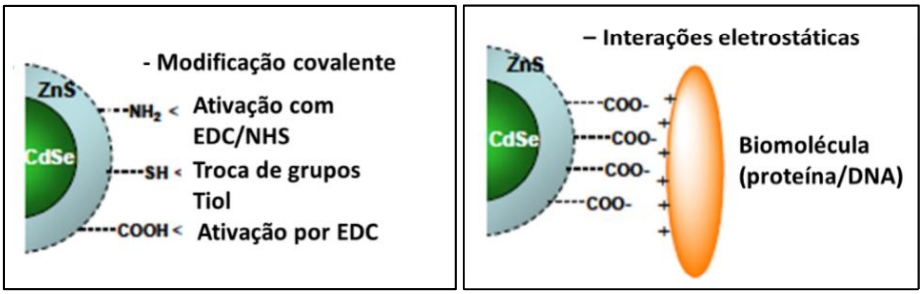
Figura 21. Estrutura de um PQ conjugado a uma biomolécula.



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

As moléculas biológicas que darão especificidade à nanopartícula poderão ser ligadas a mesma através de alguns métodos descritos na literatura. Os métodos mais comumente utilizados são as conjugações covalente e adsorção. Uma outra estratégia bastante usada é a troca de ligantes. Na conjugação covalente, grupos químicos são ativados para a ligação das biomoléculas. Os grupos carboxílicos por exemplo podem ser ativados por ésteres N-hidroxisuccinimida (NHS) 1- e N-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)para se ligarem nos grupos amina nas biomoléculas. Já na adsorção por ocorrer por meio de interações eletrostáticas com biomoléculas de cargas opostas às presentes na superfície do QD. A **Figura 22** ilustra alguns desses métodos (HERMANSON, 2008; KIM *et al.*, 2006).

Figura 22. Métodos de bioconjugação de PQs com biomoléculas.



Fonte: adaptado de KIM *et al.*, 2006.

Os PQs têm sido bastante aplicados em ciências da vida como marcadores fluorescentes, sondas para FRET (*Föster Resonance Energy Transfer*), biossensores, para o estudo de metabolismo biológico, para estudos de microorganismos, entre outros. No trabalho de He *et al.* 2017, utilizou-se PQs conjugados a lectinas para se adquirir imagens de células cancerígenas através de microscopia de fluorescência (HE *et al.*, 2017). Galvão *et al.*, 2013 utilizaram PQs conjugados a lectinas também para adquirir imagens por fluorescência para tecidos de câncer de mama (GALVÃO *et al.*, 2013). AKCA *et al.* 2014 aplicaram PQs conjugados a triflato-cisteamina manose (MTC) para a detecção de ácido siálico em células cancerígenas de câncer colorretal, pulmonar e de mama (AKCA *et al.*, 2014). Ainda, um biossensor baseado em PQs foi proposto para a detecção de câncer de mama por Zanghelini e co-autores em 2017 (ZANGHLINI *et al.*, 2017). Em 2015, Cabral-Filho *et al.* utilizaram PQs para o estudo de receptores de transferrina de células HeLa e de glioblastomas primário e recorrente através de conjugados com transferrina (CABRAL-FILHO *et al.*, 2016). Iannazo *et al.* (2017), utilizaram um sistema baseado em conjugados de PQs a doxorrubicina como um sistema de entrega direcionada de fármacos em células de câncer de pulmão. Assim, PQs associados a biomoléculas vêm se mostrando como ferramentas versáteis para avaliar a dinâmica e a expressão de biomarcadores em células tumorais.

3 METODOLOGIA E RESULTADOS

3.1 MANUSCRITO COM INTENÇÃO DE SER SUBMETIDO PARA REVISTA *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES: "Quantum Dots to Investigate Transferrin Receptors and L-Fucose Profiles in a Comparative Study Among Breast Cancer Cell Lines"*

Aline D. P. R. Oliveira[1], Camila A. P. Monteiro[1]; Ryan C. Silva[1]; Giovannia A. L. Pereira[2], Beate S. Santos[3]; Luiz B. Carvalho Júnior [4], Paulo E. Cabral Filho[1], Adriana Fontes[1]

[1]Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, Brazil.

[2]Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, Brazil.

[3]Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, Brazil.

[4]Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, Brazil.

*Corresponding authors: Adriana Fontes, Av. Prof. Moraes Rego, S/N. Departamento de Biofísica e Radiobiologia, CB, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil - Phone:+55 81 21267818, e-mail: adriana.fontes.biofisica@gmail.com.

ABSTRACT: Besides advances, there is still a need for improving the diagnosis and therapy of breast cancer, which can be supported by a deeper cancer cell biology comprehension. Herein, we applied quantum dots (QDs) conjugated to *Ulex europaeus* (UEA I) lectin or transferrin (Tf) to investigate the L-fucose glycocode, as well as the expression, internalization, and recycling of Tf receptors (TfRs) in the breast cancer cell lines MCF7, MDA-MB-231 (MDA), and T47D. QDs-UEA I specificity was confirmed by labeling A and O erythrocytes, whereas the confirmation for QDs-Tf was done by fluorescence microplate and saturation assays. Flow cytometry results showed that all breast cancer cells presented and internalized a similar amount of TfRs. On the other hand, the TfR recycling rate decreased as follows MDA>MCF7>T47D, correlating with the degree of aggressiveness. The QDs-UEA I labeling indicated that MDA presented a higher level of L-fucose when compared to the other ones. Microscopy images corroborated flow cytometry analyses. In addition, QDs-UEA I labeling showed a typical membrane-pattern, while for QDs-Tf endocytic vesicles were observed. Therefore, QDs-UEA I and QDs Tf bioconjugates showed to be specific and promising tools to study TfRs and L-fucose profiles in living breast cancer cells, allowing comparisons among them.

Keywords: lectin, transferrin, fluorescence, semiconductor nanocrystals.

1. INTRODUCTION

Cells have on their surface a structure called glycocalyx, a network of glycolipids, glycoproteins, and proteoglycans, which works as a cellular fingerprint and supports many functions like adhesion and cell-cell recognition [1–4]. Changes in glycans biosynthesis and post-translational modifications have been related as results of cell metabolism transformations, such as those caused by cancer. These modifications can reflect in an unusual exposition of carbohydrate on the cell surface, affecting the extracellular matrix, and inducing changes in cellular immunogenicity and antigenicity. Additionally, these modifications can favor tumor progress and have been associated with worse prognostics and metastasis in many cancers. The literature has described that there is a discrete change of sugar patterns during early stages of cancer, leading to more aberrant carbohydrate changes in the advanced ones [5–7]. These kinds of glycocode modifications can be accessed by using lectins, which are proteins that can bind, in a specific and reversible way, with many types of carbohydrates [8,9]. L-fucose carbohydrates, for example, has been described as involved in many tumoral antigens, conferring additional advantages to cancer cells, which can be studied by using *Ulex europaeus lectin* (UEA I) [10,11, 12 ,13].

On the other hand, cell membranes also contain a plenty of receptors, and among them, there are the transferrin receptors (TfRs), which play an important role in cell metabolism. TfR is a protein receptor always presents in low levels in all healthy cell types. This receptor is a gateway for transferrins bounded to irons entry into the cell through endocytic vesicles mediated by clathrin/dynamin. Inside the cell, iron is delivered into the cytoplasm and TfRs are recycled back to the surface [14]. Despite low levels in normal tissues, TfR can also present a higher expression in cancer, probably due to a greater dependence of iron necessary to keep the malignant cell metabolism and multiplication. Therefore, high levels of TfR expression can be associated with cancer and correlated with the tumor stage and progression of this disease. Some works have described a high level of TfR in cancers as prostatic, bladder, uterus, and liver [15–23].

Studies related to carbohydrates and cell receptors expressions can help to improve diagnosis as well as therapeutic approaches related to cancer since can support a cell biology comprehension of this disease. To a complete understanding of the mechanisms involved in cancer, it is necessary to apply tools that can go beyond the genomic barrier and complement information about the metabolism and the cellular aspects involved in the pathogenesis of this disease, which can be defined using fluorescent probes. Among the most promising

fluorophores are the quantum dots (QDs), semiconductor nanoparticles that have unique optical and chemical properties. QDs present exceptional resistance to photobleaching, enabling long-term studies, and a high active surface that allows their functionalization with biomolecules to reach biological targets with a high specificity [24]. Thus, QDs can be applied to strengthen our understanding of the roles of cellular receptors and carbohydrates in cancer [25–27].

Therefore, in this work, QDs were conjugated to UEA I lectin or transferrin to study, respectively, the L-fucose glycocode and the TfR expression, internalization, and recycling in breast cancer cell lines from adenocarcinoma (MCF7 and MDA-MB-231) and invasive ductal carcinoma (T47D). These lineages comprise the massive majority of breast cancers found in the women population [28]. This choice can allow us to delineate comparisons between two types of adenocarcinoma, with different invasive characteristics, as well as to contrast profiles associated with ductal and epithelial carcinomas. Besides considerable advances, there is still a need of improving diagnosis as well as therapeutic methods for this disease. Thus, this study can contribute to a deeper cancer cell biology comprehension, which can help to bring perspectives of developing more specific diagnosis and tumor targeting therapies.

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1 QDS SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION

QDs were prepared in an aqueous colloidal synthetic procedure based on two steps, according to methodology previously described[29], briefly: (i) metallic tellurium powder (Te^0) was reduced to Te^{2-} with a $NaBH_4$ solution in an inert nitrogen atmosphere, and (ii) the Te^{2-} ions were added to another solution containing Cd^{2+} and MSA (3-mercaptosuccinic acid) as the stabilizer agent. Both solutions of (i) and (ii) steps were prepared in a pH > 10 at *ca.* 90 ºC. Then, the reaction was maintained under stirring and heating at 90 ºC during 7 h for nanoparticle growth. The molar ratio of the synthesis was 5:1:6 (Cd:Te:MSA). All reagents used were obtained from Sigma-Aldrich. After, QDs were optically characterized by absorption (UV-Vis 1800 – Shimadzu) and emission spectroscopies (LS 55 – PerkinElmer, at 488 nm excitation). Using the absorbance and the wavelength corresponding to the first maximum absorption peak, the QDs average diameter was obtained [30]. Then, using the molar extinction coefficient for CdTe QDs [31] and the Lambert-Beer law, the QDs concentration was estimated.

2.2 QDS-TF AND QDS-UEA I CONJUGATION AND CHARACTERIZATION

CdTe-MSA QDs were conjugated with Tf or UEA I (Sigma-Aldrich), by using N-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC – Fluka) and N-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (Sulfo-NHS – Sigma-Aldrich) as coupling agents, according to methodology previous reported with some modifications [20, 29]. In both cases, firstly, the pH of the QDs suspension was adjusted to 5.5 by using a MSA solution. To Tf conjugation, for each 1 mL of QDs (at 0.8 μM), it was used 0.5 mL of EDC (4 $mg.mL^{-1}$), 0.5 mL of Sulfo-NHS (5.5 $mg.mL^{-1}$) and 97 μL of Tf (1 $mg.mL^{-1}$), to reach a *ca.* 1:2 QDs:Tf ratio. To the lectin conjugation, for each 1 mL of QDs (at 13 μM), it was applied 1 mL of EDC (4 $mg.mL^{-1}$), 1 mL of Sulfo-NHS (10 $mg.mL^{-1}$) and 400 μL of UEA I (0.5 $mg.mL^{-1}$), which rendered a proportion of *ca.* 3:1 QDs:UEA I. The conjugates were also characterized by absorption and emission spectroscopies, as previously described.

2.3 CELL CULTURE

MDA-MB-231, MCF7, and T47D cell lines were obtained from Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ – Rio de Janeiro, RJ, Brazil). MCF7 and T47D cells were cultured in Roswell Parker medium 1640 (RPMI 1640 – Gibco) and MDA in Leibovit'z L15 medium (Gibco):Ham's F12 (Sigma-Aldrich) (1:1), both supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS), 100 $mg{\cdot}mL^{-1}$ of streptomycin, and 1 $unit{\cdot}mL^{-1}$ of penicillin (Sigma-Aldrich), at 37 ºC in a humified atmosphere with 5% CO_2. When 90% of confluence was reached, cells were detached from the flask with trypsin-EDTA 0.25% (Gibco). Cells were then seeded in a 6-well plate (Greiner) for flow cytometry evaluation ($2x10^5$ cells/well) and in 4-well culture dish with glass bottom (Greiner) for confocal microscopy analysis ($1x10^5$ cells/well) and incubated for 24 h at 37 ºC in a humified atmosphere with 5% CO_2.

2.4 CELL LABELING WITH QDS-TF AND QDS-UEA I

After incubation, wells were washed with PBS 1x (from now on named as PBS, Gibco) and the following experimental conditions were assayed: 1 – control cells, and 2 – cells incubated with QDs-Tf (1:1 v/v) or QD-UEA I (1:1 v/v) conjugates. After 60 min (for QDs-Tf) or 30 min (for QDs-UEA I) of incubation at 37 ºC, cells were washed with PBS before flow cytometry and confocal microscopy analyses to remove any residual free conjugates or eventual bare QD attached in cell surface.

The percentage of labeled cells was evaluated by flow cytometry (BD Accuri™ C6, Becton Dickinson). For this analysis, cells were detached from the 6-well plate upon

incubation with trypsin-EDTA followed with inactivation with the appropriate culture medium supplemented with FBS (RPMI for MCF7 and T47D, and L15:F12 for MDA-MB-231). Then, cell suspensions were washed 3 times by centrifugation with PBS at 400 x*g* for 2 min (MiniSpin - Eppendorf). Thus, cells were analyzed and 20,000 events were acquired for each experimental condition, under excitation at 488 nm. The emission was detected with the FL2 filter (585/40) and the data were processed using the BD Accuri software.

For confocal microscopy analysis, cells plated in the dishes were washed three times with PBS. Cells were incubated for 5 min with Hoechst dye (Sigma-Aldrich, at a final concentration of 0.6 μg/mL) to stain cell nuclei in blue by DNA binding and, subsequently, washed with PBS. Cells were observed under confocal multispectral microscopy (Leica). For QDs, the emission was collected from 600 to 670 nm with excitation at 488 nm. For Hoechst nuclear dye, the fluorescence was detected from 510 to 540 nm, at 405 nm excitation.

To confirm the specificity of the labeling and evaluate the TfR recycling, cells were incubated with an excess of human holo-transferrin (10 $mg \cdot mL^{-1}$), for 60 min at 37 ºC, to saturate TfRs. Afterwards, cells were incubated with QDs-Tf for further 60 min before flow cytometry and confocal analyses, by using the conditions detailed before.

Besides, it was also performed tests applying the fluorescent microplate assay (FMA) to confirm the efficiency of the QDs-Tf conjugation [32]. For this, samples were placed in a polystyrene microplate in triplicate in the following scheme: (1) Tf, (2) QDs, and (3) QDs-Tf. The microplate was kept for 2 h in a water bath at 37 ºC, and then, washed three times PBS. Next, the fluorescent signal was quantified in a WALLAC 1420 plate reader, with software Victor 2 (PerkinElmer), using the excitation bandpass filter BP 405/5 nm and the emission bandpass filter BP 595/15 nm.

To verify the specificity and efficiency of the QDs-UEA I conjugates, it was performed an assay using type O and A red blood cells (RBCs) (ethics committee HEMOPE – 1.576.830) according to the methodology previously described by Cabral Filho *et al.* [29]. For this, A and O RBCs were incubated with QDs-UEA I for 30 min, using the proportion of 1:1 v/v (conjugates:cells in 1% saline solution). Then, cells were centrifuged at 200 x*g* for 30 s, washed and pelleted three times with PBS before flow cytometry analysis, and evaluated under the same conditions described above.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 QDS AND BIOCONJUGATES CHARACTERIZATION

Optical characterizations showed that QDs present the first maximum of absorption at *ca.* 569 nm, as can be observed in Fig. 1A. Using this value, it was possible to estimate the nanoparticles average diameter as *ca.* 3.2 nm [30]. Then, using the coefficient of molar extinction for CdTe proposed by Yu *et al.*[31] and the Lambert-Beer equation, it was found a concentration of about 13 μM. QDs showed an emission peak at 613 nm (Fig. 1A) and a full width at half maximum (FWHM) of about 54 nm.

