



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Cyro von Zuben de Valega Negrão

**Desenvolvimento de Nanopartículas Híbridas Funcionalizadas
com Oligonucleotídeos para Aplicação em Câncer**

**Development of Oligonucleotide-Functionalized Hybrid
Nanoparticles for Cancer Applications**

Campinas
2023

Cyro von Zuben de Valega Negrão

**Desenvolvimento de Nanopartículas Híbridas
Funcionalizadas com Oligonucleotídeos para Aplicação em
Câncer**

**Development of Oligonucleotide-Functionalized Hybrid
Nanoparticles for Cancer Applications**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Thesis presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the Doctor in Genetics and Molecular Biology degree, the area of: Animal Genetics and Evolution.

Orientadora: Sandra Martha Gomes Dias

Coorientadora: Natália Neto Pereira Cerize

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO CYRO VON ZUBEN DE VALEGA
NEGRÃO E ORIENTADO PELA DOUTORA
SANDRA MARTHA GOMES DIAS E
COORIENTADO PELA DOUTORA NATALIA
NETO PEREIRA CERIZE.

Campinas
2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

N312d Negrão, Cyro von Zuben de Valega, 1993-
Desenvolvimento de nanopartículas híbridas funcionalizadas com
oligonucleotídeos para aplicação em câncer / Cyro von Zuben de Valega
Negrão. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Sandra Martha Gomes Dias.
Coorientador: Natalia Neto Pereira Cerize.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Nanopartículas. 2. Câncer. 3. Oligonucleotídeos. 4. Técnicas de cultura
de células em três dimensões. I. Dias, Sandra Martha Gomes, 1975-. II. Cerize,
Natalia Neto Pereira. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Development of oligonucleotide-functionalized hybrid nanoparticles
for cancer applications

Palavras-chave em inglês:

Nanoparticles

Cancer

Oligonucleotides

Cell culture techniques, Three dimensional

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Sandra Martha Gomes Dias [Orientador]

Adriano Marim de Oliveira

João Bosco Pesquero

Marcelo Bispo de Jesus

Amauri Jardim de Paula

Data de defesa: 05-09-2023

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3921-4378>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1452781136810324>

Campinas, 05 de setembro de 2023.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a). Sandra Martha Gomes Dias

Prof. Dr. Adriano Marim de Oliveira

Prof. Dr. João Bosco Pesquero

Prof. Dr. Marcelo Bispo de Jesus

Prof. Dr. Amauri Jardim de Paula

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Unidade Instituto de Biologia.

Dedicatória

Dedico esta tese à comunidade LGBTQIAP+, que diariamente enfrenta enormes desafios para sobreviver e conquistar seus direitos em um país que infelizmente é responsável pelos maiores índices de violência contra nossa comunidade.

Como homem homossexual e *queer*, é impossível não dedicar este trabalho àqueles que perderam suas vidas lutando, permitindo que eu esteja aqui hoje. Esta dedicatória é direcionada a todos que lutam atualmente, sejam vocês que estão na política, na busca pelos direitos mínimos e pela igualdade, ou como cidadãos civis em qualquer profissão, simplesmente por estarem presentes e enfrentarem o preconceito e a discriminação. Agradeço a cada um de vocês por tornar possível a expressão de afeto entre pessoas do mesmo gênero sem que sejamos considerados doentes. Somos verdadeiros guerreiros. Além disso, dedico este trabalho também às próximas gerações da comunidade LGBTQIAP+. Vocês são a esperança e a força que continuarão a lutar para que nossos direitos sejam garantidos e para que a sociedade seja mais justa, inclusiva e empática. Que este trabalho possa contribuir para esse objetivo, inspirando e empoderando aqueles que virão depois de nós. Que cada página desta tese seja um lembrete de que não estamos sozinhos em nossa luta, e que a violência psicológica e física diária não nos definam. Que esta tese seja mais do que um agrupamento de folhas com conteúdo científico, mas sim um manifesto de resistência e um chamado à ação para a transformação social. Que ela sirva como uma voz ampliada, trazendo à luz as experiências, as lutas e as conquistas da comunidade LGBTQIAP+ no Brasil.

A vocês, membros da comunidade LGBTQIAP+, dedico este trabalho com todo o meu amor, gratidão e comprometimento. Esta tese existe em honra daqueles que se foram, e não há maior gratidão do que essa. Sigamos juntos, unidos na busca pela igualdade, pela liberdade e pelo respeito. Nossa luta é necessária e digna, e estamos escrevendo uma história que não pode ser silenciada.

Agradecimentos

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desta tese, desde sua idealização até a finalização deste texto, e que merecem ser citados.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código do financiamento 001, número da bolsa 88882.329514/2019-01. Gostaria também de agradecer o apoio do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT/FIPT). Meus agradecimentos se estendem a todos os funcionários, colaboradores e profissionais do IPT, UNICAMP e CNPEM, cujo conhecimento, suporte técnico e infraestrutura foram essenciais ao longo de todo o processo. Sem o trabalho árduo e dedicação dessas equipes, este estudo não teria sido possível. Gostaria de expressar meu agradecimento especial às minhas orientadoras, Sandra Dias e Natália Cerize. Agradeço por todo o aprendizado científico, técnico e humano adquirido ao longo desses anos, assim como pelas conversas motivacionais que tivemos durante o processo desafiador que é o doutoramento. Sou grato por tudo.

Aos colegas de bancada de laboratório, que compartilharam risadas no café e na hora do almoço, e criaram um ambiente de trabalho agradável, agradeço por tornar essa jornada mais leve e divertida. Obrigado Alliny, Amauri, Ana, Bianca, Douglas, Ellen, Gabriela, Raquel, Renna e Renata. Aos conhecidos, amigos e avaliadores que participaram de discussões científicas no ambiente de trabalho ou em eventos científicos em que estive presente, gostaria de expressar minha gratidão. Suas contribuições foram inestimáveis e enriqueceram minha compreensão do tema. Gostaria também de agradecer ao Prof. Dr. Henrique Marque-Souza, pesquisador que abriu tantas portas durante minha vivência acadêmica, e que foi o responsável por ajudar a nutrir minha paixão pela ciência.

Agradeço imensamente pelas opiniões construtivas recebidas ao longo desses anos, mesmo aquelas que não foram tão construtivas assim. Essas últimas me fizeram compreender o valor da saúde mental durante o doutoramento, a importância de valorizar meu trabalho e, acima de tudo, a relevância de um homem homossexual e *queer* lutando diariamente para ser respeitado e ouvido na obtenção de um título que, de tantas formas, tem sido negado à comunidade LGBTQIAP+.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão aos meus pais, Monik e Eduardo, que desde a adolescência, quando acordávamos às quatro da manhã para ir para outra cidade

realizar o ensino médio, me incentivaram e demonstraram a importância dos estudos. Seu apoio incondicional e amor constante foram essenciais para minha trajetória pessoal e acadêmica.

Também gostaria de mencionar um fato que se tornou intrínseco à minha vida e trajetória. Agradeço aos anos convivendo com você, caro vírus. Você me ensinou a me amar, a valorizar mais a vida e a entender a empatia em camadas até então não compreendidas. Foi difícil aceitar sua presença, mas é gratificante ver a evolução na vida que você me causou.

Um agradecimento especial ao grupo de amigos do Vórtex, que me proporcionou energia e motivação durante os momentos desafiadores da execução deste trabalho. Sua amizade e encorajamento foram fundamentais para o meu progresso. Lembro-me de ter lido uma vez que temos muita sorte de podermos escolher nossa família por amor na comunidade *queer*, em vez de sermos vinculados pelo sangue, hoje posso confirmar isso com um sorriso. Somos realmente muito sortudos, vocês são minha eterna família.

Por fim, gostaria de agradecer ao meu marido, Marcos Vinícius Martins Eloi. Eu acho que nunca terei palavras suficientes para expressar toda minha gratidão. Agradeço todo o seu apoio com conversas, gestos, amor, contínua demonstração de afeto e curiosidade constante em entender um pouco de ciência. Esses fatores me fizeram evoluir não apenas profissionalmente, mas como pessoa, além do Cyro cientista. "Você é responsável pela minha melhor versão" é uma frase que sempre gosto de lhe dizer e acredito que resume o que sinto, muito mais do que "eu te amo". Obrigado, *Chico*.

A todos vocês, meu mais sincero obrigado. Sou eternamente grato.

“Permita que eu fale, não as minhas cicatrizes
Elas são coadjuvantes, não, melhor, figurantes
Que nem devia tá aqui”

Música AmarELO, compositor Emicida,
(participação Majur e Pabllo Vittar)

Resumo

Negrão, C. Z. V. **Desenvolvimento de Nanopartículas Híbridas Funcionalizadas com Oligonucleotídeos para Aplicação em Câncer.** Tese (Doutorado). Instituto de Biologia – Universidade de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil, 2023.

Nas últimas décadas, a nanomedicina tem se destacado como uma área importante para o diagnóstico e tratamento de doenças, como o câncer. Entre os materiais possíveis, as nanopartículas (NPs) híbridas, por exemplo, compostas por óxidos metálicos e polímeros, oferecem uma sinergia entre as propriedades de ambos os materiais. Além disso, as recentes descobertas na biologia molecular resultaram no uso de oligonucleotídeos como potenciais moléculas para terapias e diagnósticos mais precisos. Nesse contexto, este trabalho propõe, inicialmente, a síntese de uma NP híbrida de óxido de ferro (IONP) encapsulada com o copolímero de bloco PDMAEMA-b-PMPC (IONPP) e funcionalizada com aptâmeros (IONPPP) para identificação de células tumorais. É importante ressaltar também que, mesmo com os avanços mencionados, estudos pré-clínicos carecem de modelos que mimetizem a complexidade tumoral e seu microambiente. Portanto, nosso segundo objetivo é estudar as diferenças entre as linhagens de células de glioblastoma (GB) U87-GM e U251-GM em culturas de células esferoidais 3D, assim como a co-cultura com células endoteliais microvasculares cerebrais (HBMEC). Esta tese descreve inicialmente em seu primeiro capítulo a caracterização física, química e biológica da NP proposta, que apresentou um tamanho hidrodinâmico de $297,2 \pm 5,8$ nm, com carga potencial de superfície de $16,33 \pm 0,25$ mV e superparamagnetismo. Ademais, não observamos uma redução na viabilidade celular superior a 20% na concentração máxima testada de 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para os copolímeros sintetizados. Por fim, as IONPPP identificaram 4,8 vezes mais células neoplásicas HER2⁺ em comparação com o grupo controle MDA-MB-231 após a separação magnética, o que indica um potencial de aplicação para o diagnóstico. Em relação ao segundo capítulo, nossos dados demonstram um padrão no crescimento dos esferoides dependente da linhagem estudada, além de descrever fatores biológicos dos esferoides de GB, como hipóxia e proliferação celular. Por fim, foi verificada a morfologia dos esferoides U87-GM ao realizar a co-cultura com HBMEC, observando a migração das células endoteliais para o interior do esferoide e a ausência de revestimento do esferoide tumoral por essas células. Em conclusão, este trabalho introduz uma NP com potencial aplicação no diagnóstico do câncer de mama e contribui para a caracterização dos esferoides em mono e co-cultura de GB.

Abstract

Negrão, C. Z. V. **Development of Oligonucleotide-Functionalized Hybrid Nanoparticles for Cancer Applications.** Thesis (Doctoral). Instituto de Biologia – Universidade de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil, 2023.

In the last decades, nanomedicine has emerged as a significant field for diagnosing and treating diseases such as cancer. Among the possible materials, hybrid nanoparticles (NPs) composed, for example, of metal oxides and polymers offer a synergy between the properties of both materials. Moreover, recent discoveries in molecular biology have led to the exploration of oligonucleotides as potential molecules for more precise therapies and diagnostics. In this context, this doctoral thesis proposes, initially, the synthesis of a hybrid iron oxide nanoparticle (IONP) encapsulated with the block copolymer PDMAEMA-b-PMPC (IONPP) and functionalized with aptamers (IONPPP) for the identification of tumor cells. It is also important to emphasize that, despite the mentioned advancements, preclinical studies lack models that mimic the complexity of tumors and their microenvironment. Therefore, our second objective is to study the differences between glioblastoma (GB) cell lines U87-GM and U251-GM in 3D spheroidal cell cultures and their co-culture with brain microvascular endothelial cells (HBMEC). This thesis initially describes in the first chapter the proposed NP's physical, chemical, and biological characterization, which exhibited a hydrodynamic size of 297.2 ± 5.8 nm, a surface potential of 16.33 ± 0.25 mV, and superparamagnetism. Additionally, we observed no cell viability reduction greater than 20% at the maximum tested concentration of 150 µg/ml for the synthesized copolymers. Finally, the IONPPP identified 4.8 times more HER2⁺ neoplastic cells compared to the MDA-MB-231 control group after magnetic separation, indicating potential diagnostic applications. Regarding the second chapter, our data demonstrate a lineage-dependent growth pattern of the spheroids and describe biological factors of GB spheroids, such as hypoxia and cell proliferation. Lastly, we examined the morphology of U87-GM spheroids during co-culture with HBMEC, observing the migration of endothelial cells into the spheroid and the absence of coating of the tumor spheroid by these cells. In conclusion, this doctoral work introduces an NP with potential applications in breast cancer diagnosis and contributes to the characterization of spheroids in mono and co-culture of GB.

Resumen

Negrão, C. Z. V. **Desarrollo de Nanopartículas Híbridas Funcionalizadas con Oligonucleótidos para Aplicaciones en Cáncer.** Tesis (Doctorado). Instituto de Biología – Universidade de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil, 2023.

En las últimas décadas, la nanomedicina ha destacado como un área importante para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades como el cáncer. Entre los materiales posibles, las nanopartículas (NPs) híbridas, compuestas por óxidos metálicos y polímeros, ofrecen una sinergia entre las propiedades de ambos materiales. Además, los recientes descubrimientos en biología molecular han llevado al uso de oligonucleótidos como moléculas potenciales para terapias y diagnósticos más precisos. En este contexto, esta tesis de doctorado propone, inicialmente, la síntesis de una NP híbrida de óxido de hierro (IONP) encapsulada con el copolímero de bloque PDMAEMA-b-PMPC (IONPP) y funcionalizada con aptámeros (IONPPP) para la identificación de células tumorales. Es importante destacar también que, incluso con los avances mencionados, los estudios preclínicos carecen de modelos que imiten la complejidad tumoral y su microambiente. Por lo tanto, nuestro segundo objetivo es estudiar las diferencias entre las líneas celulares de glioblastoma (GB) U87-GM y U251-GM en cultivos de células esferoidales 3D, así como la co-cultura con células endoteliales microvasculares cerebrales (HBMEC). Esta tesis describe inicialmente en su primer capítulo la caracterización física, química y biológica de la NP propuesta, que presentó un tamaño hidrodinámico de $297,2 \pm 5,8$ nm, con carga potencial de superficie de $16,33 \pm 0,25$ mV y superparamagnetismo. Además, no observamos una reducción en la viabilidad celular superior al 20% en la concentración máxima probada de $150 \mu\text{g}/\text{ml}$ para los copolímeros sintetizados. Por último, las IONPPP identificaron 4,8 veces más células neoplásicas en comparación con el grupo control MDA-MB-231 después de la separación magnética, lo que indica un potencial de aplicación para el diagnóstico. En cuanto al segundo capítulo, nuestros datos demuestran un patrón en el crecimiento de los esferoides dependiente del línea celular, además de describir factores biológicos de los esferoides de GB, como la hipoxia y la proliferación celular. Finalmente, verificamos la morfología de los esferoides U87-GM al realizar la co-cultura con HBMEC, observando la migración de las células endoteliales hacia el interior del esferoide y la ausencia de revestimiento del esferoide tumoral por estas células. En conclusión, este trabajo de doctorado introduce una NP con potencial aplicación en el diagnóstico del cáncer de mama y contribuye a la caracterización de los esferoides en mono y co-cultivo de GB.

Lista de Ilustrações

3.1. Capítulo I: Nanopartículas de Óxido de Ferro Revestidas com Copolímero de Bloco Biodegradável PDMAEMA-b-PMPC e Funcionalizadas com Aptâmero para Identificação de Células de Câncer de Mama HER 2⁺.

Figure 1. IONP Characterization. A) XRD (X-ray diffraction), B) FT-IR (Fourier-transformation infrared spectroscopy), and C) UV-VIS (Ultraviolet-visible spectroscopy) results related to the chemical composition characterization of IONPs; D) TGA (Thermogravimetric Analysis) results about the thermal decomposition and E) DSC (Differential Scanning Calorimetry) thermal events results; F-H) NTA (Nanoparticle Tracking Analysis), z-average size in water solution; I) ζ -Potential results in water solution by DLS (dynamic light scattering), and J) VSM (Vibrating Sample Magnetometer) magnetic IONP results.....42

Figure 2. IONP Microscopic Characterization. MET/HRMET (High-resolution Transmission Electron Microscopy) images A-C) at three magnifications, D) frequency size distribution graph; E) crystallographic results by the SAED (Selected Area Electron Diffraction), and F) HRTEM image of IONPs with four lattice planes highlights.....44

Figure 3. Block-Copolymers characterization. A) Scheme representation of experimental approach synthesis of the block-copolymer PDMAEMA-b-PMPC by RAFT method; B); FT-IR (Fourier-transformation infrared spectroscopy) spectrum of the PDMAEMA-b-PMPC_{5:1} and PDMAEMA-b-PMPC_{10:1}; C); z-average size and ζ -Potential in broad pHs of the PDMAEMA-b-PMPC_{5:1} and PDMAEMA-b-PMPC_{10:1} in water solution by DLS (dynamic light scattering).....46

Figure 4. IONP coating by the block-copolymer (IONPP). A) Scheme representation of IONPs coated by the block-copolymer PDMAEMA-b-PMPC; B) z-average size data and PDI of IONP and IONPP by DLS (dynamic light scattering); C); ζ -Potential data of IONP, IONPP, and block-copolymer by DLS; D) FT-IR (Fourier-transformation infrared spectroscopy) spectrum of IONP, IONPP, and block-copolymer (PDMAEMA-b-PMPC), black arrows indicated IONP characteristics band, while purple arrows showed the block-copolymer characteristics bands; E); IONPP VSM (Vibrating Sample Magnetometer) results; F) TEM (Transmission Electron Microscopy) image of IONPP, the red arrows indicating the IONPP structures, and G) size of IONP, IONPP, and block-copolymer coating thickness. **** p-value < 0.0001; unpaired t-test. Scale bar = 25 nm.....48

Figure 5. IONPP characterization after being captured by a magnet. A) Scheme representation of methodology employed for IONPP captured by magnet; B) z-average size of IONP and IONPP by DLS (dynamic light scattering) before and after using magnet, the red arrow indicates the IONPP after using a magnet and the sonicator; C) ζ -Potential of the IONP, block-copolymer, IONPP before using a magnet, and results after IONPP captured; D) FT-IR (Fourier-transformation infrared spectroscopy) spectrum of IONP, IONPP, and block-copolymer (PDMAEMA-b-PMPC) after using a magnet, black arrows indicated IONP

characteristics band, while purple arrows showed the block-copolymer characteristics bands; **E) TGA (Thermogravimetric Analysis)** results in weight (%/%) of IONP, block-copolymer, and IONPP after using the magnet.....**50**

Figure 6. Functionalization binding results of block-copolymer PDMAEMA-b-PMPC and aptamers. **A)** Scheme representation of block-copolymer PDMAEMA-b-PMPC binding with aptamer, the block-copolymer-aptamer complex; **B)** Gel retardation assay; **C)** EC₅₀ curves of the block-copolymer PDMAEMA-b-PMPC_{5:1}, PDMAEMA-b-PMPC_{10:1}, and the PDMAEMA₈₀; the **D)** z-average size, and the **E)** ζ -potential results of block-copolymers (not) binding to aptamers. The yellow arrow shows the aptamer band without polymers; the numbers represent the proportion between polymer and aptamer (w/w). P-value *0.0171, unpaired t-test with Welch's correction.....**52**

Figure 7. Iron oxide nanoparticles coated by block-copolymer and binding with aptamer (IONPPP) characterization. **A)** Scheme representation of iron oxide nanoparticles coated by the block-copolymer PDMAEMA-b-PMPC and functionalized with aptamers; **B)** z-average size data of IONP, IONPP, and the IONPP by DLS (dynamic light scattering) and **C)** the PDI results; **D)** ζ -Potential data of IONP, IONPP, IONPPP, and block-copolymer by DLS (dynamic light scattering); **E)** gel retardation assay of IONPPP incubation with SDS without magnet, and **F)** after using magnet.**** p-value < 0.0001; * p-value< 0.05 (0.0319); both unpaired t-test, Tukey's multiple comparisons tests.**55**

Figure 8. Application of IONPPP in tumor cells. Flow cytometry results in MDA-MB-231 and SKBR3 tumor cells of **A)** HER2 Aptamer validation; **B)** IONPP autofluorescence results; **C)** the PDMMA-b-PMPC – aptamer complex; **D)** IONPPP incubated with HER2 cell^{+/+} without using magnet IONPPP^{magnet}, and **E)** flow cytometry results of the IONPPP incubated with HER2 cell^{+/+} cell with magnet application (IONPPP^{magnet+}).....**57**

Figure Supplementary 1. Polymer characterization. **A)** Scheme representation of experimental approach synthesis of the hydrophilic cationic PDMAEMA; **B)** FT-IR (Fourier-transformation infrared spectroscopy) spectrum PDMAEMA results; **C)** z-average size and ζ -Potential of PDMAEMAs in different pHs by DLS (dynamic light scattering).....**62**

Figure Supplementary 1. Polymer characterization. **D)** Scheme representation of experimental approach synthesis of the zwitterionic polymer PMPC; **E)** FT-IR (Fourier-transformation infrared spectroscopy) spectrum PMPC results; **F)** z-average size and ζ -Potential of PMPCs in different pHs by DLS (dynamic light scattering).....**63**

Figure Supplementary 2. ¹H NMR spectra results. **A)** ¹H NMR spectra results for PDMAEMAs.....**64**

Figure Supplementary 2. ¹H NMR spectra results. **B)** ¹H NMR spectra results for PMPCs.....**65**

Figure Supplementary 2. ¹H NMR spectra results. **C)** ¹H NMR spectra results for block-copolymers PDMAEMA-b-PMPCs.....**66**

Figure Supplementary 3. Cytotoxicity panel. The MTT assay for **A**) PDMAEMA and PMPC polymer and **B**) block-copolymers PDMAEMA-b-PMPC, **C**) the percentage of live cells, and **D**) PI% relative cell staining in HaCaT cells incubated with polymers (PDMAEMA and PMPC) and block-copolymer (PDMAEMA-b-PMPC_{10:1}); **E**) mitochondria weight and **F**) nucleus volume of HaCaT cells incubated with polymers (PDMAEMA and PMPC) and block-copolymer (PDMAEMA-b-PMPC_{10:1}) in comparison with death molecule control (arsenite).....67

Figure Supplementary 4. IONPPP characterization. **A**) z-average size reported by the intensity of IONP, IONPP, block-copolymer (PDMAEMA-b-PMPC), and IONPP by DLS, and **B**) ζ -Potential of IONP, IONPP, block-copolymer (PDMAEMA-b-PMPC), and IONPP by DLS (dynamic light scattering).....68

Figure Supplementary 5. Gate strategy and microscopy analysis. Flow cytometry results related to gate strategy for **A**) SKBR3 and **B**) MDA-MB-231 tumor cells; **C**) IONP profile results in flow cytometry; **D**) fluorescence microscopic images of the PDMMA-b-PMPC – aptamer complex incubated in HER2 cell^{+/−}69

3.2. Capítulo II: Estudo de Modelos Tridimensionais de Cultura de Células de Glioblastoma e Co-Cultura com Células Endoteliais Microvasculares Cerebrais.

Figura 1. Atuais modelos de estudo de glioblastomas 3D e BHE *in vitro*. BHE: Barreira hematoencefálica, 3D: tridimensional.....73

Figura 2. Modelos de estudo. **A.** Formação dos esferoides em monocultura, utilizando apenas células tumorais, semeadas em placas de cultura tratadas com poli-HEMA; **B** Formação dos esferoides em co-cultura, com adição inicial das células tumorais de GB e posteriormente das células endoteliais microvasculares cerebrais, em placas de cultura tratadas com poli-HEMA; **C.** Formação dos esferoides em co-cultura, com adição das células tumorais de GB e endoteliais microvasculares cerebrais no mesmo dia, em placas de cultura tratadas com poli-HEMA. GB: glioblastoma, HBMEC: *human bran microvascular endothelial cells*, poli-HEMA: Poli-hidroxietilmetacrilato.....77

Figura 3. Caracterização morfológica de esferoides de GB de duas linhagens celulares, U87-GM e U251-GM. **A.** Tamanho em área dos esferoides de GB com diferentes quantidades de células tumorais semeadas; **B.** Microscopia de fluorescência mostrando esferoides marcados com DAPI em dois momentos distintos, no 5º e 15º dia após sua formação; **C.** Análise temporal do tamanho em área dos esferoides de GB com diferentes quantidades de células tumorais semeadas; **D.** Análise temporal da circularidade dos esferoides de GB com diferentes quantidades de células tumorais semeadas. Escala de tamanho: 300 μ m. GB: glioblastoma, DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol.....81

Figura 4. Caracterização biológica de esferoides de GB. **A.** Microscopia de fluorescência de esferoides U87-GM e U87-HypoxCR no 5º dia após a formação dos esferoides, escala de tamanho: 500 μ m; Imunofluorescência para verificar a expressão de KI67

em esferoides de GB no 3º após o cultivo das células **B**) U87-GM e **C**) U251-GM, escala de tamanho: 150 µm. CoCl₂: Cloreto de cobalto, GB: glioblastoma.....83

Figura 5. Microscopia de campo claro de esferoides em co-cultura de células de GB e HBMEC após 72 horas de semeadura. **A.** Esferoides em co-cultura em diferentes proporções entre células de U87-GM e HBMEC sem o uso de centrifugação; **B.** Esferoides de monocultura de U87-GM e HBMEC; **C.** Análise do impacto do uso de centrifugação na formação de esferoides em co-cultura. HBMEC: *human brain microvascular endothelial cells*.....85

Figura 6. Caracterização morfológica de esferoides em co-cultura compostos por células tumorais U87-GM e HBMEC, por meio da abordagem com formação inicial de esferoides tumorais e depois inserção das HBMEC. Imagens em duas magnificações (10x e 20x) de coloração por H&E de esferoides semeados com 20,0 x 10³ células, contendo células de **A.** U87-GM e HBMEC. As flechas pretas indicam a borda de um esferoide representativo de HBMEC, enquanto as flechas vermelhas indicam a borda de um esferoide representativo de U87-GM e **B.** Co-cultura na proporção de 1:1 entre as duas linhagens, com o círculo vermelho indicando a alteração da morfologia da borda dos esferoides. Escala de tamanho barra preta: 150 µm e branca preta 100 µm. **C.** Microscopia de campo claro e fluorescência de esferoides em co-cultura após inserção de HBMEC e centrifugação; **D.** Microscopia de fluorescência com os filtros 488 e 546 e microscopia de campo claro de esferoides em co-cultura após 24h e 48h da inserção de HBMEC. Escala de tamanho: 500 µm; **E.** Reconstrução 3D de esferoides em co-cultura após 24h, 48h e 72h em microscopia confocal. H&E: hematoxilina e eosina, HBMEC: *human brain microvascular endothelial cells*.....87

Figura 7. Caracterização morfológica de esferoides em co-cultura compostos por células tumorais U87-GM e HBMEC na proporção 1:1, utilizando a abordagem de inserção simultânea de ambas as linhagens. **A.** Microscopia de campo claro e microscopia de fluorescência com os filtros 488 e 546 de esferoides em co-cultura após 72h e 96h da semeação das células. Microscopia de fluorescência para os filtros DAPI, 488 e 546 de esferoides em co-cultura após **B**) 3 dias e **C**) 14 dias da semeação. Escala de tamanho: 100 µm. HBMEC: *human brain microvascular endothelial cells*.....79

Lista de Tabelas

3.1. Capítulo I: Nanopartículas de Óxido de Ferro Revestidas com Copolímero de Bloco Biodegradável PDMAEMA-b-PMPC e Funcionalizadas com Aptâmero para Identificação de Células de Câncer de Mama HER 2⁺.

Table 1. Reagents used to synthesize the zwitterionic PMPCs and cationic PDMAEMAs. PMPC: Poly (2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine); MPC: (2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine); PDMAEMA: Poly(2-(Dimethylamino) Ethyl Methacrylate); DMAEMA: 2-(Dimethylamino) Ethyl Methacrylate; ACVA: 4,4'-azobis(cyanovaleic acid); CPA: 4-cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentanoic acid.....**35**

Table 2. Reagents used to synthesize block-copolymers PDMAEMA-b-PMPC. PMPC: Poly (2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine); PDMAEMA: Poly(2-(Dimethylamino) Ethyl Methacrylate); DMAEMA: 2-(Dimethylamino) Ethyl Methacrylate; ACVA: 4,4'-azobis(cyanovaleic acid).....**36**

Table 3. Degree polymerization (DP) of macromonomers PMPC and PDMAEMA. PMPC: Poly (2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine); PDMAEMA: Poly(2-(Dimethylamino) Ethyl Methacrylate).....**43**

Table 4. The EC₅₀, SD, and R² of the polymer-aptamer complex. Poly (2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine); PDMAEMA: Poly(2-(Dimethylamino) Ethyl Methacrylate).....**49**

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACVA	<i>4,4'-azobis(cyanovaleic acid)</i>
BBB	<i>Blood brain barrier</i>
BHE	Barreira hematoencefálica
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cm	Centímetros
CPA	<i>4-cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentanoic acid</i>
DAPI	<i>4', 6-Diamidino-2-Phenylindole</i>
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DMAEMA	<i>2-(Dimethylamino)Ethyl Methacrylate</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	<i>Degree of polymerization</i>
EC ₅₀	Concentração de eficiência
emu	Unidades eletromagnéticas
FAPESP	Fundaçao de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FSC	<i>Forward scatter</i>
FT-IR	<i>Fourier-transform infrared</i> spectroscopy
g	Gramas
GB	Glioblastoma
GBM	Glioblastoma multiforme
GFP	<i>Green fluorescente protein</i>
H	Horas
¹ H NMR	<i>Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy</i>
HBMEC	<i>Human brain microvascular endothelial cells</i>
Hc	Coercividade intrínseca
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HIF	Fator induzível por hipoxia
HRTEM	<i>High-Resolution Transmission Electron Microscopes</i>
IB	Instituto de Biologia
IONP	<i>Iron Oxide Nanoparticles</i>

IONPP	<i>Iron Oxide Nanoparticles Polymer</i>
IONPPP	<i>Iron Oxide Nanoparticles Polymer aPtamer</i>
IPT	Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo
KDa	Quilodalton
kOe	Kilo-oersted
LNBio	Laboratório Nacional de Biociências
LNNano	Laboratório Nacional de Nanotecnologia
mg	Miligramas
Min	Minutos
miRNA	<i>Micro RNA</i>
mL	Militros
Mm	Milimetros
Mn	<i>Number average molar mass</i>
MPC	<i>2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine</i>
Ms	<i>Magnetization Value</i>
MTT	<i>3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromide</i>
mV	Milivolt
m/v	Massa/Volume
nm	Nanometro
NP	Nanopartículas/ <i>Nanoparticles</i>
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
Oe	Oersted
OMS	Organização Mundial da Saúde
PdI	<i>Polydispersity Index</i>
PDMAEMA	<i>Poly(2-(Dimethylamino)Ethyl Methacrylate)</i>
PEI	Polietilenimina
PEG	<i>Poly (ethylene glycol)</i>
PI	<i>Propidium iodide</i>
PMPC	<i>Poly (2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine)</i>
Poli-HEMA	Poli-hidroxietilmetacrilato
RAFT	<i>Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro

S	Segundos
SAED	<i>Selected Area Electron Diffraction</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>
SFB	Soro fetal bovino
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SSC	<i>Side scatter</i>
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
TGA	<i>Thermogravimetric analysis</i>
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
UV-vis	<i>Ultraviolet-visible spectroscopy</i>
VSM	<i>Vibrating Sample Magnetometer</i>
v/v	Volume/Volume
XRD	<i>X-Ray Diffractometry</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
w/v	<i>Weight/Volume</i>

Lista de Símbolos

α	Alfa
C	Carbono
Cl	Cloro
λ	Comprimento de onda
©	Copyright
Fe	Ferro
P	Fósforo
°C	Graus celsius
H1/H	Hidrogênio
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
μg	Microgramas
$\mu g/\mu L$	Microgramas por microlitro
μL	Microlitro
nm	Nanômetro
N	Nitrogênio
O	Oxigênio
θ	Teta
™	Trademark
Z	Zeta

Sumário

Dedicatória	5
Agradecimento	6
Resumo	9
Abstract	10
Resumen	11
Lista de Ilustrações.....	12
Lista de Tabelas.....	16
Lista de Abreviaturas e Siglas	17
Lista de Símbolos	20
Sumário	21
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. OBJETIVOS.....	27
Capítulo I: Nanopartículas de Óxido de Ferro Revestidas com Copolímero de Bloco Biodegradável PDMAEMA-b-PMPC e Funcionalizadas com Aptâmero para Identificação de Células de Câncer de Mama HER 2⁺.....	27
Capítulo II: Estudo de Modelos Tridimensionais de Cultura de Células de Glioblastoma e Co-Cultura com Células Endoteliais Microvasculares Cerebrais	27
3. TRABALHOS DESENVOLVIDOS	28
3.1. Capítulo I: Nanopartículas de Óxido de Ferro Revestidas com Copolímero de Bloco Biodegradável PDMAEMA-b-PMPC e Funcionalizadas com Aptâmero para Identificação de Células de Câncer de Mama HER 2 ⁺	28
Abstract.....	29
Keywords	30
Abbreviations	30
Statement of significance.....	30
Graphical Abstract	31
Introduction.....	31
Materials and Methods.....	34
Materials	34
Magnetic nanoparticle synthesis.....	34
RAFT Polymerization of (PMPC and PDMAEMA).....	35
Synthesis of the Amphiphilic Block-Copolymers.....	35

IONP Coating by Block-Copolymer PDMAEMA-b-PMPC	36
Aptamer functionalization	36
Average diameter (z-average) / ζ -potential	37
X-ray diffractometry (XRD).....	37
Thermogravimetric analysis (TGA)	37
^1H Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)	37
Vibrating Sample Magnetometer (VSM)	37
Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR).....	37
Transmission Electron Microscopy (TEM).....	38
Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)	38
Gel retardation assay	38
Cell culture	38
Cytotoxicity assays.....	38
Fluorescence microscopy	39
Flow Cytometry.....	39
Results	40
Iron Oxide Nanoparticle Characterization.....	40
Block-Copolymer synthesis and characterization	41
IONP Coating by Block-Copolymer (IONPP).....	47
IONPP Aptamer Functionalization.....	49
Isolation of HER2 breast cancer cells ⁺ with IONPPP	51
Discussion.....	53
Conclusion	60
Declaration of Competing Interests.....	61
Acknowledgments	61
Supplementary information.....	62
3.2. Capítulo II: Estudo de Modelos Tridimensionais de Cultura de Células de Glioblastoma e Co-Cultura com Células Endoteliais Microvasculares Cerebrais	70
Revisão bibliográfica	70
Glioblastoma multiforme.....	70
Modelos de estudo de GB in vitro	71
Objetivo.....	74
Metodologia	74
Cultura de Células	74

Formação dos Esferoides Tumorais Monocultura.....	74
Ensaio Co-cultura de Esferoide Tumoral-HBMEC.....	75
Fixação e criocorte	77
Caracterização dos esferoides tumorais.....	78
Resultados e discussão	79
Comportamento temporal do tamanho e morfologia de esferoides de GB	79
Aspectos biológicos de esferoides de GB	81
Modelos de co-cultura.....	83
Conclusão.....	90
4. DISCUSSÃO	91
5. CONCLUSÃO	95
6. REFERÊNCIAS	96
Anexos.....	110
Anexo I	110
Anexo II.....	111
Anexo III.....	112
Anexo IV	113
Anexo V.....	114
Anexo VI	115

1. INTRODUÇÃO

A nanomedicina tem se destacado como uma área promissora no diagnóstico e tratamento de diversas doenças, incluindo doenças oncológicas (BHATIA et al., 2022). Os materiais nanoestruturados têm sido utilizados de forma ampla em abordagens diagnósticas e terapêuticas, oferecendo métodos inovadores e eficazes para combater enfermidades complexas (BHATIA et al., 2022). Adicionalmente, compreender os mecanismos moleculares das doenças tem impulsionado a nanomedicina a fornecer abordagens mais eficientes e precisas na entrega de fármacos, além de abrir novas possibilidades com o desenvolvimento de novos nanomateriais na área da saúde (BHATIA et al., 2022; KHAFFAGA et al., 2021).

