



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

PAULO EUZÉBIO CABRAL FILHO

**INVESTIGAÇÃO DE ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS DO SISTEMA ABO
UTILIZANDO *QUANTUM DOTS* CONJUGADOS A ANTICORPOS
MONOCLONAIS E À LECTINA *Ulex europaeus***

**Recife
2013**

PAULO EUZÉBIO CABRAL FILHO

**INVESTIGAÇÃO DE ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS DO SISTEMA ABO
UTILIZANDO *QUANTUM DOTS* CONJUGADOS A ANTICORPOS
MONOCLONAIS E À LECTINA *Ulex europaeus***

Dissertação de Mestrado apresentada à
Coordenação do Programa de Pós-graduação
em Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco, como parte dos
requisitos à obtenção do grau de Mestre em
Ciências Biológicas, área de concentração:
Biotecnologia.

Orientação: Prof^a Dr^a. Adriana Fontes

Co-orientação: Prof^a Dr^a Beate Saegesser
Santos

**Recife
2013**

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

Cabral Filho, Paulo Euzébio

Investigação de antígenos eritrocitários do sistema ABO utilizando *Quantum Dots* conjugados a anticorpos monoclonais e à lectina *Ulex europaeus* / Paulo Euzébio Cabral Filho. – Recife: O Autor, 2013.

121 f.: il., fig., tab.

Orientador: Adriana Fontes

Coorientadora: Beate Saegesser Santos

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2013.

Inclui bibliografia e anexos

1. Grupos sanguíneos 2. Eritrócitos 3. Antígenos de grupo sanguíneo 4. Lectinas I. Fontes, Adriana II. Santos, Beate Saegesser III. Título.

612.11

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-291

PAULO EUZÉBIO CABRAL FILHO

**INVESTIGAÇÃO DE ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS DO SISTEMA ABO
UTILIZANDO *QUANTUM DOTS* CONJUGADOS A ANTICORPOS
MONOCLONAIS E À LECTINA *Ulex europaeus***

Dissertação de Mestrado apresentada à
Coordenação do Programa de Pós-graduação
em Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco, como parte dos
requisitos à obtenção do grau de Mestre em
Ciências Biológicas, área de concentração:
Biotecnologia.

Aprovado em: 30 de julho de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Adriana Fontes
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas – UFPE (Presidente)

Profª Drª Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães- CPqAM/PE (Titular – Membro externo)

Profª Drª Maria Danielly Lima de Oliveira
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas – UFPE (Titular – Membro interno)

**Recife
2013**

*"Para ser grande, sê inteiro: Nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és no mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda brilha, porque alta vive."*

Fernando Pessoa

À Joselita, Joseíza, Alzira e Adriana Fontes.

Palavras são insuficientes, poucas e pequenas
para expressar tão grande amor, alegria, compreensão e gratidão.

AGRADECIMENTOS

A todos que me ajudaram nesta caminhada que termina, pois não posso deixar de agradecer aqueles que foram os responsáveis pela realização de um sonho, que agora se tornou uma realidade, ser mestre. Vocês são muito especiais e serão sempre lembrados;

À Fundação HEMOPE de Recife-PE e ao HEMOCENTRO de Campinas-SP, pelas amostras fornecidas e à FACEPE pela bolsa concedida durante o desenvolvimento dessa dissertação;

A todos os doadores que tiveram seu sangue utilizado nessa pesquisa;

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fotônica - INFo pelo apoio as viagens e por alguns equipamentos necessários ao desenvolvimento desse trabalho;

À Dr^a Valéria Pereira, Dr^a Carolina, Msc. Amanda e Dr^a Irene, pelo auxílio nas análises em citometria de fluxo no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães e no Hemocentro de Campinas.

À Msc. Heloise Fernandes, Dr^a Maria de Lourdes, Dr. André e ao Dr. Carlos Lenz pela ajuda à distância;

Ao instituto de Física da UNICAMP e aos técnicos responsáveis Msc Vitor e Dr^a Mariana pelo equipamentos pelas análises;

A todos os professores da pós-graduação;

À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Beate Saegesser, pela valiosa contribuição e também aos professores do Laboratório de Biofísica Química: Prof^a Dr^a Giovannia, Prof^a Dr^a Claudia, Prof^a Dr^a Elisa e Prof. Dr. Ricardo;

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Adriana Fontes por ter aceitado me conduzir no desenvolvimento deste trabalho e pela amizade, o carinho, a dedicação e o entendimento nas horas de fardo e dificuldades encontradas no desenvolvimento deste trabalho;

A todos do Laboratório de Biofísica Química, em especial à minha “filha-irmã-científica” Maria Isabela, por me dar o prazer de ensinar, à minha “prima-científica” e a amiga Camila Galvão pela motivação e confiança, ao Dr. Rogério Tavares e à Dr^a Luciana Melo pela atenção e carinho, e aos demais membros que não irei citar nomes, para não correr risco de esquecimento, pois todos tiveram sua parcela de contribuição neste trabalho, seja ajudando com a “mão na massa”, ou escutando meu falatório e risadas dentro do laboratório;

Aos meus tios, em especial; à Joseíza Saraiva, Joseilton Saraiva, Antônio Saraiva e José Joseli pela ajuda essencial na minha formação;

Aos meus primos, em especial a minha linda irmã Talina, e aos que moram mais próximo, que me apoiaram e conseguiram dividir o fardo de atividades, correria e dias estressados durante os dois anos de mestrando, e ao meu irmão de sangue Walberto pelo apoio incondicional;

À minha mãe, Joselita e à minha avó Alzira, os alicerces fundamentais da minha vida, das quais me orgulho, pois me apoiaram a conseguir esse pilar na minha formação de vida;

A todos os meus familiares que diretamente e indiretamente me ajudaram a conquistar mais essa vitória na minha vida;

Aos amigos da infância e juventude e a minha primeira professora, que me ensinou o “be-a-bá”, Maria Aparecida, nossa tão querida tia Cida, pois mesmo de longe puderam dar sua parcela de contribuição me impulsionando a seguir firme na caminhada de estudos e superar a separação da cidade natal;

Aos meus amigos, em especial aos amigos-irmãos Ewerton, Priscila e Rosângela pelo apoio e carinho, e aos demais amigos que me ajudam a carregar o fardo e a dividir momentos de alegrias;

Aos amigos do inglês e ao Professor Gabriel, que dividem o fardo de cansaço nas aulas e multiplicam suas alegrias, fazendo com que os problemas fossem um pouco esquecidos, meu muito obrigado;

E, sobretudo, a Deus pelo dom da vida e por ter me dado forças para conseguir subir mais um degrau na minha formação, além de colocar-me ao lado de pessoas especiais como essas;

os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Há 308 antígenos distribuídos em 30 grupos sanguíneos, sendo o sistema ABO considerado o mais importante em termos transfusionais, transplantes de órgãos e em perícia criminal. As técnicas de biologia molecular são geralmente empregadas para investigações mais detalhadas de grupos e subgrupos ABO, porém são laboriosas e podem ter um custo elevado. Por essa razão, metodologias alternativas, como as baseadas em fluorescência, vêm ganhando espaço, pois além de serem menos laboriosas, são rápidas e de alta sensibilidade, permitindo a identificação e a quantificação de biomoléculas com alta especificidade. É nesse contexto, que os *quantum dots* (QDs), por apresentarem excepcional resistência à fotodegradação e uma superfície ativa para variadas funcionalizações e conjugações, vêm se destacando como potenciais nano-sondas fluorescentes em Ciências da Vida. Assim, neste trabalho QDs de CdTe/CdS foram sintetizados e conjugados covalentemente aos anticorpos monoclonais anti-A e anti-B, bem como à lectina *Ulex europaeus* (anti-H) e aplicados no estudo de grupos e subgrupos sanguíneos do sistema ABO através de citometria de fluxo. Os estudos de bioconjugação foram realizados através de espectroscopia por correlação de fluorescência, eletroforese em gel de poliacrilamida, ensaio fluorescente em microplaca e ensaios de inibição. Após a conjugação foram investigados os antígenos de doadores A₁, B₁, A₁B₁, O e do subgrupo A (A₁, A₂, A₃, A_X, e A_{el}). O sistema QDs-(anti-A) marcou uma média de 97% das hemácias A₁, 95% de A₁B₁ e conseguiu diferenciar alguns subgrupos A tanto pelo perfil como pela eficiência de marcação (A₂ - 68%; A₃ - 11%; A_X e A_{el} - 5%). Os QDs-(anti-H) marcaram uma média de 85 % das hemácias O e mostraram-se como uma importante ferramenta complementar na análise dos subgrupos A (A₂ - 70%; A_X e A_{el} - 30%), pois nesses casos a enzima não converte toda a fucose, reconhecida pelo anti-H e presente na membrana, em antígeno A. Além disso, os QDs-(anti-B) marcaram também efetivamente as hemácias B₁ (95%) e A₁B₁ (80%). Tanto para QDs-(anti-A) quanto para QDs-(anti-B) foram utilizadas hemácias O como controle, por não apresentarem antígenos A e/ou B na membrana. Até onde sabemos este foi o primeiro estudo com citometria sobre o sistema ABO que utilizou células não fixadas, imunofluorescência direta e que correlacionou antígenos A e H na membrana das hemácias de subgrupos A. Por isso, acreditamos que esses conjugados podem ser aplicados como uma ferramenta menos laboriosa, rápida, de baixo custo, quantitativa e complementar de análise da biologia eritrocitária. Além disso, esses conjugados podem ainda ser aplicados para uma melhor compreensão da distribuição destes antígenos em células ou tecidos cancerosos e em células tronco.

Palavras-chaves: hemácias, subgrupos, CdTe *quantum dots*, bioconjugação, anticorpos monoclonais, lectinas.

ABSTRACT

There are 308 antigens distributed in 30 blood groups. Among them, the ABO is considered the most important system when topics as transfusion, organs transplantation and criminal forensics are considered. Usually, molecular biology techniques are employed in order to investigate more minutely ABO groups and subgroups, but they are laborious and can be expensive. In this way, alternative methodologies, such as those based on fluorescence, have been highlighted. They are less laborious, faster and have a high sensibility allowing biomolecules identification and quantification with high specificity. In this context, due to their exceptional resistance to photobleaching and their active surface for a variety of functionalization and conjugation, QDs have been emerged as potential fluorescent nanoprobe for life sciences. In this work, CdTe/CdS QDs were synthesized and covalently conjugated to anti-A or anti-B monoclonal antibodies, as well as to *Ulex europaeus* lectin (anti-H). The bioconjugates were characterized through fluorescence correlation spectroscopy, polyacrylamide gel electrophoresis, fluorescent microplate assay and carbohydrate inhibition assay. Then, the bioconjugates were applied in the investigation of red blood cells (RBCs) membrane antigens of A₁, B₁, A₁B₁, O donors and of A subgroups donors (A₁, A₂, A₃, A_X, and A_{el}). The QDs-(anti-A) system labeled around 97% of A₁ RBCs, 95% of A₁B₁ and was able to distinguish some A subgroups either by profile and labeling efficiency (A₂ - 68%; A₃ - 11%; A_X e A_{el} - 5%). The QDs-(anti-H) labeled an average of 85% of O RBCs and showed to be an important complementary tool for analysis of A subgroups (A₂ - 70%; A_X e A_{el} - 30%), since the fucose, recognized by anti-H, is not all converted in A antigen present on RBCs membrane. Furthermore, the QDs-(anti-B) also effectively labeled B₁ RBCs (95%) and A₁B₁ (80%). Type O RBCs were used as control for both QDs-(anti-A) and QDs-(anti-B), once these cells do not present A and/or B antigens on membrane. To our knowledge, this is the first study with flow cytometry about ABO systems, that used not fixed cells, direct immunofluorescence and correlated A and H antigens in RBCs membrane of A subgroups. Therefore, we believe that these conjugates can be applied as less laborious, fast, low cost, quantitative and complementary tool for the comprehension of the erythrocyte biology. Furthermore, these conjugates can still be applied for investigation of the distribution of these antigens in other kinds of biological systems, such as cancer cells and tissues as well as stem cells.