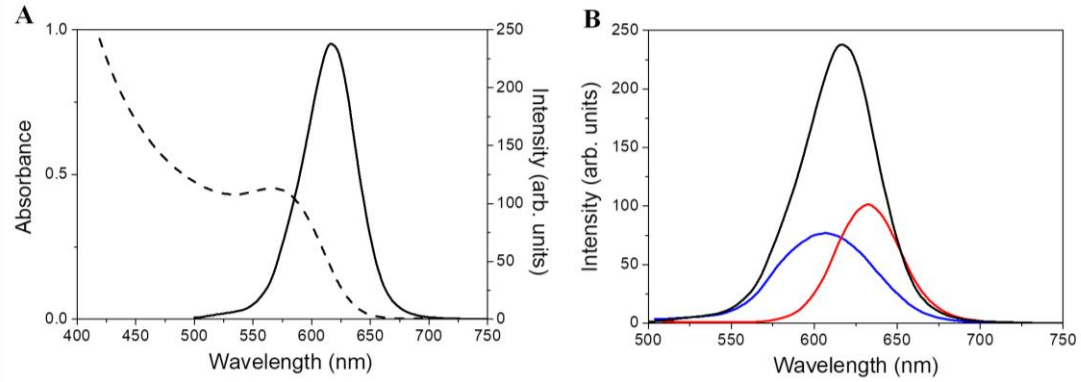


Figure 1. (A) Optical characterization of CdTe QDs: absorption (dashed line) and emission (solid line) spectrum. (B) In black, red and blue: emission spectra of bare QDs; QDs-Tf and QDs-UEA I, respectively. Excitation at 488 nm.

Bioconjugates showed similar emission profiles when compared to bare QDs. However, a red shift of approximately 20 nm was observed to QDs-Tf, as shown in Fig. 1B. On the other hand, QDs-UEA I conjugates presented a discreet blue shift of around 7 nm (Fig. 1B). These shifts can be associated with the QDs surface modification and can be considered a suggestion of conjugation [33]. Both conjugates also presented a decrease in the fluorescent signal. However, despite these changes, the conjugates remained highly fluorescent. Moreover, it was not observed considerable changes in the absorption spectrum of the conjugates when compared to bare QDs (data not shown).

3.2 CONFIRMATION OF CONJUGATION FOR QD-TF AND QDS-UEA I

From FMA data it was determined an increase of 1551.6% in the relative fluorescence (RF) for QDs-Tf when compared to controls (bare QDs and Tf alone) [32]. According to Carvalho [32], bioconjugation process is efficient when bioconjugates show a RF higher than 100%, which confirms our Tf conjugation with QDs.

Otherwise, the specificity and efficiency of QDs-UEA I conjugates was proved through the labeling of A or O RBCs, as shown in Fig. 2A and 2B, respectively. Results revealed that 96.5% of O RBCs were labeled by QDs-UEA I, while only 4.7% of A RBCs were labeled by this same conjugate. Therefore, these results prove the efficiency and specificity of QDs-UEA I conjugates to bind specifically to L-fucose, since O type present this carbohydrate exposed on its membrane.

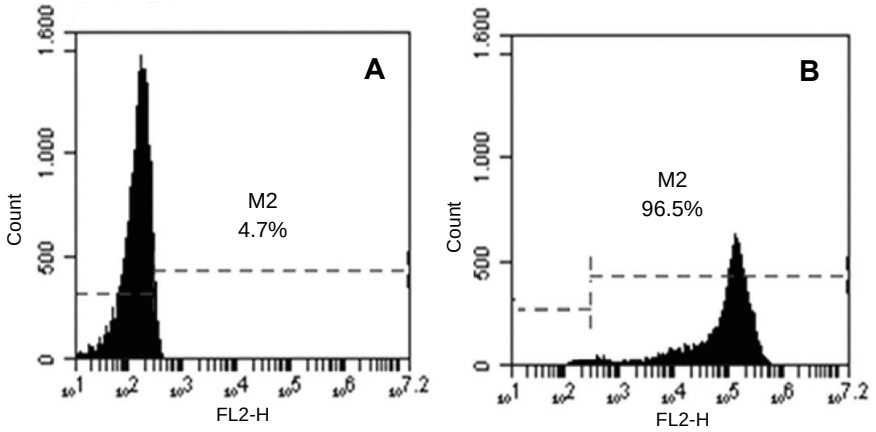


Figure 2. Flow cytometry histogram profiles for A and O RBCs (A and B, respectively) incubated with QDs-UEA I conjugates.

3.3 CELLS LABELING BY QDS-TF

When we incubated QDs-Tf with MCF7, MDA-MB-231, and T47D cells, we obtained the following average labeling percentages by flow cytometry: 80, 78 and 72%, respectively. All cells percentages are summarized in Table 1. Fig. 2 (A2, B2 and C2) shows the representative histograms for each cell line labeled by QDs-Tf. Experiments were carried out at least in triplicate.

Inoue [19] compared MCF7 and MDA-MB-231 cell lines using Scatchard analysis with ^{125}I-labeled Tf and found a close number of TfR in both of them. Faulk [17] studied breast tissues from 74 patient samples and showed a significantly higher rate of TfR in carcinoma types. Our results agree with those studies, and cells showed similar internalization and amounts of TfRs. Abe [34] studied TfRs in T47D cells using Forster Resonance Energy Transfer (FRET) and also found that this cell line express and internalize high numbers of TfRs.

Zajchowski [35] analyzed genetically all the cell lines used in this work. They showed that these cells have different genotypes characteristics, with different grades of malignity. MDA-MB-231 presents more malignant characteristics, while MCF7 and T47D were related to a lighter metastatic and invasibility profiles. Despite their genetic characteristics, according

to our study, all the cells presented a similar labeling percentage by QDs-Tf, suggesting that all breast cancer cells may have a great dependence of iron in the metabolism.

Moreover, for all cell lines it was observed a decrease of labeling after the saturation assay, which confirms the specificity of QDs-Tf to TfRs (Table 1, Fig. 3 – A3, B3, and C3). However, the saturation assay can provide knowledge beyond the TfR content and its internalization, bringing to light information also about the recycling of receptors, an aspect not usually studied in the literature. If cells have a fast recycling rate, saturation will be less effective, because they will quickly expose the internalized receptors back to the membrane to incorporate new Tf molecules. For this case, even after the saturation assay, cells will show a considerable labeling percentage [29]. Otherwise, if the cell has a slower metabolism, this process of recycling will tend to take more time, and after the saturation assay, the cell will show a lower percentage of labeling. We obtained three different patterns of labeling after the saturation according to the cell line chosen. By these results, we can have clues about how the cell metabolism is working.

MDA-MB-231 was the cell line with the higher percentage of labeling after the saturation, *ca.* 46% according to Table 1 and Fig. 3 – B3. As mentioned before, these cells are reported as a more malignant and invasive according to genotypic study, and this faster receptor recycling rate can be related to a greater need of iron ions to act as cofactors in reactions for DNA biosynthesis [35]. In another type of cancer, it was also established this kind of correlation with cell characteristics. Cabral-Filho [20] also found a faster rate of recycling for a more aggressive cell line DBTRG-05MG when compared to U87, which is associated with a better prognostic.

Table 1. Average flow cytometry percentages for MCF7, MDA-MB-231, and T47D cells: control, labeling with QDs-Tf and after the saturation assay.

Cell line	Control (%)	QDs-Tf (%)	Saturated (%)
MCF7	1.0	77.8	37.3
MDA-MB-231	1.0	80.0	46.0
T47D	1.3	72.0	7.0

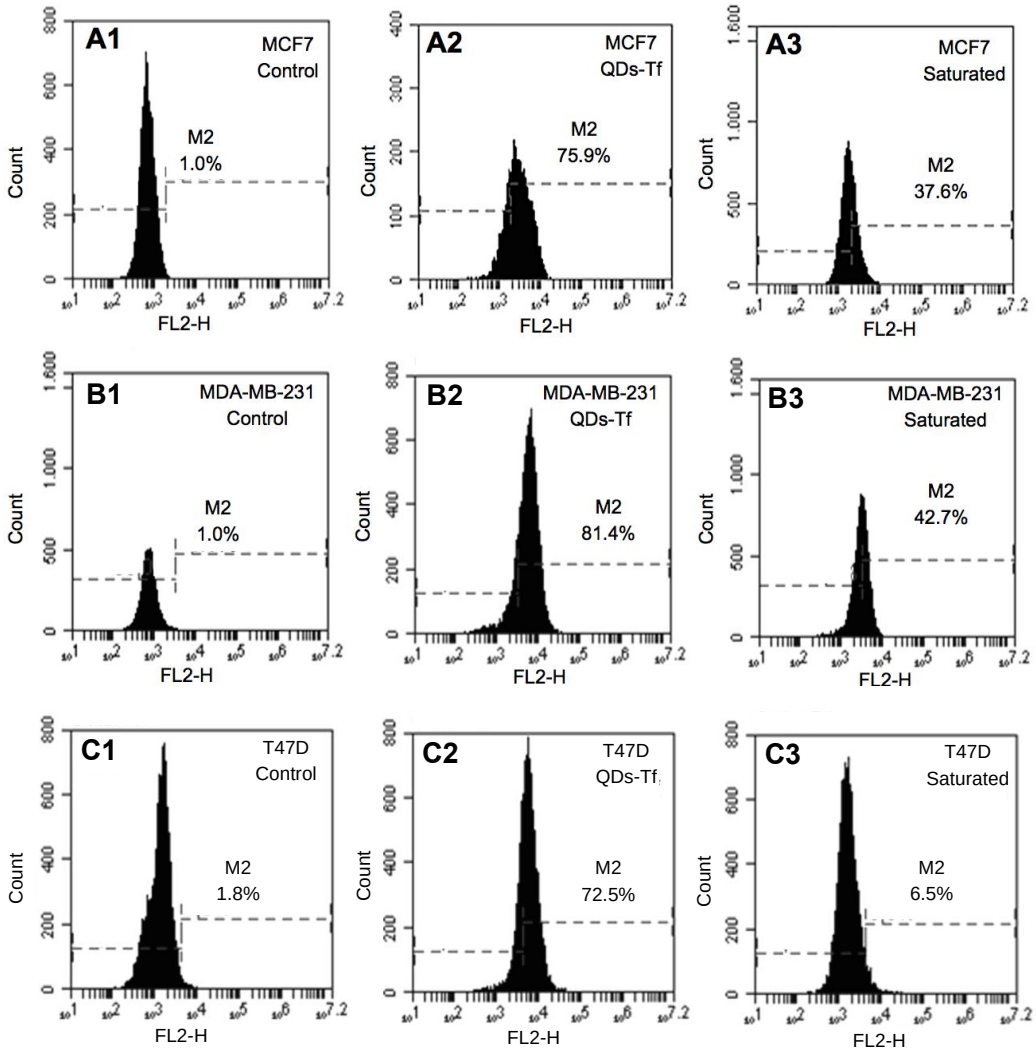


Figure 3. Flow cytometry representative histograms: A – MCF7, B – MDA-MB-231, and C – T47D: (1) control; (2) QDs-Tf labeling and (3) cells exposed to QDs-Tf after the saturation of receptors with free Tf.

Still discussing breast adenocarcinoma cell lines, MCF-7 presented a little lower labeling after saturation, about 37% (Table 1, Fig. 3 – 3A). As a little less aggressive kind of cancer, we may expect a slower rate of TfRs recycling. It was not found previous works about TfR recycling in MCF7 cells, but the still high percentage of labeled cells, even after the saturation, can also be associated with a great dependence of iron, making these cells also prioritize to recycle TfR back to the membrane.

Finally, carcinoma breast cancer cells T47D was labeled only around 7% after the saturation (Fig. 3 – C3). This cell line is reported as little aggressive [35] and their characteristics were compatible with the low labeling detected for them after the saturation assay, reflecting a slower metabolism found in cells with the low power of metastasis and invasibility. Cell lines presented similar expression and internalization profiles, but the rate of TfRs recycling was different for each of them, due to their unique characteristics, cell type and malignance grade.

Additionally, confocal microscopy images also showed an efficient internalization of TfRs, presenting a vesicular pattern in cell cytoplasm stained by QDs-Tf in red, contrasting with nucleus labeled in blue by Hoechst dye, as shown Fig. 4 for MCF7 cells. This same pattern was also found for the other cell lines (data not shown). Ghosh *et al.* also described a similar pattern for Hep2 hepatic cancer using fluorescein isothiocyanate (FITC) attached to Tf [36].

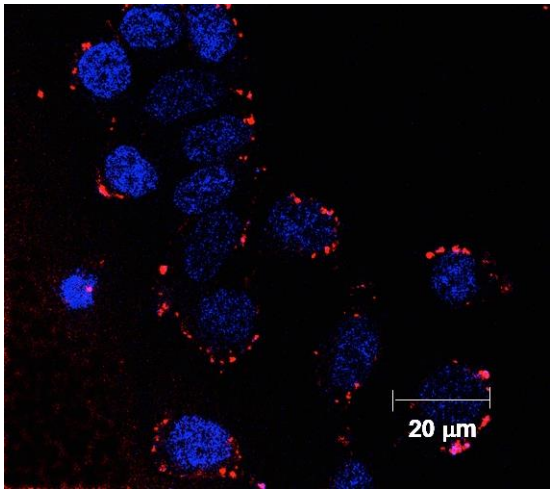


Figure 4. Confocal image showing endocytic vesicles in MCF7 due to the labeling by QDs-Tf (in red). In blue: nucleus stained by the Hoescht dye.

3.4 CELLS LABELING BY QDS-UEA I

After the confirmation of QDs-UEA I conjugation, we applied them to investigate L-fucose carbohydrate expression profile on breast cancer cells. Previous studies have been associating a higher level of carbohydrates expression to many tumors, as liver, lungs and skin, prostate and guts [2,5, 37–40].

In our results by flow cytometry, QDs-UEA I labeled an average of 79% for MDA-MB-231, 49% for MCF7 and around 35% for T47D cell lines, as shown in Table 2. Experiments were also performed at least in triplicate. Fig. 5 shows representative histograms profile for these three cell lines.

Table 2. Average flow cytometry percentages for MCF7, MDA-MB-231, and T47D cells: control and labeling with QDs-UEA I.