Devido às suas perspectivas promissoras no campo médico, a nanomedicina tem atraído a atenção de pesquisadores, profissionais da saúde e indústria farmacêutica, resultando em grandes investimentos nas últimas décadas (HARE et al., 2017) em uma grande área conhecida também como bionanomanufatura. A utilização de nanomateriais, tais como nanopartículas (NP) lipídicas, metálicas e híbridas, oferece vantagens significativas devido às propriedades resultantes da sua escala nanométrica, o que os torna extremamente atrativos para uma ampla gama de aplicações na área da nanomedicina (JAIN et al., 2020; PALIWAL; BABU; PALAKURTHI, 2014). Esses nanomateriais exibem propriedades físicas, químicas e biológicas únicas, como superparamagnetismo, alta relação área-volume e novas características ópticas, mecânicas e térmicas (SAJID; PŁOTKA-WASYLKA, 2020). Essas propriedades singulares possibilitam a modificação precisa e controlada de materiais, com o objetivo de aprimorar a eficácia e a seletividade dos tratamentos e métodos de diagnóstico já existentes.

Uma das possibilidades de aplicação promissora é a funcionalização dos nanomateriais com oligonucleotídeos, impulsionada pelos avanços tecnológicos e conhecimento dos mecanismos moleculares (GUO, 2010). Moléculas como o *siRNA* (*small interfering RNA*), vacinas de RNA mensageiro (RNAm) e aptâmeros têm demonstrado um potencial significativo na terapia de doenças oncológicas (RINOLDI et al., 2021). Por exemplo, *siRNAs* são moléculas capazes de modular a expressão gênica, almejando genes específicos envolvidos no desenvolvimento e progressão da doença, o que abre novas possibilidades terapêuticas (RINOLDI et al., 2021). Além disso, aptâmeros podem ser utilizados como moléculas funcionalizadoras em NPs, direcionando-as para tecidos específicos em novas terapias e tecnologias com foco em diagnóstico (VARTY; O'BRIEN; IGNASZAK, 2021).

No primeiro capítulo desta tese de doutoramento, o foco se dá no desenvolvimento tecnológico de um novo nanomaterial com potencial aplicação no diagnóstico do câncer de mama. A referida nanoestrutura consiste em um núcleo metálico de óxido de ferro revestido por um copolímero de bloco sintetizado e caracterizado pelo nosso grupo e, por fim, funcionalizada com um grupo específico de oligonucleotídeos, os aptâmeros. Os resultados obtidos nesse contexto são apresentados no Capítulo I desta tese e foram documentados em um artigo científico, além de terem recebido reconhecimento em premiações durante o período de realização do doutorado.

Antes de explorarmos o segundo capítulo, é essencial compreender a motivação por trás de sua realização. No início deste projeto de doutorado, nosso objetivo principal era a entrega de moléculas de *siRNA* por meio da nanopartícula mencionada anteriormente como forma de terapia para glioblastoma (GB). Além disso, esperávamos que a nanoestrutura proposta fosse capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). Naquela época, durante os primeiros anos desta pesquisa de doutorado, o grupo de pesquisa pertencente à coorientadora deste projeto estava focado em aprofundar o seu conhecimento em modelos de estudos relacionados ao GB. Durante esse período, conduzimos uma série de ensaios preliminares em esferoides de linhagens de GB. A partir dessa iniciativa, surgiu não apenas o estudo da monocultura de esferoides de GB, mas também a exploração de suas interações morfológicas em esferoides co-cultivados, tanto com células de GB quanto com células epiteliais da BHE, ambos pontos mais bem discutidos a seguir.

Verificamos que a NP proposta não possuía a capacidade de transfectar as células com oligonucleotídeos, uma vez que não identificamos fluorescência nas células após a incubação com NPs funcionalizadas com plasmídeos construídos para expressarem proteínas fluorescentes repórteres. Tais resultados nos levaram a escolher uso de aptâmeros ao invés de *siRNAs*. Tal mudança se justifica devido a interação de aptâmeros na superfície de células por meio de proteínas transmembranas, sem haver a necessidade de internalização celular, como é o caso da transfecção. Por fim, um último ponto a se esclarecer é a escolha de câncer de mama como modelo na NP estudada. Isso se deu pela ampla experiência profissional da orientadora deste projeto com tal doença oncológica. A partir de tais esclarecimento, é possível seguir com a introdução desta tese.

No âmbito do estudo de doenças, os modelos tridimensionais (3D) têm se tornado ferramentas fundamentais, tanto na ciência básica quanto na aplicada (IMAMURA et al., 2015). Esses modelos apresentam vantagens significativas em relação aos modelos 2D, proporcionando um ambiente tridimensional mais biologicamente relevante, que permite a

interação e comunicação celular de forma mais fiel à realidade *in vivo* (IMAMURA et al., 2015). Os modelos 3D têm se mostrado especialmente cruciais em doenças que carecem de bons modelos experimentais, como o GB (OSTROM et al., 2020; PAOLILLO; COMINCINI; SCHINELLI, 2021), um tumor cerebral primário com alta incidência e agressividade em adultos (OSTROM et al., 2020).

A falta de modelos experimentais representativos tem dificultado o desenvolvimento de terapias eficazes para o tratamento de GB, especialmente rem relação à modelos que incluem a barreira hematoencefálica (BOCELLATO; REHM, 2022; WANIGASEKARA et al., 2023). Nesse contexto, os modelos 3D surgem como uma promissora alternativa, oferecendo um ambiente mais verossimilhante do tumor *in vivo* e permitindo a análise de sua complexidade e comportamento. O estudo de tais modelos, é o objetivo do segundo capítulo desta tese.

Desta forma, esta tese de doutorado aborda dois tópicos principais: o desenvolvimento tecnológico de uma nova nanopartícula híbrida (óxido metal-polímero) funcionalizada com aptâmeros para a identificação de células de câncer de mama e o estudo de modelos 3D para o GB. Essas abordagens visam contribuir para o avanço da terapia e diagnóstico dessas doenças desafiadoras, oferecendo novas perspectivas e possibilidades de tratamento mais eficazes. Através da exploração desses temas, espera-se impulsionar o progresso científico e tecnológico, promovendo avanços na área da nanomedicina e no entendimento do GB.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho estão organizados de acordo com os capítulos subsequentes.

Capítulo I: Nanopartículas de Óxido de Ferro Revestidas com Copolímero de Bloco Biodegradável PDMAEMA-b-PMPC e Funcionalizadas com Aptâmero para Identificação de Células de Câncer de Mama HER 2⁺

O objetivo principal desta etapa consistiu no desenvolvimento de uma nova nanopartícula híbrida óxido metal-polimérica com funcionalização por oligonucleotídeos. Para atingir esse objetivo, foram estabelecidos os seguintes *objetivos específicos*:

- 1- Sintetizar e fazer a caracterização físico-química das nanopartículas de óxido de ferro (IONP);
- 2- Sintetizar e fazer a caracterização físico-química do copolímero de bloco PDMAEMA-b-PMPC;
- 3- Estudar a citotoxicidade dos copolímeros de bloco PDMAEMA-b-PMPC;
- 4- Revestir as nanopartículas de óxido de ferro com o copolímero de bloco PDMAEMA-b-PMPC (IONPP) e caracterizar fisico-quimicamente;
- 5- Funcionalizar a nanoestrutura IONPP com aptâmeros e verificação da sua capacidade de identificação de células cancerosas de mama HER2⁺.

Capítulo II: Estudo de Modelos Tridimensionais de Cultura de Células de Glioblastoma e Co-Cultura com Células Endoteliais Microvasculares Cerebrais

O objetivo do segundo capítulo foi realizar a caracterização de modelos 3D em monocultura de duas linhagens de Glioblastoma (GB), assim como compreender a morfologia da co-cultura entre células de GB e células endoteliais microvasculares cerebrais. Para alcançar esses objetivos, foram estabelecidos os seguintes *objetivos específicos*:

- 1- Investigar o comportamento temporal do tamanho e morfologia dos esferoides de GB;
- 2- Avaliar aspectos biológicos, como proliferação celular e hipoxia, em esferoides tumorais de GB;
- 3- Estudar a morfologia dos esferoides em co-cultura com células tumorais de GB e células endoteliais microvasculares cerebrais.

3. TRABALHOS DESENVOLVIDOS

3.1. Capítulo I: Nanopartículas de Óxido de Ferro Revestidas com Copolímero de Bloco Biodegradável PDMAEMA-b-PMPC e Funcionalizadas com Aptâmero para Identificação de Células de Câncer de Mama HER 2⁺

Artigo publicado na revista *preprint* bioRVix em 08 de junho de 2023 (DOI: 10.1101/2023.06.06.54385910.1101/2023.06.06.543859), vide Anexo I. Posteriormente artigo foi submetido na revista *Nano Today* (ISSN 1878-044X) 26 de junho de 2023 conforme consta no Anexo II.

Iron Oxide Nanoparticles Coated with Biodegradable Block-Copolymer PDMAEMA-b-PMPC and Functionalized with Aptamer for HER2 Breast Cancer Cell Identification

Cyro von Zuben de Valega Negrão^{1,2,3}, Natália Neto Pereira Cerize^{3*}, Amauri da Silva Justo-Junior², Raquel Bester Liszbinski^{1,2}, Giovanna Pastore Meneguetti³, Larissa Araujo³, Silvana Aparecida Rocco², Kaliandra de Almeida Gonçalves², Daniel Reinaldo Cornejo⁴, Patrícia Leo³, Caio Perecin³, Douglas Adamoski², Sandra Martha Gomes Dias^{2*}

¹ Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil.

² Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Zip Code 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil.

³ Bionanomanufacturing Center, Institute for Technological Research (IPT), São Paulo, Brazil.

⁴ Department of Materials and Mechanics, Institute of Physics, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

[‡] Co-corresponding author

Dr. Natália Neto Pereira Cerize

E-mail address: ncerize@ipt.br

Telephone: +55 11 3767-4682

Zip code: 05508-070

Bionanomanufacturing Center, Institute for Technological Research (IPT)

Av. Prof. Almeida Prado, 1032 - Butantã, São Paulo – SP – Brazil

^{*} Corresponding author

Dr. Sandra Dias

E-mail address: sandra.dias@lnbio.cnptem.br (CNPEM)

Zip code: 13083-100

+55 19 3512-3503

Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM)

Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000 - Polo II de Alta Tecnologia de Campinas – SP

Abstract

Hybrid nanoparticles have shown promise in biomedical applications; however, their seamless integration into clinical settings remains challenging. Here, we introduce a novel metal oxide polymer hybrid nanoparticle (NP) with a high affinity for nucleic acids. Iron oxide nanoparticles (IONP) were initially synthesized via the co-precipitation method and subjected to comprehensive characterization. Subsequently, block-copolymers were synthesized using the Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer (RAFT) technique, employing the zwitterionic PMPC (Poly (2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine)) and the cationic PDMAEMA (Poly(2-(Dimethylamino) Ethyl Methacrylate)) with varying degrees of polymerization. In vitro cytotoxicity studies demonstrated the biocompatibility of the synthesized nanoparticles, with no observed toxicity up to a concentration of 150 µg/mL. The cationic polymer PDMAEMA facilitated the coating of IONP, forming the IONPP complex, consisting of a 13.27 nm metal core and a 3.10 nm block-copolymer coating. Subsequently, the IONPP complex was functionalized with a DNA aptamer specifically targeting the human

epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in breast cancer, forming IONPPP. The block-copolymer exhibited an EC₅₀ of 7.07 µg/mL and demonstrated enhanced recognition efficiency in HER2-amplified SKBR3 cells. Our study presents a comprehensive IONPPP characterization capable of binding short DNA sequences and targeting proteins such as HER2. This newly developed nanoparticle holds significant potential for cancer cell identification and isolation, offering promising prospects in cancer research and clinical applications.

Keywords

Hybrid Nanoparticles; Aptamers; Diagnostics; Breast Cancer; block-copolymers

Abbreviations

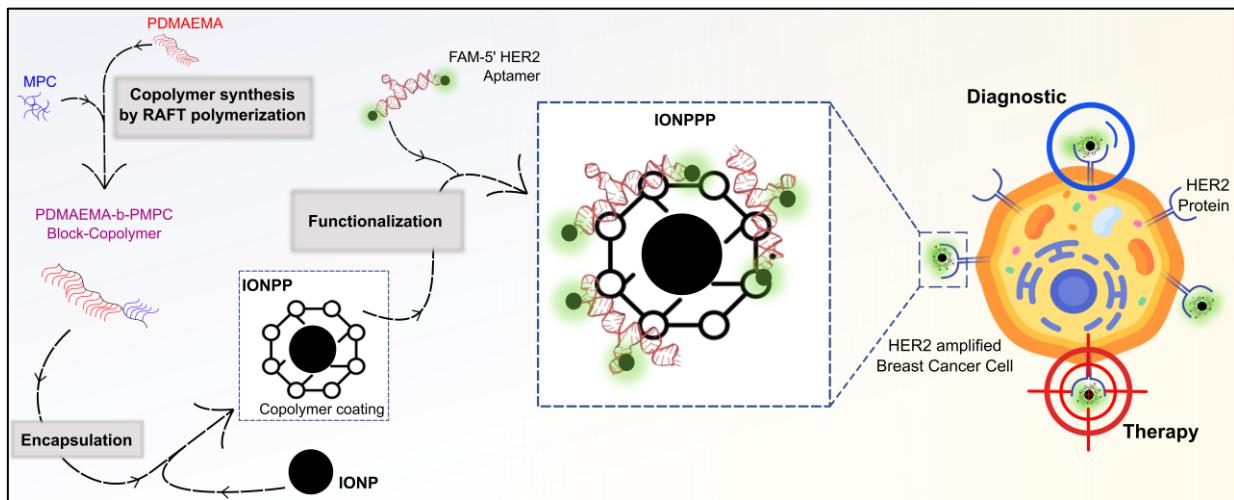
Dynamic Light Scattering (DLS); Polydispersity Index (PDI); Thermogravimetry Analysis (TGA); Poly(2-(Dimethylamino)Ethyl Methacrylate) (PDMAEMA); Poly (2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine) (PMPC); Iron Oxide Nanoparticles (IONPs); Nanoparticle (NP); Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer (RAFT); X-Ray Diffractometry (XRD); Magnetization Value (M_s); Transmission Electron Microscopy (TEM); High-Resolution Transmission Electron Microscopy (HRTEM); Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR); ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (¹H NMR); Selected Area Electron Diffraction (SAED); Vibrating Sample Magnetometer (VSM); human epidermal growth factor receptor 2 (HER2); Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX); number average molar mass (M_n); degree of polymerization (DP); 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromide – MTT, propidium iodide (PI), 4', 6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI), and standard deviation (SD).

Statement of significance

Despite recent advancements in biomedical research, developing sensitive and specific tools for recognizing biological motifs, such as cell receptors and proteins in complex biological solutions, remains a challenge. Furthermore, current approaches often rely on complex biological derivatives like antibodies, lacking a cost-effective delivery strategy. Our study proposes creating and characterizing a novel hybrid metal oxide polymer nanoparticle named IONPPP, functionalized with a DNA aptamer designed to recognize HER2-positive cells. HER2 is a clinically actionable marker for gastric, gastroesophageal, and, particularly, breast cancers. This unique combination of a metal core with an external polymeric structure

offers the potential for identification, isolation, and even theragnostic applications, benefiting from its low toxicity and high specificity.

Graphical Abstract



Introduction

Iron oxide nanoparticles (IONPs) are nanostructured assemblies of iron and oxygen atoms with remarkable properties, including superparamagnetism (AJINKYA et al., 2020; ALI et al., 2016). Over the past few decades, IONPs have found applications in various scientific fields, particularly in biomedical research (GUPTA; GUPTA, 2005; WU; JIANG; ROY, 2016). Notably, they have been extensively utilized in magnetic hyperthermia for therapeutic purposes and magnetic resonance imaging (MRI) for diagnostic imaging (ISRAEL et al., 2020; NOSRATI et al., 2019; THAKOR et al., 2016). Additionally, owing to their ability to serve as drug carriers and promote drug release, IONPs have gained attention in the field of controlled drug delivery (da Silva et al., 2018; Norouzi et al., 2020). Furthermore, leveraging their magnetic properties, IONPs have emerged as a promising tool for diagnosing cancer cells (ONISHI et al., 2022; SU et al., 2020; ZHAO et al., 2020).

Despite the recent advancements in the synthesis and purification methods of IONPs, several challenges still need to be addressed. Firstly, IONPs exhibit a short circulation half-life, limiting their efficacy in various biomedical applications. Secondly, issues related to large-scale scalability and reproducibility hinder their widespread use. Additionally, IONPs tend to aggregate when uncoated, compromising their stability and performance (WU; HE; JIANG, 2008; WU; JIANG; ROY, 2016). To overcome these challenges, the encapsulation of IONPs with other molecules, such as biodegradable polymers, has emerged as a promising

approach (Sperling & Parak, 2010). In addition, the polymeric coating promotes improved colloidal stability, preventing aggregation and ensuring long-term stability. Furthermore, combining metal and polymer components allows for developing theragnostic nanocomposites, integrating diagnostic and therapeutic functionalities. Lastly, the hybrid structure enhances the biocompatibility of the nanoparticles, expanding their potential applications (WU et al., 2019; ZHAO et al., 2020).

Among different strategies for polymer synthesis, reversible addition–fragmentation chain transfer (RAFT) has demonstrated several advantages, such as being a well-controlled, versatile, and free-of-toxic element polymerization process (ALIDEDEOGLU et al., 2009; KEDDIE, 2014; PERRIER, 2017). Poly (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC) is a zwitterionic polymer known for its high biocompatibility and low immunogenicity. In some studies, PMPC has shown an improved toxicity profile compared to poly (ethylene glycol) (PEG) (AURIEMMA et al., 2021; GODA; ISHIHARA; MIYAHARA, 2015a; LUONGO et al., 2017; THI et al., 2020). Poly(2-(dimethylamino) ethyl methacrylate) (PDMAEMA) is a cationic hydrophilic polymer commonly used as a carrier for gene and drug delivery systems (GAUTIER et al., 2013; TZANKOVA et al., 2016). The block-copolymer PDMAEMA-b-PMPC represents a synergistic combination that harnesses the unique properties of both polymers. PMPC provides protection, biocompatibility, and structural conformation, while PDMAEMA offers flexibility and the ability to selectively bind and protect nucleic acids from chemical and biological degradation. Furthermore, the PDMAEMA component enables tight retention of nucleic acids in non-acidic biological environments, such as the bloodstream, and controlled release within specific organelles like the lysosome due to the proton effect (GAUTIER et al., 2013; TZANKOVA et al., 2016). This combination of properties makes PDMAEMA-b-PMPC an excellent candidate for enhancing the stability, biocompatibility, and efficient delivery of nucleic acids in various biomedical applications. Using this novel complex for functionalizing IONP particles opens opportunities for creating multifunctional nanocomposites capable of encapsulating 3D-structured nucleic acids with biological effects spanning diagnostics to therapeutics.

Aptamers are artificial single-stranded RNA or DNA sequences consisting of dozens of base pairs with biochemical functions as standalone molecules (XIAO; FAROKHZAD, 2012). These molecules have been utilized in various applications since the proposition of *in vitro* evolution to improve and select functional molecules (MILLS; PETERSON; SPIEGELMAN, 1967). To design and select functional sequences suitable for

aptamer development, the Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) method was established as a highly efficient and practical tool (SHEIKH; MD; KESHARWANI, 2022). This tool selects the most appropriate sequence with high affinity and selectivity to target since it can fold into tertiary structures that bind precisely to proteins through salt bridges, electrostatic interaction, Van der Waals forces, hydrogen bonding, and aromatic ring stacking (SHEIKH; MD; KESHARWANI, 2022). Furthermore, aptamers are non-immuno-responsive, chemically versatile, highly stable in different pHs, and cost-effective compared to antibodies (Fu & Xiang, 2020; Xiao & Farokhzad, 2012). Their 10-30 kDa size and negative charge also make them ideal for nanoparticle complexing. The resulting NP-aptamer complexes can be used to specifically bind to various targets, including macromolecules and their carriers, as cancer cells, holding great promise in the fields of medicine and cancer research (FU; XIANG, 2020; LIU et al., 2022a; SHEIKH; MD; KESHARWANI, 2022; XIAO; FAROKHZAD, 2012). Aptamers have demonstrated their potentials in both diagnostics and therapy, such as binding to circulating tumor cells for early metastasis detection and blocking the activity of specific membrane proteins to induce effects like apoptosis and disruption of cancer cell growth and division. Clinical trials, including the phase II trial of AS1411, highlight the progress and potential of aptamer-based therapies (BATES et al., 2009; HASSAN; WILLMORE; DEROSA, 2016).

The tyrosine kinase HER2, which stands for human epidermal growth factor receptor 2 (*ERBB2* human gene), is an orphan receptor that plays a crucial role in cell growth and division. Breast cancer patients exhibiting high levels of HER2 expression often present with more aggressive and invasive tumors, leading to increased disease progression and reduced overall survival rates (Boulbes et al., 2015; Varty et al., 2021). In addition, overexpression or amplification of the HER2 gene leads to excessive production of HER2 protein, which can promote uncontrolled cell proliferation and tumor growth (BOULBES et al., 2015). Therefore, accurate identification and targeting of HER2-positive cells are essential for improving breast cancer treatment strategies and patient outcomes(BOULBES et al., 2015; VARTY; O'BRIEN; IGNASZAK, 2021). However, there is an urgent need to create new alternatives to diagnose HER2⁺ cells in the clinical once testing has had high error rates (GUTIERREZ; SCHIFF, 2011).

Here, we present a new multifunctional nanoparticle composed of an iron oxide nanoparticle coated with a block-copolymer PDMAEMA-b-PMPC (IONPP) and functionalized with an anti-HER2 DNA aptamer (IONPPP). (JIANG et al., 2017; LIANG et al., 2018; POTURNAYOVÁ et al., 2019; SALEH; SOUDI; SHOJAOSADATI, 2019; VAJHADIN et al., 2022; WANG et al., 2015a). Our innovative strategy leverages the synergistic properties of

PMPC and PDMAEMA. PMPC enhances nanoparticle (NP) biocompatibility and stability in colloidal solutions, making them suitable for biological applications. On the other hand, PDMAEMA facilitates interaction with nucleic acid molecules, providing a conducive environment for aptamer binding. Our goal is to augment the efficacy of nucleic acid aptamers, not just in terms of binding efficiency but also in their targeted delivery to tissues. This nanostructure optimizes therapeutic applications, combining stability, biocompatibility, and effective nucleic acid delivery. Finally, the metal nanocomponent was essential to increase the sensitivity to capture HER2⁺ tumor cells. Thus, this multifunctional hybrid nanoparticle showcased in our study shows significant potential as a diagnostic tool in cancer diagnosis by integrating precise targeting and efficient cell capture.

Materials and Methods

Materials

Iron (III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ≥ 98%), Iron(II) sulfate heptahydrate ($\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ≥ 98%), sodium sulfite (Na_2SO_3 , ≥ 98%), sodium hydroxide (NaOH , ≥ 98%), 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC, 97%), 2-(Dimethylamino) Ethyl Methacrylate (DMAEMA, 98%), 4-cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentanoic acid (CPA, 97%), 4,4'-azobis(cyanovaleric acid) (ACVA, ≥ 98%), Methanol-d (CD_3OD , ≥ 99.8 atom %D, contains 0.03 % (v/v) TMS, ethyl alcohol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, ≥ 99%), hydrochloric acid (HCl , ≥ 99%), methanol (CH_3OH , ≥ 99%), were purchased from Sigma-Aldrich (Merck). HER2 aptamer was synthesized by the LQS (Synthetic Chemistry Laboratory) at LNBio. All chemicals were used without further purification, and ultrapure water ($18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) was employed to prepare solutions and wash. For the biological characterization and application, we used propidium iodide (Sigma-Aldrich), RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich), 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromide – MTT (Sigma-Aldrich), MitoTracker probe (Life Technologies), and DAPI (D9542, Sigma-Aldrich).

Magnetic nanoparticle synthesis

The magnetite synthesis was performed by the classical method co-precipitation (MASSART, 1981) by mixing $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.032M, 10 mL) and $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.018M, 10 mL) salts in 30 mL of deionized H_2O , producing a red-colored $[\text{Fe}-\text{SO}_3]$ complex. After, NaOH (0.5M, 10mL) was quickly added to the aqueous solution by syringe, changing the solution color to black. After 30 min under vigorous agitation at room temperature, the product was

separated by centrifugation (2700 x g, 15 min) and washed with water five times to obtain the suspension of iron oxide nanoparticles (IONP). All steps were degassed with argon for 20 min.

RAFT Polymerization of (PMPC and PDMAEMA)

The amphiphilic and cationic polymers were synthesized by RAFT polymerization.

PMPC was obtained by first adding 4-cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentanoic acid (CPA) and MPC in acetate buffer (3 mM, pH 5.4) to a round bottom flask. Separately, 4,4'-azobis(cyanovaleic acid (ACVA) was diluted in ethanol 100%. After mixing MPC/ACVA and ACVA, the solution was degassed with argon for 20 min. The reaction occurred at 65 °C for 20 h under magnetic stirring. For PDMAEMA synthesis, DMAEMA, CPA, and ACVA were diluted in methanol and the reaction occurred at 60 °C. The PMPC purification was performed by solvent evaporation under air and washing the polymer with acetone (40 mL) at 2700 x g for 10 min three times. Specifically, for PDMAEMA, dialysis was performed using 3.5-KDa membrane at 4°C overnight. Finally, both polymer products were dried overnight in a vacuum oven at 40°C. ¹H NMR and FT-IR confirmed the synthesis. The reagent amount for all polymer syntheses is in Table 1.

Final Polymer	MPC		DMAEMA		ACVA		CPA	
	<i>mass (g)</i>	<i>mols</i>	<i>mass (g)</i>	<i>mols</i>	<i>mass (mg)</i>	<i>mols</i>	<i>mass (mg)</i>	<i>mols</i>
<i>PMPC₁₅</i> (10614 g/mol)	1.118	0.004			23.579	8.415E-05	70.530	2.525E-04
<i>PMPC₂₅</i> (16815 g/mol)	1.118	0.004			14.147	5.049E-05	42.318	1.515E-04
<i>PMPC₃₅</i> (23605 g/mol)	1.118	0.004			10.105	3.606E-05	30.227	1.082E-04
<i>PDMAEMA₈₀</i> (6254 g/mol)			4.950	3.149E-02	7.352	2.624E-05	21.992	7.872E-05
<i>PDMAEMA₁₆₀</i> (9240 g/mol)			3.960	2.519E-02	2.941	1.050E-05	8.797	3.149E-05

Synthesis of the Amphiphilic Block-Copolymers

The block-copolymers (PDMAEMA-b-PMPC) were produced by chain-extending

Table 1. Reagents used to synthesize the zwitterionic PMPCs and cationic PDMAEMAs. PMPC: Poly (2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine); MPC: (2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine); PDMAEMA: Poly(2-(Dimethylamino) Ethyl Methacrylate); DMAEMA: 2-(Dimethylamino) Ethyl Methacrylate); ACVA: 4,4'-azobis(cyanovaleic acid); CPA: 4-cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentanoic acid.

the PMPC chain transfer agent via RAFT polymerization with DMAEMA monomers. Different

degrees of polymerization (DP_x) were targeted, with different cationic segment lengths (PDMAEMA). As a result, two different block-copolymers were synthesized, altering the ratio between PDMAEMA and PMPC ($[PDMAEMA]/[PMPC]_x$) (where x is equal to 5 and 10). ACVA was used as an initiator in a molar ratio of 1/3 to PMPC, like PDMAEMA and PDMAEMA-b-PMPC synthesis. The reactions were performed in methanol (10%, w/v) at 60 °C for 24 h. Finally, the block-copolymers were purified by dialysis with 12-15 KDa membrane at 4°C overnight. Table 2 contains the reagent amounts.

Final Polymer	PMPC		DMAEMA		ACVA	
	<i>mass (g)</i>	<i>moles</i>	<i>mass (g)</i>	<i>moles</i>	<i>mass (g)</i>	<i>moles</i>
<i>PDMAEMA-b-PMPC_{5:1}</i> (24392 g/mol)	0.100	5.95E-06	4.67E-03	2.974E-05	5.56E-04	1.983E-06
<i>PDMAEMA-b-PMPC_{10:1}</i> (25178 g/mol)	0.100	5.95E-06	9.35E-03	5.947E-05	5.56E-04	1.983E-06

Table 2. Reagents used to synthesize block-copolymers PDMAEMA-b-PMPC. PMPC: Poly (2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine); PDMAEMA: Poly(2-(Dimethylamino) Ethyl Methacrylate); DMAEMA: 2-(Dimethylamino) Ethyl Methacrylate); ACVA: 4,4'-azobis(cyanovaleric acid).

IONP Coating by Block-Copolymer PDMAEMA-b-PMPC

The IONPs were coated by block-copolymer (PDMAEMA-b-PMPC), mixing the oxide metal and polymer solutions with a syringe needle without requiring robust equipment. The final solution was aspirated and released by a 1 mL syringe equipped with a needle (0.55 x 20 mm) 10 times. This process with vigorous turbulence was performed to promote block-copolymer deposition over the IONP surface, forming the core-shell structure. Two different proportions (w/w) were tested, being IONP: block-copolymer (IONPP) equals 1:5 and 1:10, and IONP and block-copolymers were diluted in water.

Aptamer functionalization

To achieve the final nanoparticle structure called IONPPPs, IONPs coated by block-copolymer (IONPP) were functionalized with aptamer. Functionalization was performed by adding HER2 aptamer (2μM) conjugated in the 5' region with FAM fluorescent molecule. First, the aptamers were heated at 90°C for 5 min and then cooled to room temperature over 15 min. The proportion was 1:60 (HER2 aptamer: IONPP, w/w). The reaction was performed in room temperature for 30 min under magnetic stirring.

Average diameter (z-average) / ζ -potential

All nanoparticle structure size and ζ -potential distributions were measured via dynamic light scattering using a Zetasizer Nano ZS90 μ V (Malvern) at 25°C. The samples were diluted in ultrapure water. The measurements were performed in triplicate and analyzed using Zetasizer software, with an automatic titrator for pH assays.

X-ray diffractometry (XRD)

XRD was performed in a Bruker D8 Advance diffractometer to identify the crystal phases present in the synthesized samples. The IONP suspension was dried, powdered in a mortar, and compacted in a glass sample holder. The X-ray patterns were collected between 20 and 80° in the 2θ range using Cu K α radiation, with 1.000 W (40 kV, 25 mA).

Thermogravimetric analysis (TGA)

TGA was performed in TGA/DSC (Mettler Toledo) equipment, in a 10 °C min⁻¹ heating rate from 25 to 1000 °C, nitrogen atmosphere at 50 mL min⁻¹ flow rate.

¹H Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)

To record ¹H NMR spectra of each sample, approximately 10-20 mg were dissolved in 0.6 mL of CD₃OD. The NMR spectra were recorded on the Agilent DD2 spectrometer from the Brazilian Biosciences National Laboratory (Brazilian Center for Research in Energy and Materials - CNPEM), operating in Larmor frequency of 499,726 equipped with a triple resonance probe. Chemical shifts for protons were reported in parts per million (ppm) downfield from tetramethylsilane (TMS, 0 δ) and were referenced to the residual proton in the NMR solvent (CD₃OD: 3.30 ppm).

Vibrating Sample Magnetometer (VSM)

The magnetic properties of the IONP and IONPP were evaluated using a conventional vibrating sample magnetometer (VSM 4500 EG&G). The samples were dried and introduced into an empty drug capsule before being inserted into the equipment. The measurements were performed at room temperature under an applied magnetic field ranging from -20 kOe to +20 kOe.

Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

For FT-IR analysis, Nicolet iS5/iD3 (ATR) equipment was used with wavenumbers from 600 to 4000 cm⁻¹. The measurements were performed using dried samples.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

The particle shape and size distribution of IONP and IONPP were examined by TEM using a JEOL JEM210F0 microscope operating at 200 kV and equipped with CM200 FEG (Philips) camera. The samples were prepared by water suspension dilution and dropped onto copper grids coated within holey carbon ultra-thin car film, 400 mesh (#01824, Ted Pella, EUA). The grids were treated in EasiGlow (I) (Ted Pella, EUA) at 25 mA for the 50s. The size distribution, average particle size (DTEM), and standard deviation (SD) were determined by measuring at least 150 nanoparticles using the free software ImageJ version v1.53t.

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

NTA measurements of the IONPs were performed using a NanoSight NS300 (NanoSight, Amesbury, United Kingdom) equipped with a sample chamber with a 532-nm green laser. The samples were measured at room temperature in PBS for 60 s with camera gain adjustments appropriate for the correct focusing of the EVs. The software NTA 3.4Build 0013 was used for data capture and analysis. Nanoparticle sizing and concentrations were determined based on the Brownian motion of individual particles and light scattering measurements.

Gel retardation assay

Gel electrophoresis was performed to evaluate the functionalization of (co)polymers and aptamers. The polymer-aptamer nanocomposites were prepared at different w/w ratios from 0.5 to 60.0 and loaded onto 3% agarose gels with glycerol 50% (2 µL). The analysis occurred in 1 × Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer at 100 V for 40 min in a 15 cm electrophoresis chamber length. The bands were visualized using Carestream Gel Logic GL2200 Imaging System equipment.

Cell culture

MDA-MB-231 (ATCC HTB-26), SKBR3 (ATCC HTB-30), and HaCaT cells (ATCC CRL-4048) were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) at 37°C under 5% CO₂ in a humidified atmosphere.

Cytotoxicity assays

For the MTT assay, MDA-MB-231 cells were grown in 96-well plates at an initial density of 10000 cells/well in 100 µl medium and incubated for 24 h before adding (co)polymers. The cytotoxicity polymers were tested with different concentrations from 0.5 to

150.0 µg/mL. Each concentration was analyzed at least in triplicate. After additional incubation for 48 h, the medium was replaced with 200 µl serum-free medium, and 20 µL MTT solution (5 mg/mL) was added per well. After 4 h, 100 µL of DMSO was added. The plate was agitated for 10 min, and the absorbance of each well was performed on a PerkinElmer EnSpire 2300 multilabel plate reader at 492 nm.

For the fluorescent cytotoxicity assays, HaCaT cells were seeded at a density of 5000 cells/well in 384-well plates in RPMI medium supplemented with 10% of fetal bovine serum. After seeding, the cells were incubated with serial dilutions of PMPC₃₅, PDMAEMA₈₀, and PDMAEMA-b-PMPC_{10:1}. The cells were incubated with 1 µg/mL propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich), MitoTracker probe (Life Technologies) 500 nM and 5 µg/mL Hoechst 33342 for 40 min in serum-free medium, at 37 °C, 5% CO₂. The positive death control used was arsenite 2mM. Cells were evaluated using fluorescence microscope and plate reader Operetta (PerkinElmer) and analyzed with Columbus v2.8 software. GraphPad Prism (GraphPad Software, USA) version 8.0.1 was used for all statistical tests. The viability was normalized by the untreated cells, while nucleus volume and mitochondrial mass were evaluated by adjustment of inhibitor dose-response curves using the log(inhibitor) vs. response function by the program GraphPad Prism (GraphPad Software, USA).