Keywords: Erythrocytes, Subgroups, CdTe quantum dots, bioconjugation, monoclonal antibodies, lectins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DO REFERENCIAL TEORICO

Figura 1 – Estrutura dos aminoácidos (A) Tirosina, (B) Triptofano e (C) Fenilalanina.....	24
Figura 2 – Espectros de absorção e emissão de corante orgânico.....	25
Figura 3 - Esquema da emissão de fluorescência através do diagrama de Jablonski.....	25
Figura 4 – Tabela periódica dos elementos químicos.	27
Figura 5 - Diferença na energia do <i>bandgap</i> para diferentes classes de materiais em sólidos.	28
Figura 6 - Esquema de formação de um éxciton.	28
Figura 7 - Redução do tamanho de partículas semicondutoras dentro do regime de confinamento quântico comparando os QDs ao <i>bulk</i> (cristal macroscópico) do mesmo material.	29
Figura 8 - Espectros de emissão e absorção dos QDs comparados com corante orgânico.	31
Figura 9 - Fotodegradação em função do tempo: antígenos nucleares corados com Alexa Fluor 488 e microtúbulos corados com QD 605 - CdSe (Tempos observados: 0s, 20s, 60s, 120s e 180s).....	31
Figura 10 - Imagens de localização intracelular de QDs por microscopia Eletrônica de Transmissão.....	31
Figura 11 - Esquema de síntese de QDs em meio aquoso.....	33
Figura 12 - Fórmulas estruturais dos agentes estabilizantes utilizados para obtenção de QDs: (A) Ácido mercaptoacético (AMA) ou ácido Tioglicólico, (B) ácido 3-mercaptopropiônico (AMP), (C) ácido mercaptosuccínico (AMS), (D) cisteína (CIS) e (E) cisteamina (CISTM).	33
Figura 13 - Esquema de um nanocristal de semicondutor (QD) funcionalizado para sua utilização como marcador fluorescente.	34
Figura 14 – Esquerda: esquema mostrando a conjugação específica de QDs de CdTe/CdS - AMP com anticorpo anti-A. Direita: QDs de CdTe/CdS com anticorpo anti-A interagindo com a membrana de eritrócitos que contém antígeno A.	35
Figura 15 - Esquema de QD conjugado à estreptavidina.	36
Figura 16 - Conjugação covalente de QDs, utilizando Sulfo-SMCC, a fragmentos de anticorpos por interação sulfidril-amina.....	37
Figura 17 – Esquema da conjugação covalente entre QDs carboxilados e proteínas..	38
Figura 18 - Modelo da membrana eritrocitária que carrega os grupos sangüíneos.....	39
Figura 19 - Classes de imunoglobulinas denominadas IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.	43
Figura 20 – Síntese dos antígenos do Sistema ABO.	45

Figura 21 – Esquema da diferença estrutural dos subgrupos A1 e A2.....	46
Figura 22 - Representação do monômero de UEA-I.	48
Figura 23 - Representação esquemática de um citômetro de fluxo FACSCalibur de bancada.	50
Figura 24 - Perfil de <i>dot plot</i> de sangue total lisado e hemácias (adquirido em escala logarítmica).....	51
Figura 25 – Representação esquemática de dot plots, histogramas e filtros de detecção de um citômetro de fluxo.....	53
Figura 26 - Esquema de uma eletroforese em gel para confirmação de conjugação.	55
Figura 27 – Esquema de um sistema de eletroforese capilar e de um eletroferograma.	56
Figura 28 - Caminho de uma molécula passando pelo foco do laser.	57
Figura 29 - Representação da contagem de fótons ao longo do tempo.	58
Figura 30 – Alterações do tempo de difusão de um pequeno ligante com fluoróforo ao interagir com uma proteína.....	59
Figura 31 - Esquema do processo de interação entre QD de CdTe/CdS e modelo representativo da placa de poliestireno empregada nos experimentos.....	62

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DO ARTIGO

Figure 1 - Emission and absorption (dashed line) spectra of green (left) and orange (right) QDs – Excitation at 365 nm.	83
Figure 2 - Optical characterization of QDs-bioconjugates (dashed lines) and QDs.....	84
Figure 3 - PAGE electrophoresis under UV Transiluminator.	85
Figure 4 – Normalized FCS correlation curves of bare and conjugated QDs.	86
Figure 5 - Typical flow cytometric histogram profile of RBCs when incubated with QDs conjugated to monoclonal antibodies..	88
Figure 6 - Histogram profile of RBCs when incubated with QDs-(anti-H). A ₁ and O RBCs are represented in histograms.	89
Figure 7 - Histogram profile of A ₂ , A ₃ and A _x subgroups when incubated with QDs-(anti-A)..	89
Figure 8 - Histogram profile of A ₂ and A _x subgroups when incubated with QDs-(anti-H).	91

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1 – Average percentage of ABO blood groups RBCs labeled with conjugated QDs....	87
Table 2 – Average percentage of A subgroups RBCs labeled with QDs-(anti-A).	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS DO REFERENCIAL TEÓRICO

AMA	Ácido Mercaptoacético
AMP	Ácido 3 - mercaptopropiônico
AMS	Ácido Mercaptosuccínico
anti-A	Anticorpo monoclonal A
anti-B	Anticorpo monoclonal B
anti-H	Lectina <i>Ulex europaeus</i>
BC	Banda de Condução
BFP	<i>Blue Fluorescent Protein</i>
BV	Banda de valência
CdS	Sulfeto de Cádmio
CdS/Cd(OH) ₂	Sulfeto de Cádmio passivado com Hidróxido de Cádmio
CdTe/CdS	Telureto de Cádmio passivado com Sulfeto de Cádmio
CIS	L-cisteína
CISTM	Cisteamina
CNS/MS	Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
Eg	Band Gap
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FCS	<i>Fluorescence correlation Spectroscopy</i>
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FL1	Filtro de Luminescência 1 (verde)
FL2	Filtro de Luminescência 2 (Laranja)
FL3	Filtro de Luminescência 3 (Vermelho)
FSC	<i>Forward Scatter Cells</i>
FR	Fluorescência Relativa
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G

IgM	Imunoglobulina M
ISBT	<i>International Society of Blood Transfusion</i>
Na - Te - Te - Na	Bitelureto de Sódio
NaBH ₄	Boridreto de Sódio
NP	Nanopartícula
QD	<i>Quantum Dot</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
SSC	<i>Side Scatter Cells</i>
Sulfo-NHS	N-hidroxisulfosuccinimida
Sulfo-SMCC	Sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato
TGA	Ácido-tioglicólico
TOP/TOPO	Trioctilfosfina /Óxido de Trioctilfosfina
UV / VIS	Ultravioleta visível
(v/v)	(volume/volume)
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
3D	Tridimensional

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO	19
---------------------	----

CAPÍTULO II

2. REFERENCIAL TEÓRICO:	23
-------------------------------	----

2.1 FLUORESCÊNCIA:	23
--------------------------	----

2.2 PONTOS QUÂNTICOS:	26
-----------------------------	----

2.4 GRUPOS SANGUÍNEOS:	38
------------------------------	----

2.4.1. Sistema ABO:	40
---------------------------	----

2.4.2 Subgrupos do Tipo A:	44
----------------------------------	----

2.5 LECTINAS	47
--------------------	----

2.6 CITOMETRIA	48
----------------------	----

2.7 PRINCIPAIS MÉTODOS DE CONFIRMAÇÃO DA CONJUGAÇÃO:	53
--	----

2.7.1 Eletroforese	54
--------------------------	----

2.7.2 Espectroscopia por Correlação de Fluorescência	57
--	----

2.8 ENSAIO FLUORESCENTE EM MICROPLACAS	61
--	----

REFERÊNCIAS	63
-------------------	----

CAPÍTULO III

3. OBJETIVOS:	73
---------------------	----

3.1. OBJETIVO GERAL:	73
----------------------------	----

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	73
-----------------------------------	----

CAPÍTULO IV

Artigo em preparação para ser submetido ao <i>International Journal of Nanomedicine</i>	75
---	----

CAPÍTULO V

5. CONCLUSÕES	97
---------------------	----

6. PERSPECTIVAS.....	98
-----------------------------	-----------

ANEXO I

Artigo Aceito para publicação no <i>Journal of Nanoscience and Nanotechnology</i>	100
---	-----

ANEXO II

Template para formatação do artigo a ser submetido ao <i>International Journal of Nanomedicine</i>	117
---	-----

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O sistema ABO foi descoberto em 1900 por Karl Landsteiner (LANDSTEINER, 1900) e é um dos 30 sistemas de grupos sanguíneos existentes (DANIELS, 2001). É considerado o mais importante em transfusão sanguínea e em transplantes de órgãos, além de ser o mais importante marcador, na identificação pessoal, em ciências forenses (AKI; IZUMI; HOSOI, 2012). Esse sistema possui três diferentes antígenos (A, B e/ou O(H)), sendo (H) o precursor dos demais antígenos do sistema ABO.

A fenotipagem desses antígenos é feita utilizando tubos ou colunas contendo anticorpos monoclonais (anticorpos anti-A e/ou anti-B) ou então lectinas, como a *Ulex europaeus* (anti-H). Estas técnicas são suficientes para a rotina laboratorial destinadas à transfusão sanguínea em pacientes, que nunca receberam sangue anteriormente. No entanto, transfusões recorrentes e transplantes de órgãos sólidos requerem uma maior observação e cuidado, na classificação do sistema ABO (AKI, IZUMI, HOSOI, 2012). Com essas técnicas de hemaglutinação, não é possível quantificar antígenos nas células e a identificação de alguns subgrupos pode ser imprecisa, por exemplo, para os subgrupos A₃ ou A_x (THAKRAL et al., 2005). A fenotipagem nesses subgrupos é difícil porque há uma redução do número de antígenos A e B na superfície dos eritrócitos (DANIELS, 2001). A incorreta identificação desses antígenos pode causar agravos transfusionais e levar o paciente a óbito (LUDWIG; ZILLY, 2007). Por isso, é necessário uma fenotipagem mais precisa, e em muitos casos são utilizados técnicas de biologia molecular.

A confirmação desses fenótipos fracos é realizada por análises do genótipo ABO, localizados no cromossomo 9 (HOSOI, 2008; OGASAWARA et al., 1996). Essas técnicas não dão informação a cerca do perfil de distribuição nem da quantificação de antígenos na membrana das células (SVENSSON et al, 2011), além de serem técnicas laboriosas e de alto custo.

Portanto, ainda há a necessidade de investigação de subgrupos por técnicas rápidas, específicas, reprodutíveis e de baixo custo. As técnicas baseadas em fluorescência possuem alta sensibilidade e possibilitam a identificação e quantificação de biomoléculas com alta especificidade, além de serem técnicas menos laboriosas. Na maioria dos casos os marcadores fluorescentes são corantes orgânicos citotóxicos que sofrem rápida fotodegradação. Por isso, novos métodos de análises, envolvendo nanocristais de semicondutores como sondas fluorescentes, vêm sendo utilizados em Ciências da Vida. De uma forma geral, a nanotecnologia vem cada vez mais se destacando e atuando tanto em trabalhos relacionados

ao diagnóstico e monitoramento de processos biológicos, assim como a novas formas de terapias (WANG; CHEN, 2011).

Esses nanocristais fluorescentes de semicondutores são chamados de pontos quânticos ou *quantum dots* (QDs) e têm diâmetros que variam de 2-10 nm. Eles têm sido bastante utilizados como marcadores biológicos por apresentarem algumas vantagens frente aos corantes orgânicos convencionais, tais como: possuem emissão sintonizável com o tamanho, estreito espectro de emissão, largo espectro de absorção e excepcional resistência à fotodegradação (SUKHANOVA; NABIEV, 2008; MEDINTZ et al., 2005, MICHALET; BENTOLILA; WEISS, 2005; ALIVISATOS et al., 2004).

Para um bom desempenho como marcadores, os QDs têm sido sintetizados com o objetivo de aperfeiçoar a sua fluorescência e sua estabilidade físico-química em meio aquoso. E, para que os QDs possam ser usados como sondas fluorescentes normalmente os recobrimos com moléculas orgânicas, que possam dar um direcionamento específico na sua interação com o sistema biológico. Esse adequado revestimento da superfície dos QDs com proteínas, processo denominado bioconjugação, desempenha um papel fundamental para aplicações biológicas. Uma bioconjugação eficaz proporcionará a aplicação dos QDs com alta especificidade em Ciências da Vida. No entanto, realizar uma bioconjugação efetiva, pode ser considerado um desafio, pois além dela proporcionar a aplicação dos QDs com alta especificidade em Ciências da Vida, deve preservar as características de ambos os materiais: a fluorescência dos QDs e as funções bioquímicas das biomoléculas.

Vencendo-se o desafio da bioconjugação e, tendo em vista a necessidade de metodologias alternativas, rápidas e de baixo custo, para imunofenotipagem de grupos e subgrupos ABO, a aplicação de QDs conjugados eficientemente a biomoléculas de reconhecimento, podem gerar ferramentas úteis para investigação e quantificação desses antígenos na membrana das hemácias.