Cell line	Control (%)	QDs-UEA I (%)
MCF7	2.0	49.0
MDA-MB-231	1.0	79.4
T47D	0.7	35.1

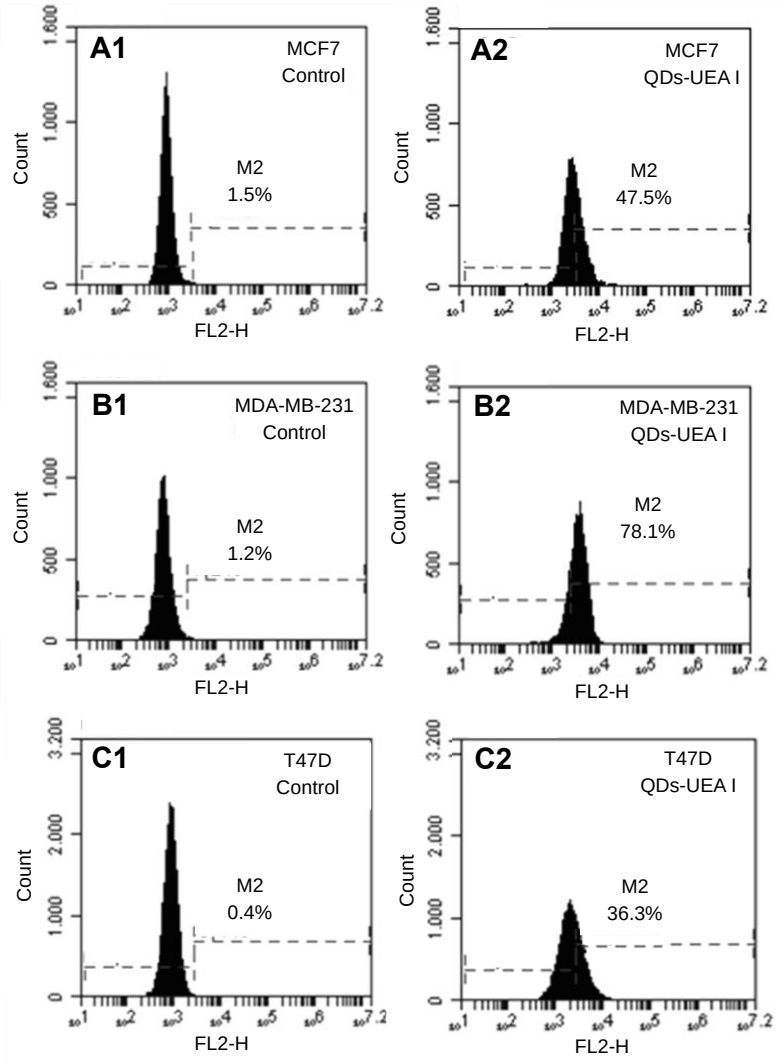


Figure 5. Flow cytometry representative data: MCF7, MDA-MB-231, and T47D labeled by QDs-UEA I.

The relation between carbohydrates and cancer has been the subject of many studies over the years [2,5,37–39]. Andrade [41]for example, used QDs conjugated to UEA I and Concanavalin A (ConA) to study benign and malign breast tissues, and showed that QDs-ConA labeled preferentially the stroma while QDs-UEA I labeled efficiently the ductal cells. These carbohydrates that can be denominated as Tumor-Associated Carbohydrate Antigens (TACA) have been related as active biomolecules in the cancer process, described a series of TACAs displaying L-fucose in their composition, such as Lewis^{X}, Lewis^{a}, Lewis^{b}, Sialyl Lewis [10, 11]. L-fucosylation has been reported as providing to cells a protection from the immunological system in the prostate, colon rectal, and melanoma cancer [12, 13]. Yuan *et al.*[7] performed a coordinated defucosylation in breast cancer cells. From these experiments it was observed that when L-fucose was removed, the interaction between the tumor and their external matrix decreased, modulating the invasion and tumor progression. In our results, a

high rate of L-fucose was found in MDA-MB-231, the more aggressive cell line studied, supporting the idea that this carbohydrate may have an important role in cancer progression, deceiving the immune system and promoting detachment from tumor cell to matrix, leading to its advance and metastasis. This idea is strengthened by the lower rates of L-fucose expressed in MCF7 and T47D, which have less malign characteristics[35]. Thus, our work pointed the potential of QDs-lectin probes to extract information from the cells and the tumor environment.

Confocal microscopy images presented in Fig. 6 (A – C) exhibit a membrane-labeling pattern for all cell lines and corroborates the flow cytometry data showing that MDA-MB-231 displayed a greater labeling in comparison with another cell lines. These achievements also corroborate genotypic data reported in the literature [35].

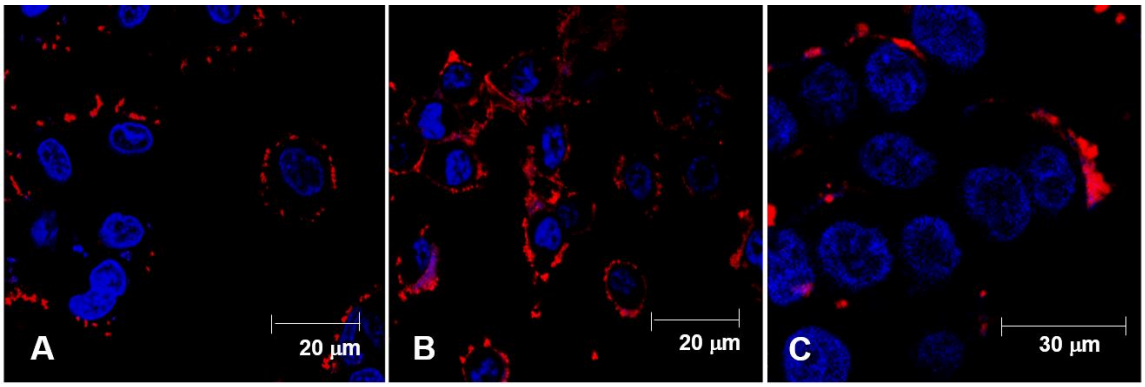


Figure 6. A) MCF7; B) MDA-MB-231 and C) T47D cells labeled with QDs-UEA I conjugates (in red). In blue: nucleus stained by the Hoescht dye.

Taking together all results, it is possible to establish some comparisons between the labeling with QDs-Tf and QDs-UEA I conjugates. Due to TfR endocytosis, vesicles perinuclear were observed after incubation with QDs-Tf conjugates, while a membrane labeling-pattern was displayed for QDs-UEA I. Moreover, despite conjugates had different cellular structural targets/localization and all cell lines displayed a great dependence of iron, results showed that the TfR recycling rate seems to be correlated with the L-Fucose expression among cell lines. This suggests that not only the amount/internalization of cell receptors but also their dynamic deserve investigation. Besides, MDA-MB-231 had the highest TfR amount, internalization, and recycling rate as well as the greatest L-Fucose expression, correlating with a more aggressive characteristic of this cell line. Thus, these conjugates can be complementary tools to support the cancer biology comprehension.

4 CONCLUSION

It was observed a great and similar dependence of iron for all cell lines revealed by the QDs-Tf labeling. However, their TfR recycling rates were different, decreasing as follows MDA-MB-231 > MCF7 > T47D. Nevertheless, MCF7 still displayed a reasonable rate of recycling. The microscopy labeling with QDs-Tf showed a vesicular profile due to cell endocytosis, while QDs-UEA I displayed a cell membrane-labeling pattern. Besides, QDs-UEA I flow cytometry results indicated that the amount of L-fucose decreases in the following way MDA-MB-231 > MCF7 > T47D, correlating then with the potential of metastasis, and invasibility level reported to these cell lines.

Therefore, QDs-Tf and QDs-UEA I bioconjugates showed to be specific and promising tools to label and study TfRs and L-fucose profiles in living breast cancer cells, allowing comparisons among them. We believe that these nanoprobes are tools that can play an important role to understand cancer cell biology, which is fundamental to improve diagnosis as well as therapeutic approaches for this disease.

NOTES: The authors declare that they do not have competing or conflicting interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE). This work is also linked to the National Institute of Photonics (INFo).

REFERENCES

[1] D. Hoja-Łukowicz, M. Przybyło, M. Duda, E. Pocheć, M. Bubka, On the trail of the glycan codes stored in cancer-related cell adhesion proteins, Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. 1861 (2017) 3237–3257.

[2] V. Padler-Karavani, Aiming at the sweet side of cancer: Aberrant glycosylation as possible target for personalized-medicine, Cancer Lett. 352 (2014) 102–112.

[3] M.M. Fuster, J.D. Esko, The sweet and sour of cancer: Glycans as novel therapeutic targets, Nat. Rev. Cancer. 5 (2005) 526–542.

[4] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: The next generation, Cell. 144 (2011) 646–674.

[5] S.S. Pinho, C.A. Reis, Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications,

Nat. Rev. Cancer. 15 (2015) 540–555.

[6] M.E. Janik, D. Hoja-łukowicz, M. Przybylo, Cadherins and their Role in Malignant Transformation : Implications for Skin Cancer Progression, in: M. Blumenberg, Human Skin Cancer, Potential Biomarkers and Therapeutic Targets, InTech, 2016.

[7] Y. Tian, Z. Yao, R.B.S. Roden, H. Zhang, Identification of glycoproteins associated with different histological subtypes of ovarian tumors using quantitative glycoproteomics, Proteomics. 11 (2011) 4677–4687.

[8] N. Sharon, Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules., J. Biol. Chem. 282 (2007) 2753–2764.

[9] H. Ghazarian, B. Idoni, S.B. Oppenheimer, A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics, Acta Histochem. 113 (2011) 236–247.

[10] J.J. Listinsky, G.P. Siegal, C.M. Listinsky, The emerging importance of ??-L-fucose in human breast cancer: A review, Am. J. Transl. Res. 3 (2011) 292–322.

[11] Hakomori S. Tumor-associated carbohydrate antigens. Annu Rev Immunol 2 (1984); 103-126.

[12] S. Cordel, C. Goupille, F. Hallouin, K. Meflah, J. Le Pendu, Role for alpha1,2-fucosyltransferase and histo-blood group antigen H type 2 in resistance of rat colon carcinoma cells to 5-fluorouracil., Int. J. Cancer. 85 (2000) 142–148.

[13] S.R. Barthel, G.K. Wiese, J. Cho, M.J. Opperman, D.L. Hays, J. Siddiqui, K.J. Pienta, B. Furie, C.J. Dimitroff, Alpha 1,3 fucosyltransferases are master regulators of prostate cancer cell trafficking, Proc. Natl. Acad. Sci. 106 (2009) 19491–19496.

[14] B.S. Skikne, Serum transferrin receptor, Am. J. Hematol. 83 (2008) 872–875.

[15] B. Lonnerdal, S. Iyer, Lactoferrin : Molecular Structure and Biologigal Function, Annu. Rev. Nutr. 15 (1995) 93–110.

[16] A.B. Schryvers, I. Stojiljkovic, Iron acquisition systems in the pathogenic Neisseria, Mol. Microbiol. 32 (1999) 1117–1123.

[17] W. Page Faulk, B.L. Hsi, P.J. Stevens, Transferrin and Transferrin Receptors in Carcinoma of the Breast, Lancet. 316 (1980) 390–392.

[18] K.C. Gatter, G. Brown, I.S. Trowbridge, R.E. Woolston, D.Y. Mason, Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance., J. Clin. Pathol. 36 (1983) 539–545..

[19] T. Inoue, P.G. Cavanaugh, P.A. Steck, N. Brünner, G.L. Nicolson, Differences in transferrin response and numbers of transferrin receptors in rat and human mammary

carcinoma lines of different metastatic potentials, J. Cell. Physiol. 156 (1993) 212–217.

[20] P.E. Cabral Filho, A.L.C. Cardoso, M.I.A. Pereira, A.P.M. Ramos, F. Hallwas, M.M.C.A. Castro, C.F.G.C. Geraldes, B.S. Santos, M.C. Pedroso De Lima, G.A.L. Pereira, A. Fontes, CdTe quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells, Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. 1860 (2016) 28–35.

[21] S.M. Jeong, S. Hwang, R.H. Seong, Transferrin receptor regulates pancreatic cancer growth by modulating mitochondrial respiration and ROS generation, Biochem. Biophys. Res. Commun. 471 (2016) 373–379.

[22] S. Shimosaki, S. Nakahata, T. Ichikawa, A. Kitanaka, T. Kameda, T. Hidaka, Y. Kubuki, G. Kurosawa, L. Zhang, Y. Sudo, K. Shimoda, K. Morishita, Development of a complete human IgG monoclonal antibody to transferrin receptor 1 targeted for adult T-cell leukemia/lymphoma, Biochem. Biophys. Res. Commun. 485 (2017) 144–151.

[23] B. Voth, D.T. Nagasawa, P.E. Pelargos, L.K. Chung, N. Ung, Q. Gopen, S. Tenn, D.T. Kamei, I. Yang, Transferrin receptors and glioblastoma multiforme: Current findings and potential for treatment., J. Clin. Neurosci. 22 (2015) 1071–6.

[24] A. Fontes, R.B. de Lira, M.A.B. Lopes Seabra, T.G. da Silva, A.G. de Castro Neto, B. Saegesser, Quantum Dots in Biomedical Research, in: Biomed. Eng. - Tech. Appl. Med., 2012.

[25] D. He, D. Wang, X. Shi, W. Quan, R. Xiong, C. Yua, H. Huang, Simultaneous fluorescence analysis of the different carbohydrates expressed on living cell surfaces using functionalized quantum dots, Rsc Adv. 7 (2017) 12374–12381.

[26] O. Akca, P. Unak, E.I. Medine, S. Sakarya, A.Y. Kilcar, C. Ichedef, R. Bekis, S. Timur, Radioiodine labeled CdSe/CdS quantum dots: Lectin targeted dual probes, Radiochim. Acta. 102 (2014) 849–859.

[27] F. Zanghelini, I.A.M. Frías, M.J.B.M. Rêgo, M.G.R. Pitta, M. Sacilloti, M.D.L. Oliveira, C.A.S. Andrade, Biosensing breast cancer cells based on a three-dimensional TIO2nanomembrane transducer, Biosens. Bioelectron. 92 (2017) 313–320.

[28] D.T. Ross, C.M. Perou, A comparison of gene expression signatures from breast tumors and breast tissue derived cell lines., Dis. Markers. 17 (2001) 99–109.

[29] P.E. Cabral Filho, Mi. Pereira, H.P. Fernandes, A.A. de Thomaz, C.L. Cesar, B.S. Santos, M.L. Barjas-Castro, A. Fontes, Blood group antigen studies using CdTe quantum dots and flow cytometry, Int J Nanomedicine. 10 (2015) 4393–4404.

[30] P. Dagtepe, V. Chikan, J. Jasinski, V.J. Leppert, Quantized growth of CdTe quantum

dots; observation of magic-sized CdTe quantum dots, J. Phys. Chem. C. 111 (2007) 14977–14983.

[31] W.W. Yu, L. Qu, W. Guo, X. Peng, Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals, Chem. Mater. 15 (2003) 2854–2860.

[32] K.H.G. Carvalho, A.G. Brasil, P.E. Cabral Filho, D.P.L.A. Tenório, A.C.A. De Siqueira, E.S. Leite, A. Fontes, B.S. Santos, Fluorescence Plate Reader for Quantum Dot-Protein Bioconjugation Analysis, J. Nanosci. Nanotechnol. 14 (2014) 3320–3327.

[33] S. Wang, P.S. Low, Folate-mediated targeting of antineoplastic drugs, imaging agents, and nucleic acids to cancer cells, J. Control. Release. 53 (1998) 39–48.

[34] K. Abe, L. Zhao, A. Periasamy, X. Intes, M. Barroso, Non-invasive in vivo imaging of near infrared-labeled transferrin in breast cancer cells and tumors using fluorescence lifetime FRET, PLoS One. 8 (2013).

[35] D. a Zajchowski, M.F. Bartholdi, Y. Gong, L. Webster, H.L. Liu, A. Munishkin, C. Beauheim, S. Harvey, S.P. Ethier, P.H. Johnson, Identification of Gene Expression Profiles That Predict the Aggressive Behavior of Breast Cancer Cells, Gene Ther. 61 (2001) 5168–5178.

[36] R.N. Ghosh, D.L. Gelman, F.R. Maxfield, Quantification of low density lipoprotein and transferrin endocytic sorting HEp2 cells using confocal microscopy., J. Cell Sci. 107 (Pt 8 (1994) 2177–2189.

[37] X. Zhang, Y. Wang, Y. Qian, X. Wu, Z. Zhang, X. Liu, R. Zhao, L. Zhou, Y. Ruan, J. Xu, H. Liu, S. Ren, C. Xu, J. Gu, Discovery of specific metastasis-related N-glycan alterations in epithelial ovarian cancer based on quantitative glycomics, PLoS One. 9 (2014).