Fluorescence microscopy

MDA-MB-231 and SKBR3 cells were seeded at 5000 cells/well density in 96-well plates in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum. After 24 h, the block-copolymer-aptamer complex (HER2 aptamer 1µM) was added with a final incubation time of 48 h. Then, the medium was replaced with PBS, and cells were evaluated using fluorescence microscope and plate reader Operetta (PerkinElmer) and further analyzed with Columbus v2.8 software.

Flow Cytometry

The MDA-MB-231 and SKBR3 tumor cells (2×10^5) were incubated with IONPPP (1 µM HER2 aptamer) for 30 min at 37°C in the binding buffer (Hanks Buffer) (LIU et al., 2012). Then, the samples were washed (2260 x g for 5 min at 4°C) once with 200 µl of binding buffer and resuspended in 200 µl PBS. For the magnet⁺ assay, after incubation, we added the magnet to the lateral microtube for 30 min at 37°C. After that, the supernatant was removed, and the complex was washed with the binding buffer (2260 x g for 5 minutes at 4°C). The

sample acquisition was performed using BD FACS Canto II flow cytometer, and the FlowJo software (version 10) was used for analysis.

Results

Iron Oxide Nanoparticle Characterization

The co-precipitation method was applied to synthesize the iron oxide nanoparticles, which demand Fe^{3+} and Fe^{2+} mixed in a basic solution, through a green and easier-to-scale-up method. The XRD (Fig. 1A) results demonstrate peaks at $2\theta = 30.2^\circ, 35.5^\circ, 43.2^\circ, 53.5^\circ, 57.1^\circ$, and 62.9° corresponding, respectively, to (220), (311), (400), (422), (511), and (440) crystalline planes of magnetite phase (JCPDS 190629). These results agree with ATR-FT-IR spectra (Fig. 1B). The FT-IR spectrum shows absorption bands at 3400, 2400, 1600, 1450, 1200, 630, and 580 cm^{-1} . These observed bands are probably due to O-H (3400, 2400, 1600 cm^{-1}) stretching, Fe-O (630 and 580 cm^{-1}) stretching, and S=O (1200 and 1450 cm^{-1}) stretching related to sulfate ions adsorbed in the surface of the nanoparticles.

We also evaluated the optical properties of IONP in the UV-VIS spectrum (Fig. 1C). The results demonstrate a maximum absorption area between 250 and 300 nm. Finally, thermogravimetry analysis (TGA) was performed until 1000°C in a nitrogen atmosphere (Fig. 1D). We observed a loss of water molecules first (3.8% at 20-120°C), with 3.3% mass loss until 346°C and 2.3% mass loss until 1000°C, resulting in a total mass loss of around 9.4%. In addition, the DSC results demonstrated one endothermic event at 80°C with thermal decomposition until 500°C (Fig. 1E).

The hydrodynamic size of IONP in water solution was $78.0 \pm -0.6 \text{ nm}$ by NTA (Fig. 1F-H). Figure 1G demonstrates a typical NTA video frame, while Fig. 1H shows the size distribution by scattergrams, revealing the highest particle concentration at lower intensity values. The ζ -potential of $-36.3 \pm 5.3 \text{ mV}$ (Fig. 1I). The superparamagnetic property was confirmed by the highly reversible hysteresis curves measured in the VSM (Fig. 1J), with a saturation magnetization value (M_s) of 60 emu/g. The weak coercivity showed by the sample ($\sim 30 \text{ Oe}$) can be attributed to a small fraction of magnetically blocked nanoparticles.

The morphology and size of IONPs were verified by TEM (Fig. 2). We observed a spherical nanoparticle (Fig. 2A-C) with an average $8.9 \pm 1.9 \text{ nm}$ diameter (Fig. 2D) and a polydispersity index ($\sigma = \text{SD}/\text{DTEM}$) of 0.2, suggesting a narrow size distribution in a monodisperse-like system (Fig. 2D). The SAED analysis also corroborates with the magnetite phase results (Fig. 2E) (BASAVARAJA et al., 2011; FARMER, 1976; MISHRA et al.,

2014). Finally, different planes can be observed in the HRTEM images of IONPs (Fig. 2F), with the following distances 2.1 Å (400), 2.4 Å (111), 2.9 Å (220), and 4.7 Å (111).

Block-Copolymer synthesis and characterization

The block-copolymers were used to coat the IONPs. The RAFT method synthesized all polymers and block-copolymers (Fig. S1A, S1D, and Fig. 3A). Firstly, we synthesized the macromonomers PMPC and PDMAEMA separately to understand the properties of each polymer. Then, we focused on two different proportions between the cationic and zwitterionic components of the block-copolymer PDMAEMA-b-PMPC. This step contemplated the theoretical molar proportions 5:1 and 10:1 between PDMAEMA and PMPC, forming, respectively, PDMAEMA-b-PMPC_{5:1} and PDMAEMA-b-PMPC_{10:1}. Finally, ¹H NMR analysis was performed to confirm the degree of polymerization (DP), the number-average molecular weight (M_n), and the residual monomer of each synthesis. All results related to macromonomers PMPC and PDMAEMA to ¹H NMR spectra are described in Table 3, and details of each synthesis are in the method section. Our results demonstrated no residual monomer to PDMAEMA synthesis (Fig. S2A) and PMPC after purification (Fig. S2B). PMPC demonstrated the experimental DP above the theoretical DP, while PDMAEMA showed beyond the experimental DP (Table 3). Moreover, Fig. S2C represents the essential assigned signals from the cationic (L' and N', for PDMAEMA) and the zwitterionic (E', F', D', G', for PMPC) components in the ¹H NMR results of the block-copolymers for all three proportion syntheses.

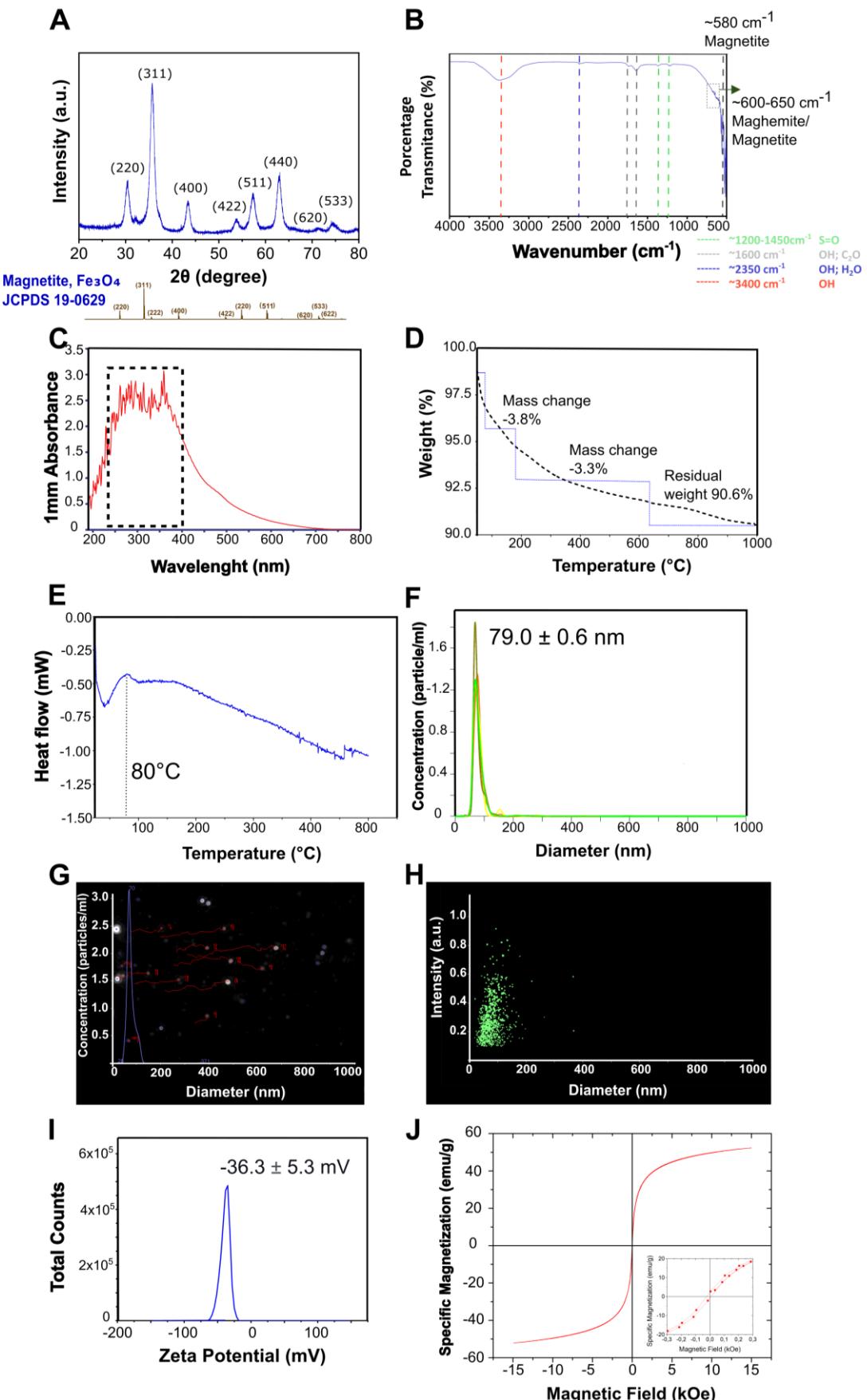


Figure 1. IONP Characterization. **A)** XRD (X-ray diffraction), **B)** FT-IR (Fourier-transformation infrared spectroscopy), and **C)** UV-VIS (Ultraviolet-visible spectroscopy) results related to the chemical

composition characterization of IONPs; **D)** TGA (Thermogravimetric Analysis) results about the thermal decomposition and **E)** DSC (Differential Scanning Calorimetry) thermal events results; **F-H)** NTA (Nanoparticle Tracking Analysis), z-average size in water solution; **I)** ζ -Potential results in water solution by DLS (dynamic light scattering), and **J)** VSM (Vibrating Sample Magnetometer) magnetic IONP results.

	Theoretical		Experimental		
$PMPC_n$	n	M_n	N	C_n	M_n
PMPC ₁₅	15	4.71	35	2.33	10.61
PMPC ₂₅	25	7.66	56	2.24	16.81
PMPC ₃₅	35	10.61	79	2.26	23.61
$PDMAEMA_m$	m	M_n	m	C_m	M_n
PDMAEMA ₈₀	80	12.86	38	0.48	6.25
PDMAEMA ₁₆₀	160	25.43	57	0.38	9.24

Table 3. Degree polymerization (DP) of macromonomers PMPC and PDMAEMA. PMPC: Poly (2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine); PDMAEMA: Poly(2-(Dimethylamino) Ethyl Methacrylate).

n/N corresponds, respectively, to the theoretical and experimental unit number of MPC monomers;
m/M corresponds, respectively, to the theoretical and experimental unit number of DMAEMA monomers,
M_n correlates with the number-average molar mass in KDa;
C_n corresponds to the correlation between experimental and theoretical polymerization for PMPCs synthesis,
while C_m is for PDMAEMAs synthesis.

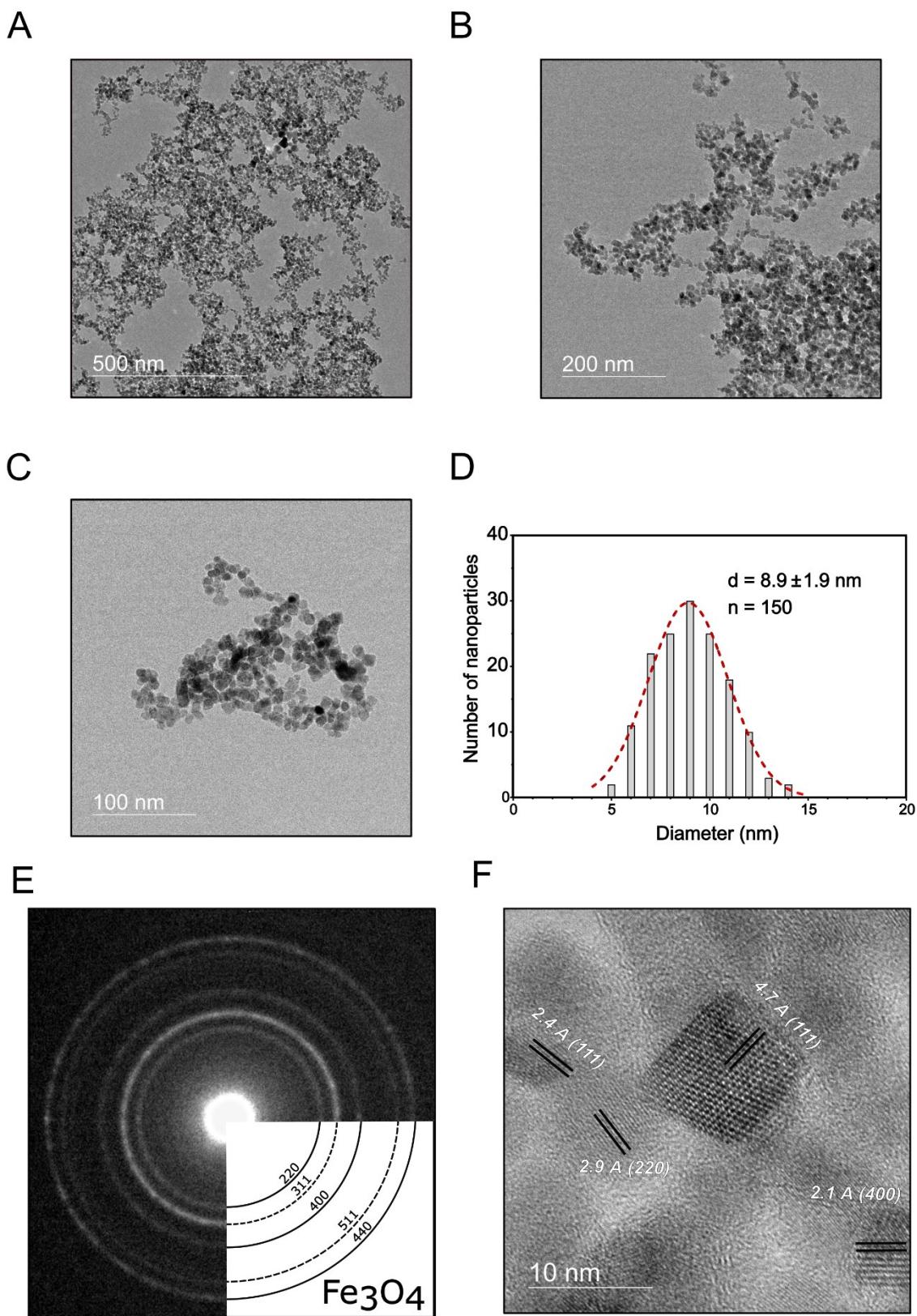


Figure 2. IONP Microscopic Characterization. MET/HRMET (High-resolution Transmission Electron Microscopy) images A-C) at three magnifications, D) frequency size distribution graph; E) crystallographic results by the SAED (Selected Area Electron Diffraction), and F) HRTEM image of IONPs with four lattice planes highlights.

ATR-FT-IR was also realized to confirm the composition of polymers and the PDMAEMA-b-PMPC. The PDMAEMA shows bands at $\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ referents to C-H stretching in $\nu(\text{N}(\text{CH}_3)_2)$, 1700 cm^{-1} (C=O), and the $1400\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ bands are related to methylene groups (Fig. S1B). The PMPC spectrum (Fig. S1E) presents bands at 1240 and 1056 cm^{-1} related respectively to symmetric and asymmetric stretching of the $\nu_{\text{as},\text{s}}(\text{P}-\text{O})$ and $\nu_{\text{as},\text{s}}(\text{P}-\text{O})$, while the quaternary amine $\nu(\text{N}^+(\text{CH}_3)_4)$ is represented at 958 cm^{-1} and the carboxylate group ($\nu(\text{COO}^-)$) at 1727 cm^{-1} . The block-copolymer structuration shows the P-O and $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ stretching, 1240 cm^{-1} , and 3000 cm^{-1} bands, respectively (Fig. 3B). The hydroxyl ($\text{O}-\text{H}$) stretching is observed at 3400 cm^{-1} in all (co)polymers synthesized.

We also measured the ζ -potential of nanoparticles to confirm the block-copolymer synthesis, whereby more PDMAEMA component means more cationic total charge in the block-copolymer due to the protonation of $(\text{N}(\text{CH}_3)_2)$ groups. Fig. 3C. clearly illustrates the shift to achieving ζ -potential of block-copolymers equals zero with a higher PDMAEMA component. Furthermore, the ζ -potential of PDMAEMA macromonomers demonstrated positive ζ -potential in acid and neutral pH (Fig. S1C). In contrast, PMPC remains negative in all pH analyses (Fig. S1F), with a more negative charge related to the polymer in basic pH.

We then evaluated the metabolic viability of cells after incubation with polymers and block-copolymers by MTT assay (Fig. S3A-B), as well as the relative number of live cells (Fig. S3C), necrotic cells (as measured by propidium iodide incorporation) (Fig. S3D), mitochondrial mass (Fig. S3E), and nucleus volume (Fig. S3F). This way, we evaluate the toxicity of polymers and block-copolymers synthesized by different biological approaches a) MTT assay measures the cells metabolic activity, indicating the metabolic viability of cells b) PI incorporation verifies the membrane integrity, resulting in the number of necrotic cells; c) differences in mitochondrial mass indicate an alteration in energy production by mitochondria, and d) alteration in nucleus volume demonstrates cellular damage, indicating genotoxicity. No relevant reduction in cell viability was observed for PDMAEMA and PMPC in the MTT assay (Fig. S3A). However, the block copolymer showed only a minimal decrease in cell viability, as assessed by the MTT assay, with a maximum reduction of 20% (Fig. S3B). Furthermore, the toxicity related to cell number (Fig. S3C), cell death (Fig. S3D), mitochondrial mass (Fig. S3E), and nucleus volume (Fig. S3F) did not significantly change compared to the death control, regardless of the tested polymer molecule.

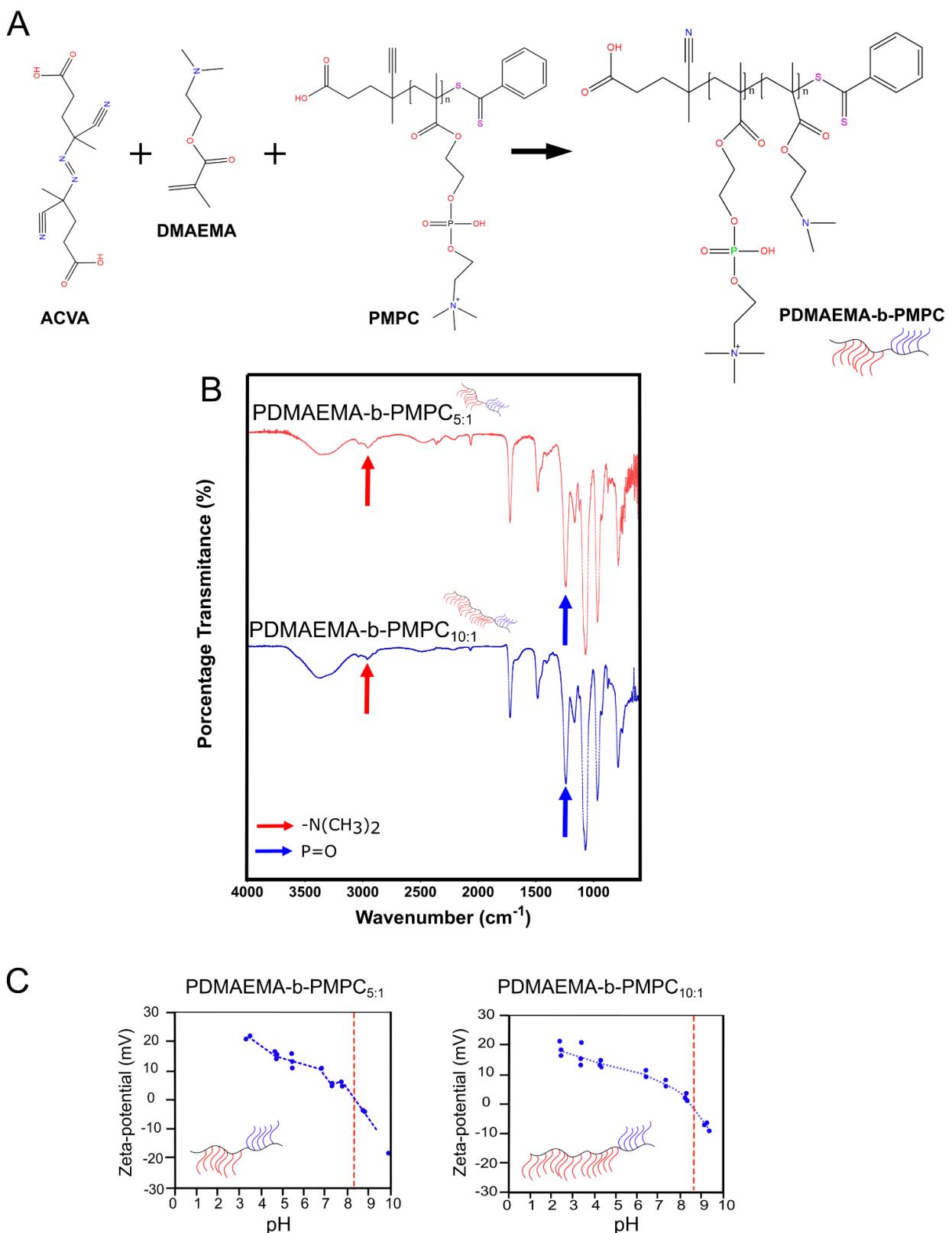


Figure 3. Block-Copolymers characterization. **A)** Scheme representation of experimental approach synthesis of the block-copolymer PDMAEMA-b-PMPC by RAFT method; **B)**; FT-IR (Fourier-transformation infrared spectroscopy) spectrum of the PDMAEMA-b-PMPC_{5:1} and PDMAEMA-b-PMPC_{10:1}; **C)**; z-average size and ζ -Potential in broad pHs of the PDMAEMA-b-PMPC_{5:1} and PDMAEMA-b-PMPC_{10:1} in water solution by DLS (dynamic light scattering).

IONP Coating by Block-Copolymer (IONPP)

We studied two different proportions (weight/weight) between IONP and block-copolymers: 1:5 and 1:10. In the proportion 1:5, we detected precipitation in 1 h (data not showed); in this regard, we followed only the IONPP_{1:10} ratio in the next steps. To confirm the encapsulation of IONP by block block-copolymer PDMAEMA-b-PMPC, we first verified the z-average size (Fig. 4B) and ζ -potential of the final nanostructure (Fig. 4C). While uncoated IONP demonstrated a size of 208.1 ± 1.5 nm, IONPP presented a size of 281.7 ± 1.5 nm (Fig. 4B); both groups showed a low polydispersity index (< 0.2) (Fig 4B). Furthermore, while the block-copolymer alone had a positive value (21.57 ± 1.43 mV), we measured a change in the total surface charge from -34.50 mV (IONP) to 3.99 mV (IONPP) (Fig. 4C). Importantly, IONPP_{1:10} maintained the superparamagnetic behavior (Fig 4E).

As expected, the IONPP morphology was spherical (Fig. 4F) with a distribution size of 13.27 ± 1.30 nm (Fig. 4G). It was possible to see the metal component in the middle of IONPP (red arrow) by TEM (Fig. 4F). Furthermore, the block-copolymer coating has 3.06 ± 0.75 nm (Fig. 4G).

Then we evaluated the binding between IONP and block-copolymers after using magnet to capture the IONPP (IONPP_{1:10}^{magnet+}) (Fig. 5A). The size of IONPP_{1:10}^{magnet+} was 992.5 ± 40.4 nm in an aqueous solution, with a higher aggregation than IONPP_{1:10}^{magnet-} (Fig 5B). However, after being sonicated for 1 h, the IONPP_{1:10}^{magnet+} reduced to 337.4 ± 3.8 nm (Fig. 5B, the red arrow). The IONPPP_{1:10}^{magnet+} ζ -potential was positive after using a magnet (14.9 ± 0.3 mV) (Fig. 5C). This result demonstrated that the block-copolymer maintains binding to IONP. However, we observed higher values of ζ -potential on the IONPP_{1:10}^{magnet+}, which can be explained by the aggregation of NPs, with more block-copolymer on the surface of IONP. We also evaluated using FT-IR and TGA the IONPP_{1:10}^{magnet+}. The FT-IR results demonstrated bands related to block-copolymer 958 and 1240 cm⁻¹ and IONP 630 cm⁻¹ (Fig. 5D), the same result of IONPP_{1:10}^{magnet-} (Fig. 4D). Furthermore, the TGA for IONPP_{1:10}^{magnet+} shows a reduction mass of 8.30% until 181°C (Fig. 5E). The second thermal event finished around 522°C, with a residue of 36.40% of the mass. The last mass loss resulted in a final mass of 22.81%.

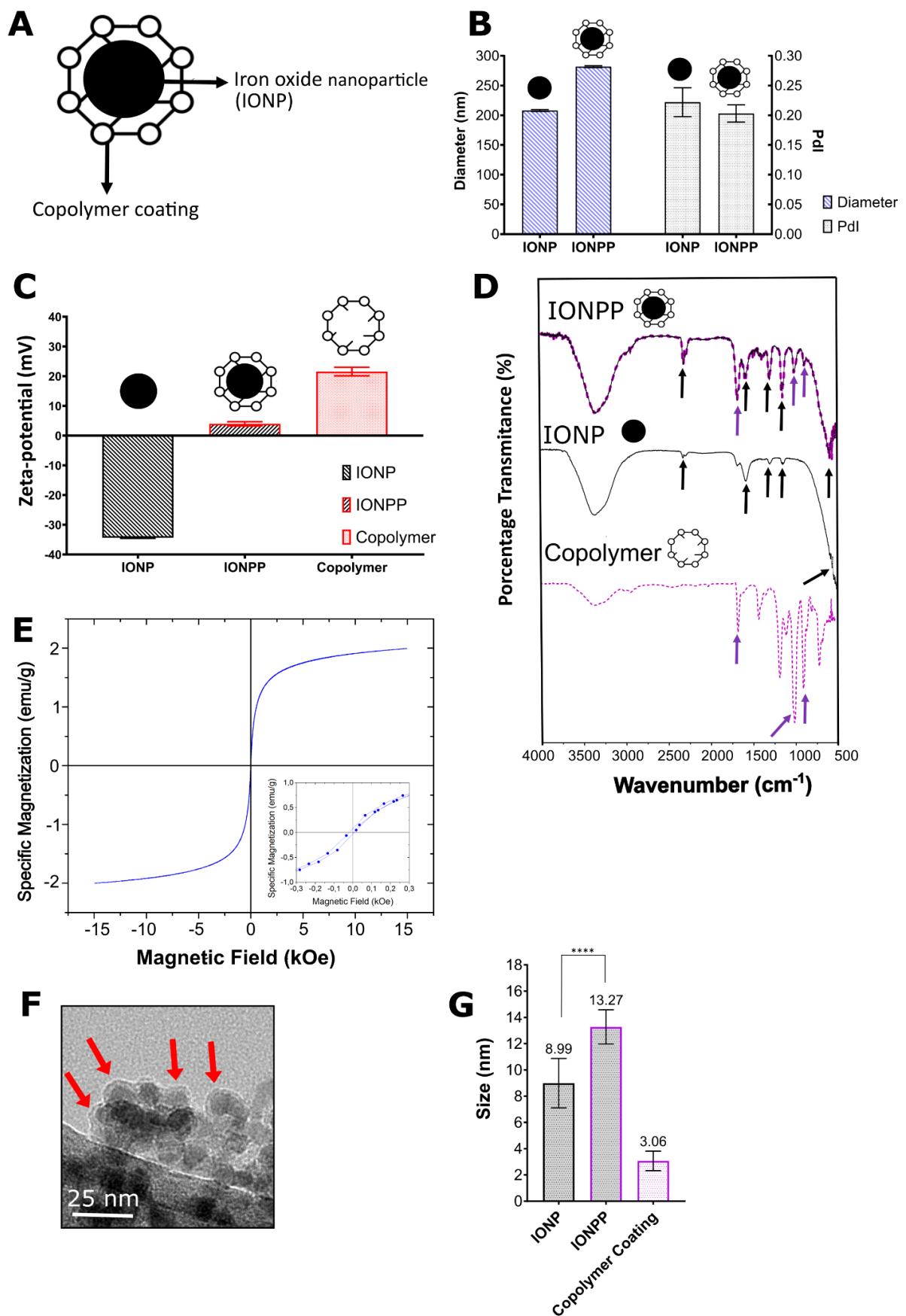


Figure 4. IONP coating by the block-copolymer (IONPP). **A)** Scheme representation of IONPs coated by the block-copolymer PDMAEMA-b-PMPc; **B)** z-average size data and PdI of IONP and IONPP by

DLS (dynamic light scattering); **C**); ζ -Potential data of IONP, IONPP, and block-copolymer by DLS; **D**) FT-IR (Fourier-transformation infrared spectroscopy) spectrum of IONP, IONPP, and block-copolymer (PDMAEMA-b-PMPC), black arrows indicated IONP characteristics band, while purple arrows showed the block-copolymer characteristics bands; **E**); IONPP VSM (Vibrating Sample Magnetometer) results; **F**) TEM (Transmission Electron Microscopy) image of IONPP, the red arrows indicating the IONPP structures, and **G**) size of IONP, IONPP, and block-copolymer coating thickness. **** p-value < 0.0001; unpaired t-test. Scale bar = 25 nm.

IONPP Aptamer Functionalization

Then, we evaluated the binding capacity of the block-copolymers to the anti-HER2 aptamer, as shown. By performing a gel retardation assay, we verified a more increased retardation of the aptamer the higher the amount of block-copolymer incubated (Fig. 6B). By measuring the migration distance of all gel-retarded bands, we calculated the EC₅₀ of the block-copolymers to the aptamer as being 10.29 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (95% CI: 10.03 to 10.54 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to PDMAEMA-b-PMPC_{5:1} and 7.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (95% CI: 6.89 to 7.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to PDMAEMA-b-PMPC_{10:1} (Table 4). In comparison, the polymer PDMAEMA₈₀ presented an EC₅₀ of 0.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (95% CI: 0.34 to 1.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The hydrodynamic size and the ζ -potential of the block-copolymer PDMAEMA-b-PMPC_{10:1} - aptamer complex was 237.2 ± 31.8 nm (Fig. 6D), showing a more compact size compared to the non-functionalized PDMAEMA-b-PMPC_{10:1}; the ζ -potential measured shifted from being positive ($+18.7 \pm 2.0$ mV) without the aptamer to being negative (-2.3 ± 0.7 mV, Fig. 6E) in the presence of the nucleic acid.

<u>Final Polymer</u>	<u>EC₅₀</u>	<u>SD</u>	<u>R²</u>
	$\mu\text{g}/\text{mL}$	$\mu\text{g}/\text{mL}$	
PDMAEMA ₈₀	0.79	0.70 to 0.89	0.9912
PDMAEMA-b-PMPC _{5:1}	10.29	10.02 to 10.55	0.9994
PDMAEMA-b-PMPC _{10:1}	7.07	6.89 to 7.25	0.9997

Table 4. The EC₅₀, SD, and R² of the polymer-aptamer complex. Poly (2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine); PDMAEMA: Poly(2-(Dimethylamino) Ethyl Methacrylate).

We then evaluated the binding of IONPP (formed with PDMAEMA-b-PMPC_{10:1}) to the anti-HER2 aptamer (IONPPP). The hydrodynamic IONPPP size was 297.2 ± 5.8 nm (Fig. 7B) with PdI 0.20 ± 0.04 (Fig. 7C), which demonstrated an increase compared to IONPP (287.4 ± 1.2 nm, Fig. 7B, Fig. S4A). The ζ -potential measured was 16.33 ± 0.25 mV, a smaller value than the IONPP (25.03 ± 0.38 mV, Fig. 7D, Fig S4B). To confirm that the aptamer was being complexed to the IONPP before and after magnet pull-down (Fig. 7E and 7F, respectively), we used SDS to break apart the molecules and analyzed them with agarose gel.

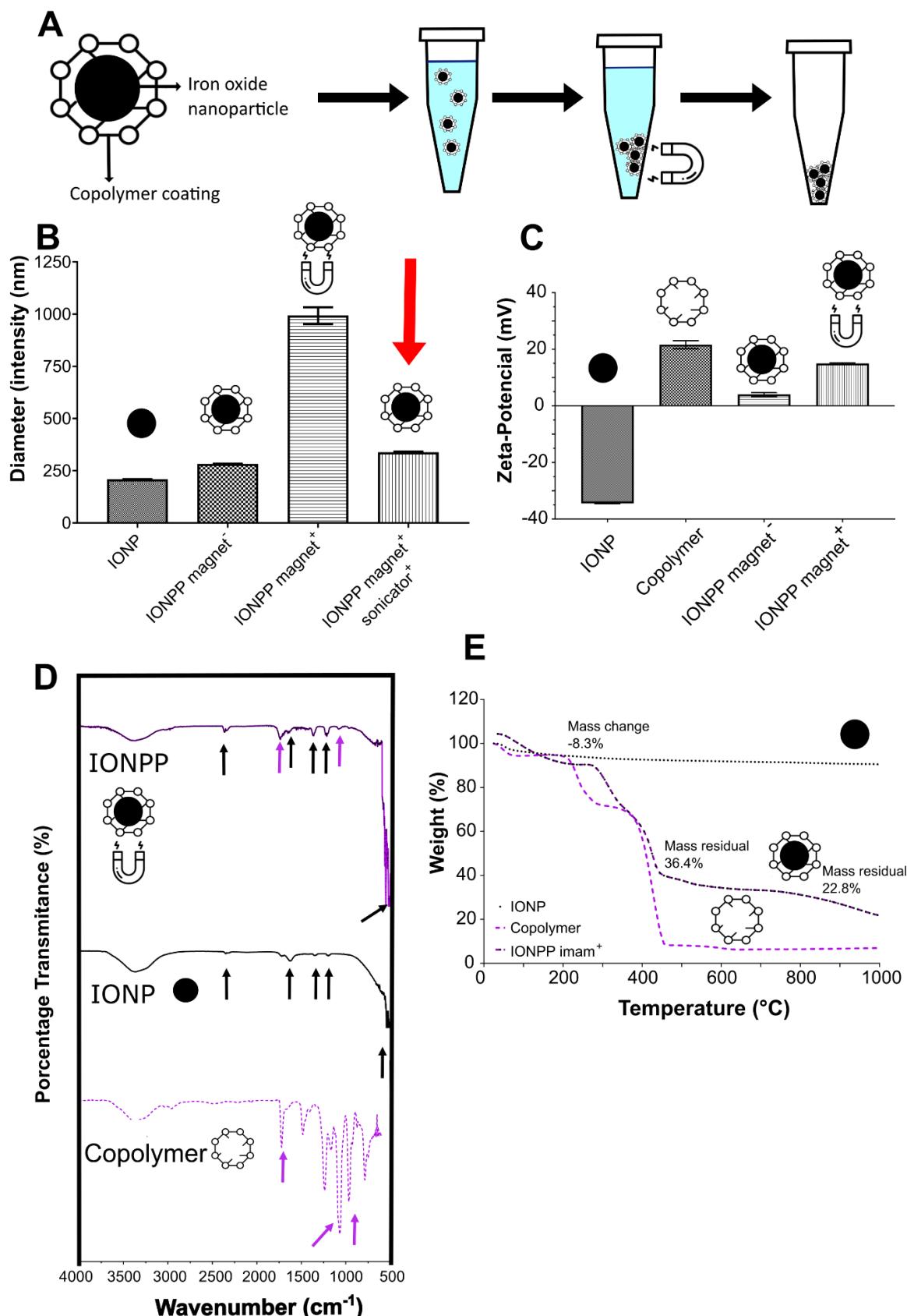


Figure 5. IONPP characterization after being captured by a magnet. **A)** Scheme representation of methodology employed for IONPP captured by magnet; **B)** z-average size of IONP and IONPP by DLS (dynamic light scattering) before and after using magnet, the red arrow indicates the IONPP after using a magnet and the sonicator; **C)** ζ -Potential of the IONP, block-copolymer, IONPP before using a magnet, and results after

IONPP captured; **D)** FT-IR (Fourier-transformation infrared spectroscopy) spectrum of IONP, IONPP, and block-copolymer (PDMAEMA-b-PMPC) after using a magnet, black arrows indicated IONP characteristics band, while purple arrows showed the block-copolymer characteristics bands; **E)** TGA (Thermogravimetric Analysis) results in weight (%/%) of IONP, block-copolymer, and IONPP after using the magnet.