Assim, neste trabalho, sintetizamos QDs de CdTe e os conjugamos covalentemente aos anticorpos monoclonais anti-A e anti-B, bem como à lectina *Ulex* anti-H. Além disso, correlacionamos os antígenos A e H na membrana das hemácias, de grupos ABO e subgrupos A (A₂, A₃, A_X e A_{el}), utilizando a técnica de citometria de fluxo.

Há alguns poucos trabalhos anteriores e recentes, que já investigaram perfil de antígenos ABO em grupos e alguns subgrupos sanguíneos por citometria de fluxo (HULT; OLSSON, 2010; AKI, IZUMI E HOSOI, 2012). No entanto, estes estudos utilizaram células fixadas e marcação indireta, com anticorpos monoclonais secundários, tornando a técnica com

custos mais elevados, além da necessidade de manipulação no escuro devido à presença dos corantes orgânicos, os quais podem sofrer fotodegradação.

Neste presente trabalho as células foram analisadas sem a utilização de agentes fixadores e com marcação direta (apenas um anticorpo ou uma lectina por vez), pois essas biomoléculas de reconhecimento, dos antígenos A, B e H, foram conjugadas diretamente aos QDs. Até onde sabemos ainda não foi investigado por técnicas de fluorescência o perfil de antígenos H em subgrupos ABO.

Portanto, os QDs conjugados aos anticorpos monoclonais anti-A, anti-B e à lectina anti-H, podem proporcionar uma metodologia complementar de análise da biologia eritrocitária contribuindo para uma maior segurança e agilidade nos exames pré-transfusionais e nos testes de biocompatibilidade relacionados a transplantes de órgãos sólidos e transfusões recorrentes.

CAPÍTULO II

2. REFERENCIAL TEÓRICO:

2.1 FLUORESCÊNCIA:

O processo de luminescência envolve duas etapas: a excitação de elétrons para níveis de energia maiores e o retorno desses elétrons para níveis de energia menores que resulta na emissão de fótons, ou seja, de luz. A luminescência pode ser classificada de acordo com o modo no qual os elétrons são excitados para geração de fótons, por exemplo: bioluminescência e quimioluminescência - os elétrons são excitados através de reações bioquímicas e químicas, tal como: a emissão de luz pelo vagalume; eletroluminescência - a excitação dos elétrons é induzida pela corrente elétrica; catodoluminescência - excitação a partir da colisão de elétrons do meio com elétrons livres originados de descargas elétricas (é o caso das lâmpadas fluorescentes); e termoluminescência - onde há liberação de elétrons presos em níveis de armadilhas pelo calor, promovendo seu decaimento (CESAR et al., 2010). Além dessas, também há a FOTOLUMINESCÊNCIA que é um dos fenômenos estudados nesse trabalho.

A fotoluminescência é um processo no qual os elétrons são excitados por fótons e quando os elétrons retornam ao estado fundamental, fótons (luz) são emitidos. A FLUORESCÊNCIA e fosforescência são processos englobados pela fotoluminescência. A fluorescência é um processo rápido que ocorre na ordem de 10^{-9} a 10^{-7} segundos, já a fosforescência é lenta, podendo durar de 10^{-3} a 100 segundos (CESAR et al., 2010). Em outras palavras, a fluorescência só ocorre enquanto a amostra estiver sendo excitada, já a fosforescência persiste por um tempo determinado depois que a excitação da amostra é finalizada.

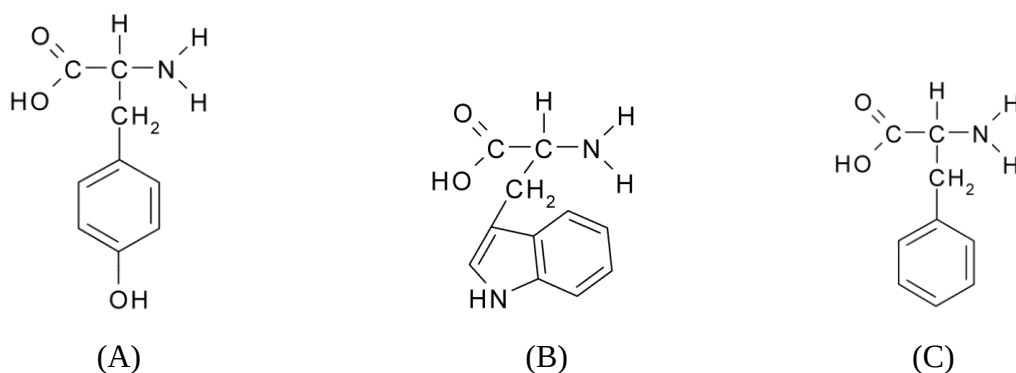
Em 1852, o físico e matemático escocês, George Stokes foi o primeiro a descrever o fenômeno da fluorescência (CESAR et al., 2010). Apesar da descoberta ter acontecido por volta de 1852, somente por volta de 1930, com a invenção dos corantes orgânicos como marcadores fluorescentes, é que a fluorescência passou a ser amplamente utilizada nas Ciências da Vida.

Quase todo tecido biológico, devido à presença dos aminoácidos aromáticos, tais como: tirosina (Figura 1 A), triptofano (Figura 1 B) e fenilalanina (Figura 1 C) é autofluorescente, pois quando excitados por luz, principalmente do UV ao verde, fluorescem

naturalmente em quase todo espectro visível (do azul ao vermelho) sem precisar da adição de substâncias exógenas.

A autofluorescência é um fenômeno indesejado em muitos casos, pois se sobrepõe à fluorescência emitida pelos fluoróforos convencionais. Por outro lado, a autofluorescência pode ser valiosa para estudos de processos celulares *in vivo*, nos quais a marcação exógena deve ser evitada (CESAR et al., 2010).

Figura 1 – Estrutura dos aminoácidos (A) Tirosina, (B) Triptofano e (C) Fenilalanina. Tirosina é um aminoácido polar neutro. Já o Triptofano e a Fenilalanina são aminoácidos apolares.



A fluorescência acontece somente se os elétrons forem excitados com luz. Essa excitação só ocorre se o comprimento de onda da luz incidente ($\lambda_{\text{incidente}}$) cair sobre um intervalo de banda chamado de banda de excitação (Figura 2) ou banda de absorção. A luz é então emitida em outro comprimento de onda ($\lambda_{\text{emissão}}$) chamado de banda de emissão (Figura 2). O deslocamento entre o máximo da excitação (absorção) e o máximo da emissão é chamado de *Stokes - shift* (Figura 2). Vale a pena ressaltar que, a banda de emissão é deslocada em relação à banda de excitação na direção de comprimentos de onda maiores (menor energia).

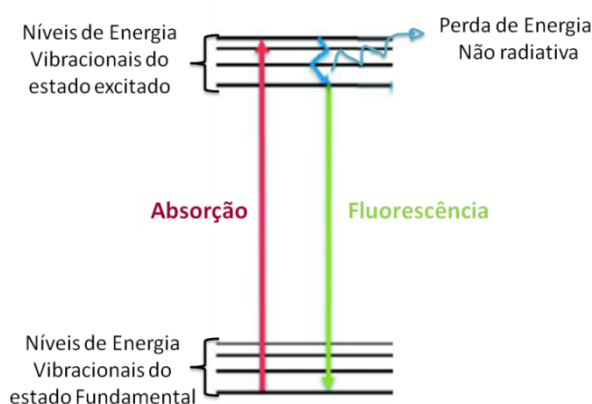
Figura 2 – Espectros de absorção e emissão de corante orgânico.



Fonte: Adaptado da Wikipédia - http://en.wikipedia.org/wiki/Stokes_shift

Para entendermos melhor o *Stokes shift* é importante visualizarmos parte do diagrama de Jablonski na Figura 3. As moléculas possuem níveis eletrônicos de energia e cada nível eletrônico possui níveis vibracionais. Quando uma molécula absorve um fóton, ganha energia e o elétron passa para um nível eletrônico e vibracional mais excitado. Então, o elétron decai para níveis vibracionais de menor energia, e posteriormente para um nível eletrônico de menor energia, liberando então esse excesso de energia na forma de fótons (LAKOVICZ, 2006; CESAR et al. 2010). No entanto, para que haja fluorescência é necessário que a transição do elétron ocorra entre níveis eletrônicos de energia, caso essa transição ocorra entre os níveis vibracionais da molécula, haverá perda de energia apenas de forma não radiativa. Portanto a diferença da energia entre o fóton emitido (menor energia) e o fóton absorvido (maior energia) é chamada de *Stokes Shift*.

Figura 3 - Esquema da emissão de fluorescência através do diagrama de Jablonski.



Fonte: Adaptado de CESAR, et al. 2010.

Análises baseadas em fluorescência têm especificidade bioquímica e alta sensibilidade. As sondas fluorescentes mais utilizadas são moléculas orgânicas, convencionalmente chamadas de corantes orgânicos. Existe atualmente uma grande diversidade desses corantes orgânicos disponíveis comercialmente. Pelo fato deles algumas vezes sozinhos não apresentarem especificidade por alguma biomolécula, muitas aplicações fazem usos destes corantes ligados a anticorpos (GIEPMANS et al., 2006).

Já nas ultimas décadas as proteínas fluorescentes vêm sendo bastante utilizadas como marcador de células e organismos. Elas são produzidas a partir de modificações genéticas, que permitem se obter imagens de células vivas e organismos, de forma não invasiva, desde que eles expressem um gene de interesse ligado a essas proteínas. Inicialmente foi descoberta, clonada e expressa a proteína fluorescente verde (GFP) da água viva, tal descoberta consagrou um prêmio Nobel de Química de 2008 a três pesquisadores americanos Osamu Shimomura, Martin Chalfie e Roger Y. Tsien (GIEPMANS et al., 2006). Já existem outras proteínas fluorescentes como a proteína fluorescente amarela (YFP), a azul (BFP), dentre outras variações (WACHTER et al. 1998).

No entanto, tanto os corantes orgânicos como as proteínas fluorescentes possuem algumas limitações. Tais como: os corantes sofrem fotodegradação e as proteínas fluorescentes necessitam de laboriosas manipulações genéticas. Por isso, há um considerável interesse no emprego de *quantum dots* como novas sondas fluorescentes para Ciências da Vida. Isso se deve ao fato deles apresentarem significativas vantagens fotofísicas em relação aos marcadores fluorescentes usados convencionalmente, o que possibilita se melhorar não só a qualidade das imagens obtidas por fluorescência, como também a compreensão de processos biológicos.

2.2 PONTOS QUÂNTICOS:

Pontos Quânticos ou *Quantum dots* (QDs) são cristais de semicondutores fluorescentes em escala nanométrica (nanocristais). Apresentam diâmetros da ordem de 1 a 10 nm, ($1\text{ nm} = 10^{-9}\text{ m}$ ou um bilionésimo do metro). QDs são constituídos de poucas centenas a poucos milhares de átomos, exibindo propriedades ópticas, que são significativamente diferentes, quando comparadas aos mesmos cristais em escala macroscópica "*bulk*" (SANTOS; FARIAS; FONTES, 2008; MICHALET; BENTOLILA; WEISS, 2008).

Os QDs podem ser feitos de vários tipos de materiais semicondutores e são referidos como sendo nanocristais dos tipos: II - VI, III - V ou IV - VI, baseado em combinações de elementos pertencentes às antigas famílias da tabela periódica (SUKHANOVA; NABIEV, 2008). Atualmente, a tabela periódica não tem subdivisão de famílias, apenas grupos de 1 a 18, no entanto, a subdivisão das famílias ainda é bastante utilizada (Figura 4). Dessa forma, nanocristais de CdTe (Telureto de Cádmio) é do tipo II-VI, pois é formado pelo Cádmio, pertencente a antiga família IIB (atual grupo 12) e o Telúrio da família VIA (atual grupo 16) (Figura 4).

Figura 4 – Tabela periódica dos elementos químicos. Em destaque os elementos das antigas Famílias IIB e VIA, atuais grupos 12 e 16, respectivamente.