[38] K.F. Boligan, C. Mesa, L.E. Fernandez, S. Von Gunten, Cancer intelligence acquired (CIA): Tumor glycosylation and sialylation codes dismantling antitumor defense, Cell. Mol. Life Sci. 72 (2015) 1231–1248.

[39] M. Li, L. Song, X. Qin, Glycan changes: Cancer metastasis and anti-cancer vaccines, J. Biosci. 35 (2010) 665–673.

[40] E.J. Joo, A. Weyers, G. Li, L. Gasimli, L. Li, W.J. Choi, K.B. Lee, R.J. Linhardt, Carbohydrate-Containing Molecules as Potential Biomarkers in Colon Cancer, Omi. A J. Integr. Biol. 18 (2014) 231–241.

[41] C.G. Andrade, P.E.C. Filho, D.P.L. Tenório, B.S. Santos, E.I.C. Beltrão, A. Fontes, L.B. Carvalho, Evaluation of glycophenotype in breast cancer by quantum dot-lectin histochemistry, Int. J. Nanomedicine. 8 (2013) 4623–4629.

3.2 MANUSCRITO A SER TRADUZIDO COM INTENÇÃO DE SER SUBMETIDO PARA A REVISTA BBA GENERAL SUBJECTS "Conjugados de Pontos Quânticos Altamente Fluorescentes para Estudo de Receptores de Folato no Câncer de Mama"

A. P. R. R. Oliveira[1,] , C. A. P. Monteiro [1,] , R. R. M. Lima [1], G. Pereira [2], B. S. Santos [3], L. B. Carvalho-Júnior [4], P. E. Cabral Filho [1], A. Fontes [1,*]

[1]Departamento de Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE, Brasil.

[2]Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE, Brasil.

[3]Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE, Brasil.

[4]Departamento de Bioquímica, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE, Brasil.

*__Autor correspondente__: Adriana Fontes, Av. Moraes Rego, S / N. Departamento de Biofísica e Radiobiologia, CB, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brasil - Telefone: +55 81 21267818, e-mail: adriana.fontes.biofisica@gmail.com.

Resumo: O ácido fólico (AF) regula atividades metabólicas essenciais ao corpo humano. A superexpressão do receptor de AF (Receptor de Folato - FR) tem sido relatada em vários tipos de câncer, mas ainda existem dados insuficientes e conflitantes sobre expressão do FR em células de câncer de mama. Sendo assim, os pontos quânticos (PQs) surgem como ferramentas que podem elucidar aspectos sobre a dinâmica celular do RF, devido às suas propriedades físico-químicas únicas. Neste trabalho, PQs conjugados com AF foram utilizados para estudar e quantificar FRs em células de câncer de mama, usando células HeLa como modelo. Os PQs foram conjugados covalentemente a AF sob diferentes proporções e o melhor conjugado foi aplicado para estudar FRs em células HeLa, MCF7 e T47D por microscopia confocal e citometria de fluxo. A conjugação foi avaliada por espectroscopia de correlação de fluorescência (FCS) e a especificidade do conjugado por ensaios de saturação. O FCS confirmou a eficácia da conjugação. As células HeLa apresentaram/internalizaram uma quantidade maior de FRs (83%) do que as células T47D (44%). As células MCF7 parecem apresentar / internalizar FRs em quantidades extremamente baixas (3%). Os ensaios

de saturação demonstraram a especificidade dos conjugados PQ-AF e sugeriram que a taxa de reciclagem de FR é baixa nas células estudadas. Sendo assim, direcionar terapia através dos FRs pode ser mais eficaz para HeLa e T47D, do que MCF7. Concluindo, os conjugados PQ-AF foram desenvolvidos com sucesso. Avaliamos o nível de expressão, internalização e reciclagem de RFs em células HeLa, T47D e MCF7 por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, e essas análises ajudaram a elucidar dados inconclusivos relacionados à dinâmica do FR, possibilitando uma melhor compreensão da biologia das células cancerígenas. Conjugados PQ-AF podem ser considerados sondas promissoras que abrem novas perspectivas no diagnóstico / terapia para esta doença.

Palavras-chave: Ácido fólico, bioconjugação, nanocristais semicondutores, células cancerígenas, receptores**.**

Introdução

O ácido fólico (AF), também conhecido como ácido pteroilglutâmico, é uma vitamina (B9) com ~ 0,44 kDa que não é produzida pelo organismo humano, sendo adquirida através da ingestão de alguns vegetais, grãos e carne vermelha. A captação da AF celular depende de receptores de folato (FR), que são proteínas com 38-40 kDa, geralmente distribuídas na porção apical celular. Depois que o AF se liga ao FR, este complexo é internalizado em vesículas endocíticas. Dentro do citoplasma, o AF é entregue e o FR é reciclado para a membrana [1]. O AF é um cofator para reações de construção de nucleotídeos, sendo essencial para o desenvolvimento do corpo humano. Um baixo nível de folato tem sido associado a muitas patologias, tais como; defeitos do tubo neural, distúrbios hematopoiéticos, doenças cardiovasculares e aumento do risco de câncer [2,3,6]. No entanto, alterações na expressão dos FRs também podem surgir em muitas doenças e estudos relataram a superexpressão desse receptor em células de câncer de cérebro, ovário, rins e mama [4-8].

Apesar do progresso, ainda há muitas questões remanescentes relacionadas a expressão do FR no câncer, pois a literatura apresenta dados conflitantes, ou escassos. Técnicas baseadas em fluorescência podem ser um método atrativo para investigar e trazer à luz informações complementares que possam auxiliar a elucidar aspectos inconclusivos relacionados à dinâmica celular dos FRs, especialmente quando empregados com fluoróforos fotoestáveis como pontos quânticos (PQs). Nanocristais semicondutores, PQs, são sondas fluorescentes únicas, com intensa fluorescência, e uma superfície versátil/ativa para conjugação com biomoléculas e, por isso, têm sido extensivamente aplicados na biomedicina [9-11] Estudos sobre internalização e metabolismo do AF realizados em células vivas com

PQs podem ser valiosos para uma melhor compreensão da biologia das células cancerosas, que pode ajudar a desenvolver e melhorar as abordagens terapêuticas específicas visando este receptor como uma porta de entrada para drogas quimioterápicas [12-15].

Assim, neste estudo, desenvolvemos conjugados baseados em PQs de CdTe conjugados ao AF para estudar o nível de expressão, internalização e reciclagem de FRs em células cancerígenas. As células HeLa (carcinoma epitelial cervical humano) foram usadas como modelo celular de controle neste estudo, uma vez que a literatura tem uma quantidade razoável de dados sobre a expressão de FRs nessas células [16-18]. Além disso, como o câncer de mama é uma das principais causas de morte em mulheres em todo o mundo, também quantificamos e estudamos o tráfego de FRs em linhagens celulares mamárias; T47D (carcinoma ductal invasivo) e MCF7 (adenocarcinoma mamário humano). Além disso, a conjugação de PQ-AF foi avaliada por espectroscopia de correlação de fluorescência (FCS) e a especificidade de marcação foi demonstrada por ensaios de saturação. Acreditamos que os conjugados PQ-AF podem ser uma ferramenta fluorescente versátil para apoiar uma compreensão mais profunda da biologia do câncer e contribuir para melhorar o diagnóstico e a terapia desta doença.

2 METODOLOGIA

2.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE PQS

Os PQs de CdTe foram preparados seguindo uma metodologia previamente descrita, com pequenas modificações [11]. Para isso, o telúrio metálico em pó (Te^0, 0,1 mmol - Sigma-Aldrich) foi reduzido a Te^{2-} com borohidreto de sódio ($NaBH_4$ -3 mmol) em atmosfera de nitrogênio inerte (N_2). Em seguida, o telúrio reduzido foi adicionado a uma solução de Cd^{2+} / AMS, preparada com $CdCl_2$ (0,5 mmol - Sigma-Aldrich) e ácido mercaptossuccínico (AMS - 0,6 mmol - Sigma-Aldrich) como agente estabilizante / funcionalizante, em pH elevado (> 10), numa razão molar de 5: 1: 6 (Cd: Te: MSA). Em seguida, a reação foi mantida sob agitação e aquecimento a 90 ºC durante 40 min para o crescimento das nanopartículas até atingir uma emissão verde.

Após essa etapa, os PQs foram caracterizados opticamente através da aquisição de espectros de absorção (UV-Vis 1800 - Shimadzu) e de emissão (LS 55 - PerkinElmer, excitação em 365 nm). O diâmetro médio dos PQs foi estimado usando a absorbância e o comprimento de onda correspondentes ao primeiro pico máximo de absorção [19]. Então,

usando o coeficiente de extinção molar para PQs de CdTe [20] e a lei de Lambert-Beer, a concentração de nanopartículas foi determinada.

2.2 BIOCONJUGAÇÃO DE PQS AO ÁCIDO FÓLICO

Os PQs foram conjugados ao ácido fólico (AF - Sigma - Aldrich) utilizando cloridrato de carbodiimida (EDC - Fluka) e N - hidroxisuccinimida (NHS - Sigma - Aldrich) como agentes de acoplamento. Para alcançar uma conjugação bem sucedida, alguns testes foram realizados considerando não apenas as relações PQ: AF de 1: 5, 1:25 e 1:50, bem como duas variações de NHS (5 e 10 mM), mantendo o EDC como 2 mM. Para escolher a conjugação mais promissora, os parâmetros físico-químicos das suspensões de conjugado, tais como manutenção de fluorescência e estabilidade coloidal, foram primeiramente avaliados. Com base nesses critérios, o sistema com 1:50 QD: AF foi excluído. Os sistemas remanescentes foram então avaliados e selecionados por ensaios de microscopia de fluorescência.

Para conjugação, o pH da suspensão de PQs foi ajustado para 5,5 com AMS (4,9% p / v). Em seguida, a suspensão foi purificada por centrifugação a 3000 xg (Hettich Zentrifugen - Universal 320 R) durante 3 min, utilizando uma coluna de ultrafiltração com membrana de 10 kDa (GE Healthcare) para remover o excesso do estabilizante. Assim, os grupos carboxílicos dos PQs (500 µL) foram ativados com EDC e NHS (250 µL cada), de acordo com as concentrações molares descritas acima. Finalmente, foi adicionado AF e as amostras foram mantidas sob agitação '*overnight'* à temperatura ambiente (~ 25 ^{o}C). Os conjugados também foram caracterizados por espectroscopias de absorção e emissão, conforme descrito anteriormente.

Para marcação das células, os grupos carboxílicos ativados de conjugados (1 mL) foram bloqueados com de TRIS (50 µL, 1 mmol·L^{-1}) por 2 h e mantidos sob agitação. Esse bloqueio é fundamental para evitar qualquer marcação inespecífica.

2.3 ESPECTROSCOPIA DE CORRELAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA (FCS)

A análise por FCS foi realizada, para os PQs e para o melhor conjugado escolhido, em um microscópio confocal (LSM 780 - Carl Zeiss), utilizando objetiva de imersão em água 40 × (NA = 1,0). As amostras foram excitadas por um laser azul (λ = 488 nm - 1 µW). Nessas condições, curvas de correlação foram obtidas e, a partir dessas curvas, tempos de difusão (τ_D) foram obtidos para cada amostra. Em seguida, o raio hidrodinâmico (R) foi determinado usando:

$$R = \frac{4\, k_B T\, \tau_D}{6\pi\eta\omega_x^2}$$

Eq. 1

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura da amostra (T ≈ 303 K), τ_D é o tempo de difusão, η é a viscosidade média (da água $\eta = 7{,}98 \times 10^{-4}$ Pa·s) e ω_x é raio lateral do volume focal (300 nm para excitação em 488 nm). Em uma análise de FCS, é possível confirmar a conjugação comparando os raios hidrodinâmicos e os tempos de difusão dos PQs e conjugados, uma vez que se espera valores mais altos para esses parâmetros quando uma conjugação é obtida [11].

2.4. CULTURA DE CÉLULAS

As células HeLa (carcinoma epitelial cervical humano) foram obtidas na *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, EUA). As células MCF7 (adenocarcinoma de mama humano) e T47D (carcinoma mamário humano) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, RJ, Brasil). As células HeLa, MCF7 e T47D foram cultivadas, respectivamente, em DMEM (meio Eagle modificado por Dulbecco - Sigma-Aldrich) e meio RPMI-1640 (Gibco). Todos os meios foram suplementados com 10% de soro bovino fetal (FBS - Gibco), 100 mg·mL^{-1} de estreptomicina e 100 unidades·mL^{-1} de penicilina (Sigma-Aldrich), e as células cresceram a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO_2. Quando se atingiu 90% de confluência, as células foram separadas do frasco com tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco). As células foram então semeadas em uma placa de 6 poços (Greiner) para avaliação de citometria de fluxo (2x10^5 células / poço) e em placa de cultura de 4 poços com fundo de vidro (Greiner) para análise por microscopia confocal (1x10^5 células / poço) e incubadas por 24 h a 37 ºC em atmosfera úmida com 5% de CO_2.

2.5. MARCAÇÃO CELULAR COM CONJUGADOS PQ-AF

Após incubação por 24 h, as células foram lavadas com tampão fosfato salino 1X (PBS - Gibco) e as condições experimentais foram estabelecidas: 1 - células controle, e 2 - células incubadas com conjugados (1: 2 v / v), por 30 min.

Para análises no microscópio confocal, as células foram lavadas com PBS e incubadas com o corante fluorescente Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, na concentração final de 0,6 μg·mL^{-1}) por 5 min e depois foram lavadas novamente com PBS duas vezes antes de serem analisadas no microscópio confocal multiespectral (Leica) Para os conjugados, a emissão foi coletada de 510 a 550 nm, a 488 nm de excitação. Para o corante Hoechst, a emissão foi coletada de 420 a 470 nm, com excitação a 405 nm.

Os níveis de internalização e taxa de reciclagem de receptores de AF foram avaliados por citometria de fluxo (BD Accuri ™ C6, Becton Dickinson). Para isto, as células foram desaderidas da placa de 6 poços após incubação com tripsina-EDTA seguida de inativação com o meio de cultura apropriado. Em seguida, as suspensões de células foram lavadas 3 vezes por centrifugação com PBS a 400 xg por 2 min (MiniSpin - Eppendorf). Assim, foram adquiridos 20.000 eventos para cada condição experimental, sob excitação a 488 nm. A emissão foi detectada com o filtro FL2 (585/40 nm) e os dados foram processados usando o software BD Accuri C6.

Para confirmar a especificidade do conjugado e estudar a reciclagem do receptor de AF, também foram realizados ensaios de saturação. Para isso, as células foram previamente incubadas com um excesso de AF (30 vezes maior que a quantidade utilizada para conjugação, 1:1 v / v), por 20 min. Em seguida, as células foram incubadas com conjugados por mais 30 minutos antes da análise por citometria de fluxo ou microscopia confocal, usando os parâmetros detalhados acima.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DE CONJUGADOS DE PQ-AF

De acordo com as caracterizações ópticas, os PQs tiveram o primeiro máximo de absorção a *ca.* 512 nm, como observado na **Figura 1A.** O diâmetro médio dos nanocristais e a concentração de suspensão foram estimados em 2,8 nm e 10 $\mu mol \cdot L^{-1}$ [19,20]. Os PQs apresentaram uma emissão máxima em 557 nm (**Figura 1A**) e uma largura total em meia altura (FWHM) de aproximadamente 53 nm.