Isolation of HER2 breast cancer cells⁺ with IONPPP

The gate strategy in flow cytometry was employed to accurately identify and analyze SKBR3 (Fig. S5A) and MDA-MB-231 (Fig. S5B) cells bound to HER2-aptamer. Gates were set based on forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) parameters to exclude debris and non-cellular particles. Subsequently, gating was performed to identify the FAM-5'HER2 Aptamer (FITC) for specific subset identification. Additionally, the pattern of IONP in a flow cytometer was verified (Fig. S5C) to exclude this area from further analysis.

We confirmed that the anti-HER2 aptamer exhibited increased recognition of the cell line SKBR3 (32.7%), which has a higher expression of HER2 (MOTA et al., 2017), compared to the cell line MDA-MB-231 (7.2%) (Fig. 8A), which display lower levels of HER2 expression (MOTA et al., 2017). This finding is consistent with our microscopy staining, which specifically occurred on the cell membrane SKBR3 (Fig S5D), as HER2 is a protein localized in the cell membrane (MOTA et al., 2017). Next, we examined the autofluorescence of IONPP when incubated with both cells and observed less than 1% of positive cells (Fig. 8B). Subsequently, we assessed the binding capacity of the block-copolymer (PDMAEMA-b-PMPC_{10:1}) - aptamer complex to bind to the HER2⁺ SKBR3 cells, with 2.40-fold higher compared to the MDA-MB-231 cells (Fig. 8C).

Furthermore, we proceeded to assess the binding capacity of IONPPP to SKBR3 cells compared to MDA-MB-231 cells. Following incubation with IONPPP, we observed that 9.8% of MDA-MB-231 cells exhibited fluorescence positivity. In contrast, the functionalized NP recognized 26.4% of SKBR3 cells (Fig. 8D). Next, we conducted a test to determine the number of positive cells that could be pulled down by a magnet after incubation with IONPPP magnet+. The results showed that 16.0% of SKBR3 cells were successfully captured by the magnetic NP. In contrast, only 3.3% of MDA-MB-231 cells were pulled down (Fig. 8E), which is 4.8-fold lower than the HER2⁺ SKBR3 cells. Despite the reduction in efficiency when using a magnet, our results demonstrated an increased sensitivity.

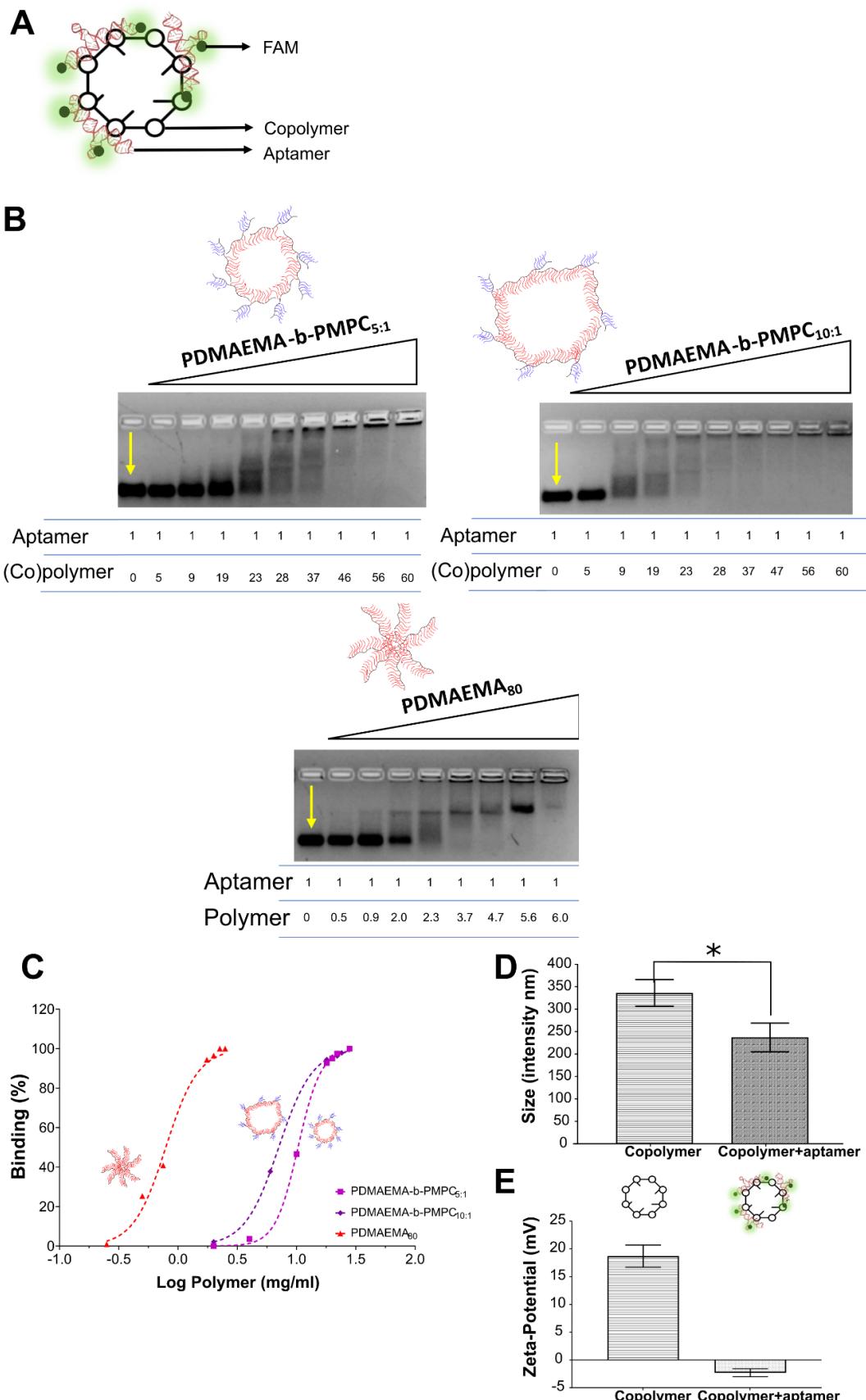


Figure 6. Functionalization binding results of block-copolymer PDMAEMA-b-PMPC and aptamers. **A)** Scheme representation of block-copolymer PDMAEMA-b-PMPC binding with aptamer, the block-copolymer-aptamer complex; **B)** Gel retardation assay; **C)** EC₅₀ curves of the block-copolymer PDMAEMA-b-

PMPC_{5:1}, PDMAEMA-b-PMPC_{10:1}, and the PDMAEMA₈₀; the **D)** z-average size, and the **E)** ζ -potential results of block-copolymers (not) binding to aptamers. The yellow arrow shows the aptamer band without polymers; the numbers represent the proportion between polymer and aptamer (w/w). P-value *0.0171, unpaired t-test with Welch's correction.

Discussion

The careful planning of nanomaterials for biomedical purposes, especially in cancer treatment and diagnosis, necessitates thoroughly considering all constituent components functioning within a multifunctional framework. First, we synthesized an IONP using the classical co-precipitation method and confirmed the chemical composition using XRD, FT-IR, UV-VIS, TGA, and SAED techniques. XRD confirms the formation of iron oxide nanoparticles with a classical pattern of other studies (Cornell & Schwertmann, 2003b; Perecin et al., 2022) corresponding to an inverse spinel structure. However, XRD cannot detect the differences between maghemite and magnetite because these two phases are isostructural. The FT-IR spectra demonstrated the magnetite formation (580 cm^{-1} characteristic band) and some nanoparticle surface adsorbed molecules (S=O). These $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ bands represent the sulfur group residue of the synthesis, which is observed in other studies (Perecin et al., 2021, 2022) and can be helpful to colloidal stabilization. Also, the bands between 600 and 650 cm^{-1} are associated with the Fe-O stretching related to the maghemite phase, indicating some oxidation of our IONPs. The SAED and HRTEM results corroborate with the chemical composition of the IONP, indicating a Fe_3O_4 cubic crystalline network, which is commonly found in the literature (Cornell & Schwertmann, 2003b).

IONPs absorb light in the UV region (CORNELL; SCHWERTMANN, 2003a). Therefore, they are strongly reflected in the visible/near IR regions, aligning with our results. The TGA results demonstrated the loss of water molecules and degradation of the adsorbed sulfate groups evidencing the thermal degradation pattern of IONPs. TEM and HRTEM verified the morphology, and we mainly observed a spherical shape. This morphology is expected due to low-temperature synthesis (less than 100°C), with probable Fe^{2+} excess over OH^- , and it is corroborated by other studies (CORNELL; SCHWERTMANN, 2003b; PERECIN et al., 2021). While the large size distribution observed in our data is classical due to the synthesis method employed (AJINKYA et al., 2020; ALI et al., 2016; BECK et al., 2022). Our results demonstrated extensive and robust characterization of the IONPs, confirming the chemical composition aligned with the literature.

The IONPs have high aggregation characteristics when uncoated (ALI et al., 2016; CORNELL; SCHWERTMANN, 2003b, 2003c). Therefore, we used a biodegradable block-

copolymer PDMAEMA-b-PMPC to encapsulate the IONPs. PMPC was chosen to provide colloidal stability and better biocompatibility (GODA; ISHIHARA; MIYAHARA, 2015b; PERECIN et al., 2022), while PDMAEMA binds to nucleic acid by electronic binding (ZHU et al., 2010). First, we synthesized and characterized the polymers separately and then the block-copolymer. As a result, we observed a DP_{experimental} above of DP_{theoretical} for PMPC, also found in another study about PMPC synthesis by RAFT (Perecin et al., 2022). Furthermore, our results indicated a low monomer conversion of DMAEMA in PDMAEMA and the block-copolymer PDMAEMA-b-PMPC, with the same pattern as previous studies (WANG et al., 2019). The improvement to achieve precise DP for DMAEMA conversion could be tested in future studies by changing the proportion between initiator and macro-CTA, temperature, and polymerization time.

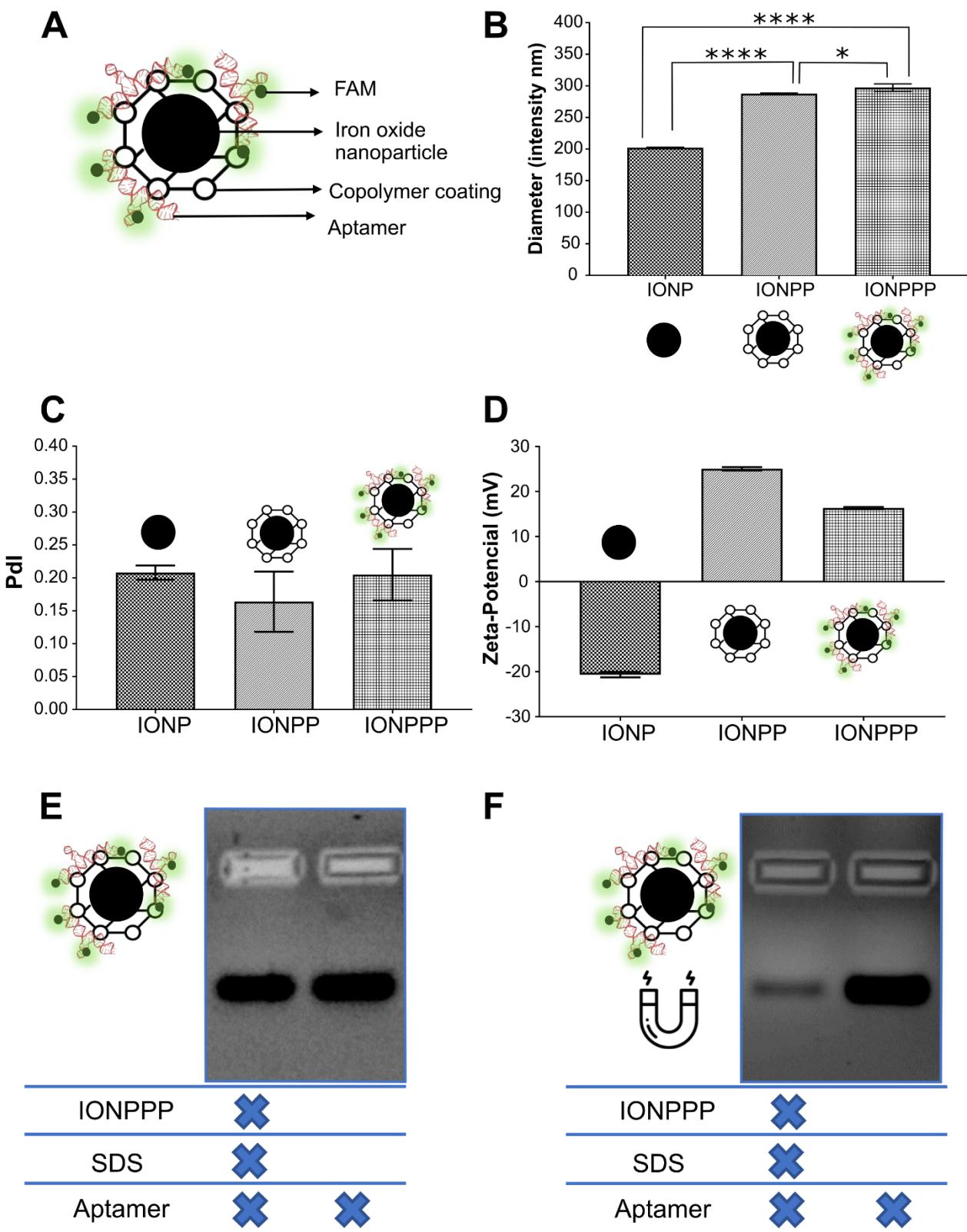


Figure 7. Iron oxide nanoparticles coated by block-copolymer and binding with aptamer (IONPPP) characterization. **A)** Scheme representation of iron oxide nanoparticles coated by the block-copolymer PDMAEAMA-b-PMPC and functionalized with aptamers; **B)** z-average size data of IONP, IONPP, and the IONPP by DLS (dynamic light scattering) and C) the PdI results; **D)** ζ -Potential data of IONP, IONPP, IONPPP, and block-copolymer by DLS; **E)** gel retardation assay of IONPPP incubation with SDS without magnet,

and F) after using magnet.**** p-value < 0.0001; * p-value< 0.05 (0.0319); both unpaired t-test, Tukey's multiple comparisons tests.

The FT-IR and ^1H NMR results confirmed the PDMAEMA and the PMPC polymerization, such as the block-copolymer PDMAEMA-b-PMPC. For the zwitterionic and cationic polymers, we could observe the aromatic hydrogen signal in the CPA ring (carbons A', B', and C'), such as the hydrogen corresponding to the MPC molecule (D', E', F', and G') and DMAEMA molecule (D' and F'). Also, the FT-IR spectrum confirms the block-copolymer PDMAEMA-b-PMPC synthesis by P-O (1240 cm^{-1}) and -N(CH₃)₂ (3000 cm^{-1}) stretching. Concerning the PDMAEMA-b-PMPC ^1H NMR results, the peaks 2.4 (O') and 2.8 (I') agree with the increase of the component PDMAEMA in the two block-copolymers proposed, which corroborates with the chemical composition of the final block-copolymer. Our ^1H NMR and FT-IR spectra results are also in concordance with previous polymer synthesis studies (HUANG et al., 2017; PERECIN et al., 2022; TAKTAK et al., 2015; TIAN et al., 2020; XIE et al., 2018). The purification protocol for polymer synthesis is easy, fast, and reproducible with the total elimination of residual monomers, an essential aspect of biological applications (JAMAHIRIYA et al., 2010), and can be applied in other studies with polymerization by RAFT.

Finally, while PMPC did not show a positive charge in any DP, our block-copolymer ζ -potential results demonstrated an increase in positive charge at pH 7.4, conforming to a higher DP between PDMAEMA and PMPC. Our work demonstrated an easy and reproducible methodology to verify the block-copolymer synthesis by the ζ -potential in a range of pH, which could be applied in other studies focusing on PDMAEMA and PMPC polymer approaches. Considering the above results, the polymerization of PMPC, PDMAEMA, and block-copolymer PDMAEMA-b-PMPC are clear.

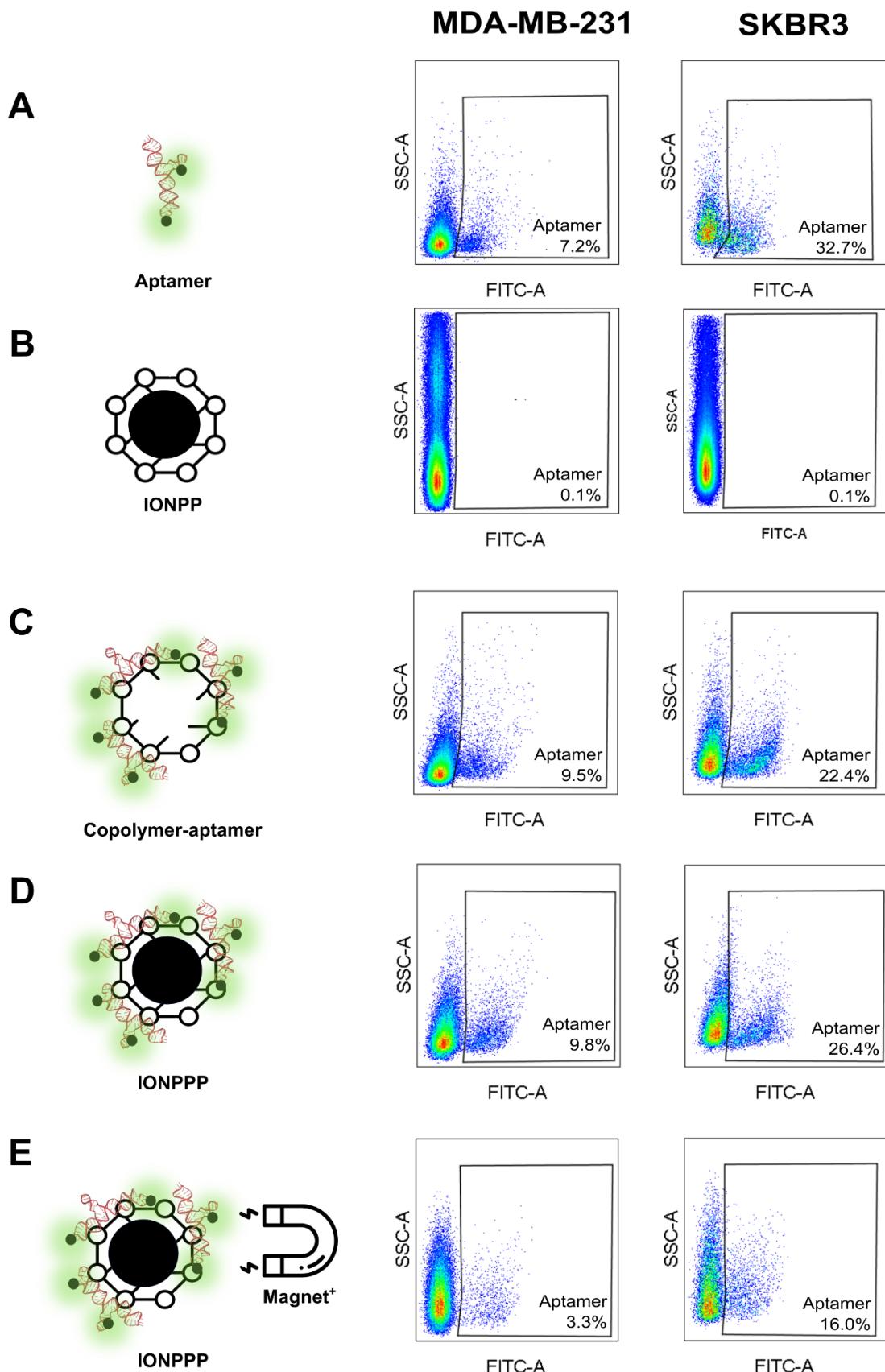


Figure 8. Application of IONPPP in tumor cells. Flow cytometry results in MDA-MB-231 and SKBR3 tumor cells of **A)** HER2 Aptamer validation; **B)** IONPP autofluorescence results; **C)** the PDMMA-b-

PMPC – aptamer complex; **D)** IONPPP incubated with HER2 cell^{-/+} without using magnet IONPPP^{magnet}; and **E)** flow cytometry results of the IONPPP incubated with HER2 cell^{-/+} cell with magnet application (IONPPP^{magnet⁺}).

Our results also demonstrated the low-toxicity polymer synthesized by different biological approaches. PMPC has been studied by previous works alone and in block-copolymers, and in concordance with our results, PMPC demonstrated no significant reduction of cell viability, even with higher concentrations until 2 mg/mL. (PENG et al., 2021; PERECIN et al., 2022; ZHANG et al., 2022). Previous works reported the high cytotoxicity of PDMAEMA, including in concentrations lower than 200 µg/mL (BONKOVOSKI et al., 2014; MENDREK et al., 2018; YU et al., 2012). Our study demonstrated the absence of cytotoxicity in the tested concentrations of PDMAEMA, potentially attributed to its lower DP. The PDMAEMA-b-PMPC block copolymers showed a slight decrease in cell viability based on metabolic activity, but no significant impact was observed using other biological toxicity measures. Despite some existing studies on the cytotoxicity of polymers synthesized by the RAFT method (FAIRBANKS; GUNATILLAKE; MEAGHER, 2015; PISSUWAN et al., 2010), there is an urgent need for further research to comprehensively assess their toxicity using diverse biological aspects. Remarkably, this study is the first to evaluate the cytotoxicity of PMPC, PDMAEMA, and PDMAEMA-b-PMPC block copolymers using multiple biological approaches.

The block-copolymer component proposed by our group allows future modifications by adding new blocks through RAFT polymerization. Some examples would understand the therapeutic application by delivering nucleic acid bound to PDMAEMA or changing the hydrophilic–lipophilic balance to achieve control release of hydrophilic and hydrophobic drugs.

Concerning the coating process, the IONPP demonstrated an increase in average size. Also, IONPP showed a positive surface charge after coating. The IONPP positive charge remained even after using the magnet. Moreover, the block-copolymers have a broad size distribution, with multiple populations in water solution at pH 7 (data not showed) explained by the hydrophilicity of both polymers, which cannot be detected in the IONPP sample with only one size peak. Therefore, we can infer that the cationic component of the block-copolymer is responsible for binding on the surface of the IONPs, once IONP had a negative charge, while the block-copolymer had a positive one. This coating induces colloidal stabilization, which explains the DLS results with a unique population and a good PdI (< 0.25). The coating process of IONPP by electrostatic interaction has been studied in previous works (Barrow et al., 2015; Nayeem et al., 2021). However, here we demonstrated for the first time the possibility of the

coating process taking very little time and simple equipment, even with two hydrophilic polymers. This is the opposite of the standard coating process, with robust equipment (ZHU et al., 2018a).

The FT-IR spectrum also corroborates with coating results showing the characteristic bands from the block-copolymer, the Fe-O, and sulfur groups before and then using the magnet. Also, besides the clear visualization of IONP in the bottom of the microtube (data not shown), the superparamagnetism confirms the presence and magnetic characteristics of the IONP. The M_s reduction is expected due to the proportion between IONP and PDMAEMA-b-PMPC, which is aligned with another coating IONP studies (BAYKAL et al., 2012; PERECIN et al., 2022; SOOD et al., 2017). We observed a more significant M_s reduction in our results compared to the literature. This result could be explained by the balance between IONP and block-copolymer mols. However, more studies are necessary to understand the impact of different polymer coating processes on the magnetic properties of IONP. Furthermore, TGA results demonstrated transitional behavior for IONPP^{magnet+}, confirming the stability of encapsulation. Our TEM results demonstrated IONPs coated by block-copolymer PDMAEMA-b-PMPC with an average size lower than IONPP hydrodynamic size. Therefore, it indicates some aggregation in the water solution of the IONPPs, which is also observed in other polymeric coating processes by PMPC polymer (PERECIN et al., 2022).

Aptamers have been used in biomedical applications in the last few years, including for disease diagnosis. Here, we used aptamer to demonstrate one proof of concept to use the IONPP proposed by our group. First, we analyzed the binding capacity between the block-copolymer PDMAEMA-b-PMPC and HER2-5'FAM aptamer molecule. This binding occurs probably due to the interaction between aptamer phosphate and block-copolymer nitrogen. The PDMAEMA-b-PMPC_{10:1} exhibited a higher aptamer binding affinity, as evidenced by its lower EC₅₀ value, indicating a greater capacity for aptamer loading between the block copolymer synthesized. Due to this advantageous characteristic, this specific block copolymer was selected for further steps in the study. Therefore, our results indicated the potential binding of cationic polymer PDMAEMA concerning aptamer in a block-copolymer conformation. Cationic polymers have been used in the literature to bind to nucleic acid (PIOTROWSKI-DASPIK et al., 2020). Nevertheless, here we also calculated the EC₅₀ for each polymer synthesized, including the block-copolymer, making it possible to understand the impact of the cationic polymer. Also, further studies can focus on the employed polymers' nucleic acid - carrying capacity to study the polymeric nanostructures' transfection capacity.

The IONPPP demonstrated a greater z-average size concerning IONPP with good PdI and a slower surface charge. Moreover, we observed a clear band after using SDS to release the aptamer in agarose gel. These results emphasize the functionalization between IONPP and aptamers (IONPPP). In addition, our results applying magnet demonstrated that functionalization remains by visualization of a band in agarose gel. This way, our study shows, for the first time, the capacity of the coating and aptamer functionalized on IONP both by the electrostatic interaction.

Finally, we conducted a biological proof of concept to evaluate the binding capacity of IONPPP for aptamers, specifically targeting the HER2 protein in SKBR3 and MDA-MB-231 cells. Our results consistently demonstrated a higher number of positive cells for SKBR3 compared to MDA-MB-231, indicating the superior sensitivity achieved with the use of IONPPP. However, we observed a reduction in the efficiency of IONPPP after performing a pull-down with a magnet, in contrast to IONPPP without a magnet or the block-copolymer-aptamer complex. This decrease in efficiency could be attributed to the internalization capability of the HER2 aptamer used in this proof of concept (WANG et al., 2015a). Additionally, the FAM molecule, which emits fluorescence, exhibits lower intensity in acidic pH conditions (SCHNEIDER et al., 2010). As a result, it is possible that the IONPPP was internalized by SKBR3 cells and lost its fluorescence, potentially leading to an underestimation of our results since the cells were not fixed during the assay. Moreover, after incubation with the magnet, we carefully removed all supernatant, leaving only the cell pellet captured by the magnet. We hypothesize that the binding between IONPPP and cells might not be stable, which explains the high number of negatively fluorescent cells observed when analyzing only the cells pulled by the magnet. These two hypotheses offer plausible explanations for our study's lack of observed enrichment.

Conclusion

We present a new nanostructure called the IONPPP, a hybrid nanoparticle with an iron oxide core coated by a block-copolymer PDMAEMA-b-PMPC. Our results showed a hybrid nanoparticle with attractive chemical-physical properties for biomedical applications, such as the identification and isolation of cells by aptamers based on the presence of surface proteins.

Declaration of Competing Interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge financial support from the Brazilian agency Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and São Paulo Research Foundation (FAPESP) for the awards #19/24563-0 (ASJJ), and #19/16351-3 (SMG). The LNNano to microscopy, XRD analysis of nanoparticles, and the LQS at LNBio all help with polymer synthesis. Also, we thank LNBio and Bionanomanufacturing Center for access to core facilities and financial support. We would like to thank the Fundação de Apoio ao Instituto de Pesquisas Tecnologicas (FIPT) for support from the Young Talent program.

Supplementary information

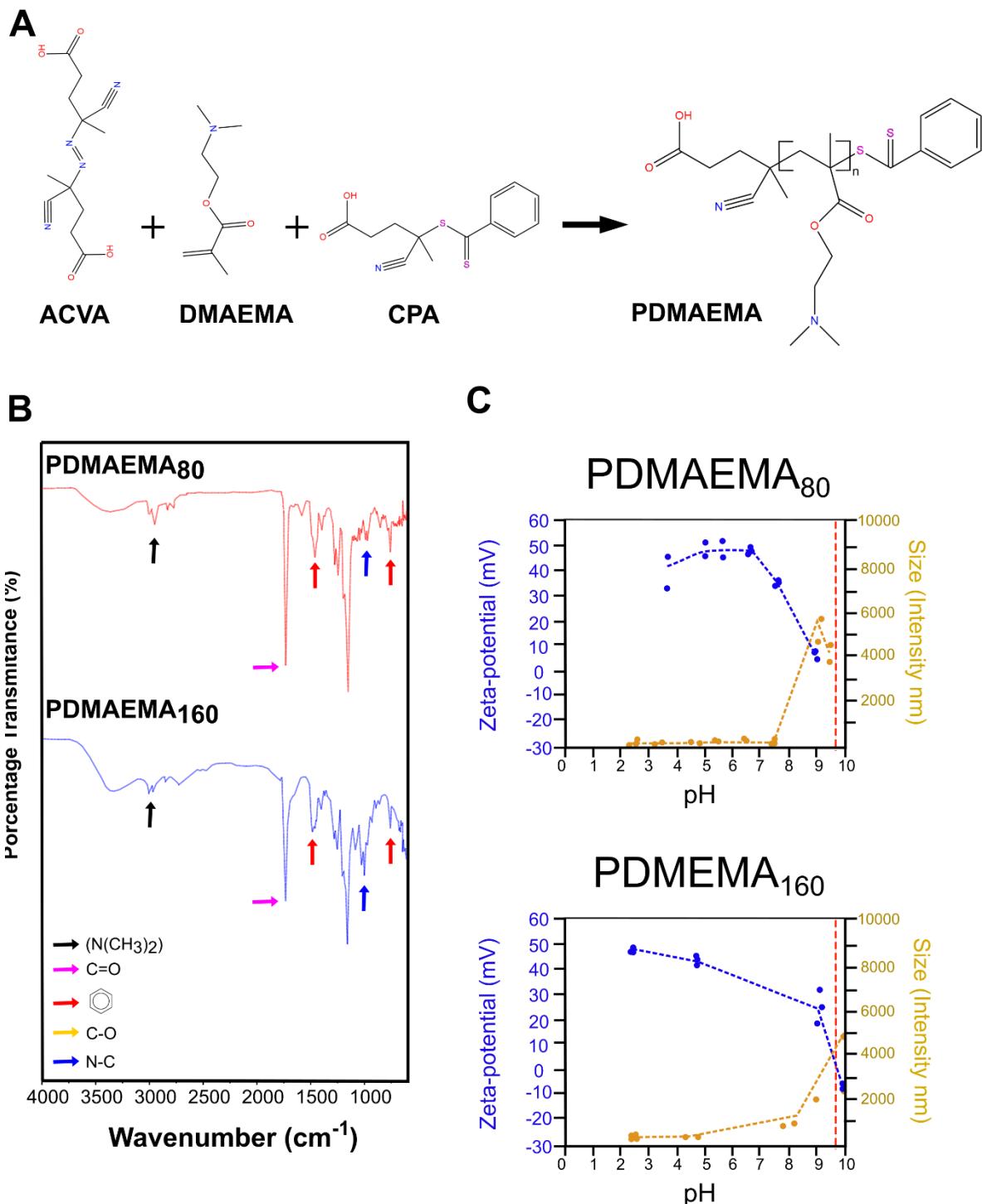


Figure Supplementary 1. Polymer characterization. A) Scheme representation of experimental approach synthesis of the hydrophilic cationic PDMAEMA; B) FT-IR (Fourier-transformation infrared spectroscopy) spectrum PDMAEMA results; C) z-average size and ζ -Potential of PDMAEMAs in different pHs by DLS (dynamic light scattering).

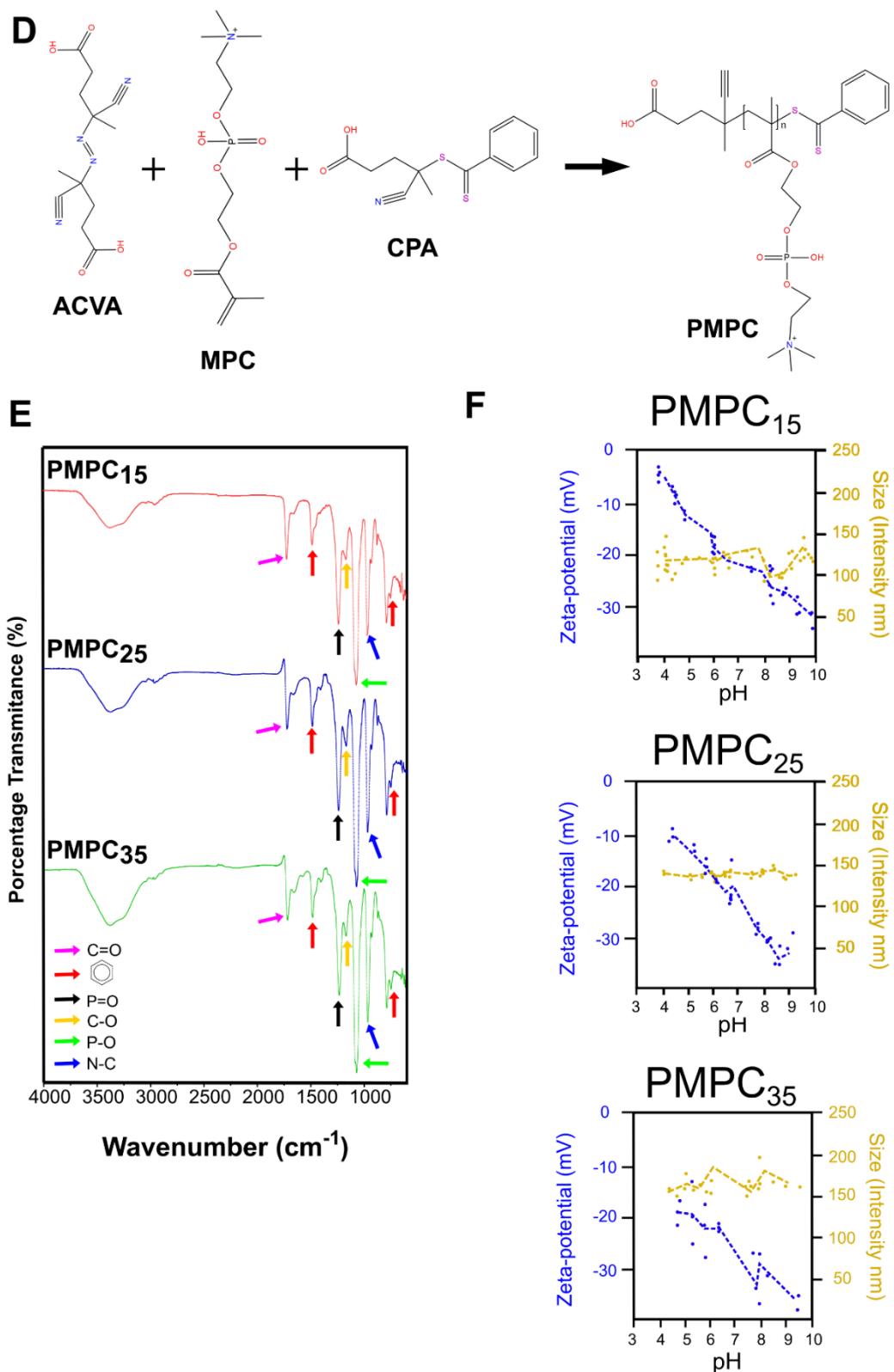


Figure Supplementary 1. Polymer characterization. **D)** Scheme representation of experimental approach synthesis of the zwitterionic polymer PMPC; **E)** FT-IR (Fourier-transformation infrared spectroscopy) spectrum PMPC results; **F)** z-average size and ζ -Potential of PMPCs in different pHs by DLS (dynamic light scattering).