Legenda:

- Metais alcalinos
- Metais alcalino-terrosos
- Metais de transição
- Lantanídeos
- Actinídeos
- Metais representativos
- Semi-metais
- Não-metais
- Halogênios
- Gases nobres
- C Sólido
- Hg Líquido
- H Gasoso
- Rf Desconhecido

Destaque em vermelho:

- Família IIB (Grupo 12): Zn, Cd, Hg
- Família VIA (Grupo 16): O, S, Se, Te, Po, Lv

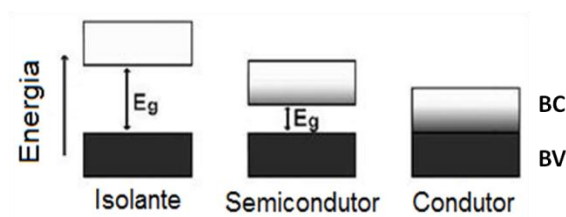
Fonte: Adaptada de Tabela periódica completa (<http://www.tabelaperiodicacompleta.com/>)

Os semicondutores são sólidos que apresentam uma banda de valência (BV) totalmente ocupada por elétrons, a qual está separada de uma banda de condução (BC) por um *band gap* de energia (Eg), Figura 5. Para que os elétrons passem da BV para a BC, eles precisam receber energias iguais ou maiores que a energia da Eg. Em semicondutores, Eg normalmente é menor que 3 eV¹, o que permite por exemplo, que luz no Ultravioleta (UV) ou visível possa ser utilizada para promover elétrons para a BC à temperatura ambiente. Por outro lado, um

¹ eV quantidade de energia cinética de um elétron quando acelerado por uma diferença de potencial elétrico de 1 Volt, no vácuo.

sólido também pode ser isolante ou condutor. Os isolantes caracterizam-se por apresentarem elevadas E_g , que à temperatura ambiente, impossibilita o elétron de passar por essa barreira de energia e chegar a BC. Já nos condutores a BV e a BC estão sobrepostas formando uma banda contínua, fazendo com que haja pouca ou nenhuma resistência à passagem dos elétrons entre as bandas (SMITH; GAO; NIE, 2004).

Figura 5 - Diferença na energia do *bandgap* para diferentes classes de materiais em sólidos.



Fonte: Adaptada de SMITH; GAO; NIE, 2004.

Quando os semicondutores recebem energia externa, por exemplo através de fótons, os elétrons da BV, a qual apresenta menor energia, passam para a BC, de maior energia, gerando um par elétron-buraco, também chamado de *éxciton*, assim como mostra a Figura 6.

Figura 6 - Esquema de formação de um *éxciton*. No qual, h^+ representa o buraco gerado na banda de valência, pela excitação do elétron e^- , $h\nu$ a energia de um fóton excitando a amostra, $E = h\nu$, h é a constante de Planck e ν é a frequência da luz.



Fonte: Adaptado de CHAVES, 2006.

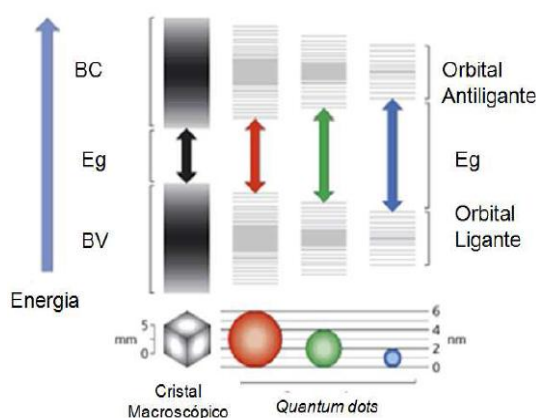
O *éxciton* formado possui uma vida de alguns nanossegundos e o processo de decaimento energético para a BV é denominado de recombinação excitônica. A recombinação dos elétrons excitados na BC com os buracos na BV dá origem à emissão característica (fluorescência) destes materiais tanto em regime macroscópico quanto nanométrico. Porém, quando em nanoescala, os elétrons e buracos sofrem um forte confinamento quântico, modificando as propriedades ópticas desses materiais.

O confinamento quântico é um fenômeno bastante importante para materiais semicondutores. No caso do semicondutor macroscópico (*bulk*), o elétron pode ocupar uma variedade de estados energéticos que estão distribuídos de modo contínuo.

Quando uma das dimensões do material torna-se fisicamente menor que o raio de Bohr² característico deste material, dizemos que essa estrutura encontra-se em confinamento quântico. Essa barreira limita o movimento dos elétrons em uma ou mais direções x, y ou z, e isso leva a uma mudança na distribuição dos estados de energia nesse material (BRUS, 1984).

Se por exemplo, limitarmos os três lados de um cubo tridimensional (3D) (ou seja, três das dimensões do material são menores que o raio de Bohr), dizemos que o movimento dos elétrons fica limitado tridimensionalmente. Nesse caso, temos um confinamento quântico em três dimensões e a formação de níveis de energia discretos, os quais podem também ser ocupados por elétrons. É nessa situação, quando o confinamento quântico é tridimensional, que temos os chamados QDs e é por essa razão que esses nanocristais também são chamados de átomos artificiais, porque apresentam estados energéticos discretos assim como os átomos (Figura 7). Assim, se, por exemplo, o raio de Bohr para o *bulk* do semicondutor CdSe (Seleneto de Cádmio) é 5,6 nm, quando o nanocristal for menor que 5,6 nm ele está em confinamento quântico e é chamado de QD.

Figura 7 - Redução do tamanho de partículas semicondutoras dentro do regime de confinamento quântico comparando os QDs ao *bulk* (cristal macroscópico) do mesmo material. Também pode-se observar que com a diminuição do tamanho das partículas aumenta-se a discretização dos níveis energéticos, aumentando o *band gap*.



Fonte: Adaptado de JONATHAN, 2003.

² Quando o semicondutor absorve um fóton, um elétron vai para a banda de condução e deixa um buraco. O par elétron-buraco pode se mover pelo material macroscópico (já que os estados são contínuos) e uma força atrativa os mantém movendo-se juntos existindo sempre uma distância média entre eles chamada raio de Bohr, em alusão ao átomo de hidrogênio. O raio de Bohr é característico de cada semicondutor e é calculado analisando o material em escala macroscópica (*bulk*).

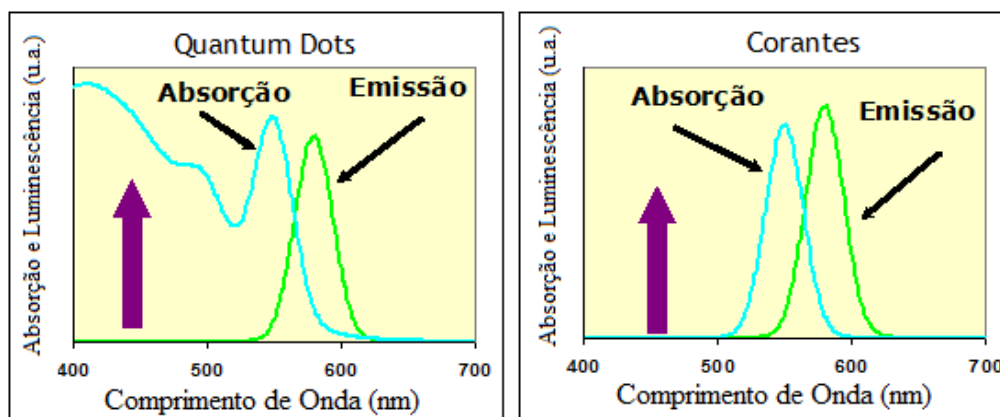
Além da discretização dos estados energéticos, o confinamento quântico também faz com que seja possível controlar em que região do espectro eletromagnético um *quantum dot* irá emitir através do controle do seu tamanho, isto é o que chamamos de sintonização do comprimento de onda de emissão em função do tamanho do nanocristal. Isto ocorre devido ao fato de que, em confinamento quântico, a E_g aumenta ou diminui de acordo com o tamanho da nanopartícula feita de um mesmo material (Figura 6).

Como $E_g \propto 1/d^2$ (onde d é o diâmetro das nanopartículas) e $E \propto 1/\lambda$ (energia E é inversamente proporcional ao comprimento de onda de emissão λ), quanto menor a partícula de um dado semiconductor, maior é a E_g e mais para a região do azul (menores comprimento de onda) é sua emissão. Enquanto para partículas maiores, menor é E_g e mais para o vermelho devem apresentar luminescência (SANTOS; FARIAS; FONTES, 2008).

Portanto, essas novas características que materiais (já bem conhecidos na escala macroscópica) adquirem quando escalonados nanometricamente é que os fazem ter grande potencial de aplicações em diferentes áreas da pesquisa, desde a microeletrônica às Ciências da Vida. Isso se deve principalmente às novas propriedades ópticas que são alcançadas controlando o tamanho desses nanomateriais (SANTOS; FARIAS; FONTES, 2008).

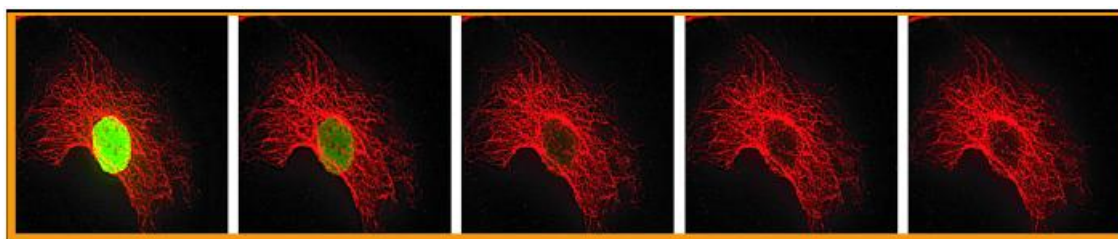
Os QDs vêm cada vez mais sendo utilizados como marcadores biológicos fluorescentes em Ciências da Vida. Isso ocorre devido ao fato destes apresentarem consideráveis vantagens em relação aos marcadores convencionais (principalmente os corantes orgânicos), tais como: (1) largo espectro de absorção, um único laser pode excitar a luminescência das nanopartículas, as quais podem (2) emitir luz em diferentes regiões do espectro variando-se apenas o tamanho da partícula (corantes orgânicos exigem mais de uma fonte de luz de excitação), como pode ser visto na Figura 8; (3) o efeito de fotodegradação da luminescência é cerca de 100 vezes menor nos QDs do que nos corantes orgânicos (isso permite que amostras com QDs sejam expostas à luz, as imagens sejam obtidas com maior intensidade de luminescência e que estudos de processos em função do tempo possam ser realizados, como podemos observar na Figura 9) e (4) os QDs são eletrodensos, permitindo localização sub-celular das nanopartículas por microscopia eletrônica de transmissão - Figura 10 (SUKHANOVA; NABIEV, 2008; MEDINTZ et al., 2005, MICHALET et al., 2005; ALIVISATOS et al., 2004).

Figura 8 - Espectros de emissão e absorção dos QDs comparados com corante orgânico. O QD por possuir um largo espectro de absorção pode ser excitado em vários comprimentos de onda, no entanto cada corante convencional necessita da excitação em comprimento de onda específico.



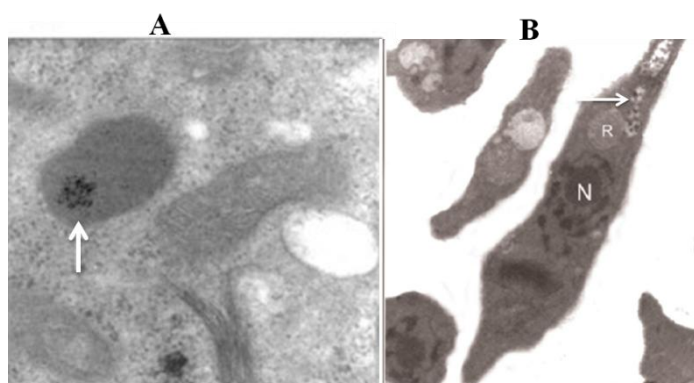
Fonte: Adaptada de FARIAS et al., 2007.

Figura 9 - Fotodegradação em função do tempo: antígenos nucleares corados com Alexa Fluor 488 e microtúbulos corados com QD 605 - CdSe (Tempos observados: 0s, 20s, 60s, 120s e 180s).



Fonte: Adaptada de ALIVISATOS, 2004.

Figura 10 - Imagens de localização intracelular de QDs por microscopia Eletrônica de Transmissão. Em (A) QDs condensados no endossoma de células epiteliais de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7), já em (B) imagens de QDs no citostoma de *Trypanosoma cruzi*.



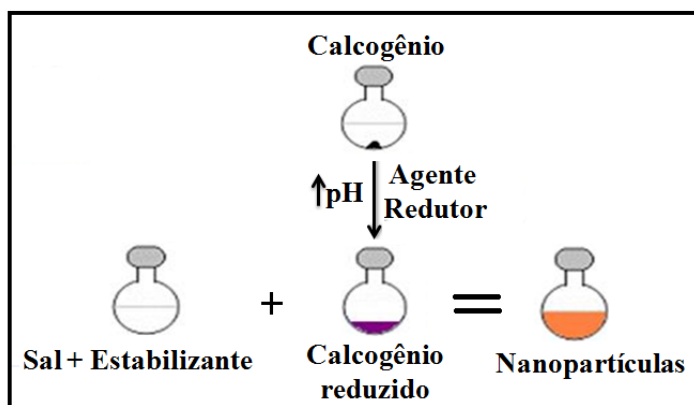
Fonte: (A) Adaptada de XIAO et al., 2010; (B) Adaptada de CHAVES et al., 2008.