Em testes preliminares com células HeLa sob microscopia de fluorescência, observou-se que havia diferenças de intensidade de fluorescência/padrão entre as variações da razão PQ:AF e a quantidade de NHS. O sistema com 1:25 (PQ:AF) e a maior quantidade de NHS foi escolhido, pois apresentou a maior intensidade de fluorescência e um padrão característico de marcação vesicular, quando comparado ao baixo sinal dos conjugados com proporção 1:5 e com o menor quantidade de NHS. Provavelmente no sistema com 1: 5 (PQ: AF) havia pouco ácido fólico, e a quantidade menor de NHS não foi suficiente para promover a conjugação.

Além disso, não foram observadas mudanças consideráveis no espectro de absorção do conjugado escolhido (1:25) quando comparado aos PQs (dados não apresentados). Adicionalmente, este conjugado mostrou uma boa estabilidade (sem precipitação) e uma

intensa fluorescência, tanto sob a excitação com UV 365 nm, como pela caracterização por espectroscopia de emissão (**Figura 1B**). Após a conjugação, houve uma diminuição de apenas *ca.* 17% na intensidade de fluorescência. Um discreto desvio para o vermelho também foi observado, o que pode ser indicativo de conjugação, como já sugerido em outros estudos [11].

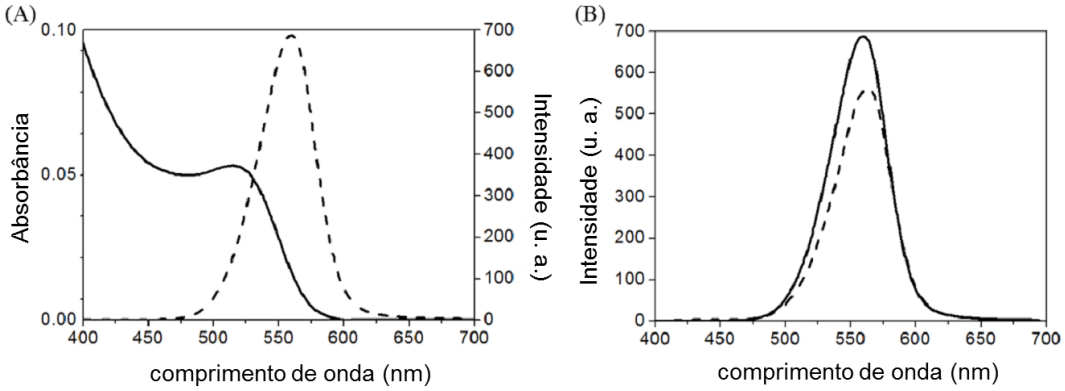


Figura 1. Caracterização óptica dos PQs e conjugados de PQ-AF (1:25). (A) Espectro de absorção (linha sólida) e emissão (linha tracejada) dos PQs. (B) Emissão dos PQs (linha preta) e conjugados (linha tracejada), λ_{exc} = 365 nm.

3.2. ESPECTROSCOPIA POR CORRELAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA (FCS)

O conjugado PQ-AF apresentou maior tempo de difusão e diâmetro quando comparado aos nanocristais de CdTe. Este resultado confirma que os PQs foram conjugados com sucesso ao AF. Os dados da FCS para os PQs e conjugados estão apresentados na **Tabela 1** e na **Figura 2.** O tempo de difusão e o raio hidrodinâmico obtidos pelo FCS já foram utilizados para verificar a conjugação de PQs com moléculas maiores, como anticorpo anti-A e UEA I [11]. O tamanho do PQ obtido pela análise por FCS (2,6 nm) corroborou com o diâmetro obtido pelos espectros de absorção. O raio hidrodinâmico do conjugado e o tempo de difusão apresentaram, respectivamente, uma variação de 0,9 nm e 20 μs quando comparados com o PQ sozinho. Estas alterações parecem estar de acordo com o peso molecular do AF de ~ 0,44 kDa e até mesmo quando consideramos que todos os 25 AF ofertados para cada QD foram ligados à superfície, pois esses resultariam em um peso molecular ainda pequeno de 10 kDa.

Tabela 1. Dados de FCS para PQs de CdTe e o conjugado PQ-AF: tempos de difusão e diâmetros hidrodinâmicos.

Amostra	Tempo de difusão (μs)	Diâmetro hidrodinâmico (nm)
PQs	61,8 ± 7,0	2,6
PQ-AF	82,7 ± 8,1	3,5

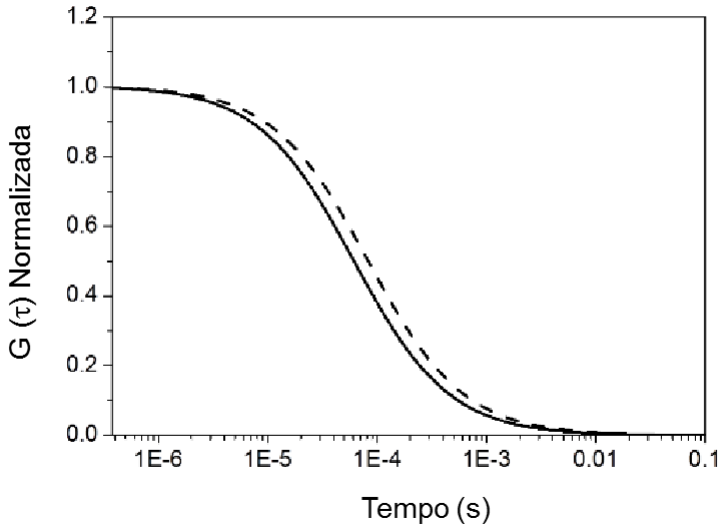


Figura 2. Curvas de correlação obtidas por FCS de PQs (linha sólida) e do conjugado PQ-AF (linha tracejada).

3.2 MARCAÇÃO DE CÉLULAS COM CONJUGADOS DE PQ-AF

3.2.1 Marcação de células HeLa

A célula HeLa foi escolhida para avaliar a especificidade e eficiência do conjugado PQ-AF, pois esta linhagem celular é uma das mais estudadas e, de acordo com a literatura, possui alta expressão de FR [16,17]. As imagens do microscópio mostraram numerosas pequenas vesículas no citoplasma das células HeLa, sugerindo uma marcação específica com os conjugados PQ-AF, conforme observado na **Figura 3A..** O mesmo padrão foi descrito por Wang & Low [16] e Lei et al. [17] que também estudaram FRs em células HeLa. Nossos resultados também mostraram que a internalização do AF foi rápida, e 30 min de incubação foram suficientes para a endocitose do receptor. O uso do corante nuclear Hoechst também

permitiu observar a localização intracelular dos receptores internalizados, revelando um padrão vesicular perinuclear (em verde) em contraste com os núcleos corados em azul.

A análise de citometria de fluxo também foi realizada e indicou que cerca de 83% das células HeLa expressaram e internalizaram os receptores FRs (**Figura 4B**). Zhang et al. [18] desenvolveram uma sonda de conjugação por adsorção CdS / ZnS QDs revestida com polietilenimina e AF, baseadas na fluorescência do PQ. Quando o FR é expresso na membrana, o AF se liga a ele e a fluorescência do PQ aparece. Os autores encontraram uma porcentagem de expressão de FRs de cerca de 86% em células HeLa, corroborando nossos resultados.

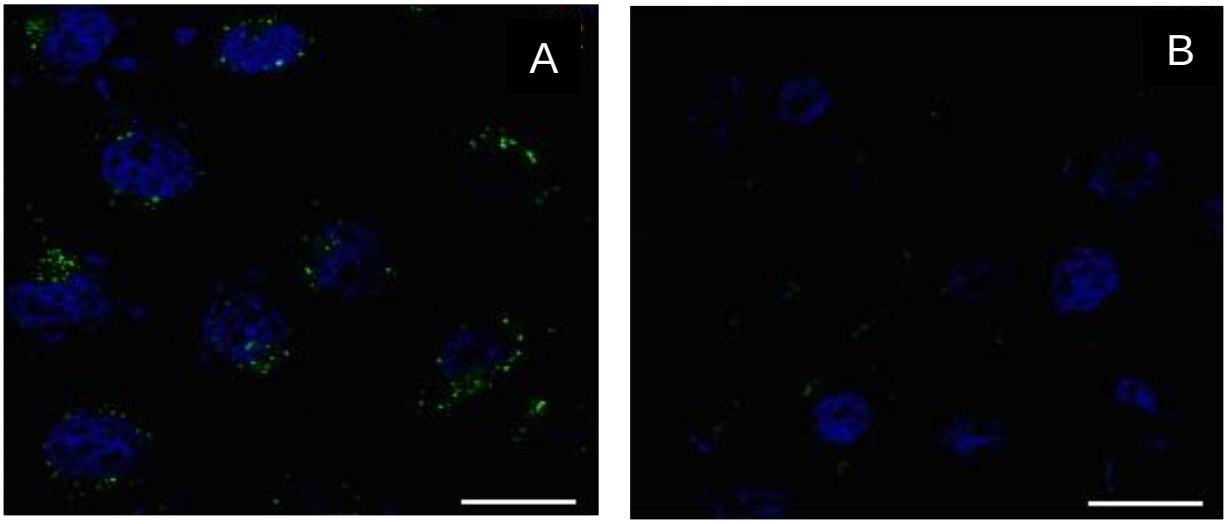


Figura 3. Imagens de microscopia confocal de células HeLa marcadas por conjugados PQ-AF. A e B: células incubadas com conjugados PQ-AF antes e após o ensaio de saturação, respectivamente. Em verde: fluorescência PQ-AF, em azul: núcleos corados pelo corante Hoechst. Barra de escala: 20 μm.

Após a saturação prévia dos FRs, a marcação foi de apenas 6% (**Figura 4C**), comprovando a especificidade dos conjugados. As células HeLa mostraram ser uma escolha adequada como modelo para padronizar os conjugados de PQ-AF. As fotomicrografias corroboram os resultados da citometria de fluxo mostrando discreta marcação após a saturação (**Figura 3B**).

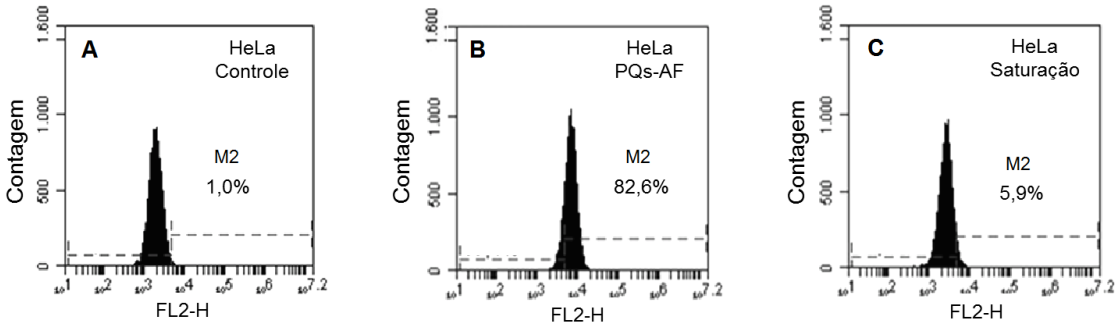


Figura 4. Histogramas representativos de citometria de fluxo para células HeLa. Em (A) controle, (B) marcação por PQ-AF e (C) células marcadas com PQ-AF após a saturação de receptores com AF.

3.2.2 Marcação das linhagens celulares de câncer de mama MCF7 e T47D

Após comprovação da eficiência e especificidade do conjugado PQ-AF, foram realizados estudos relacionados à expressão e internalização dos FRs em linhagens celulares de câncer de mama MCF7 e T47D.

As células T47D marcaram em torno de 45% e as células MCF7 não apresentaram marcação relevante (3%), como mostrado na **Tabela 2** e na **Figura 5** (**A2** e **B2)**, respectivamente. As células T47D expressam e internalizam FRs, mas em uma taxa muito menor quando comparadas com HeLa (**Figura 4B**). A **Figura 5** mostra histogramas representativos de citometria de fluxo para células MCF7 e T47D e a **Tabela 2** mostra a marcação média por citometria de fluxo para todas as células. Os experimentos foram executadas pelo menos em duplicata.

Tabela 2. Porcentagens médias de marcação por citometria de fluxo para HeLa, T47D e MCF7 de controle e células incubadas com conjugados PQ-AF (antes e após o ensaio de saturação).

Linhagem celular	Controle (%)	PQ-AF (%)	Saturado (%)
HeLa	1	82	6
T47D	1	44	10
MCF7	1	3	1

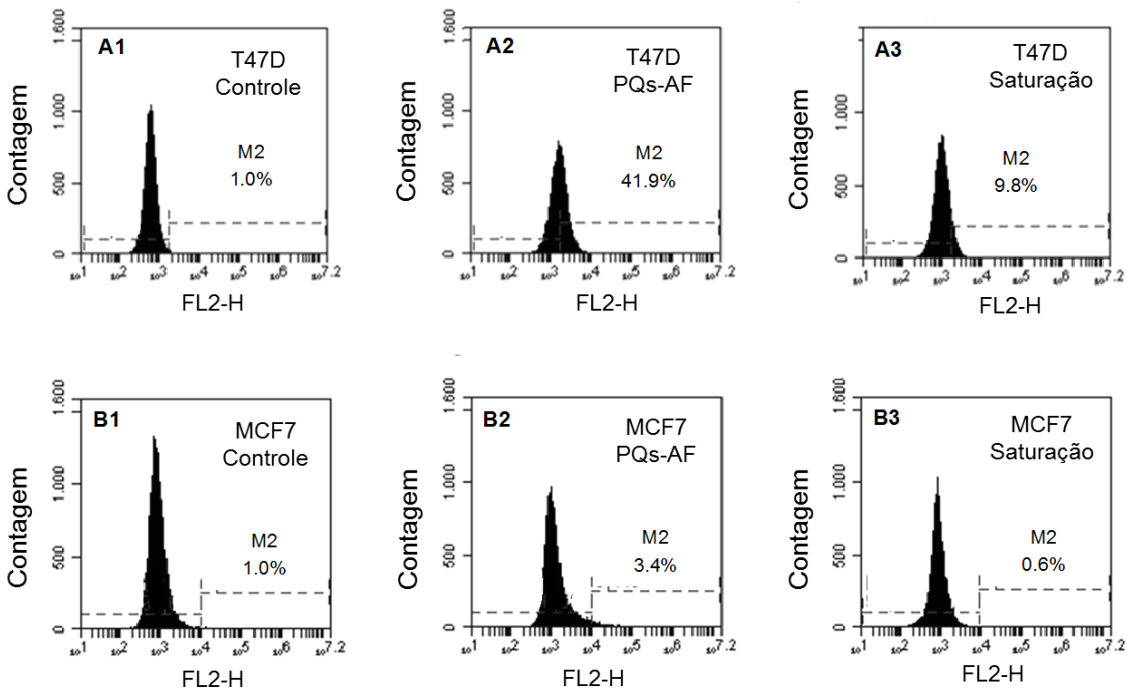


Figura 5. Histogramas representativos de citometria de fluxo para células T47D (A) e MCF7 (B). A identificação (1) representa o controle; (2) marcação pelos conjugados PQ-AF e (3) células incubadas com os conjugados após a saturação dos receptores com AF.

A literatura tem relatado estudos conflitantes sobre a expressão de FRs em MCF7 (adenocarcinoma). Estudos como Sonvico et al. [21] usaram o AF conjugado com nanopartículas superparamagnéticas fluorescentes para marcar o MCF7 e observaram que essas células não tinham FRs em sua membrana. Feng et al. [22] também estudaram a expressão de FRs de MCF7 usando óxido de grafeno (OG) e rodamina B (RB) conjugada ao AF como uma nanossonda com capacidade de resposta on/off. Quando o AF foi ligado ao FR, houve transferência de fluorescência do OG para RB. Então, sinal de fluorescência foi observado para células HeLa, mas não para MCF7. Por outro lado, Wang et al. [23] desenvolveram um lipossoma com quitosana modificado com AF e PEG catiônico e relataram uma alta captação de folato pelas células MCF7. Tavassolian et al. [15] distribuíram nanopartículas de poli (L-g-glutamil glutamina) de docetaxel em células MCF7 e indicaram expressão de FRs através de microscopia de fluorescência. Nossos resultados sugerem que as células MCF7 parecem possuir e internalizar uma quantidade extremamente baixa desse receptor.