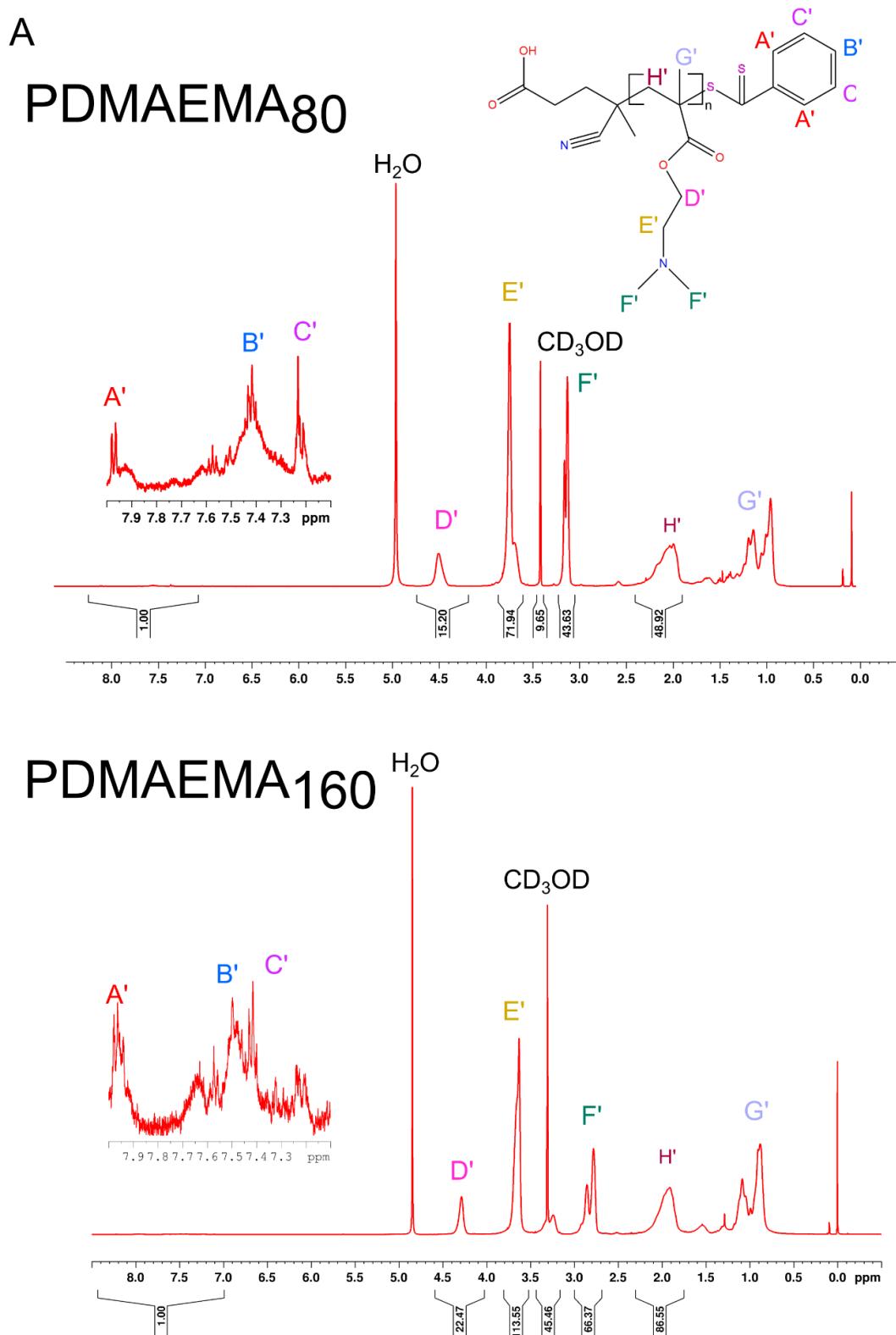
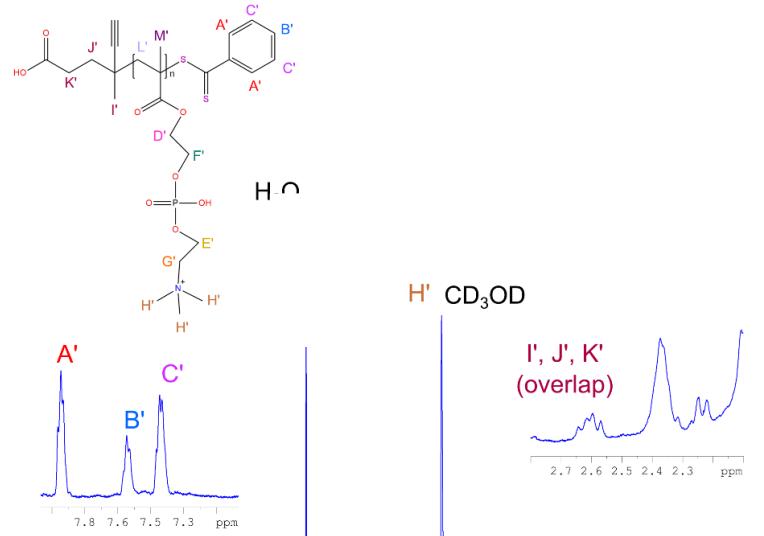
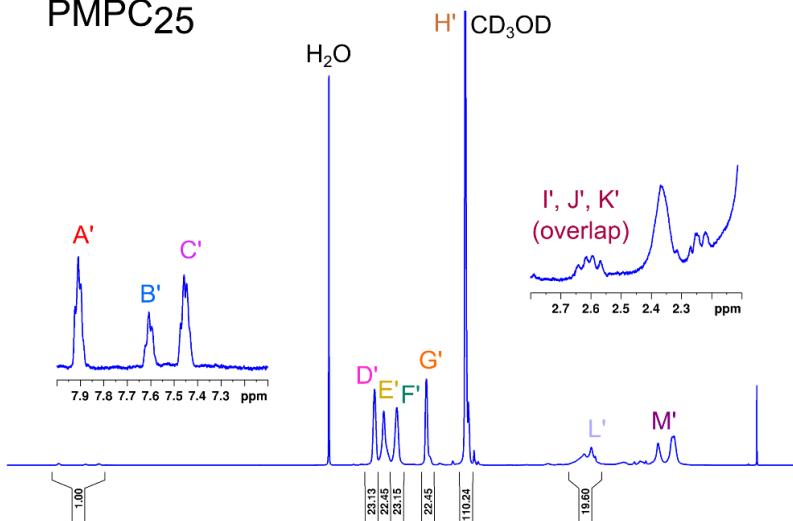


Figure Supplementary 2. ¹H NMR spectra results. A) ¹H NMR spectra results for PDMAEMAs,

B PMPC15



PMPC25



PMPC35

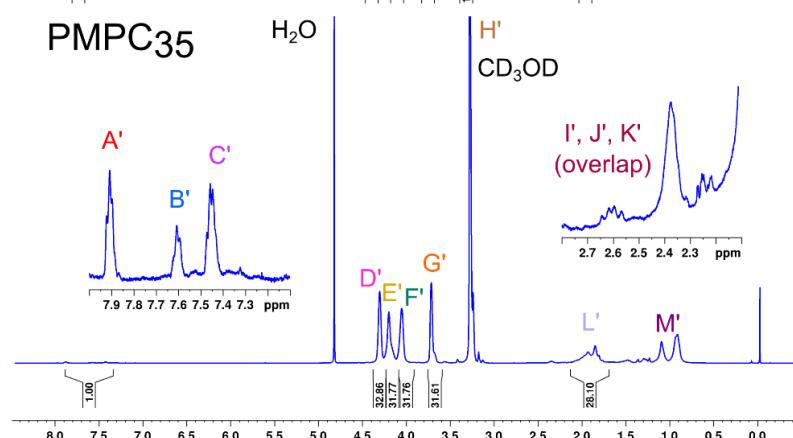


Figure Supplementary 2. ¹H NMR spectra results. B) ¹H NMR spectra results for PMPCs,

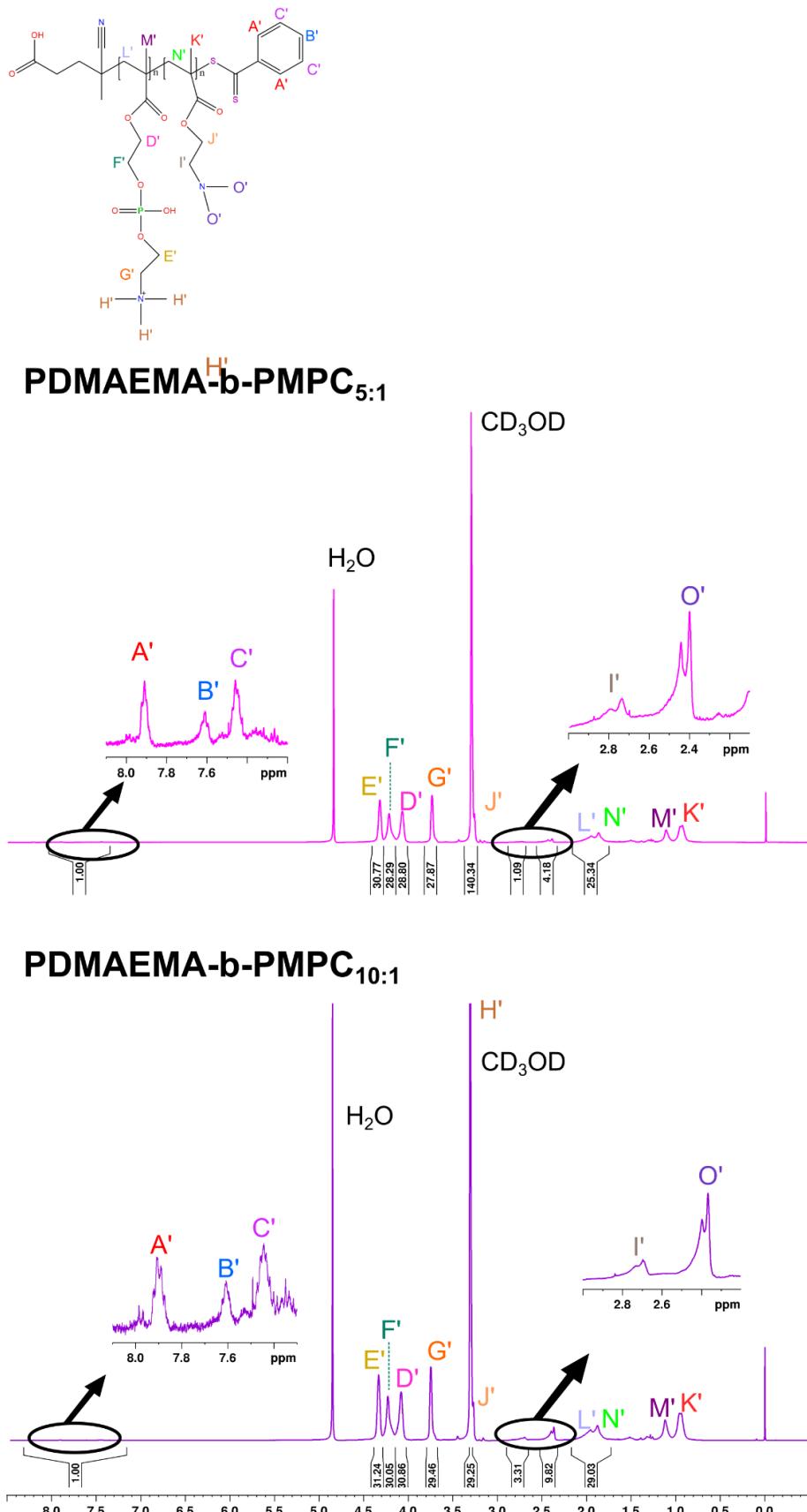


Figure Supplementary 2. ¹H NMR spectra results. C) ¹H NMR spectra results for block-copolymers PDMAEMA-b-PMPCs.

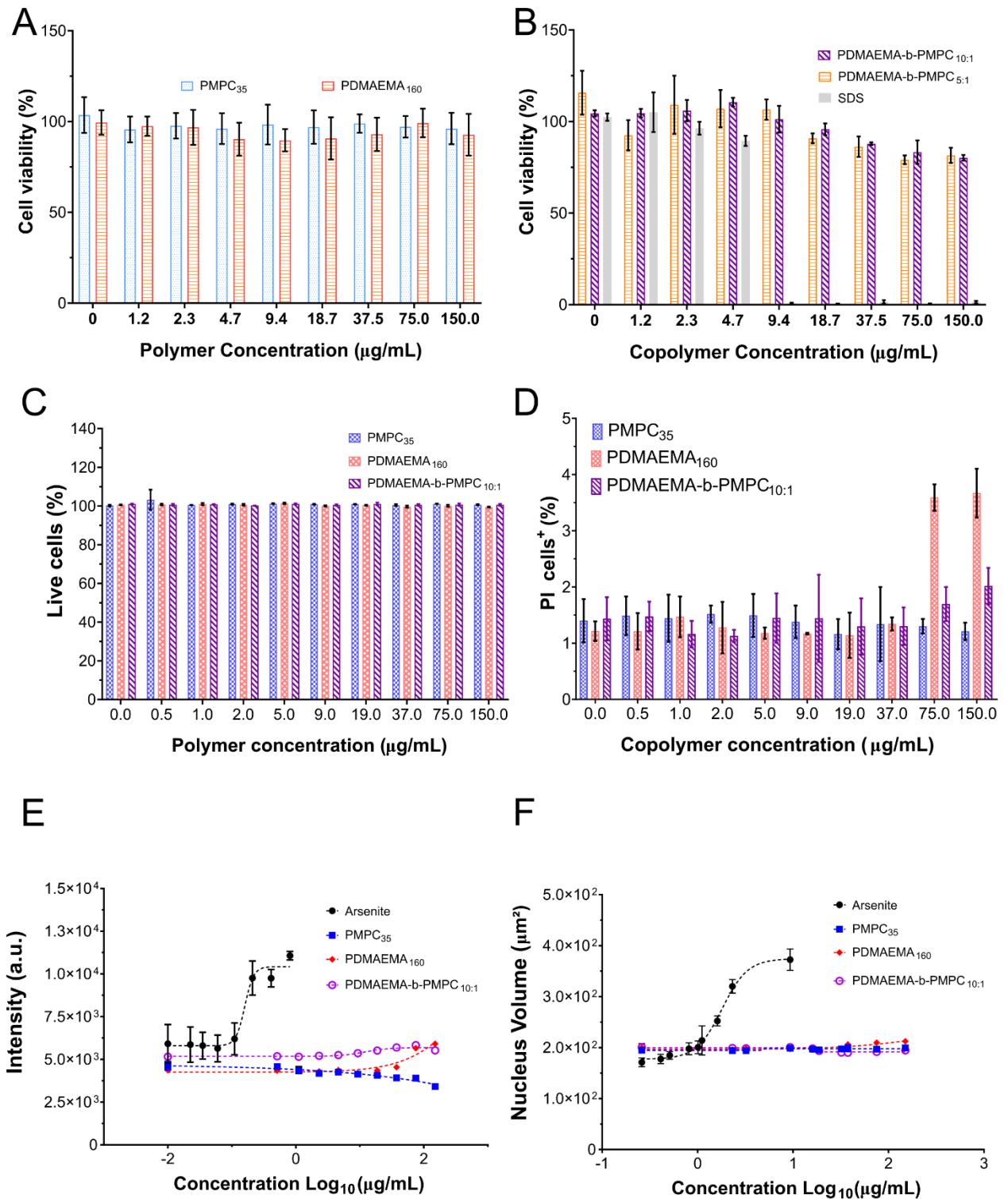


Figure Supplementary 3. Cytotoxicity panel. The MTT assay for **A**) PDMAEMA and PMPC polymer and **B**) block-copolymers PDMAEMA-b-PMPC, **C**) the percentage of live cells, and **D**) PI% relative cell staining in HaCaT cells incubated with polymers (PDMAEMA and PMPC) and block-copolymer (PDMAEMA-b-PMPC_{10:1}); **E**) mitochondria weight and **F**) nucleus volume of HaCaT cells incubated with polymers (PDMAEMA and PMPC) and block-copolymer (PDMAEMA-b-PMPC_{10:1}) in comparison with death molecule control (arsenite).

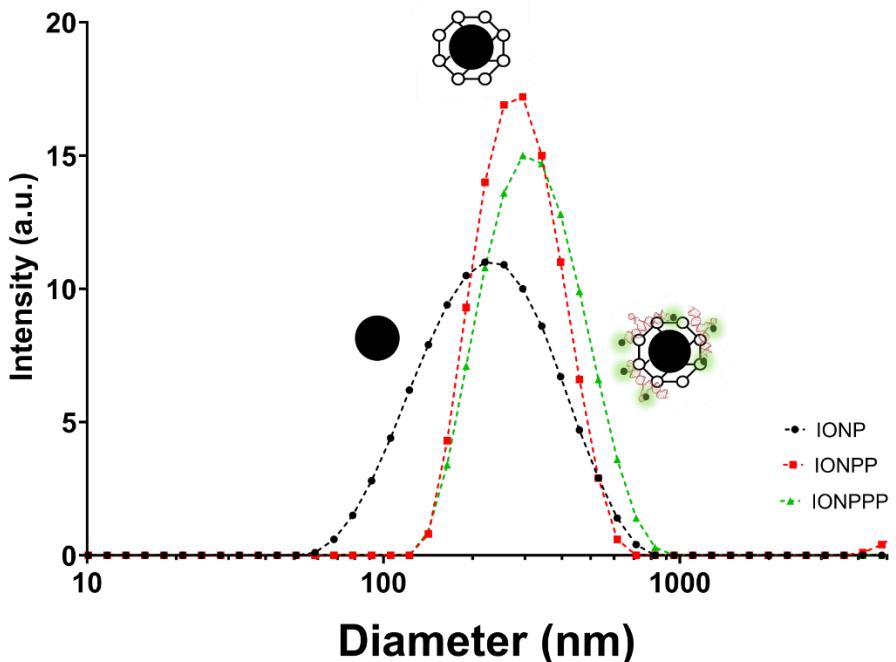
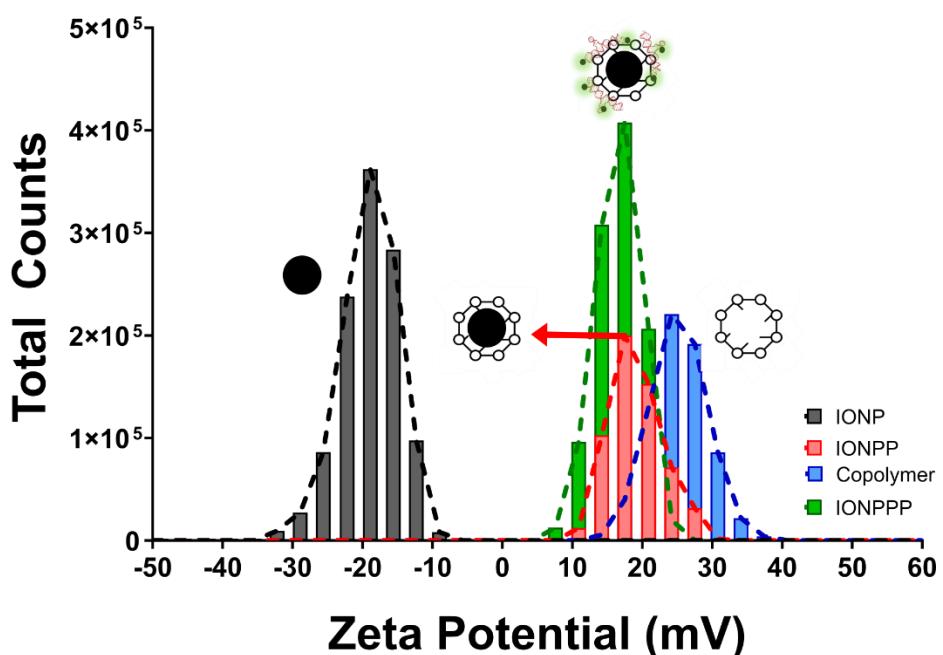
A**B**

Figure Supplementary 4. IONPPP characterization. A) z-average size reported by the intensity of IONP, IONPP, block-copolymer (PDMAEMA-b-PMPC), and IONPP by DLS, and B) ζ -Potential of IONP, IONPP, block-copolymer (PDMAEMA-b-PMPC), and IONPP by DLS (dynamic light scattering).

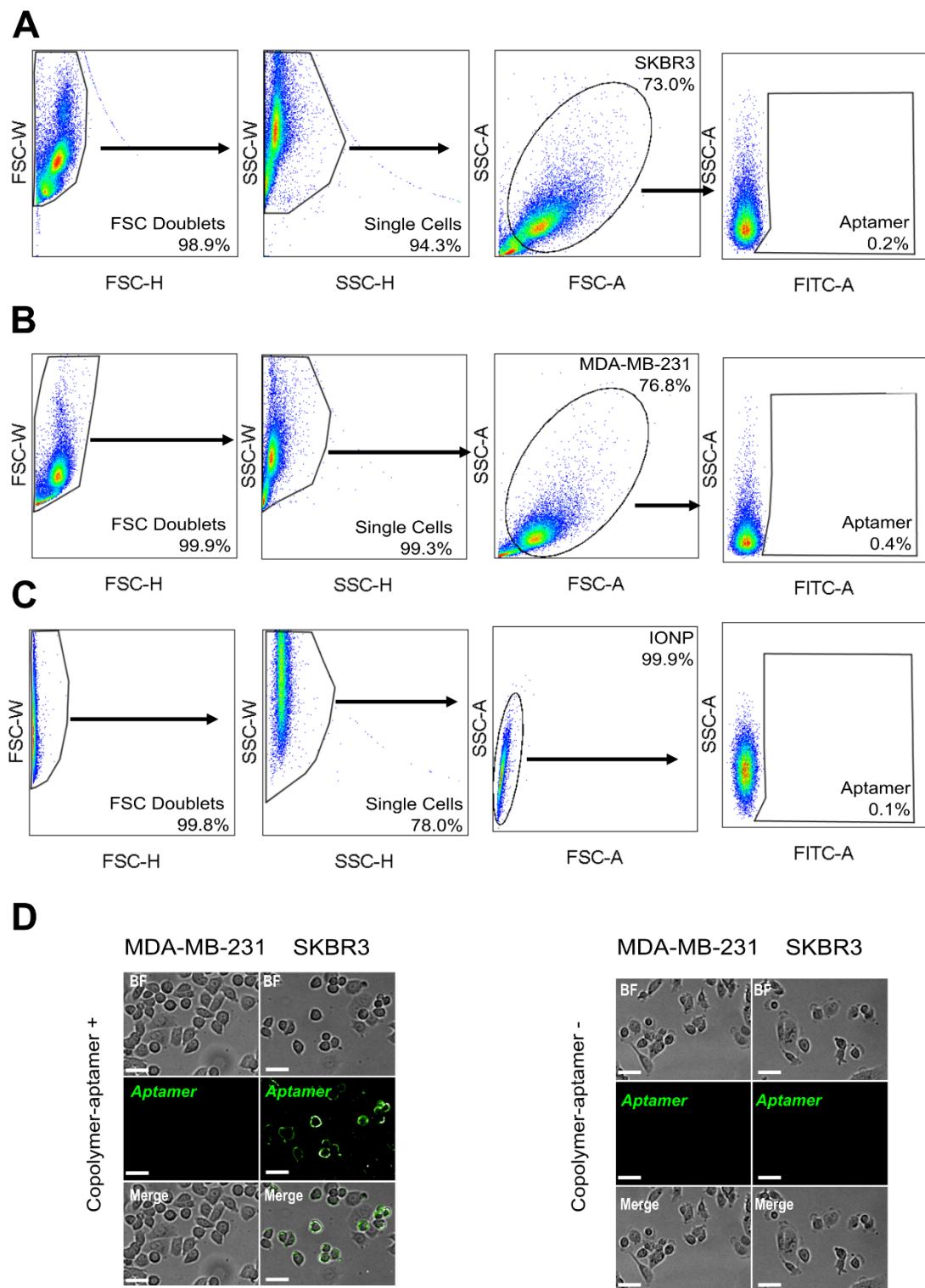


Figure Supplementary 5. Gate strategy and microscopy analysis. Flow cytometry results related to gate strategy for **A)** SKBR3 and **B)** MDA-MB-231 tumor cells; **C)** IONP profile results in flow cytometry; **D)** fluorescence microscopic images of the PDMMA-b-PMPC – aptamer complex incubated in HER2 cell^{+/+}.

3.2. Capítulo II: Estudo de Modelos Tridimensionais de Cultura de Células de Glioblastoma e Co-Cultura com Células Endoteliais Microvasculares Cerebrais

Revisão bibliográfica

Glioblastoma multiforme

Os tumores cerebrais, juntamente com outras neoplasias do sistema nervoso central (SNC), destacam-se pela elevada taxa de mortalidade em relação à sua frequência, quando comparados a outros tipos de câncer (BRAY et al., 2018).

Entre os tumores do SNC, os gliomas são os mais comuns, representando cerca de 80% de todos os tumores malignos primários nessa região anatômica (CHEN et al., 2017). Os gliomas podem ser classificados com base na semelhança das células tumorais com os diferentes tipos de células da glia, incluindo astrocitomas, oligodendrogliomas, oligoastrocitomas e glioblastoma multiforme (GBM), também conhecido como glioblastoma ou GB (CHEN et al., 2017; LOUIS et al., 2016).

O GB é, portanto, um subtipo de glioma que se destaca pela sua alta taxa (54%) entre todos os gliomas, com uma incidência de aproximadamente 3,19 casos a cada 100.000 pessoas (DA HORA et al., 2019; MARENCO-HILLEMBRAND et al., 2020). Classificado como grau IV, o GB apresenta um rápido crescimento e disseminação nos tecidos adjacentes (OSTROM et al., 2020). Trata-se do tumor cerebral maligno primário mais frequente e letal, com um prognóstico médio de apenas 14 a 15 meses após o diagnóstico (LOZADA-DELGADO; GRAFALS-RUIZ; VIVAS-MEJÍA, 2017; MARENCO-HILLEMBRAND et al., 2020; WICK; KESSLER, 2018). Além disso, as taxas de sobrevida são extremamente baixas, com números de apenas 33% dos pacientes após um ano e somente 5% alcançam os cinco anos de sobrevida (BURT NABORS et al., 2013; OSTROM et al., 2015).

O tratamento de primeira linha para o GB consiste na cirurgia para a remoção do tumor, seguida de radioterapia (RT) e quimioterapia, geralmente utilizando o fármaco alquilante Temozolomida (TMZ) (LOZADA-DELGADO; GRAFALS-RUIZ; VIVAS-MEJÍA, 2017). Apesar dos avanços na área da oncologia, o GB continua apresentando desafios

significativos para um tratamento eficaz, o que resulta em um prognóstico desfavorável (ADAMSON et al., 2009; ALEXANDER; CLOUGHESY, 2017). Além dos fatores biológicos como a heterogeneidade das células tumorais, alta capacidade de infiltração, recorrência e angiogênese patológica, outros obstáculos têm dificultado os avanços tecnológicos no tratamento dessa doença. Um desses obstáculos refere-se à dificuldade de entrega de medicamentos às células tumorais cerebrais, principalmente devido à barreira hematoencefálica (BHE) (AIGNER; KÖGEL, 2018; ALEXANDER; CLOUGHESY, 2017; LOZADA-DELGADO; GRAFALS-RUIZ; VIVAS-MEJÍA, 2017). A BHE atua como uma barreira anatômica e fisiológica, regulando a entrada de moléculas no cérebro e limitando mais de 98% do potencial terapêutico disponível atualmente no mercado (KUMAR et al., 2007). Ademais o número de estudos pré-clínicos e ensaios clínicos que acabam não avançando por conta desta estrutura vem sendo registrado há anos (HELMS et al., 2022). Portanto, é evidente que a entrega de medicamentos aos pacientes com GB através da BHE representa um dos maiores desafios no tratamento dessa neoplasia cerebral (ALEXANDER; CLOUGHESY, 2017).

Desta forma, o GB continua sendo infelizmente uma doença com uma alta taxa de mortalidade e poucos avanços em novas terapias nas últimas décadas (BIKFALVI et al., 2023). Diante disso, torna-se imperativo investir em novas tecnologias e estudos que possam contribuir para a compreensão da doença, desde a reprodução da estrutura tumoral até abordagens que busquem melhorar o diagnóstico e o tratamento.

O enfoque desta tese em entender a epidemiologia de GB tanto em relação aos seus dados analíticos como descritivos, resultou em uma revisão bibliográfica (DOI: 10.31219/osf.io/89c3r), a qual está contida no Anexo III deste capítulo. Até a escrita desta tese o mesmo artigo encontra-se em revisão na revista *Cancer epidemiology* (Anexo IV).

Devido ao grande gargalo de novas tecnologias, uma das áreas de investimento nos últimos anos são pesquisas que têm se concentrado no desenvolvimento de modelos para estudos relacionados ao GB, assim como na superação dos desafios da entrega de medicamentos através da BHE (BAGCHI et al., 2019; PAOLILLO; COMINCINI; SCHINELLI, 2021; WANIGASEKARA et al., 2023).

*Modelos de estudo de GB *in vitro**

A reprodução da intricada composição celular do GB e sua distribuição espacial em modelos de estudo apresentam um desafio significativo na área. Nos últimos anos, ocorreram avanços consideráveis na simulação desse ambiente *in vitro*, no entanto, ainda existem obstáculos a serem superados (BOCELLATO; REHM, 2022; WANIGASEKARA et al.,

2023). O GB, assim como outros tipos de câncer, possui uma estrutura tridimensional multifacetada, composta por diversas células, como células endoteliais, células do sistema imunológico e fibroblastos associados às células cancerosas, formando um microambiente tumoral (TME do inglês *tumor microenvironment*) complexo e dinâmico (BIKFALVI et al., 2023). Embora a composição específica varie de um tumor para outro, além das células já citadas, o TME também inclui componentes como matriz extracelular, fatores de crescimento, citocinas e outras células do SNC, como astrócitos, neurônios e pericitos (KIM; JEON; OTHMER, 2017; MANINI et al., 2018). Diante desse cenário, surge a urgente necessidade de modelos que possam adequadamente representar esse tumor, impulsionando estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Os modelos convencionais em duas dimensões (2D) falham em refletir essa complexidade, começando pela própria estrutura e formato do tumor (IMAMURA et al., 2015). Além disso, esses modelos não capturam as interações entre as células nem entre as células e a matriz extracelular (IMAMURA et al., 2015). Também não conseguem reproduzir o gradiente de nutrientes e oxigênio presente nos tumores, o que afeta diversos estudos, incluindo aqueles relacionados ao metabolismo tumoral (IMAMURA et al., 2015). Adicionalmente, os modelos 2D apresentam taxas de proliferação celular e morfologias celulares diferentes daquelas observadas em tumores de pacientes (LV et al., 2017; SHIN et al., 2013; YAMADA; CUKIERMAN, 2007). Estudos recentes também demonstraram diferenças no perfil de expressão gênica entre culturas 2D e 3D (FONTOURA et al., 2020). Por todas essas razões, os modelos tridimensionais (3D) de culturas celulares têm se tornado o estado-da-arte em neuro-oncologia, inclusive para triagem em larga escala de novos fármacos com massivos investimentos da indústria farmacêutica (AKAY et al., 2018; HUANG et al., 2011; KOO; VELEV, 2013).

Atualmente, existem diversos modelos de cultura celular 3D *in vitro*, cada um com suas vantagens e desvantagens. Alguns exemplos dessas representações incluem organoides derivados de tumores, esferoides multicelulares organotípicos, esferoides multicelulares com linhagens celulares comerciais e esferoides multicelulares originados de tumores (AZZARELLI, 2020; ISHIGURO et al., 2017). Esferoides são, portanto, um dos modelos tridimensionais de cultura de células. Estruturalmente, os esferoides se assemelham a esferas contendo uma ou mais linhagens celulares, podendo ser obtidos comercialmente (esferoides multicelulares) ou diretamente de tumores (esferoides multicelulares derivados de tumores). Sua formação pode ser realizada por meio de diferentes metodologias, como a técnica de *hanging droplet* (ANANTHANARAYANAN; KIM; KUMAR, 2011; HEFFERNAN et al.,

2015; PEDRON; BECKA; HARLEY, 2015, 2013; WANG; TONG; YANG, 2014), sobreposição líquida ou *liquid-overlay technique* (DILNAWAZ; SAHOO, 2013; FEHLAUER et al., 2007), placas de cultura de células tratadas com polímeros ou placas *round bottom*, ou até mesmo utilizando-se de *beads* magnéticos (AABERG-JESSEN et al., 2013; AHMED et al., 2018; DAUTZENBERG et al., 2014; GÜNTHER et al., 2003; MUSAH-EROJE; WATSON, 2019; VINCI et al., 2012).

Além disso, é possível incorporar matrizes de hidrogéis ou matrizel nesses modelos mencionados, utilizando polímeros específicos que facilitem a simulação da estrutura complexa tumoral e seu microambiente (BENTON et al., 2014; MONTEIRO et al., 2020). Por fim, uma ferramenta emergente que tem sido utilizada para auxiliar na mimetização de gliomas são os "brain-on-a-chips" (KARZBRUN et al., 2018; SERVICE, 2014; SONTHEIMER-PHELPS; HASSELL; INGBER, 2019; YI et al., 2019) . Esses microdispositivos têm como objetivo não apenas imitar aspectos biológicos do tumor, mas também reproduzir características físicas do microambiente tumoral, como tensão de cisalhamento e fluxo contínuo de uma solução (AKAY et al., 2018; SONTHEIMER-PHELPS; HASSELL; INGBER, 2019). Todos esses possíveis modelos que visam auxiliar na mimetização do tumor e seu ambiente são resumidos na Figura 1.