A redução do volume da partícula resulta num aumento da relação área/volume, no entanto, a elevada área superficial aumenta a contribuição dos defeitos de superfície dos nanocristais (átomos da superfície do cristal que tem ligações não compartilhadas) resultando no decréscimo da eficiência da emissão de luz pelas nanopartículas.

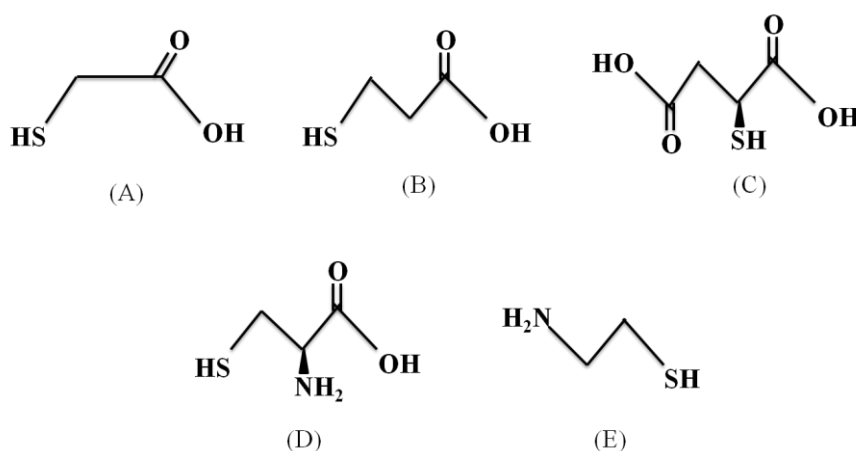
Isso ocorre porque os defeitos levam à formação de níveis intermediários entre a BV e a BC, e ao invés do elétron ir diretamente da BC para a BV, ele vai perdendo energia aos poucos nesses níveis intermediários, levando a uma baixa eficiência de luminescência. Uma maneira de contornar esses problemas é crescer uma "casca" (camada de passivação), de umas poucas camadas de átomos, de um material semiconductor com um *band gap* maior do que o do semiconductor do núcleo da nanopartícula. Esse processo da formação da "casca" é denominado passivação e as partículas resultantes apresentam uma estrutura física do tipo *core/shell* (núcleo/casca).

Os QDs são considerados coloides. Um coloide é uma mistura de pelo menos duas substâncias em fases diferentes: a fase dispersa, que pode ser sólida, líquida ou gasosa, e deve ser finamente dividida, com pelo menos uma das dimensões entre 1 μm e 1 nm; e a fase contínua, que também pode ser sólida, líquida ou gasosa e é denominada meio de dispersão. No caso dos QDs, a fase dispersa é sólida e a dispersante é líquida. Assim, os QDs são normalmente sintetizados por métodos de síntese química coloidal que são baseados numa reação de precipitação controlada feita em água ou em solventes orgânicos. Neste trabalho destacamos a síntese em água de nanopartículas de CdTe passivadas com CdS (Sulfeto de Cádmio) para produção de QDs que serão utilizados em Ciências da Vida, ou seja, são hidrofílicos e, portanto, compatíveis com os sistemas biológicos.

Simplificadamente, a síntese em água é dividida em três etapas (Figura 11). Em uma primeira etapa, é feita uma solução aquosa, em pH e temperatura controlados, contendo um sal de um metal de transição (do atual grupo 12 ou da antiga família IIB da tabela periódica) e um agente estabilizante, cujo papel é controlar o crescimento do núcleo inicial e evitar a aglomeração das nanopartículas. Numa segunda etapa (em pH alcalino, temperatura controlada e atmosfera inerte), ocorre a redução de um calcogênio através da ação de um agente redutor. Na terceira etapa, o calcogênio reduzido é então adicionado à solução da etapa 1 e a reação continua ao longo do tempo, à temperatura controlada, até que se tenha o tamanho de nanopartícula desejado (SANTOS; FARIAS; FONTES, 2008).

Figura 11 - Esquema de síntese de QDs em meio aquoso.

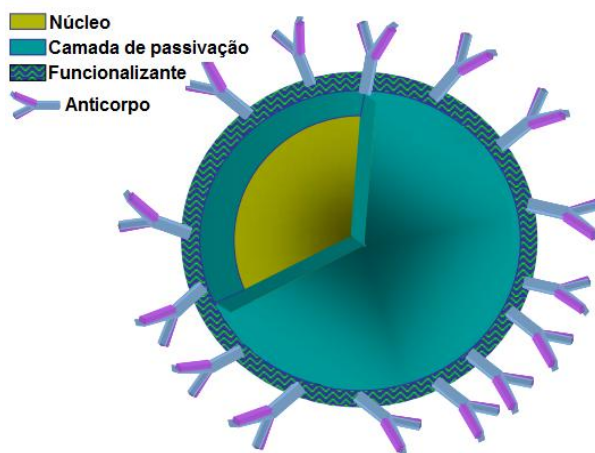
Os estabilizantes comumente utilizados em QDs coloidais apresentam grupamento tiol ($-SH$). Moléculas contendo esses grupamentos são ótimos estabilizantes de nanopartículas, pois o enxofre ajudará compor a camada de passivação e o restante da molécula conferirá cargas (positivas ou negativas) às partículas, mantendo-as afastadas em suspensão. Dentre os agentes estabilizantes mais utilizados, destacam-se; o ácido mercaptoacético (AMA) ou ácido tioglicólico (TGA), o ácido 3-mercaptopropiônico (AMP), o ácido mercaptosuccínico (AMS), a L-cisteína (CIS) e a cisteamina (CISTM) (SILVA et al., 2012; ROGACH et al., 2007; IDOWU; LAMPRECHT; NYOKONG, 2008; ZHANG et al., 2011; CHANG et al., 2012; RIBEIRO et al., 2013). Na Figura 12 podemos observar as estruturas químicas desses principais estabilizantes.

Figura 12 - Fórmulas estruturais dos agentes estabilizantes utilizados para obtenção de QDs: (A) Ácido mercaptoacético (AMA) ou ácido Tioglicólico, (B) ácido 3-mercaptopropiônico (AMP), (C) ácido mercaptosuccínico (AMS), (D) cisteína (CIS) e (E) cisteamina (CISTM).

Como podemos observar na Figura 12, além do grupamento tiol essas partículas apresentam grupamentos funcionais (ácidos carboxílicos ou aminas), que possibilitarão a ligação (ou bioconjugação) dos QDs a biomoléculas, por isso os agentes estabilizantes são também chamados de funcionalizantes.

No final, os QDs são então uma nanoestrutura complexa composta de várias camadas como pode ser visto na Figura 13, na qual: o núcleo da nanopartícula (NP) determina sua emissão, a camada de passivação determina a intensidade da emissão e, por fim, a camada orgânica, funcionalizante e mais externa, determina a sua estabilidade química e o grau de funcionalidade em relação à marcação do sistema biológico de interesse (SANTOS; FARIAS; FONTES, 2008). Podem ser efetuadas também bioconjugações dos QDs a biomoléculas, tais como albumina ou imunoglobulinas, para dar mais especificidade e direcionalidade à nanoestrutura.

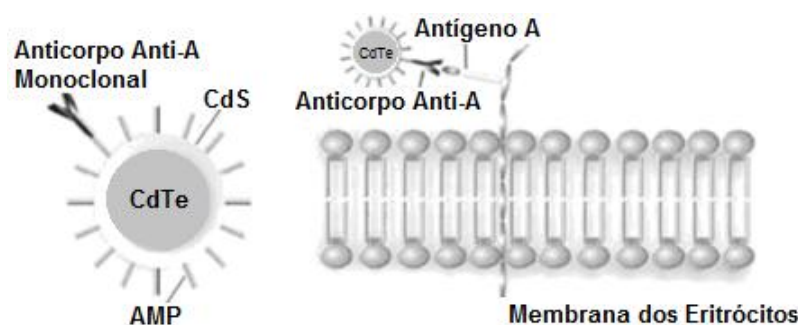
Figura 13 - Esquema de um nanocristal de semiconductor (QD) funcionalizado para sua utilização como marcador fluorescente.



Fonte: Adaptada de WALLING; NOVAK; SHEPARD, 2009.

Essas nanopartículas bioconjugadas possibilitam, por exemplo, a marcação de antígenos específicos, como os do sistema ABO, utilizando-se QDs bioconjugados a anticorpos ou lectinas (Figura 14).

Figura 14 – Esquerda: esquema mostrando a conjugação específica de QDs de CdTe/CdS - AMP com anticorpo anti-A. Direita: QDs de CdTe/CdS com anticorpo anti-A interagindo com a membrana de eritrócitos que contém antígeno A.



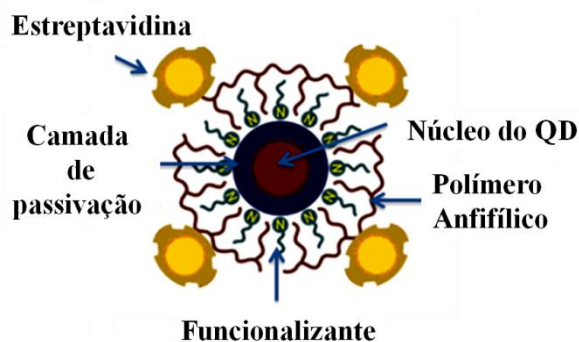
Fonte: Adaptada de SANTOS; FARIAS; FONTES, 2008.

2.3 MÉTODOS DE CONJUGAÇÃO DE QUANTUM DOTS A PROTEÍNAS:

Uma boa conjugação é aquela que mantém as propriedades fluorescentes dos QDs e as propriedades funcionais das biomoléculas. Os tipos de conjugações de QDs com biomoléculas mais conhecidos são: (1) conjugação covalente utilizando agentes de acoplamento de ordem zero, como o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e a N-hidroxisuccinimida (Sulfo-NHS) ou através de maleimidas, como o Sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (Sulfo-SMCC); (2) conjugação covalente utilizando o glutaraldeído, (3) adsorção ou ligação não covalente e, (4) a forte interação de QDs funcionalizados com moléculas de avidina ou estreptavina com a biotina (MEDINTZ et al., 2005).

A estreptavidina tem elevada afinidade pela biotina, esta por sua vez pode ligar-se a uma imunoglobulina ou proteína celular. Assim, o tipo de ligação é altamente específica, o que abre uma gama de possibilidades para possíveis aplicações dos QDs em imunomarcações, como em técnicas de imunofluorescência, possibilitando sua aplicação no diagnóstico de doenças (SANTOS; FARIAS; FONTES, 2008; STANISAVLJEVIC et al., 2013). Essa interação pode ser observada na Figura 15.

Figura 15 - Esquema de QD conjugado à estreptavidina. A estreptavidina (amarelo) pode se ligar a até 4 moléculas de biotina.



Fonte: Adaptado de SMITH et al., 2008.

Um outro mecanismo de conjugação que pode ser feito é a adsorção. O mecanismo de adsorção é baseado em atrações hidrofóbicas (Van der Waals do tipo London) e/ou por interação eletrostática, sendo portanto, um método simples, flexível e bastante utilizado atualmente. Na adsorção não há desnaturação do anticorpo como pode acontecer quando usa-se alguns agentes de acoplamento, já a avidina é uma proteína de alto custo, sendo portanto, a adsorção um método economicamente mais satisfatório, pois dispensa o uso de outras substâncias.

A adsorção passiva tem sido estudada extensivamente para imobilização de imunoglobulinas em microplacas de poliestireno e em microesferas (HERMANSON, 2008).

A adsorção passiva tem sido estudada extensivamente para imobilização de imunoglobulinas em microplacas de poliestireno e em microesferas (HERMANSON, 2008). Em muitas situações a adsorção é vantajosa, no entanto, ela é dependente da força iônica do meio, do ponto isoelétrico (pI) das proteínas e muitas vezes é irreprodutível (*Bangs Laboratories*, 2008, HERMANSON, 2008).