Estudos anteriores investigaram a superexpressão de FRs em tumores, incluindo cânceres de mama, pulmão, colorretal e da bexiga [4-8]. Mas a expressão de FRs no

carcinoma de mama ainda é uma área conflitante. Hartman et al. [24] estudaram 63 amostras de pacientes com câncer de mama invasivo (com resultados clínicos divergentes) e mostraram que não houve correlação entre a expressão de FRs e o grau do tumor. Por outro lado, Ginter et al. [25] estudaram um câncer invasivo triplo negativo e observaram taxas mais altas de FRs em piores prognósticos. Aboulhagag et al. [26] estudaram a expressão de FRs em 50 blocos de tecido de carcinoma ductal invasivo, corados através de imunohistoquímica usando um anticorpo para o FR, mostrando superexpressão de FR associada aos piores prognósticos. Em nosso estudo, o T47D, uma célula originada de carcinoma ductal invasivo, foi marcada aproximadamente 44% com o conjugado PQ-AF. Este resultado sugere que o carcinoma ductal invasivo expressa e internaliza FRs, mas em uma taxa menor que as células HeLa (83% da marcação). A inibição da marcação após ensaios de saturação para T47D (10%) e HeLa (6%) mostrou que a os conjugados de PQ-FA reconheceram especificamente os FRs (**Tabela 2**). Além disso, a taxa de reciclagem do FR parece ser lenta para as células T47D e HeLa, considerando as condições estudadas, uma vez que apresentaram marcação semelhante e baixa após a saturação dos FRs.

As imagens de microscopia confocal para T47D apresentadas na **Figura 6 A - B**, corroboram com resultados de citometria de fluxo mostrados na **Figura 5**. As células apresentaram o mesmo padrão vesicular típico (de forma mais sutil) devido à internalização dos receptores quando comparadas com as células HeLa.

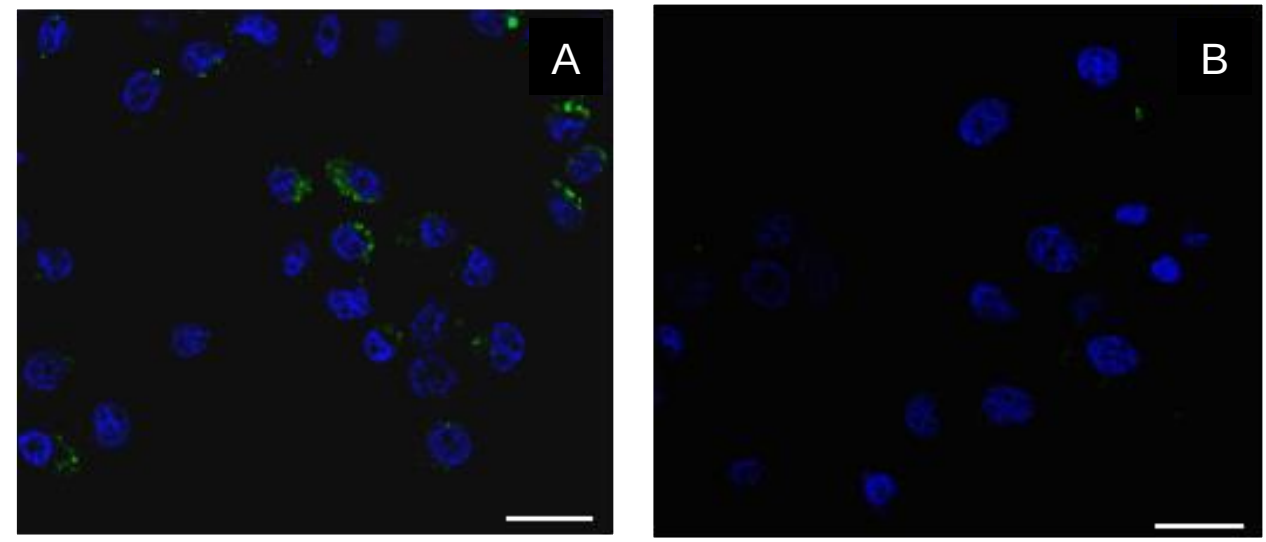


Figura 6. Imagens de microscopia confocal de células T47D marcadas por conjugados de PQ-AF. A e B: células incubadas com conjugados de PQ-AF antes e após o ensaio de saturação, respectivamente. Em verde: fluorescência dos conjugados, em azul: núcleos corados pelo corante Hoechst. Barra de escala: 20 μm.

Apesar de muitos estudos sobre FRs, não houve consenso sobre a expressão e internalização desse receptor na literatura, pelo menos para células de câncer de mama, formas complementares de quantificar esses receptores poderiam ajudar a elucidar essas questões ainda conflitantes. Até onde sabemos este é o primeiro estudo que desenvolveu conjugados de PQ-AF, provou sua especificidade através de ensaios de saturação e os aplicou com sucesso para quantificar e estudar tráfego de FRs em linhagens celulares de câncer de mama MCF7, T47D e HeLa (como padrão de comparação). Além disso, este trabalho avaliou a expressão de FRs utilizando duas técnicas complementares baseadas em fluorescência (citometria de fluxo e microscopia de fluorescência).

A superexpressão de FRs pode ser uma porta de entrada importante para tipos de câncer com menos opções terapêuticas, como mostrado por Ianazzo et al. [27] que aplicaram PQs conjugados com doxorrubicina (uma droga de DNA intercalante) e biotina. Eles usaram a expressão aumentada de receptores de biotina para entregar com sucesso a droga dentro de células A549 visando uma melhor abordagem terapêutica do câncer. Portanto, uma melhor compreensão da expressão dos FRs pode ajudar a desenvolver novas abordagens para o tratamento de cânceres, principalmente para aqueles com menos opções terapêuticas disponíveis, como câncer de mama triplo negativo e carcinoma ductal invasivo não responsivo às drogas usuais.

4 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi desenvolvida uma estratégia simples e eficaz para conjugar o AF com PQs de CdTe. Os resultados mostraram que as células HeLa possuem e internalizam uma quantidade maior de FRs quando comparada às células T47D, porém o MCF7 possivelmente expressa e internaliza FRs em níveis extremamente baixos. Os ensaios de saturação provaram a especificidade de marcação dos PQ-AF e sugeriram que a taxa de reciclagem dos FRs pode ser baixa para as linhagens celulares HeLa e T47D.

Além disso, este estudo permitiu complementar os dados da literatura sobre a expressão de FRs em linhagens celulares de câncer, a qual ainda é uma área ainda conflitante. Este estudo sugeriu que a terapia envolvendo os FRs poderia ser mais eficaz para HeLa e T47D, mas não para MCF7, devido à falta de expressão FRs nestas células. Assim, acreditamos que este estudo apoiou uma melhor compreensão da biologia das células cancerígenas, sendo os conjugados PQ-FA ferramentas promissoras para abrir perspectivas no diagnóstico e na terapia.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE). Este trabalho também está ligado ao Instituto Nacional de Fotônica (INFo).

REFERÊNCIAS

[1] C. Chen, J. Ke, W. Yi, J.S. Brunzelle, J. Li, E.L. Young, K. Melcher, Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors. Nature. 500 (2013) 486-489.

[2] M.F. Stokstad, E.L.R. Gregory, J.F. Eds, Folic Acid Metabolism in Health and disease. Wiley-Liss. 13 (1990) 1-21.MRC. Vitamin Study Research Group. Prevention of Neural Tube Defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study. Lancet. 338 (1991) 131-137.

[3] A.E. Czeizel, I. Dudas. Prevention of the First Occurrence of Neural-tube Defects by Periconceptional Vitamin Supplementation. N. Engl. J. Med. 327 (1992) 1832-1835.

[4] C. D. Chancy, R. Kekuda, W. Huang, P.D. Prasad,J.M. Kuhnel, F.M. Sirotnak. Expression and differential polarization of the reduced-folate transporter-1 and the folate receptor alpha in mammalian retinal pigment epithelium. Journal of Biological Chemistry. 275 (2000) 20676–20684.

[5] S.D. Weitman, K.M. Frazier, B.A. Kamen, The folate receptor in central nervous system malignancies of childhood. Journal of Neuro-oncology. 21 (1994) 107–112.

[6] I.B. Vergote, C. Marth, R.L. Coleman, Role of the folate receptor in ovarian cancer treatment: evidence, mechanism, and clinical implications. Cancer Metastasis Rev 34(1) (2015) 41-52.

[7] B.R. Driver, R. Barrios, Y. Ge, A. Haque, D. Tacha,P.T. Cagle, Folate Receptor alpha Expression Level Correlates With Histologic Grade in Lung Adenocarcinoma. Arch Pathol Lab Med 140(7) (2016) 682-685.

[8] D. Yua, H. Yanb, C. Wuc. Folate receptor expression in bladder cancer and its correlation with tumor behaviors and clinical outcome. 4 (4) (2017) 130-133.

[9] B.A. Kairdolf, Semiconductor quantum dots for bioimaging and biodiagnostic applications. Annual Review of Analytical Chemistry. 6 (2013) 143–162.

[10] F.A. Esteve-Turrillas, A. Abad-Fuentes, Applications of quantum dots as probes in immunosensing of small-sized analytes. Biosensors and Bioelectronics. 41 (2-13) 12–29.

[11] P.E. Cabral Filho, M.I.A. Pereira, H.P. Fernandes, A.A. de Thomaz, C.L. Cesar, B.S. Santos, M.L. Barjas-Castro, A. Fontes, Blood group antigen studies using CdTe quantum dots and flow cytometry, Int. J. Nanomedicine. 10 (2015) 4393–404. doi:10.2147/IJN.S84551.

[12] I.B. Bwatanglang, F. Mohammad, N. A. Yusof, J. Abdullah, N.B. Alitheen, M. Z. Hussein, N. Abu, N. E. Mohammed, N. Nordin, N. R. Zamberi, S. K. Yeap, In vivo tumor targeting and anti-tumor effects of 5-fluororacil loaded, folic acid targeted quantum dot system. Journal of Colloid and Interface Science. 480 (2016) 146–158.

[13] C. Su, H. Li, Y. Shi, G. Wang, L. Liu, L. Zhao, Carboxymethyl-β-cyclodextrin conjugated nanoparticles facilitate therapy for folate receptor-positive tumor with the mediation of folic acid, Int. J. Pharm. 474 (1) (2014) 202–211.

[14] Z. Shen, Y. Li, K. Kohama, B. Oneill, J. Bi, Improved drug targeting of cancer cells by utilizing actively targetable folic acid-conjugated albumin nanospheres, Pharmacol. Res. 63 (1) (2011) 51–58.

[15] F. Tavassolian, R. Dinarvand, Targeted poly(l-y-glutamyl glutamine) nanoparticles of docetaxel against folate over-expressed breast cancer. International Journal of Pharmaceutics. 467 (1-2) (2014) 123-138.

[16] S. Wang, P.S. Low, Folate-mediated targeting of antineoplastic drugs, imaging agents, and nucleic acids to cancer cells. Journal of Controlled Release. 53 (1998) 39–48.

[17] D. Lei, W. Yang, Y. Gong, J. Jing, H. Nie, B. Yu, X. Zhang, Non-covalent decoration of carbon dots with folic acid via a polymer-assisted strategy for fast and targeted cancer cell fluorescence imaging. Sensors and Actuators B: Chemical. 230 (2016) 714-720.

[18] Y. Zhang, J. Liu, X. Yan, Self-assembly of folate onto polyethyleneimine-coated CdS/ZnS quantum dots for targeted turn-on fluorescence imaging of folate receptor overexpressed cancer cells. Anal Chem, China. 85(1) (2013) 223-228.

[19] P. Dagtepe, V. Chikan, J. Jasinski, V.J. Leppert, Quantized growth of CdTe quantum dots; observation of magic-sized CdTe quantum dots. The Journal of Physical Chemistry C. 111(41) (2009) 14977-14983.

[20] W. W. Yu, L Qu, W. Guo, X. Peng. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe , and CdS nanocrystals. Chem. Mater. 125 (17) (2003) 2854–2860.

[21] F. Sonvico, S. Mornet, S. Vasseur, C. Dubernet, D. Jaillard, J. Degrouard, J. Hoebeke, E. Duguet, P. Colombo, P.Couvreur, Folate-Conjugated Iron Oxide Nanoparticles for Solid Tumor Targeting as Potential Specific Magnetic Hyperthermia Mediators: Synthesis, Physicochemical Characterization, and in Vitro Experiments. Bioconjugate Chem. 16 (2005) 1181-1188.

[22] D. Feng, Y. Song, W. Shi, X. Li, H. Ma, Distinguishing Folate-Receptor-Positive Cells from Folate-Receptor-Negative Cells Using a Fluorescence Off−On Nanoprobe. Anal. Chem. 85 (2013) 6530−6535.

[23] H. Wang, P. Zhao, X. Liang, X. Gong, T. Song, R. Niu, J. Chang, Folate-PEG coated cationic modified chitosan – Cholesterol liposomes for tumor-targeted drug delivery. Biomaterials. 31 (2010) 4129–4138.

[24] L. C. Hartmann, G. L. Keeney, W. L. Lingle, T.J.H. Christianson, B. Varghese, D. Hillman, A. L. Oberg, P. S. Low, Folate receptor overexpression is associated with poor outcome in breast cancer. Int. J. Cancer. 121 (2007) 938–942.

[25] O.S. Ginter, P.J. McIntire, L. IRSHAID, Y. LIU, Z. CHEN, S.J. SHIN, Folate Receptor Alpha Expression Is Associated with Increased Risk of Recrrence In Triple Negative Breast Cancer. Clin Breast Cancer. 17(7) (2017) 544-549.

[26] N.A.E. Aboulhagag, R.F. Torky, S.A. Fadel, Folate receptor is associated with poor clinicopathological perspectives in breast carcinoma. Pathophysiology. 25 (2018) 71–76.

[27] D. Iannazzo, A. Pistonea, M. Salamòa, S. Galvagnoa, R. Romeob, S.V. Giofréb, C. Branca, G.Visallid, A. Pietro, A Graphene quantum dots for cancer targeted drug. International Journal of Pharmaceutics. 518 (2017) 185–192.

4 CONCLUSÃO

- O artigo de revisão ilustrou as principais formas de conjugação de PQs a lectinas e carboidratos, bem como as suas principais aplicações;
- Transferrina, ácido fólico e UEA I foram conjugados aos PQs de CdTe-MSA mostrando-se estáveis e eficientes nas marcações específicas das linhagens de mama estudadas;
- Os resultados indicaram que as linhagens de mama possuem e internalizam uma quantidade similar de RTf , denotando uma grande dependência de ferro para os tipos de câncer de mama estudados. A marcação através de microscopia confocal evidenciou vesículas endocíticas;
- Os ensaios de saturação dos RTf mostraram que apesar da células estudadas expressarem e internalizarem quantidades semelhantes de RTf, a taxa de reciclagem é diferente, podendo estar relacionada à alta taxa metabólica associada às células que possuem maior potencial de agressividade, MDA-MB-231>MCF>T47D;
- Além disso, a marcação com os conjugados de PQs-UEA I indicou que a linhagem MDA-MB-231 possui uma grande quantidade de L-fucose em sua membrana, seguida de MCF7 e T47D (MDA-MB-231>MCF7>T47D), sugerindo que a expressão acentuada de L-fucose se relaciona ao perfil metastático e de invasibilidade celular. A microscopia confocal corroborou a citometria de fluxo e apresentou um padrão de marcação de membrana;
- Foi desenvolvido um conjugado de PQs-AF que reconheceu de maneira específica RFs nas linhagens cancerígenas. A expressão e internalização dos RFs foi maior para HeLa que para T47D, e a MCF7 apresentou uma expressão/internalização extremamente baixa. A reciclagem desses receptores não foi significativa nas condições estudadas para essas linhagens.
- As nanossondas baseadas em PQs aqui utilizadas mostram-se ser ferramentas potenciais para ajudar na compreensão da biologia celular do câncer, o que é fundamental para se aprimorar o diagnóstico, bem como as abordagens terapêuticas para esta doença.