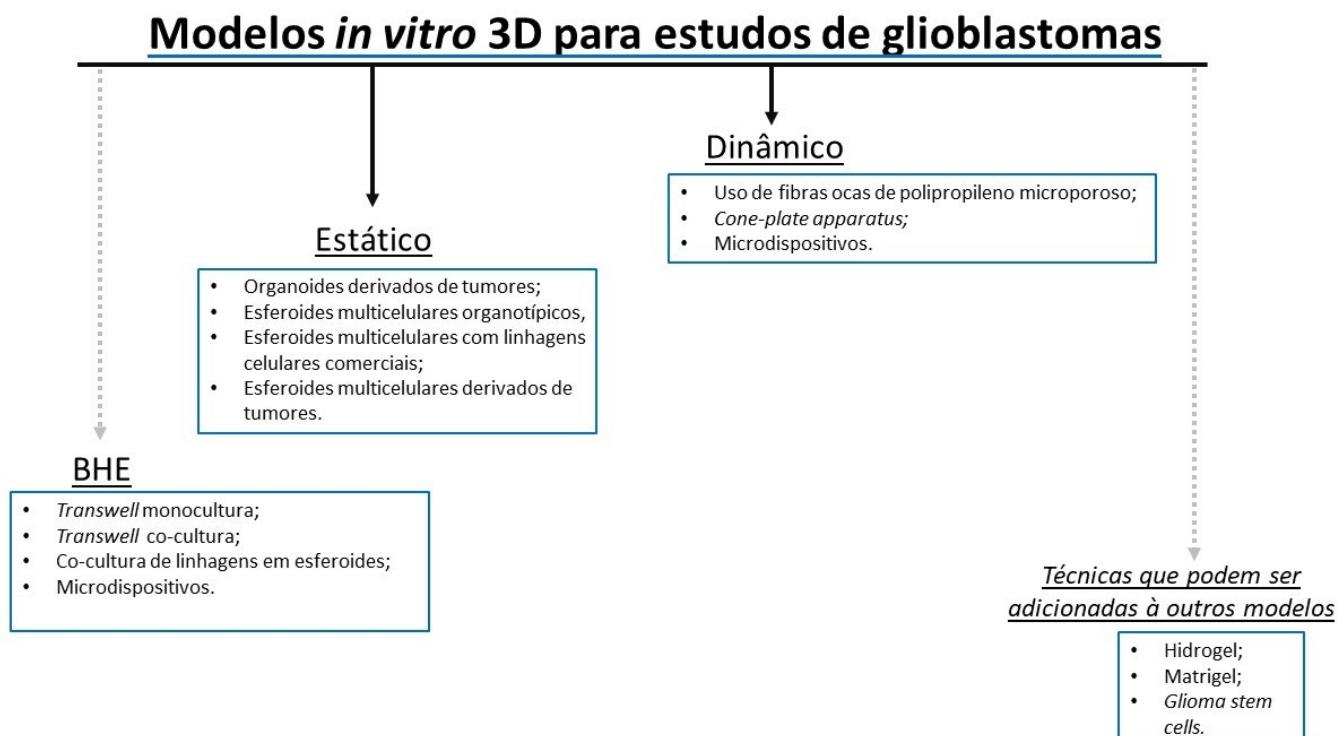


Figura 1. Atuais modelos de estudo de glioblastomas 3D e BHE *in vitro*. BHE: Barreira hematoencefálica, 3D: tridimensional.

Dessa forma, fica evidente o número de possibilidades para estudos *in vitro* 3D e suas vantagens em relação aos modelos tradicionais 2D. Entretanto, ainda há o gargalo de uma melhor e mais ampla compreensão de tais modelos, para que possam ser cada vez mais fidedignos e correlacionados com ensaios *in vivo* e clínico, resultando, desta forma, na necessidade de estudos que se concentrem em compreender as diferenças entre modelos 2D e 3D, bem como ampliando essa complexidade por meio da inclusão de diferentes tipos de células.

Objetivo

O objetivo deste capítulo foi compreender as diferenças morfológicas e biológicas entre duas linhagens de GB em cultura 3D e avaliar o impacto da co-cultura com células endoteliais microvasculares cerebrais. Para atingir esses objetivos, foram estabelecidos os seguintes *objetivos específicos*:

- 1- Investigar o comportamento temporal do tamanho e morfologia dos esferoides de GB;
- 2- Avaliar aspectos biológicos, como proliferação celular e hipóxia, em esferoides tumorais de GB;
- 3- Estudar a morfologia dos esferoides em co-cultura com células tumorais de GB e células endoteliais microvasculares cerebrais.

Metodologia

Cultura de Células

As linhagens de células tumorais U251-GM (ATCC HTB-17TM) e U87-GM (ATCC HTB-14TM), juntamente com endoteliais cerebrais (*human brain microvascular endothelial cells*, HBMEC), foram cultivadas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich) com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), sem a adição de antibiótico. Esse protocolo é amplamente utilizado em diversos artigos que empregam as mesmas linhagens (HADJIPANAYIS et al., 2010; KUANG et al., 2016; WANG et al., 2015b; WEI et al., 2016). Todas as células foram mantidas a 37°C em uma atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂.

Formação dos Esferoides Tumorais Monocultura

As placas de cultura de 96 poços foram revestidas com 21 µL de polihidroxietilmetacrilato (poli-HEMA, 12 mg/mL, Sigma-Aldrich) em cada poço. Após um período de 96 horas para secagem do polímero em estufa a 37°C, diferentes quantidades de células foram semeadas e analisadas para verificar a formação de esferoides tumorais. O

número de células por poço foi de $1,0 \times 10^3$; $5,0 \times 10^3$; $10,0 \times 10^3$; $15,0 \times 10^3$; $20,0 \times 10^3$; $25,0 \times 10^3$ e $50,0 \times 10^3$, todas cultivadas em DMEM suplementado com 10% de SFB conforme mencionado anteriormente. A formação dos esferoides foi avaliada inicialmente em intervalos de 24 horas por meio de microscopia de luz e corresponde ao modelo tumoral apresentado na Figura 2.A deste capítulo.

Ensaio Co-cultura de Esferoide Tumoral-HBMEC

Inicialmente, as linhagens celulares foram modificadas para expressar genes fluorescentes exógenos, a fim de facilitar a distinção entre as células tumorais e endoteliais durante a análise por microscopia de fluorescência. Para criar essas linhagens geneticamente modificadas, utilizamos os vetores pBABE-*eGFP* (plasmídeo *addgene* #10668) e pQC-*mKO2*, proveniente da construção *addgene* 110389. O vetor pBABE-*eGFP* foi responsável pela transdução da proteína *green fluorescent protein*, que emite fluorescência verde (excitação 488 nm e emissão 509 nm), enquanto o vetor pQC-*mKO2* codifica a proteína *monomeric Kusabira-Orange 2*, que apresenta fluorescência alaranjada (excitação 551 nm e emissão 565 nm).

As partículas virais foram sintetizadas seguindo o seguinte protocolo: 10^6 células da linhagem Heck 293t/17 (CRL-11268TM) foram plaqueadas em uma placa de 60 mm contendo 3 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB. No segundo dia, adicionamos as seguintes quantidades de plasmídeos em solução salina (NaCl 0.9% m/v, Sigma-Aldrich): 2,214 µg do plasmídeo do gene exógeno (*eGFP* ou *mKO-2*), 1,718 µg do plasmídeo UMVC (Addgene #8449) e 0,190 µg do plasmídeo PCMV-VSV-G (Addgene #8454), completando um volume total de 150 µL. O plasmídeo UMVC é responsável pela produção de partículas retrovirais, enquanto o plasmídeo CMV-VSV-G permite a transdução da proteína do envelope viral.

Em seguida, adicionamos 12 µL do polímero PEI (polietilenimina, 1 mg/mL, Sigma-Aldrich) à solução e incubamos por 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, adicionamos essa solução contendo o polímero e os plasmídeos às células Heck 293t/17. Mantivemos a solução em contato com as células por 6 horas. Após o período de incubação, substituímos o meio de cultura por DMEM suplementado com SFB sem antibiótico. Coletamos o sobrenadante a cada 24 horas, realizando a troca do meio de cultura por dois a três dias consecutivos. O sobrenadante foi armazenado a 4°C entre as coletas. Na última etapa da síntese, centrifugamos o material coletado a 970 x g por 5 minutos em uma centrífuga refrigerada a 4°C. Desta forma, obtivemos as partículas virais de retrovírus para transdução das células tumorais e endoteliais cerebrais.

Por fim, para a transdução das células, utilizamos o polímero *polybrene* (Sigma-Aldrich) na concentração final de 8 µg/mL por poço. Diariamente, as linhagens celulares foram observadas em um microscópio de fluorescência vertical (Leica DM6) para verificar a efetividade da transdução. Após 24 horas de transdução, o antibiótico puromicina na concentração de 1 µg/mL (Life Technologies) foi utilizado como agente de seleção devido à construção dos vetores pBABE-*eGFP* e pQC-*mKO2*. As linhas tumorais transduzidas foram denominadas U87-*eGFP* e U251-*eGFP*, enquanto a linhagem endotelial foi denominada neste trabalho de HBMEC-*mKO2*.

Após essa etapa inicial na construção das linhagens de interesse, foram empregadas duas metodologias distintas para o estudo do modelo de co-cultura. A primeira metodologia envolveu a síntese prévia dos esferoides tumorais, seguida pela adição de diferentes proporções de HBMECs e linhagens tumorais no mesmo poço, nas proporções de U87-GM : HBMEC 1:1, 2:1, 1:2, 9:1 e 1:9 (Fig. 2B). A segunda abordagem consistiu no cultivo simultâneo das linhagens tumorais e não tumorais (Fig. 2C). Para garantir a co-cultura no modelo representado na figura 2C, a placa foi submetida a uma centrifugação a 240 x g por 3 minutos e a adição das HBMECs ocorreu 48 horas após a semeadura das células tumorais. Em ambos os casos, a co-cultura foi acompanhada visualmente por microscopia óptica e fluorescência, com verificações realizadas a cada 24 horas para avaliar a formação dos esferoides. Ambos os modelos de co-cultura foram mantidos em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por três dias antes do processo de fixação, criocorte e montagem das lâminas para análise por microscopia de fluorescência. Além disso, o número total de células utilizado em cada poço foi sempre de 20,0 x 10³ células e os esferoides foram mantidos em DMEM com 10% de suplementação com SFB. Aquisição das imagens dos esferoides antes da fixação foi realizada utilizando o equipamento de microscopia de fluorescência Operetta High-Content Imaging System (Perkin-Elmer), e a análise das imagens foram realizadas pelo software Columbus Image Data Storage e Analysis System (Perkin-Elmer). Já a construção 3D dos esferoides em co-cultura foi realizada após adicionar os esferoides em lâmina côncava com PBS, para aquisição de imagens em microscopia confocal *Leica TCS SP8 X®* (*Leica*) e, por fim, análise no software *Las X®* (*Leica*).

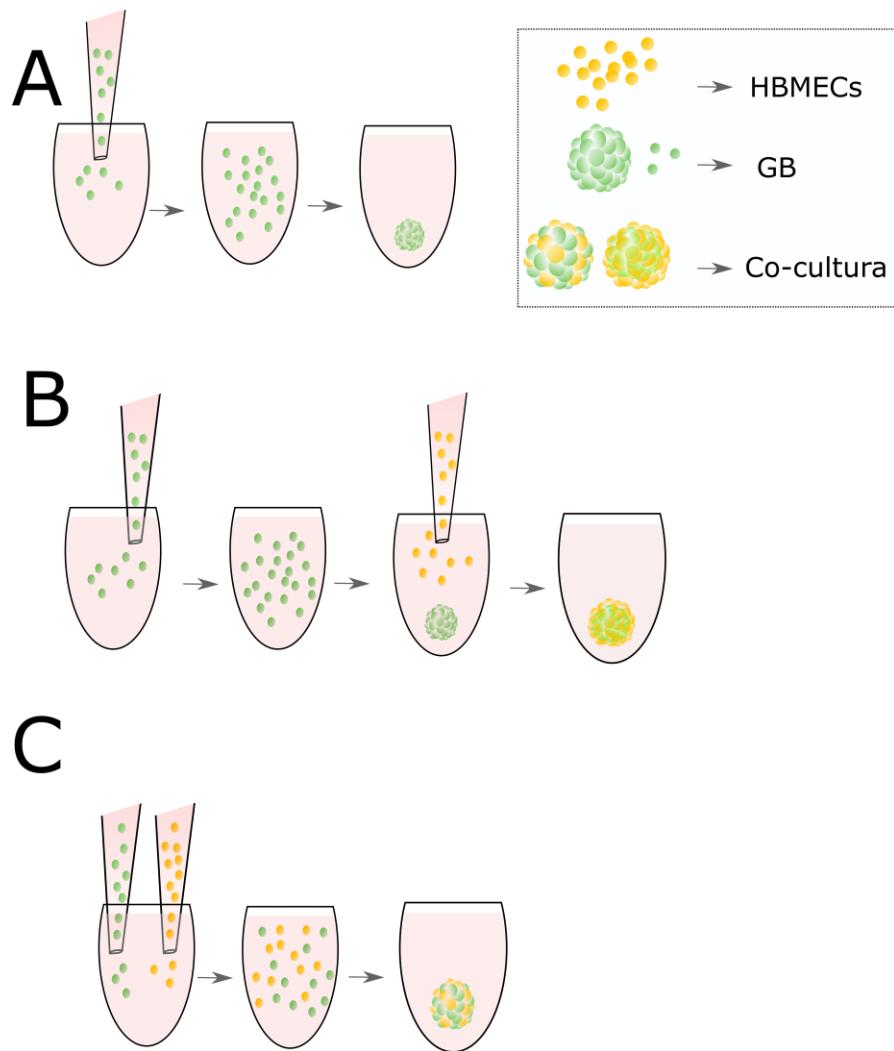


Figura 2. Modelos de estudo. A. Formação dos esferoides em monocultura, utilizando apenas células tumorais, semeadas em placas de cultura tratadas com poli-HEMA; B. Formação dos esferoides em co-cultura, com adição inicial das células tumorais de GB e posteriormente das células endoteliais microvasculares cerebrais, em placas de cultura tratadas com poli-HEMA; C. Formação dos esferoides em co-cultura, com adição das células tumorais de GB e endoteliais microvasculares cerebrais no mesmo dia, em placas de cultura tratadas com poli-HEMA. GB: glioblastoma, HBMEC: *human brain microvascular endothelial cells*, poli-HEMA: Poli-hidroxietilmetacrilato.

Fixação e crioporte

Além dos ensaios mencionados anteriormente, foram conduzidas outras análises para a caracterização biológica dos esferoides em monocultura e co-cultura. Para isso, os esferoides foram fixados em paraformaldeído (PFA, 4% v/v, Sigma-Aldrich) por 30 minutos e submetidos a três lavagens com 1 mL de PBS (solução tampão fosfato salino, do inglês *Phosphate-Buffered Saline*, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄) com duração de 15 minutos cada lavagem. Em seguida, os esferoides foram colocados em um suporte de acrílico e tratados com o reagente TissueTeck (Start Biosciences). O suporte foi posicionado sobre nitrogênio líquido para congelar os esferoides, e os blocos contendo os

esferoides criopreservados foram mantidos a -80°C até o momento do corte em criostato (Leica CM1950). Os cortes foram realizados a temperaturas entre -23°C e -15°C, resultando em seções de 5-8 µm, que foram colocadas em lâminas previamente tratadas com HistoGrip (Sigma-Aldrich) para garantir uma boa adesão do material. Para a marcação nuclear adicional nos cortes congelados, foi utilizado o corante 4', 6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich) em uma concentração de 0,25 ng/µL em PBS, por um período de 5 minutos à temperatura ambiente. Após a lavagem com PBS, as lâminas foram analisadas utilizando um microscópio de fluorescência confocal Leica TCS SP8 X® (Leica) e, por fim, as imagens foram analisadas pelo software Las X® (Leica).

Caracterização dos esferoides tumorais

Área e circularidade: Para uma avaliação mais precisa do tamanho e formato dos esferoides, realizamos a fixação dessas estruturas com 50 µL de PFA (4% v/v) por um período de 30 minutos, seguida pela marcação com 100 µL de DAPI (0,25 ng/µL) durante 120 minutos. Utilizamos o sistema de imagem de alto conteúdo Operetta (Perkin-Elmer) para capturar imagens dos esferoides, enquanto o software Columbus Image Data Storage and Analysis System (Perkin-Elmer) foi empregado para a análise dos dados, incluindo a determinação da área e da circularidade dos esferoides.

Hipóxia: No caso da verificação da expressão do fator induzível por hipóxia (HIF), a linhagem U87-GM foi transduzida com um lentivírus contendo a proteína repórter *GFP* acoplada a proteína HIF. O plasmídeo utilizado foi o HypoxCR (Addgene #59946). Após a seleção com puromicina por duas semanas na concentração 1 µg/mL, utilizamos a nova linhagem (U87-HypoxCR) para a formação de esferoides contendo 20 mil células. Após 5 dias, verificamos a presença de *GFP* por meio de microscopia de fluorescência.

Proliferação celular: Para a análise de proliferação celular por meio de imunofluorescência (IF), foram realizados os seguintes procedimentos: após a fixação e criocorte dos esferoides conforme mencionado anteriormente, as lâminas foram tratadas com PBS por 30 minutos para remover o excesso de TissueTeck. Em seguida, foi adicionada uma solução de permeabilização (0,3 mM Triton X-100 em PBS) por 30 minutos, seguida pela solução de bloqueio Image-iT FX (Thermofisher) por 30 minutos. O anticorpo primário Ki67 (15580, Abcam) foi adicionado e incubado por 4 horas, com uma diluição de 1:300 em solução de tampão de trabalho (SFB 10% m/v, Tween-20 0,1% v/v e azida sódica 0,02% m/v em PBS). Em seguida, realizamos a incubação com anticorpo secundário de cabra anti-coelho Alexa Fluor 633 (1:500, Invitrogen) por duas horas à temperatura ambiente e protegidos da luz também em

solução de trabalhado. Em seguida, lavamos com PBS a lâmina e realizamos a contramarcação com DAPI (0,25 ng/µL). Os dados foram adquiridos utilizando um microscópio de fluorescência confocal Leica TCS SP8 X® (Leica) e, por fim, foram analisados pelo software Las X® (Leica).

Avaliação morfológica por Hematoxilina/Eosina: Após o congelamento e fixação, os esferoides foram submetidos à coloração com hematoxilina e eosina seguindo o protocolo estabelecido pelo grupo (TAVARES et al., 2020), com hematoxilina de Harris (Laborclin, Brasil) e solução de eosina a 2% (InLab, Brasil). As lâminas foram montadas com Fluoromount, e as imagens foram obtidas utilizando o equipamento Leica DM6 Fs.

Resultados e discussão

Comportamento temporal do tamanho e morfologia de esferoides de GB

Para compreender o modelo 3D tumoral aqui proposto, o primeiro passo foi a formação de esferoides de diferentes tamanhos a partir de concentrações iniciais variadas de células tumorais semeadas. Observamos que os esferoides apresentam um aumento em sua área à medida que aumentamos o número de células/esferoide semeado (Figura 3A). A literatura também relata diferenças no tamanho do esferoide de acordo com o número de células semeadas em trabalhos anteriores envolvendo U87-GM e U251-GM (FAN et al., 2015; MIRAB; KANG; MAJD, 2019; NAPOLITANO et al., 2007).

Em seguida, investigamos a influência do tempo no tamanho dos esferoides, após observarmos uma redução no tamanho do esferoide U251-GM em relação aos esferoides U87-GM, quando contramarcados com DAPI, após 15 dias da realização dos esferoides (Figura 3B). Notamos que os esferoides U87-GM, semeados inicialmente com $1,0 \times 10^3$ e $5,0 \times 10^3$ células, aumentaram de tamanho ao longo dos dias, enquanto os esferoides com $10,0 \times 10^3$ e $20,0 \times 10^3$ células apresentaram um crescimento leve após o 5º dia (Figura 3C). Por fim, os esferoides com $50,0 \times 10^3$ células diminuíram de tamanho ao longo do tempo (Figura 3C). Em contraste, os esferoides U251-GM apresentaram um padrão temporal diferente de tamanho em relação à área. Os esferoides com $1,0 \times 10^3$, $5,0 \times 10^3$ e $10,0 \times 10^3$ células não sofreram alterações no tamanho, enquanto os esferoides com $20,0$ e $50,0 \times 10^3$ células apresentaram uma redução de tamanho (Figura 3C).

Também analisamos a morfologia dos esferoides tumorais U87-GM e U251-GM em relação à sua circularidade (Figura 3D). Observamos que todos os tamanhos dos esferoides nas duas linhagens testadas atingiram índices de circularidade acima de 0,8 no 2º dia, indicando

uma morfologia circular dos esferoides ao longo do tempo. Verificamos variação entre as circularidades apenas no primeiro dia de análise para ambas as linhagens de GB (Figura 3D).

Estudos anteriores demonstraram o aumento da área ou diâmetro do esferoide ao longo do tempo para a linhagem U87-GM (GRIGALAVICIUS et al., 2020; MA et al., 2016; ZHU et al., 2018b). Entretanto, encontramos também um estudo que relatou uma forte redução inicial no tamanho do esferoide, seguida por uma recuperação de 50% do tamanho (TANG; LIU; CHEN, 2016). Nesse estudo, o número inicial de células no esferoide foi muito maior do que em outros trabalhos, sendo de $2,5 \times 10^5$ células/esferoide. Provavelmente, grandes quantidades de células, como no caso desse estudo, passam por um processo de comportamento diferente e atingem um platô de crescimento, como observado após o 9º dia de cultura por Tang e colaboradores e em nossos resultados para os tamanhos de $1,0 \times 10^3$, $5,0 \times 10^3$ e $10,0 \times 10^3$ células. Além disso, os estudos citados sobre esferoides de U87-GM e sua variação de tamanho ao longo do tempo observaram apenas o crescimento do esferoide nos primeiros dias e não após períodos mais longos, como em nosso estudo. É interessante notar que todos os estudos, incluindo o nosso, indicam um platô de crescimento que não excede $0,6 \text{ mm}^2$. No entanto, observamos que a linhagem U251-GM apresentou um crescimento em vez de uma diminuição do esferoide em outro estudo ao longo dos dias (MIRAB; KANG; MAJD, 2019). É importante reforçar que a área do esferoide nesse estudo é significativamente menor do que a nossa, o que pode explicar parcialmente os resultados obtidos, uma vez que o esferoide pode apresentar um aspecto diferente quando semeado com um número muito maior de células em comparação com quantidades menores de células.

Esses resultados sugerem que o comportamento do tamanho dos esferoides de GB ao longo do tempo é dependente da linhagem celular.

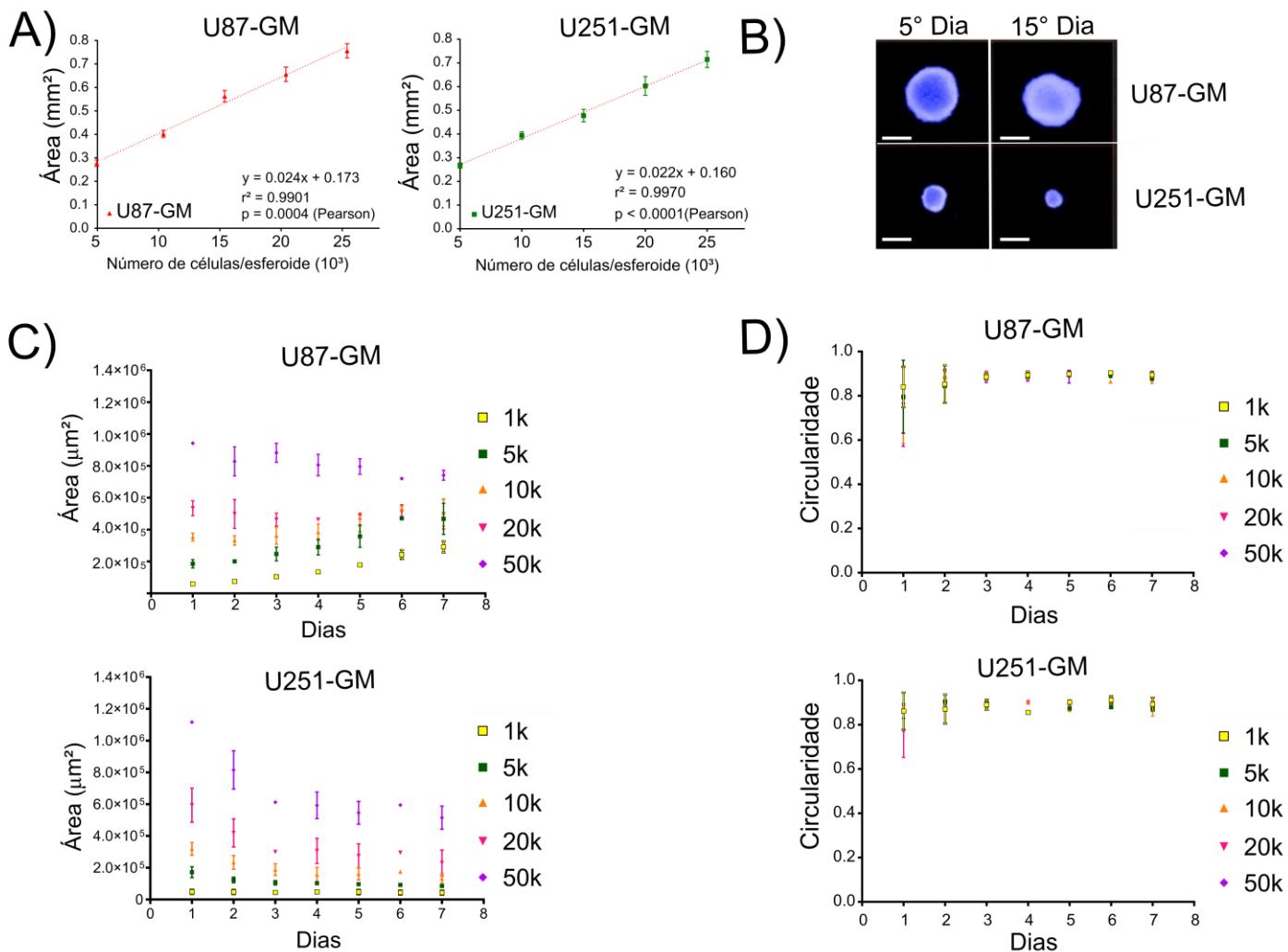


Figura 3. Caracterização morfológica de esferoides de GB de duas linhagens celulares, U87-GM e U251-GM. A. Tamanho em área dos esferoides de GB com diferentes quantidades de células tumorais semeadas; B. Microscopia de fluorescência mostrando esferoides marcados com DAPI em dois momentos distintos, no 5º e 15º dia após sua formação; C. Análise temporal do tamanho em área dos esferoides de GB com diferentes quantidades de células tumorais semeadas; D. Análise temporal da circularidade dos esferoides de GB com diferentes quantidades de células tumorais semeadas. Escala de tamanho: 300 μm . GB: glioblastoma, DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol.

Aspectos biológicos de esferoides de GB

Este estudo visou compreender esferoides tumorais em sua morfologia, cinética de crescimento e tamanho, bem como também entender fatores biológicos como hipóxia, região necrótica e células proliferativas dessas estruturas.

Inicialmente conseguimos sintetizar uma nova linhagem para verificação de células tumorais em hipóxia (U87-HypoxCR). Infelizmente, não conseguimos transduzir a linhagem U251-GM para realizar a comparação. Verificamos que esferoides U87-HypoxCR de $20,0 \times 10^5$

células semeadas apresentam marcação para hipóxia após 5 dias quando analisados por microscopia de fluorescência (Figura 4A). Vemos na literatura outros trabalhos com esferoides da linhagem U87-GM apresentando região de hipóxia (SNELL et al., 2014), com presença de HIF já em tamanhos de aproximadamente de 300 µm de diâmetro, tamanho esse menor do que nossos esferoides (BENSAAD et al., 2014; LIM et al., 2018), corroborando assim com os nossos achados.

Posteriormente, verificamos que esferoides tumorais com 2 dias tinham marcação para *Ki67* mais na região de borda do esferoide U87-GM (Figura 4B), entretanto, para os esferoides U251-GM havia marcação em todo o esferoide (Figura 4C). Na literatura vemos que esferoides com mais de 500 µm de U87-GM já apresentam uma região proliferativa mais de borda do que central (PETTERSON et al., 2016), o que corrobora com os nossos dados.

Verificamos então na literatura indícios de marcadores de morte celular, para levantarmos a hipótese se a marcação de hipóxia e os resultados de células proliferativas observados em nossos resultados está correlacionada com uma região necrótica no interior dos esferoides. Interessantemente, até mesmo esferoides de U87-GM com $2,5 \times 10^5$ células em dois dias não apresentavam marcação por PI em trabalhos anteriores (TANG; LIU; CHEN, 2016). Em relação a linhagem U251-GM há uma escassez na literatura para estudos que enfoquem na caracterização dessas células em modelos 3D. Os nossos resultados e da literatura sugerem que esferoides U87-GM apresentam a partir de determinado tamanho e dias após semeados, uma região de hipóxia, um centro necrótico e uma região de borda proliferativa, ademais com crescimento temporal do esferoide tumoral, sugerindo U87-GM ser um modelo mais fidedigno ao mimetizar tumores GB. Contudo, mais análises são necessárias, como marcação de outros marcadores de morte celular para ambas linhagens e análises de hipóxia para a linhagem U251-GM.

Em suma, nossos dados reforçam as diferenças observadas entre as linhagens para um mesmo tipo de doença. Ademais, uma das prováveis causas é o padrão diferencial da expressão de genes existente entre linhagens, por exemplo encontrado em alguns estudos com enfoque nas linhagens U87-GM e U251-GM (LI et al., 2017; MOTALN et al., 2015; SCHULZ et al., 2022). Nossos achados destacam a importância de considerar a linhagem celular ao investigar as propriedades e o comportamento dos esferoides de GB. Além disso, fornecem informações sobre o crescimento e a morfologia dessas estruturas 3D temporalmente, bem como diferenças no padrão das células proliferativas. Em resumo, este estudo contribui para a compreensão do comportamento dinâmico dos esferoides de GB, fornecendo *insights*

relevantes para pesquisas futuras nessa área e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes no combate ao GB.

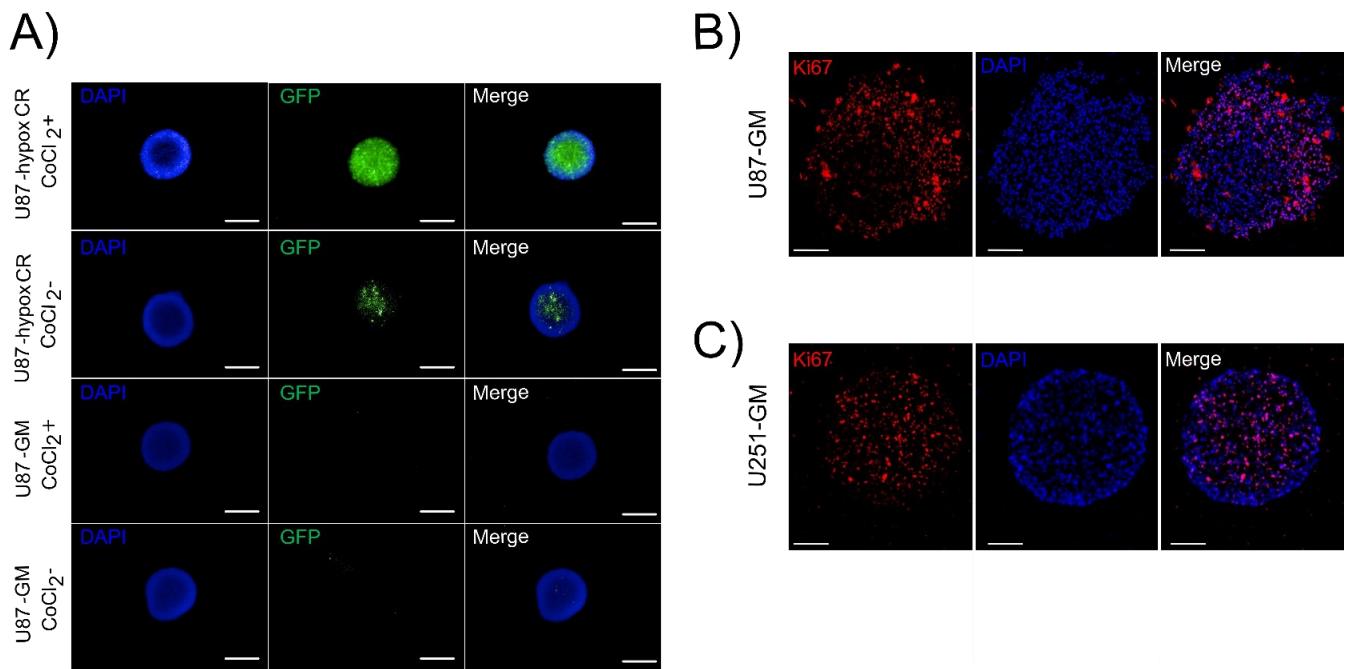


Figura 4. Caracterização biológica de esferoides de GB. A. Microscopia de fluorescência de esferoides U87-GM e U87-HypoxCR no 5º dia após a formação dos esferoides, escala de tamanho: 500 µm; Imunofluorescência para verificar a expressão de Ki67 em esferoides de GB no 3º após o cultivo das células B. U87-GM e C. U251-GM, escala de tamanho: 150 µm. CoCl₂: Cloreto de cobalto, GB: glioblastoma.

Modelos de co-cultura

A barreira hematoencefálica (BHE) representa um dos principais obstáculos a serem superados no desenvolvimento de novos fármacos para o glioblastoma (GB), e sua representação em estudos *in vitro* também apresenta desafios significativos. No entanto, nos últimos anos, novas tecnologias têm sido utilizadas para aprimorar essa mimetização (BAGCHI et al., 2019; CHO et al., 2017; XU et al., 2016). O modelo mais utilizado é o uso de uma monocultura de células endoteliais microvasculares cerebrais humanas (HBMEC) em *transwell* (WEKSLER; ROMERO; COURAUD, 2013). Um segundo modelo envolve o co-cultivo de HBMEC com outros tipos celulares importantes na constituição da BHE, como astrócitos e pericitos, ainda em *transwell* (HASELOFF et al., 2005; TOYODA et al., 2013), ou modelos tridimensionais em esferoides (CHO et al., 2017; NZOU et al., 2018). Além dos avanços mencionados, várias pesquisas têm se concentrado em aprimorar tanto a mimetização do tumor quanto da BHE simultaneamente, como a combinação de esferoides que representam os tumores e o uso de células em *transwell* que simula a BHE (SHERMAN; ROSSI, 2019).

O objetivo deste estudo é investigar a morfologia de duas diferentes abordagens de co-cultura entre células endoteliais da BHE e células tumorais de GB (Fig. 2B/C). Inicialmente, estudamos o seguinte modelo de co-cultura: primeiro formamos os esferoides tumorais e depois adicionamos as células endoteliais. Realizamos ensaios com as linhagens U87-GM e HBMEC e observamos que era necessário realizar uma centrifugação após adicionar a linhagem HBMEC, pois apenas a adição não promovia uma co-cultura, resultando em esferoides satélites (Fig. 5A), ao contrário dos esferoides de monocultura (Fig. 5B). Em seguida, testamos diferentes proporções entre células tumorais e endoteliais e constatamos que, em todos os modelos, no final, obtivemos a formação de um esferoide único (sem a presença de esferoides satélites) (Fig. 5C). Quanto à abordagem com co-cultivo, desde o início verificamos que não era necessário realizar a centrifugação para obtermos esferoides únicos após três dias de co-cultura.

Para analisar a morfologia das células em esferoides em monocultura (Fig. 6A) e co-cultura (Fig. 6B), adotamos a técnica de criocorte seguida de tratamento com HE. Para os esferoides de monocultura, foram semeadas $20,0 \times 10^3$ células, enquanto nas co-culturas seguimos a proporção de 1:1, totalizando também $20,0 \times 10^3$ células. Os esferoides de GB e HBMEC em monocultura apresentaram morfologias completamente distintas (Fig. 6A). Enquanto as células endoteliais tinham núcleos grandes e formato mais arredondado, as células tumorais eram mais alongadas, com núcleos não tão arredondados e apresentando pseudópodes. Essas morfologias são consistentes com estudos anteriores (CHENG et al., 2015; KATT et al., 2016). Além disso, a diferença na borda dos esferoides também foi evidente. Enquanto os esferoides de células tumorais apresentavam uma borda menos definida, com células com aspecto de invasividade (Fig. 6A, indicadas por setas vermelhas), os esferoides de células endoteliais mostravam uma borda muito mais uniforme (Fig. 6A, indicadas por setas pretas). Os experimentos descritos na figura 6A correspondem a criocortes de esferoides no 3º dia.