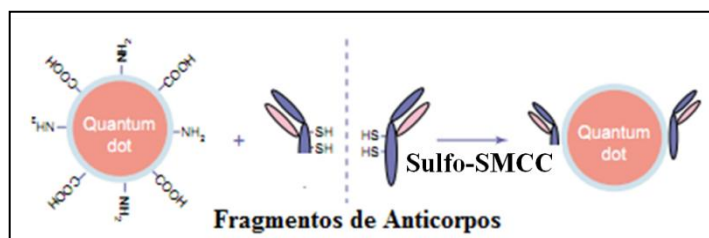
Dependendo do agente estabilizante/funcionalizante utilizado na síntese dos QDs, podem ser utilizados diferentes compostos químicos que proporcionem uma ligação covalente entre o QD e a proteína de interesse. O glutaraldeído é uma molécula que contém dois grupamentos aldeídicos, sendo um em cada uma de suas extremidades, esse fato possibilita a ligação dessa molécula à porção amina das proteínas, formando bases de Schiff³. Por possuir essa afinidade por aminas, o glutaraldeído pode ser usado como agente funcionalizante inespecífico para qualquer tipo de proteínas presente nas células. Bem como, agente de ligação de QDs à biomoléculas, que sejam capazes de se ligar especificamente a certas estruturas biológicas, como aos anticorpos por exemplo. Para estas finalidades, o glutaraldeído deve ser utilizado em concentrações menores que 1%, pois em concentrações

³ É uma estrutura lábil formada pela reação entre um grupamento aldeído e uma amina primária.

maiores pode causar fixação de estruturas biológicas, bem como, promover ligações indesejáveis ou inativar biomoléculas (MENEZES et al., 2005; MENEZES, 2006).

Para os QDs que possuem amina na sua superfície, além do glutaraldeído que, como já foi citado anteriormente, propicia uma ligação amina-amina, pode também se utilizado o Sulfo-SMCC para promover a ligação entre grupamentos amina dos QDs e com sulfidrilas da biomolécula – Figura 16 (GAO, 2005). Essa reação normalmente é feita em pH aproximado de 7,5, pois até esse pH o grupo maleidimida do Sulfo-SMCC é estável e pode propiciar a ligação entre grupamentos sulfidrilas e amina (HERMANSON, 2008). Na maioria dos casos quando se utiliza o Sulfo-SMCC é necessário utilizar um agente que exponha os grupamentos sulfidrilas das proteínas – agente redutor, sendo os mais utilizados, o ditioneitol (DTT) (TIWARI et al., 2009) ou a mercaptoetanolamina (MAHMOUD et al., 2011). No entanto Pathak em 2007 observou que essa metodologia, quando comparada ao uso da ligação pela estreptavidina, diminui significativamente a eficiência do bioconjugado. Essa diminuição da efetividade do conjugado pode ser devida à quebra dos anticorpos, gerando fragmentos menos eficientes ou que se liguem ao QD de forma inadequada (PATHAK; DAVIDSON; SILVA, 2007).

Figura 16 - Conjugação covalente de QDs, utilizando Sulfo-SMCC, a fragmentos de anticorpos por interação sulfidril-amina.



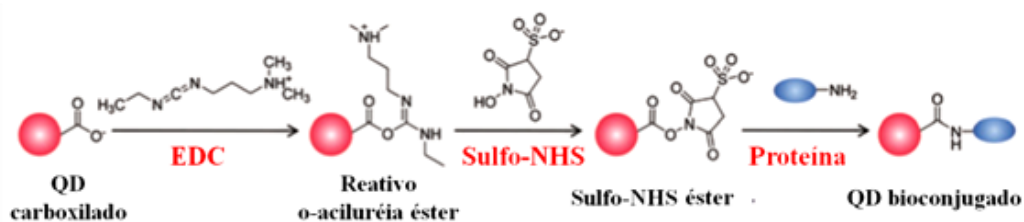
Fonte: Adaptada de GAO et al., 2005.

Outros agentes de acoplamento normalmente utilizados são: o EDC e o (Sulfo-NHS), pois possibilitam a formação de ligações amidas entre o QD e a proteína que se deseja conjugar. O EDC reage com a carboxila presente no QD formando um intermediário instável (*o*-acilisouréia), produto de um carbono do grupamento $-N=C=N-$ (carbodiimida) da molécula do EDC e o grupamento carboxilato dos QDs. A *o*-aciluréia pode rearranjar-se formando *N*-aciluréia ou hidrolisar-se em meio aquoso, essas reações são indesejáveis, pois dificilmente será obtida a ligação amida no final. Por esse motivo, a estabilização do intermediário ativo é frequentemente essencial para reações de conjugação utilizando EDC com aminas primárias (HERMANSON, 2008).

A adição do Sulfo-NHS na reação com EDC permite a formação do intermediário Sulfo-NHS éster, produto da reação entre o grupamento hidroxila do Sulfo-NHS com o complexo reativo *o*-aciluréia. Em seguida, o Sulfo-NHS éster interage com a amina primária oriunda da proteína, promovendo a formação da ligação amida e a consequente conjugação do QD à biomolécula, como pode ser observado na Figura 17. O Sulfo-NHS éster é negativamente carregado e, portanto, apresenta maior estabilidade quando comparada a *o*-aciluréia. Entretanto, é importante ressaltar que empregando reação de etapa única (apenas com EDC) ou por meio da reação com duas etapas (EDC e Sulfo-NHS), os produtos finais obtidos são os mesmos, a formação de ligações amidas estáveis. No entanto, na reação com duas etapas há um aumento do rendimento e uma melhora na cinética do processo. A ligação covalente com EDC e Sulfo-NHS permite tanto a ligação de QDs carboxilados, às aminas das proteínas, como a ligação de QDs aminados, aos grupamentos carboxilas das proteínas (HERMANSON, 2008; WANG et al., 2012). Segundo Nakajima e Ikada (1995), a formação da ligação amida ocorre com maior rendimento na faixa de pH 4-6, podendo ainda ser utilizado pH mais elevados, porém o rendimento será menor (NAKAJIMA; IKADA, 1995).

O EDC e Sulfo-NHS são os agentes de acoplamento mais utilizados. No entanto, a efetividade da conjugação não está ligada apenas a eles e as nanopartículas, mas também, as diferenças estruturais e estabilidade de cada biomolécula na suspensão, por isso são necessários protocolos de conjugação diferenciados para cada uma delas.

Figura 17 – Esquema da conjugação covalente entre QDs carboxilados e proteínas. Os QDs carboxilados podem ser ligados a proteínas ou outras moléculas, que contêm amina, usando EDC/Sulfo-NHS para formar uma ligação amida.



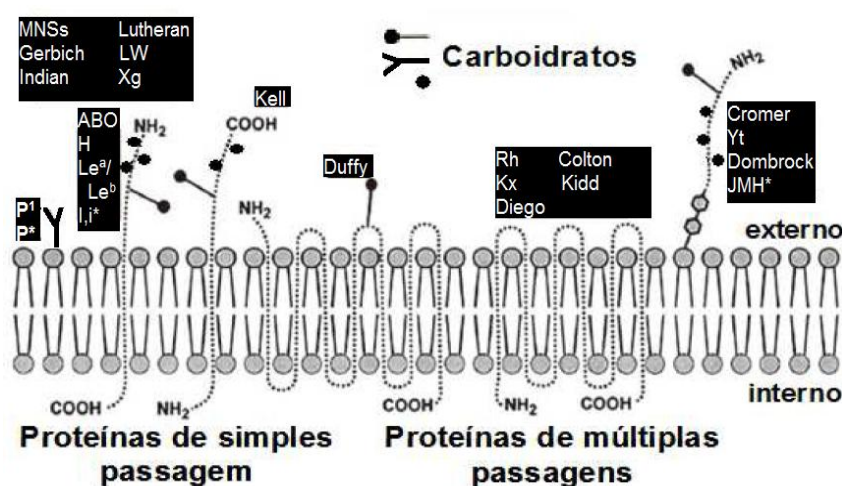
Fonte: adaptado de Wang et al., 2012.

2.4 GRUPOS SANGUÍNEOS:

A constituição da membrana eritrocitária, sua forma de mosaico fluido e os sistemas de grupos sanguíneos são testemunhos inequívocos da hereditariedade, onde a diversidade expressa na membrana eritrocitária define a identidade biológica de cada indivíduo (MURADOR; DEFFUNE, 2007).

A maioria dos antígenos eritrocitários corresponde a moléculas de carboidratos associadas a proteínas da membrana plasmática, formando as glicoproteínas, ou a moléculas de carboidratos associadas a fosfolipídios da membrana, que formam os glicolipídios (SAMPEDRO et al., 1998). A Figura 18 mostra um esquema de membrana eritrocitária na qual estão representados alguns antígenos de grupos sanguíneos.

Figura 18 - Modelo da membrana eritrocitária que carrega os grupos sanguíneos



Fonte: Adaptada de HOSOI, 2008.

De acordo com a *International Society of Blood Transfusion* (ISBT), existem 308 antígenos reconhecidos, dentre os quais, 270 estão descritos em 30 sistemas de grupos sanguíneos (DANIELS et al., 2009). A fenotipagem desses antígenos é normalmente baseada em reações de imunoaglutinação.

A identificação desses antígenos é importante, pois sua classificação é pré-requisito para transfusões sanguíneas, e até mesmo para transplantes de órgãos, pois grande parte desses antígenos está presente, não só nas hemácias, mas também em várias células do corpo. Transfusões de sangue com antígenos diferentes aos dos pacientes podem levar a sérias reações imunológicas, chamadas de incidentes transfusionais ou mais comumente de reações transfusionais, que são agravos ocorridos durante ou após a transfusão sanguínea podendo levar, até mesmo, o paciente a óbito (LUDWIG; ZILLY, 2007).

A hereditariedade dos grupos sanguíneos passada de pais para filhos, seguindo as leis da genética, foi comprovada cientificamente desde 1908. Além disso, foi provado também que alguns deles são constantes e diversos; constantes no mesmo indivíduo permanecendo do nascimento até a morte e diversos na coletividade, ou seja, um mesmo indivíduo possui vários antígenos de vários grupos sanguíneos (MURADOR; DEFFUNE, 2007).

A grande variedade de antígenos eritrocitários tem significado biológico ainda pouco compreendido. Transporte de membrana, adesão celular, atividade enzimática e participação na eritropoiese são algumas das funções atribuídas a esses antígenos na superfície das hemácias (DANIELS, 2001).

Existem várias evidências de que os grupos sanguíneos tenham um papel na susceptibilidade ou resistência a diversas doenças infecciosas e não infecciosas. Como o processo infeccioso é relacionado à ligação dos microrganismos às moléculas expressas em células hospedeiras, provavelmente os antígenos carboidratos do sistema ABO (e este associado geneticamente aos fenótipos dos sistemas Secretor e Lewis), criam um perfil polimórfico nas membranas das mucosas que é importante para alterar os receptores para bactérias e vírus (MATTOS; MOREIRA, 2004).

Alguns alelos responsáveis por esses antígenos não codificam os antígenos diretamente, pois são carboidratos e não proteínas, mas codificam enzimas chamadas glicosiltransferases, que adicionam moléculas de carboidratos às moléculas de proteínas ou de lipídios presentes na membrana celular da hemácia (DANIELS, 2001).

O conhecimento dos grupos sanguíneos tem contribuído para o entendimento de alguns dos mecanismos básicos da herança genética e a mais de um século de sua descoberta continua sendo de grande interesse prático e conceitual (DEL PEÓN-HIDALGO et al., 2002).

2.4.1. Sistema ABO:

O sistema de grupo sanguíneo ABO desde sua descoberta, em 1900 pelo cientista austríaco Karl Landsteiner, é considerado até hoje o mais importante sistema de grupo sanguíneo na medicina clínica transfusional. Karl Landsteiner, em 1900, encontrou três diferentes tipos sanguíneos (A, B e O) pelas diferenças sorológicas no sangue. Em 1902, von DeCastello e Stürli descobriram um quarto tipo, o AB (DANIELS, 2001).

Este sistema é caracterizado pela expressão de dois antígenos carboidratos (A, B e H) na membrana das hemácias, podendo ser também encontrados em várias células como: Linfócitos, células endoteliais do capilar venoso e arterial, plaquetas, células sinusoidais do baço, medula óssea, da mucosa gástrica, além de secreções e outros fluidos como saliva, urina e leite. Além disso, o sistema ABO também possui dois anticorpos plasmáticos que são produzidos após o nascimento: o anti-A e o anti-B (MATTOS; MOREIRA, 2004; HOSOI, 2008).