5 PERSPECTIVAS

- Realizar o estudo de FRs na linhagem MDA-MB-231 utilizando os conjugados de PQs-AF através de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência;
- Complementar o estudo do perfil de carboidratos nas linhagens cancerígenas de mama, através de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, avaliando o padrão de glicose e manose com PQs conjugados à concanavalina A**.**

REFERÊNCIAS

ALIVISATOS, P.; YIN, Y. Review Article Colloidal nanocrystal synthesis and the organic–inorganic interface. Nature. n 437, p 664-670. 2005.

ABBAS, ABUL K.; KUMAR, VINAY. Bases Patológicas Das Doenças. 9ª ed. Brasil. Editora Elsevier, 2012. 1440p.

ALIVISATOS, P. The use of nanocrystals in biological detection. Nature biotechnology. n 22, p 47-52. 2004.

ALIVISATOS, P.; GU, W.; LARABELL, C. Quantum dots as fluorescent probes. Ann Ver Biomed Eng. v 7, p 55–76. 2005.

ALVES, P.M.M; CARRONDO, M.J.T; CRUZ, P.E. Introdução à tecnologia de cultivo de células animais. In: MORAIS, A.M; AUGUSTO, E.F.P; CASTILHO, L.R. Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica. 1 ed. São Paulo: Roca, 2008.cap 1, p. 2-14.

ANDRADE, C.G.; CABRAL-FILHO, P.E.; TENÓRIO, D.P.L.; SANTOS, B.S.; BELTRÃO, E.I.C.; FONTES, A.; CARVALHO-JUNIOR, L.B.C. Evaluation of glycophenotype in breast cancer by quantum dot-lectin histochemistry. International journal of nanomedicine. v 8, p 4623-4629. 2013.

ANDREWS, C. Disorders of iron metabolism. The New England Journal of Medicine. v 341, p 1986-1995. 1999.

AUDETTE, G. F.; VANDONSELAAR, M.; DELBAERE, L T. J. The structure of the O(H)-blood-group-specific lectin I from Ulex europaeus. Journal of Molecular Biology. v 304, p 423-433, 2000.

BATES, S.E.; VALVERIUS, E.M.; ENNIS, B.W.; BRONZERT, D.A.; SHERIDAN, J.P. STAMPFER, M.R.; MENDELSOHN, J.; LIPPMAN, M.E., DICKSON, R.B. Expression of the transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor receptor pathway in normal human breast epithelial cells. Endocrinology. V126, P 596-607, 1990.
BIES, C.; LEHR, C.M.; WOODLEY, J.F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. Adv Drug Deliv Rev. n 56, p 425–35. 2004.

BOLIGAN, K.F.; MESA, C.; FERNANDEZ, L.E.; GUNTEN, S.V. Cancer intelligence acquired (CIA): tumor glycosylation and sialylation codes dismantling antitumor defense. Cell mol life sci. v 72, n 7, p 1231-1248. 2015.

BRUS, L. E. Electron–electron and electron–hole interactions in small semiconductor crystallites–the size dependence of the lowest excited electronic state. Journal of Chemical Physics. v 80, p 4403–4409. 1984.

BUHRO, W.E.; COLVIN, V.L. Semiconductor nanocrystals: Shape matters. Nature Materials. V 2, 138-139.2003.

CABRAL-FILHO, P.E. INVESTIGAÇÃO DE ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS DO SISTEMA ABO UTILIZANDO *QUANTUM DOTS* CONJUGADOS A ANTICORPOS

MONOCLONAIS E À LECTINA *Ulex europaeus*. 122 p. Universidade federal de Pernambuco. Recife, 2013.

CAILLEAU, R.; OLIVÉ, M. & CRUCIGER, Q.V.J. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. In Vitro. V 14, p 911-915, 1978.

CAILLEAU, R.; YOUNG, R.; OLIVÉ, M.; REEVES, W. J. Breast Tumor Cell Lines From Pleural Effusions. *J Natl Cancer Inst*. V 53, n 3, p 661-674. 1974.

CARREL, A. On the permanent life of tissues outside the organism. The journal of experimental medicine, v XV; 1912.

CHAN, S.M.; HOFFER, P.B.; MARIC, M.; DURAY,P. Inhibition of gallium- 67 uptake in melanoma by an anti-human transferrin receptor monoclonal antibody. J Nucl Med. V, p 1303-1307. 1987.

CHANDAN, H.R.; SHIFFMAN, J.D.; BALAKRISHNA, R.G. Quantum dots as fluorescent probes: Synthesis, surface chemistry, energy transfer mechanisms, and applications. Sensors and actuators B: chemical. V 258, p 1191-1214. 2018.

CHITAMBAR, C.R.; ZIVCOVIK, Z. Uptake of gallium-67 by human leukemic cells: demonstration of transferrin receptor-dependent and transferrin receptor-independent mechanisms. Cancer Res. V 47, p 3929-3924. 1987.

CRUCIGER Q, *et al*. Morphological, biochemical and chromosomal characterization of breast tumor lines from pleural effusions. In Vitro. V 12, p 331, 1976.

DICKSTEIN, B.; VALVERIUS, E. M.; WOSIKOWSKI, K.; SACEDA, M.; PEARSON, J. W.; MARTIN, M. B.; BATES, S. E. Increased epidermal growth factor receptor in an estrogen-responsive, adriamycin-resistant MCF-7 cell line. J. Cell. Physiol., n 157, p 110–118. 1993).

EVANS, R.W.; KONG, X.; HIDER, R.C. Iron mobilization from transferrin by therapeutic iron chelating agents. Biochemica et biophysica acta (BBA) general subjects. V 1820, p 282-290. 2012.

FARIAS, P.M.; FONTES, A.; GALEMBECK, A.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; SANTOS, B.S. Fluorescent II-VI Semiconductor Quantum Dots: Potential Tools for Biolabeling and Diagnostic. J. Braz. Chem. Soc. v 19, n 2, p 352-356, 2008.

FARIAS, P.M.A.; SANTOS, B.S.; MENEZES, F.D.; BRASIL-JR, A.G.; FERREIRA, R.; MOTTA, M.A.; CASTRO-NETO, A.G.; VIEIRA, A.A.S.; SILVA, D.C.N. FONTES, A.; CESAR, C.L. Highly fluorescent semiconductor core–shell CdTe–CdS nanocrystals for monitoring living yeast cells activity. Appl. Phys. v 89, p 957–961, 2007.

FAULK, W.P.; HSI, B.L.; STEVENS, P.J. Transferrin and transferrin receptors in carcinoma of the breast.V 316, p 390-392. 1980.

FEIZI, T.; MULLOY, B.; Carbohydrates and glycoconjugates: glycomics: the new era of carbohydrate biology. Curr Opin Struct Biol. n 13, p 602–604. 2003.

FILHO, G.B. Biogliolo: Patologia. Editora Guanabara. 9 Edição, 2016.

FONTES, A. LIRA, R.B. SEABRA, M.A.B.; SILVA, T.G. NETO, A.G.C.; SANTOS, B.S. Quantum Dots in Biomedical Research. Biomedical Engineering – Technical Applications in Medicine. 2012.

FRESHNEY, R.I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 4ª edição. New York. Editora wiley-liss. 1994. 397p.

GATTER, K.C.; BROWN, G.; TROWBRIDGE, I.S.; WOOLSTON, R.E.; MASON, D.Y. Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance.

GKOUVATSOS, K.; PAPANIKOLAOU, G.; PANTOPOULOS, K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. Biochemica et biophysica acta. V 1820, p 180-202. 2012.

GORELIK, E.; GALILI, U.; RAZ, A.; On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. Cancer Metastasis Rev. n 20, p 245–277. 2001.

HAIKE, GHAZARIAN.; BRIAN, IDONI.; STEVEN, B.A. glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. Oppenheimer acta histochemical. n 113, p 236–247. 2011.

HANAHAN, D; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: The next Generation. Cell, v.144, p 646-674, 2011.

HARMS, K.; KAISER,T. Beyond soluble transferrin receptor: old challenges and new horizon. Best practice and research clinical endocrinology and new horizons. V 29, 799-810. 2015.

HE, D.; WANG, D.; SHI, X.; QUAN, W.; XIONG, R.; YUAB, C.; HUANGA, H. Simultaneous fluorescence analysis of the different carbohydrates expressed on living cell surfaces using functionalized quantum dots. RSC advances. v 7, n 20, 12374-12381. 2017.

HERMANSON, G.T. Bioconjugate agents. 2ªedição. United states of America. Editora Elsevier. 2008. 1233p.

HIPERMÍDIA. MINISTÉRIO DA SAÚDE, SISTEMA ÚNICO DE SAUDE. Online < disponível em : http://rle.dainf.ct.utfpr.edu.br/hipermidia/index.php/radiologia-convencional/tecnologia-e-funcionamento-dos-equipamentosrx/127-mamografia/anatomia-das-mamas#udlt > Acesso em: 24/04/2017.

HUGUET, E.L.; MCMAHON , J.A.; BICKNELL, R.; HARRIS, A.L. Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. Cancer Res. V.54, p 2615-2621, 1994.

IANNAZZO, D.; PISTONE, A.; SALAMO, M.; GALVAGNO, S.; ROMEO, R.; GIOFRE, S.V.; BRANCA, C.; VISALLI, G.; PIETRO, A. Graphene quantum dotsfor cancer target drug delivery. International jornal of pharmaceutics. V 518, p 185-192. 2017.

INCA. Ministério da Saúde do Brasil. 2012, online. <Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama > Acesso em: 20/01/2016.

INOUE, T.; CAVANAUGH, P.G.; STECK, P.A.; BRUNNER, N.; NICOLSON,G.L. Differences in transferrin response and numbers of transferrin receptors in rat and human mammary carcinoma lines of different metastatic potentials. V 156, p 212-217. 1993.

JEONG, S.M.; HWANG, S.; SEONG, R.H. Transferrin receptor regulates pancreatic cancer growth by modulating mitochondrial respiration and ROS generation. Biochemical and Biophysical Research Communications. v 471, n 3, p 373–379. 2016.

JESINGER, R.A.; MSE, MD. Breast anatomy for the interventionalist. Techniques in vascular and interventional radiology. V 17 I 1, p 3-9. 2014.

JOHNSON, M.C.; CUTLER, M.L. Anatomy and Physiology of the Breast. Management of Breast Diseases. Springer International Publishing, 2016.
JONATHAN, C. A. quantum paint box. Chemistry World. p. 1–8, 2003.

JUDGE S.M.; CHATTERTON R.T. J.R. Progesterone-specific stimulation of triglyceride biosynthesis in a breast cancer cell line (T-47D). Cancer Research. v43, p 4407-4412, 1983.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 13ª edição. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan. 2013. 488p.

KARAVANI, P.V. Aiming at the sweet side of cancer: Aberrant glycosylation as possible target for personalized-medicine. Cancer Letters. V 352, p 102-112. 2014.

KAWAMOTO, M.; HORIBE, T.; KOHNO, M.; KAWAKAMI, K. A novel transferrin receptor-targeted hybrid peptide disintegrates cancer cell membrane to induce rapid killing of cancer cells. *BMC Cancer*. V 11, p359. 2011.

KEYDAR I.; CHEN, L.; KARBY, S.; WEISS, F.R., DELAREA, J.; RADU, M.; CHAITCIK,S. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. European Journal of Cancer. v15, p 659-670, 1979.

LAWRENCE, C.M.; RAY, R.; BABYONYSHEY, M.; GALLUSER, R.; BORHANI, D.W.; HARRISON, S.C. Crvstal Structure of the Ectodomain of Human Transferrin Receptor. Science. V 286, 779-782. 1999.

LAMP S.J.; FINDLAY, D.M.; MOSELEY, J.M.; MARTIN, T.J. Calcitonin induction of a persistent activated state of adenylate cyclase in human breast cancer cells (T-47D). The journal of biological chemistry. v 256, p12269-12274, 1981.

LI, M.; SONG, L. QIN, X. Glycan changes: cancer metastasis and anti-cancer vacines. Journal of Biosciences. v 35, n 4, p 665-673. 2010.

LIU, Y.; YU, J. Selective synthesis of CdTe/CdS quantum dots: the effect of ligants. Journal of colloid and interface sciences. V 333, p 690-698. 2009.

LUTGENDORF SK, SOOD AK. Biobehavioral Factors and Cancer Progression: Physiological Pathways and Mechanisms. *Psychosomatic Medicine*. v. 73, n9, p724-730,

2011.

MASTERS, J.R. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. Nature Reviews Cancer. V 2, 315-319. 2002.

MAY, W.S.; CUATRECASAS, PEDRO. Transferrin Receptor: Its Biological significance. The journal of membrane biology. v 88, p 205–215. 1985.

MARSHALEK, J.P.; SHEERAN, P.S.; INGRAM, P.; DAYTON, P.A.; WITTE, R.S.; MATSUNAGA, T.O. Intracellular delivery and ultrasonic activation of folate receptor-targeted phase-change contrast agents in breast cancer cells in vitro. Journal of Controlled Release. v 243, p 69-77. 2016.

MILLET, L.J. & GILLETTE, M.U. Over a century of neuron culture: From the hanging drop to microfluidic devices. Yale journal of biology and medicine. v 85, p 501-521. 2012.

MIZUTANI, K.; TOYODA, M.; MIKAMI, B. X-ray structures of transferrin and related proteins. Biochemica et biophysica acta (BBA) general subjects. V 1820, p 203-211. 2012.

PERIODIC TABLE. General chemistry for engineers. 2018.

PLICHTA, J.K., M.S., CAMPBELL B.M., MITTENDORF, E.A., HWANG, E.S. Anatomy and breast cancer staging: still relevant? Surgical oncology clinics of north America. V27 I 1, p 51-67. 2018.

PINHO, S.S. & REIS, C.A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. Nature Reviews Cancer. Nature reviews cancer. v 15, p 540-555. 2015.

PORTO, G.; RÊMA, A.; FARIA, F., GOMEZ-LAZARO, M.; SILVA, P.;SILVA, B.M.; LOPES, C. Local iron homeostasis in the breast ductal carcinoma microenvironment. *BMC câncer*. V 16, p 187. 2016.

PRATT S.E.; POLLAK M.N. Estrogen and antiestrogen modulation of MCF7 human breast cancer cell proliferation is associated with specific alterations in accumulation of insulin-like growth factor-binding proteins in conditioned media. Cancer Research. V.53, p 5193-5198, 1993.

RABINOVICH, G.A.; TOSCANO, M.A.; JACKSON, S.S.; VASTA, G.R. Functions of cell surface galectin–glycoprotein lattices. Curr Opin Struct Biol. n 17, p 513–520. 2007.

RICHARDSON, D.; BAKER, E. Two mechanisms of iron uptake from transferrin by melanoma cells. The effect of desferrioxamine and ferric ammonium citrate*. J Biol Chem. V 267, n 20, p 13972-13979. 1992.

ROSS, D.T.; PEROU, C.M. A comparison of gene expression signatures from breast tumors and breast tissue derived cell lines. Disease markers. n 17, p 99-109.2001.