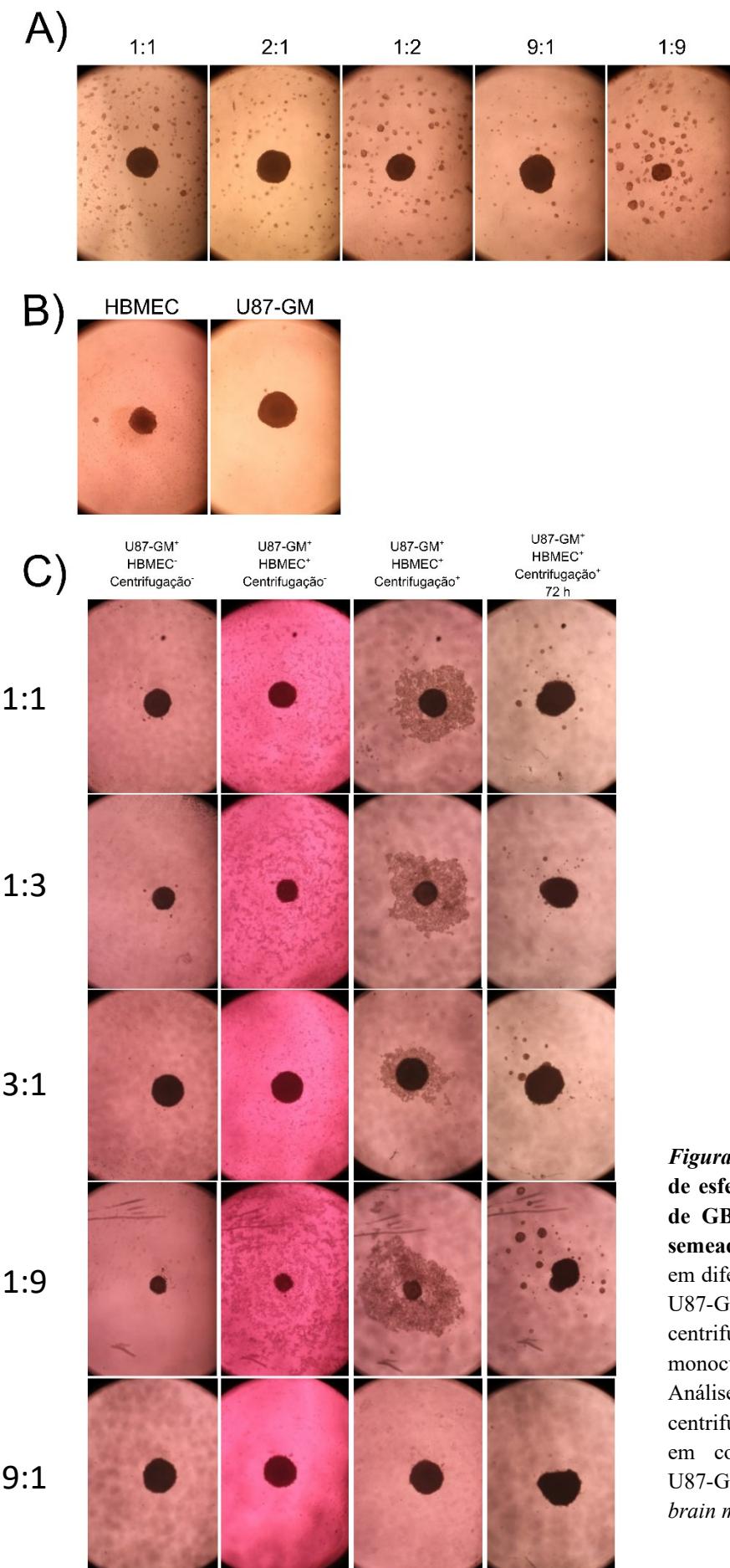


Figura 5. Microscopia de campo claro de esferoides em co-cultura de células de GB e HBMEC após 72 horas de semeadura. **A.** Esferoides em co-cultura em diferentes proporções entre células de U87-GM e HBMEC sem o uso de centrifugação; **B.** Esferoides de monocultura de U87-GM e HBMEC; **C.** Análise do impacto do uso de centrifugação na formação de esferoides em co-cultura. Proporções indicadas: U87-GM : HBMEC. HBMEC: *human brain microvascular endothelial cells*.

De forma interessante, observamos padrões distintos na morfologia dos esferoides em co-cultura (Fig. 6B). Alguns esferoides apresentavam morfologia de células tumorais em seu interior, enquanto a sua borda era mais similar aos esferoides endoteliais (Fig. 6B). Além disso, em alguns pontos, aparentemente, as células tumorais atravessaram a borda formada pelas células endoteliais (Fig. 6B, indicadas por círculo vermelho). É sabido que a linhagem U87-GM, assim como outras linhagens de GB, apresenta características de invasividade, o que pode explicar os resultados obtidos (LEE et al., 2014; MA et al., 2016; ORAIOPOULOU et al., 2019), inclusive com a observação de invasividade em células endoteliais cerebrais *in vitro* (MCCOY et al., 2019a).

Em seguida, para uma melhor compreensão da morfologia dos esferoides em co-cultura, realizamos estudos de microscopia de fluorescência. Nesse momento, concentrarmos na proporção 1:1 entre as linhagens de GB e endoteliais. O número total de células foi de 20 mil células por esferoide, utilizando as linhagens transduzidas U87-*eGFP* e HBMEC-*mKO2*. Observamos, por microscopia de fluorescência, que a centrifugação anteriormente realizada realmente fazia com que as células endoteliais (cor vermelha) ficassem ao redor do esferoide tumoral (cor verde) (Fig. 6C). Após três dias de co-cultura, tentamos delimitar onde cada linhagem se encontrava no esferoide por meio microscopia de fluorescência (Fig. 6D). No entanto, ficou evidente que não era possível adotar tal metodologia para elucidar a morfologia da co-cultura devido à sobreposição da fluorescência das células.

Para obter uma melhor compreensão da estrutura formada, realizamos a reconstrução 3D dos esferoides por meio de microscopia confocal nos esferoides de co-cultura GB-HBMEC (Fig. 6E). Primeiramente, ficou claro que, devido ao tamanho dos esferoides, a técnica limitou-se a capturar as primeiras camadas de células dos esferoides. Apesar dessa limitação, ficou explícita a formação de um anel de células endoteliais em cima dos esferoides tumorais em todos os tempos analisados. Portanto, não observamos um recobrimento das células endoteliais no esferoide tumoral a partir do modelo empregado, que era num das nossas hipóteses iniciais nosso objetivo inicial.

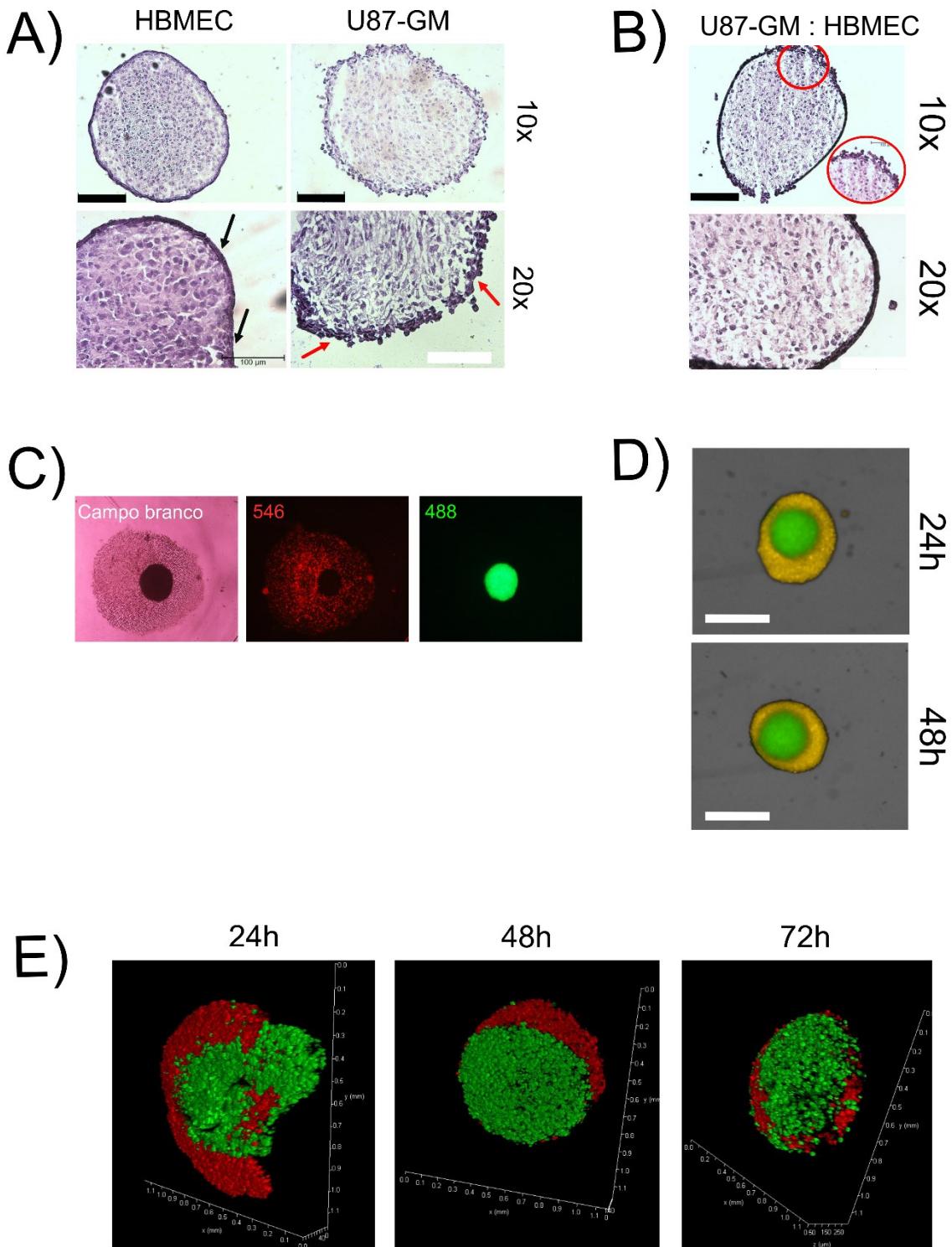


Figura 6. Caracterização morfológica de esferoides em co-cultura compostos por células tumorais U87-GM e HBMEC, por meio da abordagem com formação inicial de esferoides tumorais e depois inserção das HBMEC. Imagens em duas magnificações (10x e 20x) de coloração por H&E de esferoides semeados com $20,0 \times 10^3$ células, contendo células de A. U87-GM e HBMEC. As flechas pretas indicam a borda de um esferoide representativo de HBMEC, enquanto as flechas vermelhas indicam a borda de um esferoide representativo de U87-GM e B. Co-cultura na proporção de 1:1 entre as duas linhagens, com o círculo vermelho indicando a alteração da morfologia da borda dos esferoides. Escala de tamanho barra preta: 150 μm e branca preta 100 μm . C. Microscopia de campo claro e fluorescência de esferoides em co-cultura após inserção de HBMEC e centrifugação; D. Microscopia de fluorescência com os filtros 488 e 546 e microscopia de campo claro de

esferoides em co-cultura após 24h e 48h da inserção de HBMEC. Escala de tamanho: 500 µm; E. Reconstrução 3D de esferoides em co-cultura após 24h, 48h e 72h em microscopia confocal. H&E: hematoxilina e eosina, HBMEC: *human brain microvascular endothelial cells*.

A segunda abordagem foi o co-cultivo simultâneo de células de GB U87-eGFP e HBMEC-*mKO2*. Nessa etapa, avaliamos a morfologia dos esferoides de co-cultura por meio de microscopia de fluorescência em 72 horas e 96 horas após plaqueamento (Fig. 7A). Em ambos os tempos, observamos a migração da linhagem endotelial para a região central do esferoide em co-cultura. Para uma melhor compreensão da morfologia, procedemos com a fixação e criocorte dos esferoides. Observamos que tanto em 3 dias (Fig. 7B) quanto em 14 dias (Fig. 7C), a linhagem HBMEC-*mKO2* estava localizada na região central do esferoide.

O objetivo desta etapa do projeto foi compreender a morfologia da co-cultura entre células de GB e células endoteliais cerebrais por meio de duas metodologias diferentes. Já é conhecido que o potencial angiogênico de células de GB é alterado em modelos 3D comparado à cultura de células 2D, assim como outros processos biológicos (BHAT et al., 2021). Muitos estudos visam compreender o impacto das células endoteliais cerebrais nos esferoides cerebrais tumorais, focando em aspectos como alterações em vias de sinalização, proliferação, migração e invasão celular (GHOCHANI et al., 2022; LEITE et al., 2020; LIU et al., 2022b; MCCOY et al., 2019b; NGO et al., 2022; SÁNCHEZ-DENGRA et al., 2023). No entanto, é importante destacar que a maioria dos estudos existentes utilizam predominantemente modelos de co-culturas em hidrogéis, tornando este trabalho inovador tanto pela abordagem adotada, que não envolve o uso de hidrogéis, quanto pelo foco específico na morfologia em si. Além disso, a migração observada das HBMECs nos nossos resultados apresenta uma oportunidade para futuras pesquisas, explorando diferentes proporções celulares para alcançar estruturas que se assemelham a tumores pré-vascularizados (EHSAN et al., 2014). O modelo estudado também permite a investigação do perfil de expressão gênica e proteica na co-cultura, bem como a análise da influência em vias de sinalização relacionadas ao crescimento tumoral, marcadores de angiogênese e hipóxia, ou ainda metabolismo e morte celular. Portanto, o modelo de co-cultura desenvolvido neste estudo, com a inserção simultânea de ambas as linhagens, apresenta um potencial significativo para futuros estudos com foco na angiogênese em GB.

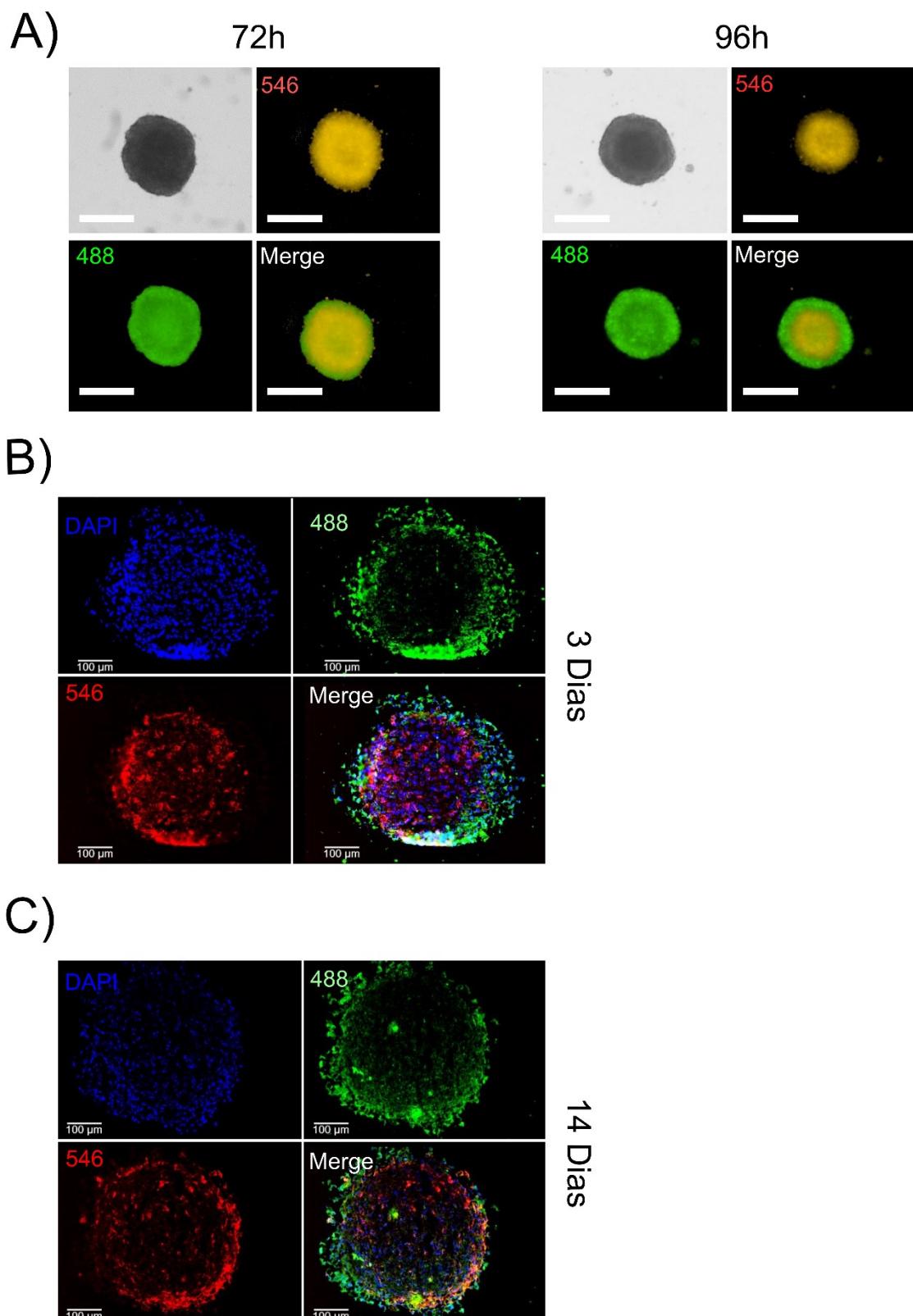


Figura 7. Caracterização morfológica de esferoides em co-cultura compostos por células tumorais U87-GM e HBMEC na proporção 1:1, utilizando a abordagem de inserção simultânea de ambas as linhagens. **A.** Microscopia de campo claro e microscopia de fluorescência com os filtros 488 e 546 de esferoides em co-cultura após 72h e 96h da semeação das células. Escala de tamanho: 500 µm. Microscopia de fluorescência para os filtros DAPI, 488 e 546 de esferoides em co-cultura após **B.** 3 dias e **C.** 14 dias da semeação. Escala de tamanho: 100 µm. HBMEC: *human brain microvascular endothelial cells*.

Em suma, um dos resultados possíveis deste trabalho seria a obtenção de esferoides tumorais com a BHE, por meio do revestimento de U87-GM com as células HBMEC. No entanto, nossos resultados demonstram que não ocorre um recobrimento pelas células endoteliais. Por fim, ressaltamos que a migração das células endoteliais observada em nossos resultados para a região central dos esferoides tumorais pode servir de inspiração para estudos futuros com enfoque em novos modelos 3D que explorem o processo de angiogênese.

Conclusão

Pesquisas recentes têm se concentrado em desenvolver novos modelos de estudos *in vitro* para várias doenças, incluindo câncer. Esses modelos têm recebido investimentos consideráveis como uma alternativa aos testes pré-clínicos em animais, com resultados promissores e maior fidelidade na reprodução de estruturas complexas, como tumores e seu microambiente tumoral. O GB tem sido um dos focos mais importantes para o desenvolvimento de novos modelos na avaliação de fármacos, uma vez que existe uma grande dificuldade em reproduzir a estrutura da BHE nesses estudos, o que resulta em baixas taxas de sucesso clínico.

Este capítulo teve três objetivos principais: 1) analisar a morfologia e 2) os aspectos biológicos dos esferoides de GB ao longo do tempo em uma monocultura; e 3) compreender a morfologia da co-cultura entre células de GB e HBMEC utilizando duas metodologias distintas.

Nossos resultados destacam a importância da escolha da linhagem de GB, dependendo da pergunta biológica específica do estudo. Confirmamos os achados da literatura recente, que mostram diferenças não apenas entre modelos 3D e 2D, mas também entre diferentes linhagens dentro do mesmo modelo 3D em termos de morfologia, hipóxia e proliferação celular. Em relação aos resultados de esferoides em co-cultura, nenhuma das abordagens resultou no recobrimento das células tumorais pelas células endoteliais cerebrais. Entretanto, observamos a migração das HBMEC quando co-semeadas simultaneamente, o que representa uma oportunidade promissora para investigações futuras sobre estudos biológicos da angiogênese em GB.

Dessa forma, este capítulo contribui para o entendimento da dinâmica dos esferoides de GB, fornecendo perspectivas relevantes para estudos futuros nessa área e para o aprimoramento de abordagens terapêuticas mais eficazes no combate ao GB, incluindo a inclusão de células da barreira hematoencefálica em investigações adicionais.

4. DISCUSSÃO

As doenças oncológicas representam a segunda maior causa de mortes em todo o mundo, com um total de 19,3 milhões de pessoas diagnosticadas e 10,0 milhões de mortes registradas apenas no ano de 2020, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (WORLD HEATH ORGANIZATION). Esses números evidenciam a necessidade urgente de novas tecnologias para diagnósticos mais precoces e terapias mais eficazes, que possam melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Nesse contexto, as nanoestruturas têm sido empregadas em diversas áreas tecnológicas nos últimos anos, inclusive na medicina, impulsionando assim o campo emergente da nanomedicina (BHATIA et al., 2022). Essa área de conhecimento tem proporcionado avanços significativos em métodos de diagnóstico cada vez mais precoces, incluindo o desenvolvimento de produtos como o *CellSearch®* para detecção de metástases (COUMANS; TERSTAPPEN, 2015). Além disso, a nanomedicina tem proposto abordagens terapêuticas mais eficazes e precisas para o tratamento de doenças oncológicas, o que é evidenciado pelo registro de mais de 350 ensaios clínicos apenas no website ClinicalTrials.gov.

Ademais, nos últimos anos, têm-se destacado métodos alternativos ao uso de animais em estudos científicos. Isso se deve à baixa correlação entre os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo*, assim como à baixa correlação entre esses resultados e os ensaios clínicos (IMAMURA et al., 2015). Nesse sentido, o uso de estruturas tridimensionais (3D), como os esferoides, tem se mostrado uma estratégia promissora para a mimetização mais precisa de tumores em comparação com os modelos de cultura de células convencionais em duas dimensões (2D). Esses modelos 3D apresentam diferenças nos perfis de expressão gênica e na morfologia das células em relação aos 2D (BOCELLATO; REHM, 2022; FONTOURA et al., 2020; WANIGASEKARA et al., 2023), demonstrando maior fidelidade aos tumores encontrados em humanos. Além disso, permitem o co-cultivo com diferentes tipos de células, aumentando ainda mais a semelhança com o microambiente tumoral (BIKFALVI et al., 2023). Dessa forma, os novos modelos de cultura 3D têm o potencial de fornecer resultados mais promissores no desenvolvimento de novos fármacos.

No âmbito deste trabalho de doutorado, foram estabelecidos dois objetivos principais, que foram abordados em capítulos separados. O primeiro capítulo tratou da síntese e caracterização de uma nova nanopartícula híbrida funcionalizada com oligonucleotídeos e com potencial aplicação no diagnóstico de câncer de mama. Para isso, foi utilizado um

copolímero de bloco composto pelo polímero zwitteriônico PMPC e o polímero catiônico PDMAEMA, que por sua vez, foi empregado para a encapsulação da nanopartícula de óxido de ferro e a funcionalização com oligonucleotídeos. Como prova de conceito, selecionamos um aptâmero previamente validado na literatura para o reconhecimento de células de câncer de mama HER2⁺.

No primeiro capítulo, realizamos a síntese e caracterização da IONPPP, uma nova nanopartícula híbrida óxido metal-polimérica funcionalizada com oligonucleotídeos. A unidade polimérica PDMAEMA foi responsável pela encapsulação da nanopartícula magnética e pela funcionalização com o aptâmero com afinidade à HER2. O mecanismo dessas interações ocorre devido à carga catiônica do PDMAEMA, que possui um átomo de nitrogênio que interage eletronicamente com as hidroxilas presentes na superfície das IONPs e com o oxigênio dos aptâmeros, ambos com carga aniônica.

Além da inovação no material nanoestruturado proposto, também realizamos, pela primeira vez, a avaliação da citotoxicidade dos polímeros PMPC e PDMAEMA por meio de diferentes ensaios biológicos, com resultados evidenciando a baixa toxicidade do componente polimérico. Destaca-se a flexibilidade da metodologia utilizada na construção da nanoestrutura IONPPP, permitindo a adição de novos polímeros por meio da síntese por RAFT com diferentes finalidades, como veiculação a outros fármacos para aplicações terapêuticas.

O núcleo superparamagnético da IONPPP, composto por nanopartículas de óxido de ferro, possibilitou a captura de células cancerosas. A força magnética necessária para a separação foi fornecida por um pequeno ímã, cujo valor magnético é adequado para ser utilizado em laboratórios clínicos convencionais que já empregam técnicas de separação magnética.

A rota de síntese das nanopartículas utiliza uma infraestrutura passível de escalonamento industrial, em condições de assepsia, empregando materiais já aprovados na indústria e de uso farmacêutico, o que demonstra sua viabilidade técnica. O controle de qualidade das NPs pode ser realizado por meio de caracterizações químicas e físicas, como as empregadas neste trabalho, como a verificação de tamanho e carga pela técnica de *DLS* e a análise da composição química por *FTIR*, permitindo o monitoramento da estabilidade de formulações que possam ser aplicadas comercialmente.

A funcionalização por aptâmeros do nanomaterial aqui descrita funciona como uma ferramenta para o carreamento direcionado ao alvo tumoral e a captura/separação de células tumorais. Na prova de conceito utilizada, o aptâmero selecionado liga-se especificamente à molécula HER2, uma proteína de membrana superexpressa em certos grupos de células

cancerosas de mama, com relevância clínica em relação ao tratamento escolhido e correlação com a sobrevida de pacientes. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram uma eficácia e sensibilidade promissoras na captação de células cancerosas de mama por meio da nanoestrutura inovadora desenvolvida no presente estudo.

Por fim, é importante reforçar a multifuncionalidade da tecnologia desenvolvida em relação à sua funcionalização, permitindo o uso de outros aptâmeros com foco em outras doenças, assim como a incorporação de moléculas como *siRNA* e *miRNA* para terapia gênica, ampliando assim a aplicação da tecnologia desenvolvida.

Vale ressaltar que o primeiro capítulo resultou na publicação do artigo em *preprint* e atualmente está em processo de revisão por pares para publicação. Futuros estudos podem visar melhorias no enriquecimento por separação magnética proposto pela NP, bem como outras aplicações como terapia genética por aptâmeros ou ainda *miRNA* e *siRNA*. Por fim, um dos pontos não abordados neste trabalho foi a verificação da aplicação de modelos mais complexos, como células tumorais provenientes de modelos *in vivo* ou ainda células de pacientes.

No segundo capítulo, concentrarmos inicialmente nossa atenção na compreensão da morfologia e do crescimento dos esferoides tumorais de GB. Foi evidente que essas características não são apenas dependentes do tamanho da estrutura em si, mas também variam entre as diferentes linhagens celulares utilizadas. Como mencionado na introdução desta tese, a motivação para este capítulo surgiu do interesse inicial do nosso grupo em direcionar os esforços deste trabalho para o desenvolvimento de uma nanopartícula para terapia gênica em GB. Para alcançar esse objetivo, era crucial aprofundar nosso conhecimento não apenas sobre os esferoides 3D de GB, mas também estudar as células endoteliais da BHE, uma vez que a entrega de fármacos através dessa estrutura apresenta um dos maiores desafios para novos fármacos.

Os resultados obtidos reforçaram dados previamente relatados na literatura, evidenciando que as estruturas 3D de células tumorais apresentam padrões distintos de proliferação celular e regiões de hipóxia (BENSAAD et al., 2014; LI et al., 2017; LIM et al., 2018; MOTALN et al., 2015; PETTERSON et al., 2016; SCHULZ et al., 2022; SNELL et al., 2014; TANG; LIU; CHEN, 2016), os quais são influenciados pela linhagem celular escolhida. Essas descobertas destacam a importância de considerar não apenas a morfologia do modelo 3D, mas também compreender as respostas biológicas que esses modelos podem oferecer e selecionar cuidadosamente a linhagem celular mais adequada para abordar questões específicas. Por exemplo, os esferoides da linhagem U87-GM apresentam um tamanho maior em

comparação com a linhagem U251-GM e exibem regiões proliferativas na borda dos esferoides, características que não são observadas na linhagem U251-GM. Nesse sentido, estudos que visam modelos com regiões de hipóxia e menor proliferação celular no interior do esferoide, devem basear-se na linhagem U87-GM, levando em consideração nossos resultados e outros estudos da literatura. Esse exemplo ilustra a importância de selecionar a linhagem celular adequada em estudos, indo além da morfologia que melhor representa os modelos 3D, em comparação com a cultura convencional de células em 2D.

Além disso, nosso estudo investigou a co-cultura entre células de GB e células endoteliais microvasculares cerebrais (HBMEC). Em ambas as metodologias estudadas, a co-cultura não resultou no encobrimento das células tumorais pelas células endoteliais. Entretanto, em uma das metodologias, observamos a migração das HBMEC para o interior do esferoide tumoral. Essa observação é particularmente interessante, pois o modelo desenvolvido apresentou uma morfologia que pode ter implicações promissoras para estudos futuros sobre angiogênese em esferoides de GB. Ademais, nosso trabalho resulta em uma metodologia simples e de fácil reprodução, sem o uso de *scaffolds* como outros trabalhos da literatura.

Dessa forma, o presente trabalho de doutorado abre novas perspectivas para o desenvolvimento de uma nanoestrutura multifuncional, com potenciais aplicações na área médica, ao mesmo tempo em que contribui para a compreensão da cultura 3D de células de GB e células endoteliais microvasculares cerebrais, fornecendo *insights* relevantes para pesquisas futuras nessa área e para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

5. CONCLUSÃO

Este projeto de doutorado tem como foco duas áreas do conhecimento que visam proporcionar melhorias na ciência aplicada com ênfase em oncologia: o uso de nanoestruturas para o diagnóstico de doenças e aprimoramentos em modelos de estudo.

Em relação à primeira frente, este trabalho apresentou todo o desenvolvimento tecnológico de uma nova nanopartícula de óxido de ferro, revestida com copolímero de bloco e funcionalizada com aptâmero. Além de realizar a caracterização química e física da nanoestrutura proposta, o projeto de doutorado demonstrou uma prova de conceito para a aplicação da nanopartícula desenvolvida, com a identificação e captura magnética de células tumorais de câncer de mama. Embora haja espaço para melhorias no enriquecimento e verificação da sua aplicação em modelos mais complexos, o projeto abordou de forma satisfatória toda a linha de desenvolvimento tecnológico, fornecendo evidência da síntese da nanopartícula proposta, bem como servindo como base sólida para futuros trabalhos devido à multifuncionalidade do nanomaterial desenvolvido.

No segundo capítulo, abordamos o estudo de esferoides em monocultura e co-cultura, com foco em células tumorais de GB e HBMEC. Destacamos a importância de não limitar o uso de modelos 3D apenas com base em sua estrutura e morfologia, mas ressaltamos a necessidade de selecionar cuidadosamente a linhagem celular de acordo com a pergunta biológica do estudo. Nossos resultados reforçam e contribuem com os dados da literatura, evidenciando a importância de compreender aspectos biológicos, como hipóxia e proliferação celular, na escolha do modelo 3D adequado. Além disso, este projeto trouxe novos conhecimentos sobre a morfologia da co-cultura de células de GB e HBMEC, servindo como inspiração e base para futuros modelos de co-cultura, principalmente para aqueles com enfoque no estudo da angiogênese em GB. O forte envolvimento em estudos relacionados à GB resultou na publicação de um artigo de revisão em epidemiologia analítica e descritiva, o qual esperamos que sirva como base para diferentes pesquisadores e médicos da área.

Em geral, este projeto de doutorado aborda dois pontos importantes da pesquisa médica atual: nanomedicina e modelos 3D. Apresentamos uma nanoestrutura inovadora com potencial aplicação no diagnóstico de câncer de mama e contribuímos para o conhecimento sobre esferoides em monocultura e co-cultura no GB. O trabalho realizado traz, em suma, contribuições significativas para a ciência e sugere caminhos promissores para pesquisas futuras.

6. REFERÊNCIAS

AABERG-JESSEN, C. et al. Invasion of primary glioma- and cell line-derived spheroids implanted into corticostriatal slice cultures. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, 2013.

ADAMSON, C. et al. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 18, n. 8, p. 1061–1083, 2009.

AHMED, E. M. et al. A HIF-independent, CD133-mediated mechanism of cisplatin resistance in glioblastoma cells. **Cellular Oncology**, 2018.

AIGNER, A.; KÖGEL, D. **Nanoparticle/siRNA-based therapy strategies in glioma: Which nanoparticles, which siRNAs?** *Nanomedicine*, 2018.

AJINKYA, N. et al. Magnetic Iron Oxide Nanoparticle (IONP) Synthesis to Applications: Present and Future. **Materials (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 20, p. 1–35, 2 out. 2020.

AKAY, M. et al. Drug Screening of Human GBM Spheroids in Brain Cancer Chip. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018.

ALEXANDER, B. M.; CLOUGHESY, T. F. Adult glioblastoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 21, p. 2402–2409, 2017.

ALI, A. et al. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 9, p. 49–67, 19 ago. 2016.

ALIDEDEOGLU, A. H. et al. Aqueous RAFT polymerization of 2-aminoethyl methacrylate to produce well-defined, primary amine functional homo- And copolymers. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, 2009.

ANANTHANARAYANAN, B.; KIM, Y.; KUMAR, S. Elucidating the mechanobiology of malignant brain tumors using a brain matrix-mimetic hyaluronic acid hydrogel platform. **Biomaterials**, 2011.

AURIEMMA, R. et al. Preformed Biodegradable Zwitterionic Nanoparticles as Tunable Excipients for the Formulation of Therapeutics Directly at the Point of Care. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 60, n. 29, p. 10699–10709, 28 jul. 2021.

AZZARELLI, R. Organoid Models of Glioblastoma to Study Brain Tumor Stem Cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 1–9, 16 abr. 2020.

BAGCHI, S. et al. In-vitro blood-brain barrier models for drug screening and permeation studies: an overview. **Drug design, development and therapy**, v. 13, p. 3591–3605, 2019.

BARROW, M. et al. Design considerations for the synthesis of polymer coated iron oxide nanoparticles for stem cell labelling and tracking using MRI. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 19, p. 6733–6748, 21 set. 2015.

BASAVARAJA, S. et al. Solvothermal synthesis and characterization of acicular α -Fe₂O₃ nanoparticles. **Bulletin of Materials Science**, v. 34, n. 7, p. 1313–1317, 17 dez. 2011.

BATES, P. J. et al. Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. **Experimental and molecular pathology**, v. 86, n. 3, p. 151–164, jun. 2009.

BAYKAL, A. et al. Synthesis and characterization of dendrimer-encapsulated iron and iron-oxide nanoparticles. **Journal of Superconductivity and Novel Magnetism**, v. 25, n. 5, p. 1541–1549, 9 jul. 2012.

BECK, W. et al. Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Synthesized by Micellar Approach as a Potential Dual-Mode T1-T2 Contrast Agent. **Current Nanomedicine**, v. 12, n. 1, p. 63–75, 11 maio 2022.

BENSAAD, K. et al. Fatty Acid Uptake and Lipid Storage Induced by HIF-1 a Contribute to Cell Growth and Survival after Hypoxia- Article Fatty Acid Uptake and Lipid Storage Induced by HIF-1 a Contribute to Cell Growth and Survival after Hypoxia-Reoxygenation. **CellReports**, v. 9, n. 1, p. 349–365, 2014.

BENTON, G. et al. Matrigel: from discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. **Advanced drug delivery reviews**, v. 79–80, p. 3–18, 15 dez. 2014.

BHAT, S. M. et al. 3D tumor angiogenesis models: recent advances and challenges. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 147, n. 12, p. 3477, 1 dez. 2021.

BHATIA, S. N. et al. Cancer nanomedicine. **Nature Reviews Cancer 2022 22:10**, v. 22, n. 10, p. 550–556, 8 ago. 2022.

BIKFALVI, A. et al. Challenges in glioblastoma research: focus on the tumor microenvironment. **Trends in cancer**, v. 9, n. 1, p. 9–27, 1 jan. 2023.