Os indivíduos que não apresentam um antígeno particular (A e/ou B) de grupo sanguíneo podem produzir anticorpos naturais contra antígenos ausentes. O grupo O não possui as transferases A e B, mas apresenta o antígeno H em grande quantidade na superfície das hemácias. Quando os eritrócitos do indivíduo possuem antígeno A e/ou B, os anticorpos correspondentes, anti-A e/ou anti-B, estão ausentes no soro. Por outro lado, se os antígenos A e/ou B estão ausentes na membrana eritrocitária, o soro contém o anticorpo contra o antígeno ausente. Por conseguinte, o indivíduo do tipo A terá anticorpos anti-B no soro; o indivíduo do tipo B terá anticorpos anti-A no soro; o indivíduo do tipo O terá isoanticorpos anti-A e anti-B no soro e, o indivíduo AB não apresentará isoanticorpos no soro, como podemos ver exemplificado na Tabela 1 (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2005; HOSOI, 2008). Sendo assim, se um indivíduo receber células sanguíneas que expressam o antígeno ausente, os anticorpos preexistentes se ligam a estas células transfundidas, desencadeando reações transfusionais (AMENDOEIRA, 1991).

Tabela 1 - Correlação entre o antígeno presente nas células do indivíduo e o anticorpo circulante no soro.

Grupo Sanguíneo	Antígeno Eritrocitário	Anticorpo presente no Soro
A₁	A	anti-B
B₁	B	anti-A
A₁B₁	A e B	Ausente
O	*	anti-A e anti-B

* Possui o antígeno H, o qual é a base de todos os outros antígenos. A ausência deste antígeno originou o "O" Bombay. O "O" Bombay não possui nenhum antígeno, mas o paciente possui no soro o anti-H, portanto indivíduos desse grupo sanguíneo só recebe transfusão de outro indivíduo "O" Bombay.

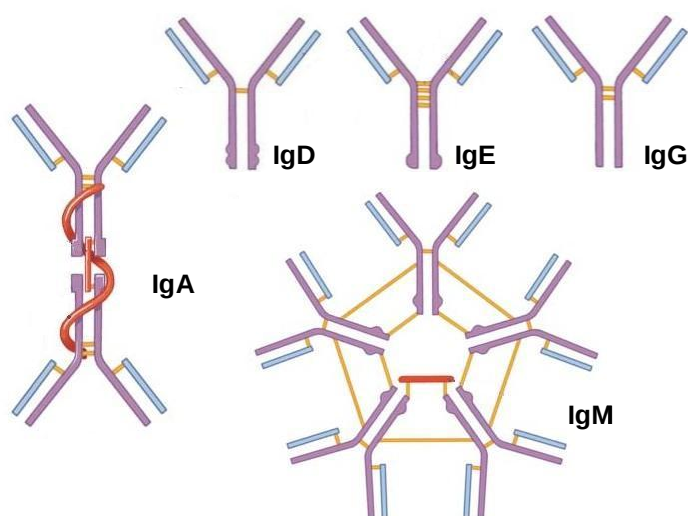
Estas reações podem provocar: hemólise imediata, mediada pelo sistema complemento; fagocitose extensiva das hemácias revestidas por anticorpos e complemento; liberação exacerbada de hemoglobina que pode chegar a níveis tóxicos para células renais; febre alta; choque; coagulação intravascular disseminada, entre outras reações (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2005; LUDWIG; ZILLY, 2007).

Ainda não está totalmente esclarecida a razão pela qual o organismo é estimulado a produzir anticorpos contra os antígenos A ou B ausentes, todavia, aparentemente existem antígenos semelhantes às estruturas ABO na natureza que de algum modo produzem sensibilização natural. A hipótese mais disseminada para a produção de anticorpos pelo organismo é a de uma reação cruzada com epítomos de antígenos expressos em bactérias, vírus, plantas e até mesmo em alimentos que possuem estrutura similar a dos antígenos A e B levando à produção destes anticorpos (RAVEL, 2005; DANIELS, 2001; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2005; HOSOI, 2008).

Os anticorpos anti-A e anti-B podem ser da classe IgM, IgG ou IgA, podendo conter as três classes em alguns soros. Indivíduos não imunizados possuem predominantemente IgM, embora IgG e IgA também possam estar presentes. Os anticorpos ABO eventualmente detectados no soro de neonatos são usualmente IgG de origem materna. Isso ocorre, pois em recém-nascidos os anticorpos predominantes são da classe IgG, estes são pequenos (Figura 19) e podem atravessar a barreira hematoplacentária. Geralmente outras classes de anticorpos, IgM por exemplo, são detectados em pequenas concentrações aos três meses de idade, e continuam aumentando até alcançar níveis de adultos, entre 5 e 10 anos (DANIELS, 2001).

Anticorpos são proteínas globulínicas chamadas Imunoglobulinas (Ig) e são divididas em classes distintas denominadas IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Toda molécula de anticorpo possui a mesma característica estrutural básica composta de duas cadeias leves e duas cadeias pesadas variando principalmente nas regiões de ligação ao antígeno. Tanto a cadeia pesada quanto a cadeia leve possuem uma região amino terminal variável, que participa do reconhecimento dos antígenos, e de regiões constantes carboxiterminais com funções efetoras. Cada anticorpo contém pelo menos dois sítios de ligação com o antígeno e podem se ligar a duas moléculas ao mesmo tempo, essa flexibilidade é conferida pela região de dobradiça (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2005)

Figura 19 - Classes de imunoglobulinas denominadas IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.



No organismo há milhões de anticorpos, estima-se que haja aproximadamente de 10^7 a 10^9 diferentes tipos, cada um com uma única sequência de aminoácidos o que gera elevada especificidade e afinidade ao antígeno. Os anticorpos possuem muitas funções efetoras, tais como: indução de neutralização tanto de micro-organismo como toxinas microbianas, opsonização de antígenos aumentando a fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpo em que há marcação pelos anticorpos aos microrganismos que serão destruídos pelo sistema imunológico natural, hipersensibilidade imediata, ativação do sistema complemento, entre outros (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2005).

Em pesquisas laboratoriais, diagnósticos clínicos e em terapia, utilizam-se anticorpos monoclonais e/ou policlonais, para a identificação de antígenos específicos expressos na membrana das hemácias, por exemplo. Normalmente esses anticorpos são adquiridos comercialmente. Os anticorpos monoclonais são produzidos por um único clone de células B (hibridomas de células B), crescidas em cultura de células. Os anticorpos produzidos desta forma reconhecerão um único epítopo no mesmo antígeno, pois possuem a mesma estrutura, especificidade e afinidade. Esta técnica de produção clonal de anticorpos foi desenvolvida por Georges Kohler e Cesar Milstein (KOHLE; MILSTEIN, 1975; LEHNINGER, 2002), que ocasionou grande avanço nas ciências biomédicas e é empregada em diferentes técnicas como cromatografia de afinidade, ELISA e imunofluorescência, devido a sua alta especificidade. Já os anticorpos policlonais são derivados de diferentes linhagens de células B. Estes são uma mistura de moléculas de imunoglobulinas secretadas contra um antígeno específico, cada uma

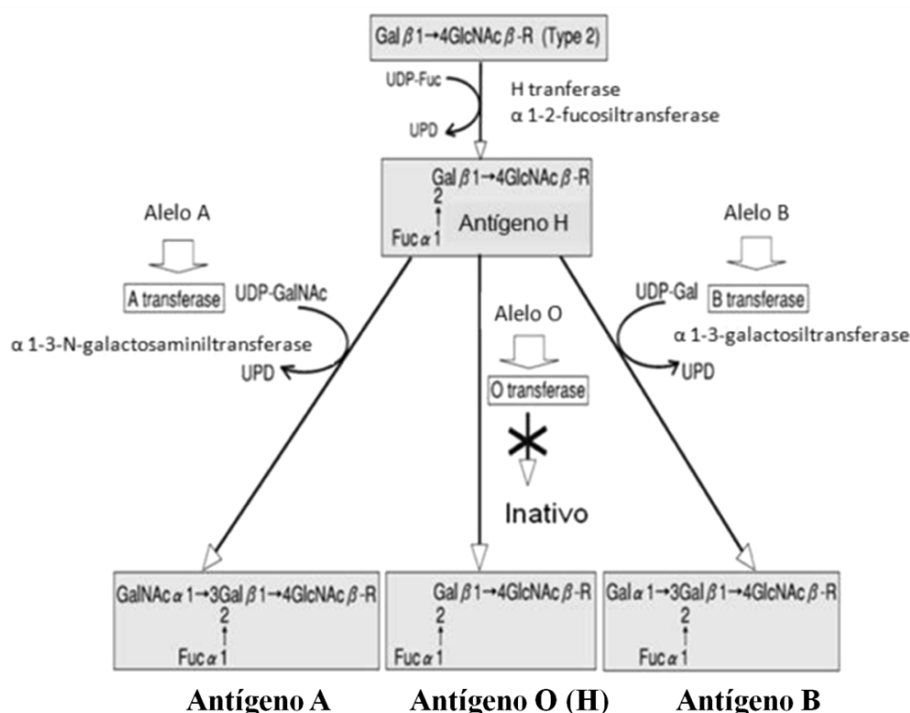
reconhecendo um epítopo diferente, por isso, são muito utilizados para detectar proteínas que possuem níveis baixos de expressão. Isso é possível, pois com o uso de policlonais um maior número de anticorpos poderão se ligar a uma única molécula de proteína aumentando o sinal de detecção.

O perfil que o sistema ABO apresenta quanto à distribuição de antígenos e presença de anticorpos naturais circulantes, gera um grande obstáculo para a transfusão sanguínea pela resposta imunológica aos antígenos expressos na membrana eritrocitária, que podem ser diferentes entre indivíduos. Uma das dificuldades, que ainda persistem, é a identificação de alguns subgrupos do sistema ABO, pois nos subgrupos a quantidade de antígenos é diminuída, podendo ocorrer erros de fenotipagem e/ou dificuldade de análise. Dentre os diversos antígenos existentes, os do sistema ABO são os que despertam maiores respostas sendo uma barreira ao sucesso de transplantes de órgãos sólidos (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2005; WITTIG et al., 2006). Além disso, os anticorpos naturais da classe IgM, anti-A e/ou anti-B, os quais podem estar presentes no soro, constituem também uma barreira nas transfusões de sangue e transplante de órgãos ABO incompatíveis (THAKRAL et al., 2005).

2.4.2 Subgrupos do Tipo A:

Os subtipos do grupo ABO são chamados de subgrupos ou variantes e são distinguidos pela redução da quantidade de antígenos A, B ou O (H) nos eritrócitos, sendo o grupo A o que tem a maior variação de subgrupos (HOSOI, 2008).

O locus ABO que é localizado no braço longo do cromossomo 9 codifica transferases específicas para formação dos açúcares N-acetil-D-galactosamina (antígeno A) e/ou D-galactose (antígeno B) a partir do antígeno H – Figura 20 (THAKRAL et al., 2005, HOSOI, 2008). Por sua vez, esse antígeno é um carboidrato produzido pela ação da enzima α -2-L-fucosiltransferase, que é codificada no locus *FUT1* do cromossomo 19 e, portanto, é geneticamente independente do locus ABO (BATISSOCO; NOVARETI, 2003)

Figura 20 – Síntese dos antígenos do Sistema ABO.

Fuc: L-Fucose; Gal: D-galactose; GalNAc: N-acetilgalactosamina;
GlcNAc: N-acetilglicosamina

Fonte: Adaptada de HOSOI, 2008.

O grupo A apresenta dois subgrupos principais: A_1 e A_2 . Aproximadamente 80% dos indivíduos do grupo A pertencem ao subgrupo A_1 e 19% ao A_2 . Apenas 1% dos indivíduos pertence aos demais subgrupos de A (RAVEL, 2005) como, A_3 , A_4 , A_5 , A_x , A_o , A_m , A_{end} , A_{bantu} , A_{lae} , A_{el} e um tipo intermediário, o A_{int} , que é uma variante do A_2 (SAMPEDRO et al., 1998). A quantidade de antígenos expressos neles diminui na seguinte ordem: $A_1 > A_2 > A_3 > A_x > A_{end} > A_m > A_{el}$, não sendo citado neste trabalho a expressão de antígenos dos subgrupos A_4 , A_5 , A_o , A_{bantu} , A_{lae} (HOSOI, 2008).