RUBIN, R.; STRAYER, D. S. Rubin’s pathology. 6º ed. China. Editora Lippincott Williams & Wilkins, 2012. 1466p.

SANTOS, B. S.; FARIAS, P.M.A; FONTES, A. Semiconductor quantum dots for biological applications. Handbook of Self Assembled Semiconductor Nanostructures Novel Devices in Photonics and Electronic, Editora Elsevier, 2008. 271p.

SAPSFORD, K. E.; PONS, T.; MENDITZ, IGOR L. MEDINTZ, MATTOUSSI, H. Biosensing with luminescent semiconductor. Sensors. v 6, n 8, p 925-953. 2006.

SEGERITZ, C.; VALLIER, L. Cell culture: growing cells as model systems in vitro. Basic science methods for clinical researchers: Academic press. C 9, P 151-172. 2017.

SHARON, N.; Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. Biochim Biophys Acta. n 1760, p 527–537. 2006.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. Glycobiology. n 14, p 53-62. 2004.

SHER E.; EISMAN, J.A.; MOSELEY, J.M.; MARTIN, T.J. Whole-cell uptake and nuclear localization of 1,25-dihydroxy-cholecalciferol by breast cancer cells (T-47D) in culture. Biochem J. v 200, p 315-320, 1981.

SHIMOSAKI, S.; NAKAHATA, S.; ICHIKAWA ,T.; KITANAKA, A.; KAMEDA, T.; HIDAKA, T.; KUBUKI, Y.; KUROSAWA, G.; ZHANG, L.; SUDO, Y.; SHIMODA, K.; MORISHITA, K. Development of a complete human IgG monoclonal antibody to transferrin receptor 1 targeted for adult T-cell leukemia/lymphoma. v 485, p 144-151. 2017.

SIMS-MOURTADA, J.; ROHINA, A.N.; SAMUEL, S.; ESKRIDGE, C.; KMIEC, E.B. Enrichment of breast cancer stem-like cells by growth on electrospun polycaprolactonechitosan nanofiber scaffolds. International Journal of Nanomedicine. v 9, p 995–1003. 2014.

SINGH, R.S.; TIWARY, A.K.; KENNEDY, J.F. Lectins: sources, activities, and applications. Critical reviews in biotechnology. v 19, p 145-178. 2008.

SILVA, B; FAUSTINO, P. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the 3 associated pathologies. Biochemical and biophysica acta. n xxx. 2015.

SICILIANO, M.J.; BARKER, P.E., CAILLEAU. Mutually exclusive genetic signatures of human breast tumor cell lines with a common chromosomal marker. Cancer Res. v 39, p 919-922, 1979.

SOULE, H.D.; VAZQUEZ, J; LONG, A.; ALBERT, S.; BRENNAN, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. J. Natl. Cancer Inst. v. 51, p 1409-1416. 1973.

TADA, H.; HIGUCHI, H.; WANATABE, T.M.; OHUCHI, N. *In vivo* real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice. Cancer Research. v 67, p1138–1144. 2007.

TAKAHASHI K.; SUZUKI K. Association of insulin-like growth-factor-I-induced DNA synthesis with phosphorylation and nuclear exclusion of p53 in human breast cancer MCF-7 cells. International Journal of Cancer. v 55, p 453-458, 1993.

THOM, I.; SHULT-KRONEFELD, I.; BURKHOLDER, I.; GOERN, M.; ANDRITZKY, B.; BLONSKI, K.; KUGLER, C.; EDLER, L.; BOKEMEYER, C.; LAACK, E. Lectin

histochemistry of metastatic adenocarcinomas of the lung.lung cancer. v 56, n 3, p 391-397. 2007.

TRINDER, D.; ZAK, O.; AISEN, P. Transferrin receptor-independent uptake of diferric transferrin by human hepatoma cells with antisense inhibition of receptor expression. Hepatology. v 23, p 1512-1520.1996.

UNICAMP. online < disponível em: http://anatpat.unicamp.br/lamgin21.html > Acesso em: 24/04/2017.

VOJTA, A.; SAMARZIJA, I.; BOCKOR, L.; ZOLDOS, V. Glyco-genes change expression. In cancer through aberrant methylation. Biochemica et biophysica acta (BBA) – general subjects. v 1860, p 1776-1785. 2016.

VOTH, B.; NAGASAWA, D.T.; PELARGOS, P. E.; CHUNG, L.K.; UNG, N.; GOPEN, Q.; TENN, S.; KAMEI, D.T. YANG, Q. Transferrin receptors and glioblastoma multiforme: Current findings and potential for treatment. Journal of Clinical Neuroscience. v 22, p 1071-1076. 2015.

WADE, L.G. & SIMEK, J.W. Organic chemistry. 8ª edição. United states of America. Editora Pearson. 2013. 1326p.

WEGNER, K.D.; HILDEBRANDT, N. Quantum dots: bright and versatile *in vitro* and *in vivo*fluorescence imaging biosensors. Chem. Soc. Rev. v 44, p 4792-4834. 2015.

YANG, D.C.; WANG, F.; ELLIOT, R.L. HEAD, J.F. Expression of transferrin receptor and ferritin H-chain mRNA are associated with clinical and histopathological prognostic indicators in breast cancer. Anticancer Res. v 21. p 541-549. 2001.

ZAJCHOWSKI, A.; BARTHOLDI, M.F.; GONG, Y.; WEBSTER, L.; LIU, H.L.; MUNISHKIN, A.; BEAUHEIM, C.; HARVEY, S.; ETHIER, S.P.; JOHNSON, P.H. Identification of Gene Expression Profiles That Predict the Aggressive Behavior of Breast Cancer Cells. Cancer Research. v 61, p 5168-5178. 2001.

ZANGHELINI, F.; FRÍAS, I. A. M.; REGO, M.J.B.M.; PITTA, M.G.R.; SACILLOTI, M.; OLIVEIRA, MARIA D.L.; ANDRADE, C.A.S. Biosensing Breast Cancer Cells Based On A Threedimensional Tio2 Nanomembrane Transducer. Biosensors and Bioelectronics v 92, n 15, p 313–320. 2017.

ZHANG, Z.; WANG, Y.; QIAN, Y.; WU, X.; ZHANG, Z.; LIU, X.; ZHAO, R.; ZHOU, L.; RUAN, Y.; XU, J.; REN, S.; XU, C.; GU, J. Discovery of Specific Metastasis-Related *N*-Glycan Alterations in Epithelial Ovarian Cancer Based on Quantitative Glycomics. PLoS ONE, 2014.

KAITTANIS, C; SHAFFER, T.M.; THOREK, D.L.J.; GRIMM, J. Dawn of Advanced Molecular Medicine: Nanotechnological Advancements in Cancer Imaging and Therapy. Critical reviews in oncogenesis, V 19, n 3-4, p 143-176. 2014.

KRISNAMURTI, D.G.B.; LOUISA, M.; ANGGRAENI, E.; WANANDI, I. Drug efflux transporters are overexpressed in short-term tamoxifen-induced MCF7 breast cancer cells. Advances in Pharmacological Sciences. V 2016. 2016.

STOVER, P.J. Physiology of Folate and Vitamin B12 in Health and Disease Patrick J. Stover, Ph.D. Nutrition Reviews. n 6, v. 62. 2004.

ROSS, J.F.; CHAUDHURI, P.K.; RATNAM, M. Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines. Physiologic and clinical implications.n 73, p 2432–43.1994.

MIOTTI, S.; BAGNAHI, M.; OTTONE, F.; TOMASSETTI, A.; COLNAGHI, M.I.; CANEVARI, S. Simultaneous activity of two different mechanisms of folate transport in ovarian carcinoma cell lines. J Cell Biochem. N 65, p 479–91.1997.

YU, D.; YAN, H.; WU, C. Folate receptor expression in bladder cancer and its correlation with tumor behaviors and clinical outcome. Journal of cancer research and practice. Online access. 2017.

WALTERS, C.L.; AREND, R.C.; ARMSTRONG, D.K.; NAUMANN, R.W.; ALVAREZ, R.D. Folate and folate receptor alpha antagonists mechanism of action in 3 ovarian cancer. Gyncology Oncology. n 131, v 2, p 493-498. 2013.

LEAMON, C.P.; LOW, P.S. Delivery of macromolecules into living cells: a method that exploits folate receptor endo- Green, Tumor selective radiopharmaceutical targeting via Cytosis. Proc. Natl. Acad. Sci. n 88, v 5572–5576. 1991.

GINTER, P. S.; MCINTIRE, P.J.; XIAOYAN, C.; IRSHAID, L.; LIU, Y.; CHEN, Z.; SHIN, S.J. Folate Receptor Alpha (FOLR1) Expression is Associated with Increased Risk of Recurrence in Triple- 2 Negative Breast Cancer (TNBC). Clinical Breast Cancer. Accepted article, 2017.

MOROSINI, V.; BASTOGNE, T.; FROCHOT, SCHNEIDER, R.; FRANÇOIS, A.; FRANÇOIS, G.; BARBERI-HEYOB, M. Quantum dot–folic acid conjugates as potential photosensitizers in photodynamic therapy of cancer. Photochem. Photobiol. Sci. v 10, p 842-851. 2011.

DU, J.; WU, Y.; HAO, X.; ZHAO, X. Study on the interaction between CdTe quantum dots and folic acid by two-photon excited fluorescence spectroscopic techniques. Journal of Molecular Structure. n 1006, p 650–654, 2011.

GESZKE, M.; MURIAS, M.; BALAN, L.; MEDJAHDI, G.; KORCZYNSKI, J.; MORITZ, M.; LULEK, J.; SCHNEIDER, R. Folic acid-conjugated core/shell ZnS:Mn/ZnS quantum dots as targeted probes for two photon fluorescence imaging of cancer cells. Acta Biomaterialia. v 7, p 1327–1338. 2011.

SINGH, G.; KUMAR, M.; SONI, U.; ARORA, V.; BANSAL, V.; GUPTA, D.; BHAT, M.; DINDA, A.K.; SAPRAZ, S.; SINGH, H. Cancer Cell Targeting Using Folic Acid/Anti-HER2 Antibody Conjugated Fluorescent CdSe/CdS/ZnS-MPA and CdTe-MSA Quantum Dots. Nanosci. Nanotechnol. N 12, v 15. 2015.

KELEMAN,L. The role of folate receptor a in cancer development, progression and treatment: Cause, consequence or innocent bystander? Int. J. Cancer. n 119, p 243–250. 2006.

KUMAR, P.; TAMBE, P.; PAKNIKAR, K.M.; GAJBHIVE, V. Folate/N-acetyl glucosamine conjugated mesoporous silica nanoparticles for targeting breast cancer cells: A comparative study. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. N 156, p 203-212. 2017.

BWATANGLANG, IBRAHIM BIRMA; MOHAMMAD, FARUQ; YUSOF, NOR AZAH, ABDULLAH, JAAFAR; ALITHEEN, NOORJAHAN BANU; HUSSEIN, MOHD ZUBIR; ABU, NADIAH; MOHAMMED, NURUL ELYANI; NORDIN, NORAINI. *In vivo* tumor targeting and anti-tumor effects of 5-fluororacil loaded, folic acid targeted quantum dot system. Journal of Colloid and Interface Science. N 480, p 146-158. 2016.

PAN, J & FENG, SS. Targeting and imaging cancer cells by folate-decorated, quantum dots (QDs)- loaded nanoparticles of biodegradable polymers. v 6, p 1176-1983. 2009.

ATCC, cell lines. Disponível em: <https://www.atcc.org/~/media/Attachments/B/D/D/8/1975.ashx> acesso em 06/06/2017.

Sernec, portal < http://sernecportal.org/portal/taxa/index.php?taxon > - acesso em 20.03.16.

WU, A.M., LISOWSKA, M.D.; YANG, Z. Lectins as tools in glycoconjugate research. Glycoconjugate journal. V 26, p 899-913. 2009.

ANEXO A - ARTIGO PUBLICADO NA BBA *GENERAL SUBJECTS*: "*Biomedical Applications of Glyconanoparticles Based on Quantum Dots*"

BBA - General Subjects 1862 (2018) 427–439

Contents lists available at ScienceDirect

BBA - General Subjects

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbagen

Review

Biomedical applications of glyconanoparticles based on quantum dots

C.R.A. Cunha[a,b,f], A.D.P.R. Oliveira[a,f], T.V.C. Firmino[c,g], D.P.L.A. Tenório[a], G. Pereira[d], L.B. Carvalho Jr.[c], B.S. Santos[e], M.T.S. Correia[b], A. Fontes[a,*]

[a] Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil
[b] Departamento de Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil
[c] Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil
[d] Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil
[e] Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil
[f] Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil
[g] Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Quantum dots
Lectin
Carbohydrate
Glycobiology
Fluorescence

ABSTRACT

Background: Quantum dots (QDs) are outstanding nanomaterials of great interest to life sciences. Their conjugation versatility added to unique optical properties, highlight these nanocrystals as very promising fluorescent probes. Among uncountable new nanosystems, in the last years, QDs conjugated to glycans or lectins have aroused a growing attention and their application as a tool to study biological and functional properties has increased.

Scope of review: This review describes the strategies, reported in the literature, to conjugate QDs to lectins or carbohydrates, providing valuable information for the elaboration, improvement, and application of these nanoconjugates. It also presents the main applications of these nanosystems in glycobiology, such as their potential to study microorganisms, the development of diseases such as cancer, as well as to develop biosensors.

Major conclusions: The development of glyconanoparticles based on QDs emerged in the last decade. Many works reporting the conjugation of QDs with carbohydrates and lectins have been published, using different strategies and reagents. These bioconjugates enabled studies that are very sensitive and specific, with potential to detect and elucidate the glycocode expressed in various normal or pathologic conditions.

General significance: Produce a quick reference source over the main advances reached in the glyconanotechnology using QDs as fluorescent probes.

1. Introduction

Glyconanotechnology, a term used firstly by de la Fuente and Penadés in 2004 [1] to describe the association between nanotechnology and glycoscience, has attracted much attention in the last years [2]. Glyconanoparticles emerged as new nanoprobes with potential application in glycobiology, materials science and biomedicine, allowing the study of protein-carbohydrate and carbohydrate-carbohydrate interactions [2,3]. Glycobiology is the science that deals with the study of the carbohydrates' roles in cell biological processes (*e.g.* energy flow, proliferation, differentiation and migration, among others) and their interaction with other biomolecules [2].

Carbohydrates are one of the fundamental classes of biomolecules, together with proteins, lipids and nucleic acids. Thus, their study can help to understand the cell biology and to develop new therapeutic and diagnostic approaches. Carbohydrates are present in all cell membranes and walls. Many biological processes, such as cell adhesion, cancer metastasis, immune response and intracellular trafficking are guided by carbohydrate-protein interactions [2]. These versatile molecules act as important mediators in endocytosis processes [4], intercellular interaction or between cells and extracellular matrix [5,6], adhesion and cell growth [7,8], fertilization [9], and also interactions between pathogen and host [10].

Carbohydrate-binding proteins, called lectins, possess a specific and reversible interaction with a particular carbohydrate. Lectins were firstly discovered in plants, but now it is known that they are present in other biological systems, having a variety of structures and functions. They have been greatly used in studies involving carbohydrates recognition and detection in cell surfaces [11,12].

The association of carbohydrates or lectins to nanomaterials results in new hybrid materials with synergistic properties, the glyconanoparticles, which associate the optical, electrical and/or magnetic

* Corresponding author at: Departamento de Biofísica e Radiobiologia, CB, UFPE, 50670-901 Recife, PE, Brazil.
E-mail address: adriana.fontes@pq.cnpq.br (A. Fontes).

https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.11.010
Received 31 May 2017; Received in revised form 1 November 2017; Accepted 5 November 2017
Available online 07 November 2017
0304-4165/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.