BOCCELLATO, C.; REHM, M. Glioblastoma, from disease understanding towards optimal cell-based in vitro models. **Cellular oncology (Dordrecht)**, v. 45, n. 4, p. 527–541, 1 ago. 2022.

BONKOVOSKI, L. C. et al. Polyelectrolyte complexes of poly[(2-dimethylamino)ethyl methacrylate]/chondroitin sulfate obtained at different pHs: I. Preparation,

characterization, cytotoxicity and controlled release of chondroitin sulfate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, n. 1–2, p. 197–207, 30 dez. 2014.

BOULBES, D. R. et al. HER family kinase domain mutations promote tumor progression and can predict response to treatment in human breast cancer. **Molecular oncology**, v. 9, n. 3, p. 586–600, 1 mar. 2015.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BURT NABORS, L. et al. **Central nervous system cancers. JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, 2013.

CHEN, R. et al. Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. **Neurotherapeutics**, v. 14, n. 2, p. 284–297, 2017.

CHENG, V. et al. High-content analysis of tumour cell invasion in three-dimensional spheroid assays. **Oncoscience**, 2015.

CHO, C. et al. Blood-brain-barrier spheroids as an in vitro screening platform for brain-penetrating agents Choi-Fong. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–14, 2017.

CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. Chapter 7: Characterization. Em: **The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses**. [s.l: s.n.]. p. 139–183.

CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. Chapter 13. Formation. Em: **The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses**. [s.l: s.n.]. p. 345–364.

CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. 1 Introduction to the iron oxides. Em: **The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses**. [s.l: s.n.]. p. 1–7.

COUMANS, F.; TERSTAPPEN, L. Detection and Characterization of Circulating Tumor Cells by the CellSearch Approach. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1347, p. 263–278, 2015.

DA HORA, C. C. et al. Patient-Derived Glioma Models: From Patients to Dish to Animals. **Cells**, v. 8, n. 10, p. 1177, 2019.

DA SILVA, P. B. et al. Recent Advances in the Use of Metallic Nanoparticles with Antitumoral Action - Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 12, p. 2108–2146, 2018.

DAUTZENBERG, I. J. C. et al. Mammalian orthoreovirus T3D infects U-118 MG cell spheroids independent of junction adhesion molecule-A. **Gene Therapy**, 2014.

DILNAWAZ, F.; SAHOO, S. K. Enhanced accumulation of curcumin and temozolomide loaded magnetic nanoparticles executes profound cytotoxic effect in

glioblastoma spheroid model. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2013.

EHSAN, S. M. et al. A three-dimensional in vitro model of tumor cell intravasation. **Integrative Biology (United Kingdom)**, v. 6, n. 6, p. 603–610, 2014.

FAIRBANKS, B. D.; GUNATILLAKE, P. A.; MEAGHER, L. Biomedical applications of polymers derived by reversible addition – fragmentation chain-transfer (RAFT). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 91, p. 141–152, 30 ago. 2015.

FAN, Y. et al. Engineering a high-throughput 3-D In vitro glioblastoma model. **IEEE Journal of Translational Engineering in Health and Medicine**, 2015.

FARMER, V. C. (J. A.) Gadsden. The infrared spectra of minerals and related inorganic compounds. London (Butterworths), 1975. 277 pp. Price £15.00. **Mineralogical Magazine**, v. 40, n. 313, p. 540–540, mar. 1976.

FEHLAUER, F. et al. The inhibition of proliferation and migration of glioma spheroids exposed to temozolomide is less than additive if combined with irradiation. **Oncology reports**, v. 17, p. 941–945, 2007.

FONTOURA, J. C. et al. Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance. **Materials Science and Engineering: C**, v. 107, p. 110264, 1 fev. 2020.

FU, Z.; XIANG, J. Aptamer-Functionalized Nanoparticles in Targeted Delivery and Cancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 9123**, v. 21, n. 23, p. 9123, 30 nov. 2020.

GAUTIER, J. et al. Recent advances in theranostic nanocarriers of doxorubicin based on iron oxide and gold nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 169, n. 1–2, p. 48–61, 2013.

GHOCHANI, Y. et al. A molecular interactome of the glioblastoma perivascular niche reveals integrin binding sialoprotein as a mediator of tumor cell migration. **Cell Reports**, v. 41, n. 3, p. 111511, 18 out. 2022.

GODA, T.; ISHIHARA, K.; MIYAHARA, Y. Critical update on 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer science. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 16, p. 41766, 20 abr. 2015a.

GODA, T.; ISHIHARA, K.; MIYAHARA, Y. Critical update on 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer science. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 16, p. 41766, 20 abr. 2015b.

GRIGALAVICIUS, M. et al. Photodynamic Efficacy of Cercosporin in 3D Tumor Cell Cultures. **Photochemistry and Photobiology**, v. 96, n. 3, p. 699–707, 2020.

GÜNTHER, W. et al. Temozolomide induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids. **British Journal of Cancer**, 2003.

GUO, P. The emerging field of RNA nanotechnology. **Nature Nanotechnology** 2010 **5:12**, v. 5, n. 12, p. 833–842, 21 nov. 2010.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3995–4021, 2005.

GUTIERREZ, C.; SCHIFF, R. HER 2: Biology, Detection, and Clinical Implications. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 135, n. 1, p. 55, jan. 2011.

HADJIPANAYIS, C. G. et al. EGFRvIII antibody-conjugated iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging-guided convection-enhanced delivery and targeted therapy of glioblastoma. **Cancer Research**, v. 70, n. 15, p. 6303–6312, 2010.

HARE, J. I. et al. Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: An industry perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 108, p. 25–38, 1 jan. 2017.

HASELOFF, R. F. et al. In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 2005.

HASSAN, E. M.; WILLMORE, W. G.; DEROSA, M. C. Aptamers: Promising Tools for the Detection of Circulating Tumor Cells. **Nucleic acid therapeutics**, v. 26, n. 6, p. 335–347, 1 dez. 2016.

HEFFERNAN, J. M. et al. Bioengineered Scaffolds for 3D Analysis of Glioblastoma Proliferation and Invasion. **Annals of Biomedical Engineering**, 2015.

HELMS, H. C. C. et al. Drug Delivery Strategies to Overcome the Blood-Brain Barrier (BBB). **Handbook of experimental pharmacology**, v. 273, p. 151–183, 2022.

HUANG, G. Y. et al. **Microfluidic hydrogels for tissue engineering**. **Biofabrication**, 2011.

HUANG, Y. et al. Micellization and gelatinization in aqueous media of pH- and thermo-responsive amphiphilic ABC (PMMA82-b-PDMAEMA150- b -PNIPAM65) triblock copolymer synthesized by consecutive RAFT polymerization. **RSC Advances**, v. 7, n. 46, p. 28711–28722, 2017.

IMAMURA, Y. et al. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. **Oncology reports**, v. 33, n. 4, p. 1837–1843, 1 abr. 2015.

ISHIGURO, T. et al. **Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications.** *Cancer Science*, 2017.

ISRAEL, L. L. et al. Magnetic iron oxide nanoparticles for imaging, targeting and treatment of primary and metastatic tumors of the brain. **Journal of Controlled Release**, v. 320, n. January, p. 45–62, 2020.

JAIN, V. et al. A review of nanotechnology-based approaches for breast cancer and triple-negative breast cancer. **Journal of Controlled Release**, v. 326, p. 628–647, 10 out. 2020.

JAMAHIRIYA, A. et al. Local and Systemic Effects of Unpolymerised Monomers. **Dental Research Journal**, v. 7, n. 2, p. 82, 2010.

JIANG, K. et al. A carrier-free dual-drug nanodelivery system functionalized with aptamer specific targeting HER2-overexpressing cancer cells. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 46, p. 9121–9129, 29 nov. 2017.

KARZBRUN, E. et al. Human brain organoids on a chip reveal the physics of folding. **Nature Physics**, 2018.

KATT, M. E. et al. Human Brain Microvascular Endothelial Cells Derived from the BC1 iPS Cell Line Exhibit a Blood-Brain Barrier Phenotype. **Plos One**, v. 11, n. (4), p. 1–18, 2016.

KEDDIE, D. J. A guide to the synthesis of block copolymers using reversible-addition fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 2, p. 496–505, 2014.

KHAFAGA, A. F. et al. Celecoxib repurposing in cancer therapy: Molecular mechanisms and nanomedicine-based delivery technologies. **Nanomedicine**, v. 16, n. 19, p. 1691–1712, 1 ago. 2021.

KIM, Y.; JEON, H.; OTHMER, H. The Role of the Tumor Microenvironment in Glioblastoma: A Mathematical Model. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, 2017.

KOO, H. J.; VELEV, O. D. Regenerable photovoltaic devices with a hydrogel-embedded microvascular network. **Scientific Reports**, 2013.

KUANG, Y. et al. Dual Functional Peptide-Driven Nanoparticles for Highly Efficient Glioma-Targeting and Drug Codelivery. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, n. 5, p. 1599–1607, 2016.

KUMAR, P. et al. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. **Nature**, 2007.

LEE, H. et al. A microfluidic platform for quantitative analysis of cancer angiogenesis and intravasation. **Biomicrofluidics**, 2014.

LEITE, D. M. et al. A human co-culture cell model incorporating microglia supports glioblastoma growth and migration, and confers resistance to cytotoxins. **The FASEB Journal**, v. 34, n. 1, p. 1710–1727, 1 jan. 2020.

LI, H. et al. Differences in Protein Expression between the U251 and U87 Cell Lines. **Turkish neurosurgery**, v. 27, n. 6, p. 894–903, 2017.

LIANG, T. et al. Cascaded Aptamers-Governed Multistage Drug-Delivery System Based on Biodegradable Envelope-Type Nanovehicle for Targeted Therapy of HER2-Overexpressing Breast Cancer. **ACS applied materials & interfaces**, v. 10, n. 40, p. 34050–34059, 10 out. 2018.

LIM, W. et al. Formation of size-controllable tumour spheroids using a microfluidic pillar array (μ FPA) device.pdf. **Analytical Chemistry**, v. 143, p. 5841–5848, 2018.

LIU, M. et al. Aptamer-Enabled Nanomaterials for Therapeutics, Drug Targeting and Imaging. **Cells**, v. 11, n. 1, p. 1–33, 2022a.

LIU, Y. et al. Paradoxical role of β 8 integrin on angiogenesis and vasculogenic mimicry in glioblastoma. **Cell Death & Disease** 2022 13:6, v. 13, n. 6, p. 1–13, 8 jun. 2022b.

LIU, Z. et al. Novel HER2 Aptamer Selectively Delivers Cytotoxic Drug to HER2-positive Breast Cancer Cells in Vitro. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 1, p. 148, 20 jul. 2012.

LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, p. 803–820, 2016.

LOZADA-DELGADO, E. L.; GRAFALS-RUIZ, N.; VIVAS-MEJÍA, P. E. RNA interference for glioblastoma therapy: Innovation ladder from the bench to clinical trials. **Life Sciences**, v. 188, n. June, p. 26–36, 2017.

LUONGO, G. et al. Scalable High-Affinity Stabilization of Magnetic Iron Oxide Nanostructures by a Biocompatible Antifouling Homopolymer. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, n. 46, p. 40059–40069, 22 nov. 2017.

LV, D. et al. **Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery**. **Oncology Letters**, 2017.

MA, J. et al. Patterning hypoxic multicellular spheroids in a 3D matrix - a promising method for anti-tumor drug screening. **Biotechnology Journal**, v. 11, n. 1, p. 127–134, 2016.

MANINI, I. et al. **Role of microenvironment in glioma invasion: What we learned from in vitro models**. **International Journal of Molecular Sciences**, 2018.

MARENCO-HILLEMBRAND, L. et al. Trends in glioblastoma: outcomes over time and type of intervention: a systematic evidence based analysis. *Journal of Neuro-Oncology* Springer, , 1 abr. 2020.

MASSART, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. **J. R. Garrood, Proc. Phys. Soc**, v. 34, n. 2, p. 142, 1981.

MCCOY, M. G. et al. Endothelial cells promote 3D invasion of GBM by IL-8-dependent induction of cancer stem cell properties. **Scientific Reports**, 2019a.

MCCOY, M. G. et al. Endothelial cells promote 3D invasion of GBM by IL-8-dependent induction of cancer stem cell properties. **Scientific Reports 2019 9:1**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 21 jun. 2019b.

MENDREK, B. et al. Synthesis, Characterization and Cytotoxicity of Novel Thermoresponsive Star Copolymers of N,N'-Dimethylaminoethyl Methacrylate and Hydroxyl-Bearing Oligo(Ethylene Glycol) Methacrylate. **Polymers 2018, Vol. 10, Page 1255**, v. 10, n. 11, p. 1255, 12 nov. 2018.

MILLS, D. R.; PETERSON, R. L.; SPIEGELMAN, S. An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 58, n. 1, p. 217, 1967.

MIRAB, F.; KANG, Y. J.; MAJD, S. Preparation and characterization of size-controlled glioma spheroids using agarose hydrogel microwells. **PLoS ONE**, 2019.

MISHRA, D. et al. Synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles by solvothermal method. **Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces**, v. 50, n. 5, p. 628–631, 12 set. 2014.

MONTEIRO, M. V. et al. Hydrogel 3D in vitro tumor models for screening cell aggregation mediated drug response. **Biomaterials science**, v. 8, n. 7, p. 1855–1864, 7 abr. 2020.

MOTA, A. DE L. et al. Molecular characterization of breast cancer cell lines by clinical immunohistochemical markers. **Oncology Letters**, v. 13, n. 6, p. 4708, 1 jun. 2017.

MOTALN, H. et al. Heterogeneous glioblastoma cell cross-talk promotes phenotype alterations and enhanced drug resistance. **Oncotarget**, v. 6, n. 38, p. 40998, 12 dez. 2015.

MUSAH-EROJE, A.; WATSON, S. A novel 3D in vitro model of glioblastoma reveals resistance to temozolomide which was potentiated by hypoxia. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 142, n. 2, p. 231–240, 2019.

NAPOLITANO, A. P. et al. Scaffold-free three-dimensional cell culture utilizing micromolded nonadhesive hydrogels. **BioTechniques**, 2007.

NAYEEM, J. et al. Silica coating of iron oxide magnetic nanoparticles by reverse microemulsion method and their functionalization with cationic polymer P(NIPAm-co-AMPTMA) for antibacterial vancomycin immobilization. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 611, p. 125857, 20 fev. 2021.

NGO, M. T. et al. Perivascular Stromal Cells Instruct Glioblastoma Invasion, Proliferation, and Therapeutic Response within an Engineered Brain Perivascular Niche Model. **Advanced Science**, v. 9, n. 31, p. 2201888, 1 nov. 2022.

NOROUZI, M. et al. **Doxorubicin-loaded iron oxide nanoparticles for glioblastoma therapy: a combinational approach for enhanced delivery of nanoparticles**. **Scientific Reports**, 2020.

NOSRATI, H. et al. New Insight about Biocompatibility and Biodegradability of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles: Stereological and In Vivo MRI Monitor. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

NZOU, G. et al. Human Cortex Spheroid with a Functional Blood Brain Barrier for High-Throughput Neurotoxicity Screening and Disease Modeling. **Scientific Reports**, n. January, p. 1–10, 2018.

ONISHI, T. et al. Application of Magnetic Nanoparticles for Rapid Detection and In Situ Diagnosis in Clinical Oncology. **Cancers**, v. 14, n. 2, p. 364, 1 jan. 2022.

ORAIOPPOULOU, M. E. et al. A 3D tumor spheroid model for the T98G Glioblastoma cell line phenotypic characterization. **Tissue and Cell**, v. 59, n. November 2018, p. 39–43, 2019.

OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS statistical Report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012. **Neuro-Oncology**, p. v1–v75, 2015.

OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017. **Neuro-oncology**, v. 22, n. 12 Suppl 2, p. IV1–IV96, 1 out. 2020.

PALIWAL, R.; BABU, R. J.; PALAKURTHI, S. Nanomedicine Scale-up Technologies: Feasibilities and Challenges. **Ageing International**, v. 15, n. 6, p. 1527–1534, 27 nov. 2014.

PAOLILLO, M.; COMINCINI, S.; SCHINELLI, S. In Vitro Glioblastoma Models: A Journey into the Third Dimension. **Cancers 2021, Vol. 13, Page 2449**, v. 13, n. 10, p. 2449, 18 maio 2021.

PEDRON, S.; BECKA, E.; HARLEY, B. A. Spatially gradated hydrogel platform as a 3D engineered tumor microenvironment. **Advanced Materials**, 2015.

PEDRON, S.; BECKA, E.; HARLEY, B. A. C. Regulation of glioma cell phenotype in 3D matrices by hyaluronic acid. **Biomaterials**, 2013.

PENG, S. et al. Hypoxia-degradable and long-circulating zwitterionic phosphorylcholine-based nanogel for enhanced tumor drug delivery. **Acta pharmaceutica Sinica. B**, v. 11, n. 2, p. 560–571, 1 fev. 2021.

PERECIN, C. J. et al. Aqueous synthesis of magnetite nanoparticles for magnetic hyperthermia: Formation mechanism approach, high water-dispersity and stability. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 627, 20 out. 2021.

PERECIN, C. J. et al. Magnetite Nanoparticles Coated with Biodegradable Zwitterionic Polymers as Multifunctional Nanocomposites for Drug Delivery and Cancer Treatment. **ACS Applied Nano Materials**, 25 nov. 2022.

PERRIER, S. 50th Anniversary Perspective: RAFT Polymerization - A User Guide. **Macromolecules**, v. 50, n. 19, p. 7433–7447, 2017.

PETTERSON, S. A. et al. Short-term effects of radiation in glioblastoma spheroids. v. 9, n. 2, p. 576–588, 2016.

PIOTROWSKI-DASPIK, A. S. et al. Polymeric Vehicles for Nucleic Acid Delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 156, p. 119, 1 jan. 2020.

PISSUWAN, D. et al. In vitro cytotoxicity of RAFT polymers. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 2, p. 412–420, 8 fev. 2010.

POTURNAYOVÁ, A. et al. Detection of Breast Cancer Cells Using Acoustics Aptasensor Specific to HER2 Receptors. **Biosensors**, v. 9, n. 2, 1 jun. 2019.

RINOLDI, C. et al. Nanotechnology-Assisted RNA Delivery: From Nucleic Acid Therapeutics to COVID-19 Vaccines. **Small Methods**, v. 5, n. 9, p. 2100402, 1 set. 2021.

SAJID, M.; PŁOTKA-WASYLK, J. Nanoparticles: Synthesis, characteristics, and applications in analytical and other sciences. **Microchemical Journal**, v. 154, p. 104623, 1 maio 2020.

SALEH, T.; SOUDI, T.; SHOJAOSADATI, S. A. Aptamer functionalized curcumin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles for targeted delivery to HER-2 positive breast cancer cells. **International journal of biological macromolecules**, v. 130, p. 109–116, 1 jun. 2019.

SÁNCHEZ-DENGRA, B. et al. Establishment and Validation of a New Co-Culture for the Evaluation of the Permeability through the Blood–Brain Barrier in Patients with Glioblastoma. **Pharmaceutics** 2023, Vol. 15, Page 1431, v. 15, n. 5, p. 1431, 7 maio 2023.

SCHNEIDER, U. V. et al. A novel FRET pair for detection of parallel DNA triplexes by the LightCycler. **BMC Biotechnology**, v. 10, 27 jan. 2010.

SCHULZ, J. A. et al. Characterization and comparison of human glioblastoma models. **BMC Cancer**, v. 22, n. 1, p. 1–18, 1 dez. 2022.

SERVICE, R. F. **The brain chip. Science**, 2014.

SHEIKH, A.; MD, S.; KESHARWANI, P. Aptamer grafted nanoparticle as targeted therapeutic tool for the treatment of breast cancer. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 146, 1 fev. 2022.

SHERMAN, H.; ROSSI, A. E. A novel three-dimensional glioma blood-brain barrier model for high-throughput testing of tumoricidal capability. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. MAY, 2019.

SHIN, C. S. et al. Development of an in vitro 3D tumor model to study therapeutic efficiency of an anticancer drug. **Molecular Pharmaceutics**, 2013.

SNELL, C. E. et al. Proline-Hydroxylated Hypoxia-Inducible Factor 1 a (HIF-1 a) Upregulation in Human Tumours. **Plos One**, v. 9, n. 2, 2014.

SONTHEIMER-PHELPS, A.; HASSELL, B. A.; INGBER, D. E. **Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips. Nature Reviews Cancer**, 2019.

SOOD, A. et al. Multifunctional gold coated iron oxide core-shell nanoparticles stabilized using thiolated sodium alginate for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 80, p. 274–281, 1 nov. 2017.

SU, D. et al. Magnetic nanotechnologies for early cancer diagnostics with liquid biopsies: a review. **Journal of Cancer Metastasis and Treatment**, v. 6, p. 19, 10 jul. 2020.

TAKTAK, F. et al. A novel triple-responsive hydrogels based on 2-(dimethylamino) ethyl methacrylate by copolymerization with 2-(N-morpholino) ethyl methacrylate. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 39–46, 2 jan. 2015.

TANG, Y.; LIU, J.; CHEN, Y. Agarose multi-wells for tumour spheroid formation and anti-cancer drug test. **Microelectronic Engineering**, v. 158, p. 41–45, 2016.

TAVARES, R. S. N. et al. Skin Irritation Testing beyond Tissue Viability: Fucoxanthin Effects on Inflammation, Homeostasis, and Metabolism. **Pharmaceutics** 2020, Vol. 12, Page 136, v. 12, n. 2, p. 136, 5 fev. 2020.

THAKOR, A. S. et al. Clinically Approved Nanoparticle Imaging Agents. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 57, n. 12, p. 1833–1837, 2016.

THI, T. T. H. et al. The Importance of Poly(ethylene glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug Delivery and Bioconjugation. **Polymers** 2020, Vol. 12, Page 298, v. 12, n. 2, p. 298, 2 fev. 2020.

TIAN, Y. et al. Diselenide-crosslinked zwitterionic nanogels with dual redox-labile properties for controlled drug release. **Polymer Chemistry**, v. 11, n. 13, p. 2360–2369, 2020.

TOYODA, K. et al. Initial contact of glioblastoma cells with existing normal brain endothelial cells strengthen the barrier function via fibroblast growth factor 2 secretion: A new in vitro blood-brain barrier model. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 2013.

TZANKOVA, V. et al. In vitro and in vivo toxicity evaluation of cationic PDMAEMA-PCL-PDMAEMA micelles as a carrier of curcumin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 97, p. 1–10, 2016.

VAJHADIN, F. et al. MXene-based cytosensor for the detection of HER2-positive cancer cells using CoFe₂O₄@Ag magnetic nanohybrids conjugated to the HB5 aptamer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 195, p. 113626, 1 jan. 2022.

VARTY, K.; O'BRIEN, C.; IGNASZAK, A. Breast Cancer Aptamers: Current Sensing Targets, Available Aptamers, and Their Evaluation for Clinical Use in Diagnostics. **Cancers**, v. 13, n. 16, 1 ago. 2021.

VINCI, M. et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. **BMC Biology**, 2012.

WANG, C.; TONG, X.; YANG, F. Bioengineered 3D brain tumor model to elucidate the effects of matrix stiffness on glioblastoma cell behavior using peg-based hydrogels. **Molecular Pharmaceutics**, 2014.

WANG, K. et al. Specific aptamer-conjugated mesoporous silica-carbon nanoparticles for HER2-targeted chemo-photothermal combined therapy. **Acta biomaterialia**, v. 16, n. 1, p. 196–205, 2015a.

WANG, L. et al. Co-delivery of doxorubicin and siRNA for glioma therapy by a brain targeting system: Angiopep-2-modified poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. **Journal of Drug Targeting**, v. 23, n. 9, p. 832–846, 2015b.

WANG, L. et al. Cell membrane mimetic copolymer coated polydopamine nanoparticles for combined pH-sensitive drug release and near-infrared photothermal therapeutic. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 176, p. 1–8, 1 abr. 2019.

WANIGASEKARA, J. et al. Three-Dimensional (3D) in vitro cell culture protocols to enhance glioblastoma research. **PloS one**, v. 18, n. 2, 1 fev. 2023.

WEI, L. et al. Brain tumor-targeted therapy by systemic delivery of siRNA with Transferrin receptor-mediated core-shell nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 510, n. 1, p. 394–405, 2016.

WEKSLER, B.; ROMERO, I. A.; COURAUD, P. O. **The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. Fluids and Barriers of the CNSBioMed Central**, , 26 mar. 2013.

WICK, W.; KESSLER, T. New glioblastoma heterogeneity atlas — a shared resource. **Nature Reviews Neurology**, v. 14, n. 8, p. 453–454, 26 ago. 2018.

WORLD HEATH ORGANIZATION. **Cancer data**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 12 jun. 2023.

WU, K. et al. Magnetic nanoparticles in nanomedicine: A review of recent advances. **Nanotechnology**, v. 30, n. 50, 2019.

WU, W.; HE, Q.; JIANG, C. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategies. **Nanoscale Research Letters**, v. 3, n. 11, p. 397–415, 2008.

WU, W.; JIANG, C. Z.; ROY, V. A. L. L. Designed synthesis and surface engineering strategies of magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Nanoscale**, v. 8, n. 47, p. 19421–19474, 2016.

XIAO, Z.; FAROKHZAD, O. C. Aptamer-Functionalized Nanoparticles for Medical Applications: Challenges and Opportunities. **ACS nano**, v. 6, n. 5, p. 3670, 5 maio 2012.

XIE, R. et al. Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-based biodegradable nanogels for controlled drug release. **Polymer Chemistry**, v. 9, n. 36, p. 4556–4565, 2018.

XU, H. et al. A dynamic in vivo-like organotypic blood-brain barrier model to probe metastatic brain tumors. **Scientific Reports**, 2016.

YAMADA, K. M.; CUKIERMAN, E. **Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D. Cell**, 2007.

YI, H. G. et al. A bioprinted human-glioblastoma-on-a-chip for the identification of patient-specific responses to chemoradiotherapy. **Nature Biomedical Engineering**, 2019.

YU, S. et al. Enhanced gene transfection efficiency of PDMAEMA by incorporating hydrophobic hyperbranched polymer cores: effect of degree of branching. **Polymer Chemistry**, v. 3, n. 12, p. 3324–3329, 30 out. 2012.

ZHANG, M. et al. Synthesis and Characterization of Palmitoyl- block-poly(methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) Polymer Micelles for Anticancer Drug Delivery. **Biomacromolecules**, v. 23, n. 11, p. 4586–4596, 14 nov. 2022.

ZHAO, S. et al. Multifunctional magnetic iron oxide nanoparticles: An advanced platform for cancer theranostics. **Theranostics**, v. 10, n. 14, p. 6278–6309, 2020.

ZHU, C. et al. Co-delivery of siRNA and paclitaxel into cancer cells by biodegradable cationic micelles based on PDMAEMA-PCL-PDMAEMA triblock copolymers. **Biomaterials**, v. 31, n. 8, p. 2408–2416, 2010.

ZHU, N. et al. Surface Modification of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 10, 9 out. 2018a.

ZHU, X. et al. Transferrin / aptamer conjugated mesoporous ruthenium nanosystem for redox-controlled and targeted chemo-photodynamic therapy of glioma. **Acta Biomaterialia**, v. 82, p. 143–157, 2018b.

Anexos

Anexo I

Foi anexado ao presente documento o e-mail de comprovante de aceite do artigo referente ao Capítulo I desta tese, recebido da plataforma de *preprint* bioRxiv.



Cyro von Zuben de Valega Negrão <cyrovonzuben@gmail.com>

bioRxiv -- Manuscript Screened

1 mensagem

biorxiv@cshlbp.org <biorxiv@cshlbp.org>
Para: cyrovonzuben@gmail.com, sandra.dias@lnbio.cnpem.br

8 de junho de 2023 às 12:42



MS ID#: BIORXIV/2023/543859
MS TITLE: Iron Oxide Nanoparticles Coated with Biodegradable Block-Copolymer PDMAEMA-b-PMPC and Functionalized with Aptamer for HER2 Breast Cancer Cell Identification

Dear Dr. Dias,

We are pleased to inform you that the above manuscript has passed screening and will be online shortly. Processing typically completes same or next day (occasionally longer if over a weekend or a holiday).



After an article is published in a journal, **bioRxiv** will automatically update the preprint with a link to the published version. Depending on the journal, this process may take up to two weeks. Please email us at biorxiv@cshl.edu if after two weeks your preprint page does not link to the published version.

The bioRxiv team



Cold Spring Harbor Laboratory

Anexo II

Foi anexado ao presente documento o e-mail de comprovante de submissão do artigo referente ao Capítulo I desta tese pela revista *Nano Today*.

28/06/2023, 09:43

Gmail - Confirm co-authorship of submission to Nano Today



Cyro von Zubén de Valega Negrão <cyrovonzuben@gmail.com>

Confirm co-authorship of submission to Nano Today

1 mensagem

Nano Today <em@editorialmanager.com>

26 de junho de 2023 às 08:07

Responder a: Nano Today <support@elsevier.com>

Para: Cyro von Zubén de Valega Negrão <cyrovonzuben@gmail.com>

This is an automated message.

Journal: Nano Today

Title: Iron Oxide Nanoparticles Coated with Biodegradable Block-Copolymer PDMAEMA-b-PMPC and Functionalized with Aptamer for HER2 Breast Cancer Cell Identification

Corresponding Author: Ms Sandra Martha Gomes Dias

Co-Authors: Cyro von Zubén de Valega Negrão, Ph.D.; Natália Neto Pereira Cerize; Amauri da Silva Justo-Junior; Raquel Bester Liszbinski; Giovanna Pastore Meneguetti; Larissa Araújo; Silvana Aparecida Rocco; Kaliandra de Almeida Gonçalves; Daniel Reinaldo Correjo; Patrícia Leo; Caio Perecin; Douglas Adamoski

Manuscript Number: NANOTODAY-D-23-00700

Dear Cyro,

The corresponding author Ms Sandra Martha Gomes Dias has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for Nano Today.

Submission Title: Iron Oxide Nanoparticles Coated with Biodegradable Block-Copolymer PDMAEMA-b-PMPC and Functionalized with Aptamer for HER2 Breast Cancer Cell Identification

Elsevier asks all authors to verify their co-authorship by confirming agreement to publish this article if it is accepted for publication.

Please read the following statement and confirm your agreement by clicking on this link: Yes, I am affiliated.

I irrevocably authorize and grant my full consent to the corresponding author of the manuscript to: (1) enter into an exclusive publishing agreement with Elsevier on my behalf (or, if the article is to be published under a CC BY license, a non-exclusive publishing agreement), in the relevant form set out at www.elsevier.com/copyright; and (2) unless I am a US government employee, to transfer my copyright or grant an exclusive license of rights (or for CC BY articles a non-exclusive license of rights) to Elsevier as part of that publishing agreement, effective on acceptance of the article for publication. If the article is a work made for hire, I am authorized to confirm this on behalf of my employer. I agree that the copyright status selected by the corresponding author for the article if it is accepted for publication shall apply and that this agreement is subject to the governing law of the country in which the journal owner is located.

If you did not co-author this submission, please contact the corresponding author directly at sandra.dias@lnbio.cnptem.br.

Thank you,
Nano Today

More information and support

FAQ: What is copyright co-author verification?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28460/supporthub/publishing/

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub: <https://www.elsevier.com/authors>
FAQ: How can I reset a forgotten password?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/

For further assistance, please visit our customer service site: <https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. ([Remove my information/details](#)). Please contact the publication office if you have any questions.

<https://mail.google.com/mail/u/1/?ik=9645648bfa&view=pt&search=all&permthid=thread-f:1769763163350256885&simpl=msg-f:17697631633502...> 1/2

Anexo III

Foi anexado ao presente documento o e-mail de comprovante de aceite do artigo referente ao Capítulo II desta tese, recebido da plataforma de *preprint Open Science Framework* (OSF).



Confirmation of your submission to OSF Preprints
1 mensagem
openscienceframework-noreply@osf.io <openscienceframework-noreply@osf.io>
Para: cyrovonzuben@gmail.com

9 de maio de 2023 às 14:07



Hello Cyro von Zuben de Valega Negrao,

Your preprint [The Descriptive and Analytical Epidemiology of Glioblastoma Worldwide: an Informative Science Review](#) has been successfully submitted to OSF Preprints.

Now that you've shared your preprint, take advantage of more OSF features:

- Upload supplemental, materials, data, and code to an OSF project associated with your preprint. [Learn how](#)
- Preregister your next study. [Read more](#)
- Or share on social media: Tell your friends through:

Learn more about [OSF Preprints](#) or [OSF](#).

Sincerely,
The OSF team

Anexo IV

Foi anexado ao presente documento o e-mail de comprovante de que o artigo referente ao Capítulo II desta tese está em processo de revisão pela revista *Cancer Epidemiology*.



Cyro von Zubén de Valega Negrão <cyrovonzuben@gmail.com>

Fwd: Track the status of your submission to Cancer Epidemiology

1 mensagem

Natalia Neto Pereira Cerize <ncerize@ipt.br>

9 de junho de 2023 às 06:49

Para: Cyro von Zubén de Valega Negrão <cyrovonzuben@gmail.com>, "Cyro Von Zubén de Valega Negrão (FIPT)" <cyrozvn@ipt.br>

Enviado do meu iPhone

Início da mensagem encaminhada:

De: Track your Elsevier submission <no-reply@submissions.elsevier.com>

Data: 9 de junho de 2023 03:41:28 BRT

Para: Natalia Neto Pereira Cerize <ncerize@ipt.br>

Assunto: Track the status of your submission to Cancer Epidemiology

Manuscript Number: CANEP-D-23-00365

Manuscript Title: The Descriptive and Analytical Epidemiology of Glioblastoma Worldwide: an Informative Science Review

Journal: Cancer Epidemiology

Dear Natália Cerize,

Your submitted manuscript is currently under review. You can track the status of your submission in Editorial Manager, or track the review status in more detail using Track your submission here: <https://track.authorhub.elsevier.com?uuid=f6beb00c-fbb5-4f1e-a53b-13567240b79d>

This page will remain active until the peer review process for your submission is completed. You can visit the page whenever you like to check the progress of your submission. The page does not require a login, so you can also share the link with your co-authors.

If you are a WeChat user, then you can also receive status updates via WeChat. To do this please click the following link; you will be taken to Elsevier China's website where further instructions will guide you on how to give permission to have your submission's details made visible in WeChat. Note that by clicking the link no submission data is transferred to the WeChat platform. If you have any questions about using Track your submission with WeChat please visit 在线咨询 https://cn.service.elsevier.com/app/chat/chat_launch/supporthub/publishing/session/ - Journal Article Publishing 支持中心

<https://webapps.elsevier.cn/st-wechat/subscribe?signature=1686291870-29078144a9b725ba92a399ea98d1daca&uuid=f6beb00c-fbb5-4f1e-a53b-13567240b79d>

We hope you find this service useful.

Kind regards,
Journal Office of Cancer Epidemiology
Elsevier B.V.

Anexo V

Foi anexado ao presente documento a declaração de que a não infringe os dispositivos da lei nº 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Desenvolvimento de Nanopartículas Híbridas Funcionalizadas com Oligonucleotídeos para Aplicação em Câncer**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 05 de setembro de 2023

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Cyro von Zuben de Valega Negrão**
RG n.º 34.996.018-5

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Sandra Martha Gomes Dias**
RG n.º M7854719

Anexo VI

Foi anexado ao presente documento a declaração de que o trabalho não versou sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais, patrimônio genético ou temas afetos a biossegurança.



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada "**Desenvolvimento de Nanopartículas Híbridas Funcionalizadas com Oligonucleotídeos para Aplicação em Câncer**", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura:

Nome do(a) aluno(a): Cyro von Zuben de Valega Negrão

Assinatura:

Nome do(a) orientador(a): Sandra Martha Gomes Dias

Data: 05 de setembro de 2023