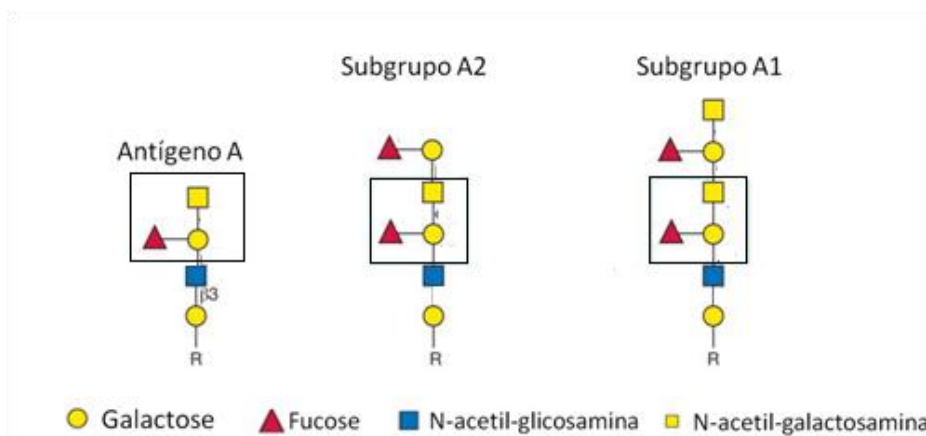
Além disso, a baixa expressão de antígenos A e B em subgrupos podem também estar associadas com condições patológicas ou fisiológicas incluindo doenças malignas hematológicas, infecções bacterianas e gravidez (HULT; OLSSON, 2010)

Sorologicamente, a distinção na fenotipagem entre A_1 e A_2 é baseada numa diferença no número e distribuição dos antígenos A na membrana da hemácia e numa diferença qualitativa de estrutura. A diferenciação entre ambas é feita mediante a utilização de anticorpos monoclonais e lectinas específicas, a *Dolichos biflorus* (anti- A_1) e a *Ulex europaeus* (anti-H) (ROSASCO; LIPPI; VALVERDE, 2001). O subtipo A_2 apresenta

deficiência da enzima N-acetil-galactosamina transferase, que insere a N-acetil-galactosamina terminal ao antígeno H, caracterizando o antígeno A.

O fenótipo A_2 , comum em caucasianos, é detectado sorologicamente por meio da capacidade dos eritrócitos aglutinarem com o soro anti-A e de não aglutinarem com a lectina anti- A_1 , ao contrário do fenótipo A_1 , cujas hemácias são aglutinadas tanto na presença do anti- A_1 como do anti-A (BATISSOCO; NOVARETTI, 2003). A lectina anti- A_1 reconhece a N-acetil- α -D-galactosamina terminal, já o anti-A reconhece o antígeno A em qualquer posição, por isso, tanto A_1 quanto A_2 aglutinam com o anticorpo monoclonal anti-A, enquanto apenas A_1 aglutina com a lectina anti- A_1 . Na Figura 21 podemos observar esquematicamente a diferença estrutural dos subgrupos A_1 e A_2 .

Figura 21 – Esquema da diferença estrutural dos subgrupos A_1 e A_2 .



Adaptada STANLEY; CUMMINGS, 2009.

O subgrupo A_{int} , mais comum na raça negra, apresenta características intermediárias entre A_1 e A_2 (ROSASCO; LIPPI; VALVERDE, 2001). Os critérios para classificar o A_{int} são controversos. Alguns grupos classificam de A_{int} aquelas células com reações fracas com *Dolichos biflorus* (anti- A_1), porém com reatividade anti-H mais forte que as A_2 , ao passo que outros classificam por sua forte reatividade com anti- A_1 e anti-H (ROSASCO; LIPPI; VALVERDE, 2001).

O fenótipo A_3 é um dos subgrupos A mais incomum, devido à reação sorológica apresentar-se como campo misto, onde uma parte das células aglutina e outra parte não aglutina na presença do anti-A (SVENSSON et al., 2011). Alguns autores relatam que ocorre uma teoria chimera ou mosaico, na qual algumas células possuem antígenos A e outras não possuem (OLSSON; CHESTER, 1996). Já Svensson e colaboradores em 2011 sugeriram que poderia ser uma causa bioquímica (ramificação de um glicolípido). No entanto, estes autores

afirmam ser necessárias análises acerca da distribuição espacial de antígenos na membrana dessas hemácias a fim de explicar a presença de campo misto nesses pacientes (SVENSSON et al., 2011).

2.5 LECTINAS

O reconhecimento entre proteínas e carboidratos é de fundamental importância em muitos processos biológicos. A variação na expressão de carboidratos nos vários processos metabólicos de reconhecimento celular possibilita o uso das lectinas como marcadores estruturais, revelando o glicocódigo de glicoconjugados em superfícies celulares (SHARON & LIZ, 2004).

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas, com um ou mais sítios por subunidade, que podem se ligar, de forma reversível, aos resíduos de açúcares específicos, através de pontes de hidrogênio e interações de Van Der Waals (LIZ & SHARON, 1998). Sistemas utilizando lectinas e moléculas luminescentes, como sondas moleculares, têm se mostrado promissores na investigação de modificações na expressão de glicoproteínas presentes na superfície da membrana celular (CASTRO, 2008).

A lectina *Ulex europaeus* agglutinin-I (UEA-I) se liga especificamente a resíduos de α -L-fucose presentes em glicoproteínas e glicolipídeos. A UEA-I é uma metaloglicoproteína homodimérica. Cada uma de suas subunidades (Figura 22) tem peso molecular de aproximadamente 27 KDa (AUDETTE et al., 2000). Em processos nos quais ocorre alteração da glicosilação alterada, resíduos terminais de fucose, aos quais a UEA-I se liga, podem ser expressos em cadeias de carboidratos seja pela adição de resíduos de fucose ou pela perda de açúcares de outros terminais (OKAZAKI et al., 2004).

Figura 22 - Representação do monômero de UEA-I.



As lectinas vêm se mostrando como preciosa ferramenta nas pesquisas bioquímicas e biomédicas devido a sua estabilidade química, fácil utilização e sua alta especificidade no reconhecimento de carboidratos distintos, associada a grande disponibilidade na natureza, sendo otimizadas em diversas aplicações biológicas (SAMÉS et al., 2001).

2.6 CITOMETRIA

A citometria de fluxo é uma técnica multiparamétrica que permite uma análise rápida, objetiva, qualitativa e quantitativa de células em suspensão (NAKAGE et al., 2005), examinando e classificando partículas microscópicas, com tamanhos de 0,2 a 150 μm , suspensas em meio líquido sob um fluxo contínuo.

Por meio de uma detecção, óptico-eletrônica, o citômetro de fluxo analisa características tanto físicas como bioquímicas de uma única célula. Assim, propriedades de interesse podem ser determinadas em populações e subpopulações de uma amostra. A análise física propicia a delimitação de uma subpopulação de interesse e é feita utilizando o sistema óptico para analisar basicamente o tamanho e a granulosidade das células. Alguns aparelhos podem realizar uma separação física das células de acordo com suas características citométricas (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999). A análise bioquímica está, assim como na microscopia, relacionada à utilização de marcadores fluorescentes, daí vem o nome FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*). Utilizando a fluorescência, quantidade e tipos de antígenos ou proteínas presentes na membrana, citoplasma ou núcleo podem ser quantificados

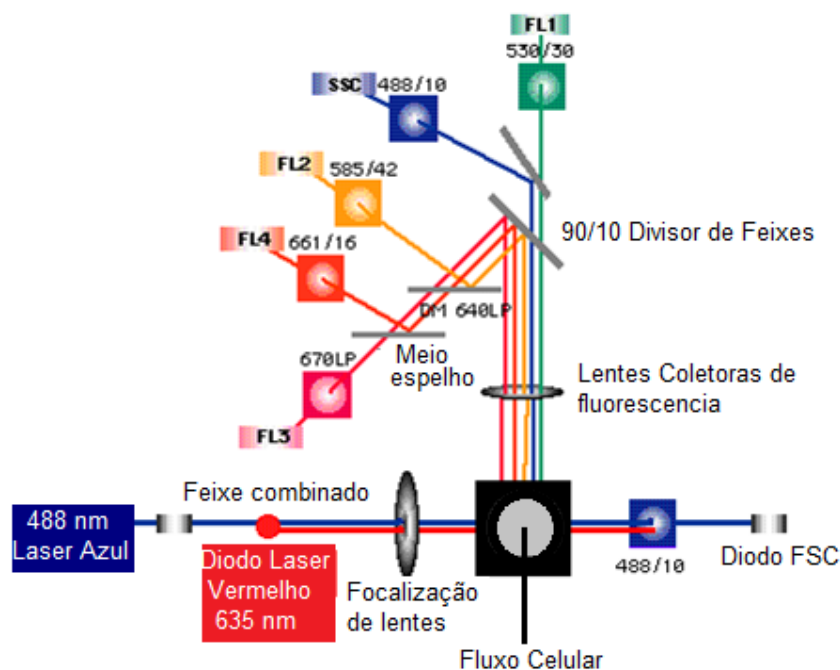
e classificados (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999; GUILHERME et al., 2008). Uma diferença básica entre microscopia de fluorescência e citometria é que a microscopia permite a localização morfológica de proteínas ou antígenos em um pequeno número de células, já a citometria não permite essa localização, mas permite uma quantificação com alta sensibilidade de um grande número de células marcadas.

A estrutura de um citômetro é composta basicamente de três diferentes sistemas físicos complementares:

- de fluxo: onde, com o auxílio de um líquido, as células são transportadas, uma a uma, na câmara de fluxo ou “*flow cell*” para que sejam posicionadas no centro de um feixe de laser;
- óptico: que consiste em um feixe de laser que ao interagir com a célula sofre espalhamento podendo gerar fluorescência. Tanto o espalhamento quanto a fluorescência são coletados por um conjunto de filtros e detectores ópticos apropriados;
- eletrônico: responsável pela conversão dos sinais ópticos detectados em sinais eletrônicos, estes são processados e analisados por sistema computacional.

A Figura 23 mostra uma representação de um citômetro FACSCalibur, por exemplo.

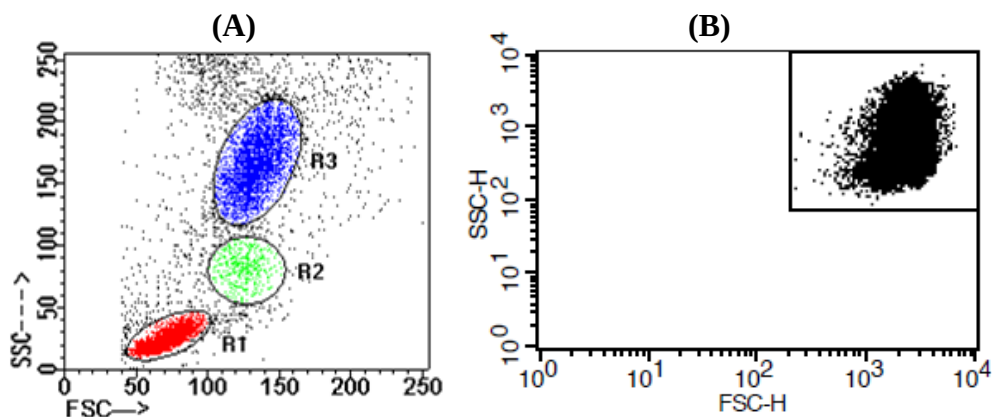
Figura 23 - Representação esquemática de um citômetro de fluxo FACSCalibur de bancada.



Fonte: Adaptado do manual da BD Biosciences, 2000.

A suspensão é introduzida por aspiração no citômetro e conduzida através de um fluxo de líquido isotônico até a câmara de fluxo. Nesse compartimento, um feixe laser incide sobre cada célula, sendo que uma parte do laser incide frontalmente ("Forward Scatter Cell" ou FSC) e outra parte é dispersa lateralmente ("Side Scatter Cell" ou SSC). A fração FSC é relativa ao tamanho da célula e a SSC representa a complexidade intracitoplasmática, que nas células sanguíneas caracteriza a granulosidade interna (CAVALCANTI JUNIOR et al., 2004). Correlacionando as medidas FSC e SSC é possível diferenciar grupos celulares em uma população de células heterogêneas e, a partir daí, selecionar um grupo ("gating") e direcionar as próximas análises para a população selecionada. Na Figura 24 A são representadas diferentes populações celulares; linfócitos (R1), monócitos (R2) e polimorfonucleares (R3), onde o eixo Y do gráfico representa a complexidade e granulosidade da célula (SSC) e o eixo X representa o tamanho da célula (FSC). As hemácias (Figura 24 B) são as células menores e menos complexas do sangue (não possuem núcleo nem grânulos intracitoplasmáticos), por isso elas são normalmente adquiridas em escala logarítmica, visto que em escala linear a população referente às hemácias fica muito próxima aos fragmentos celulares, tornando-se difícil sua identificação.

Figura 24- Perfil de *dot plot* de sangue total lisado e hemácias (adquirido em escala logarítmica). Em (A) sangue total lisado (adquirido em linearidade) mostrando as regiões características das populações celulares nos parâmetros FSC x SSC. Em R1 nós temos linfócitos, em R2 monócitos e R3 polimorfonucleares. E em (B) perfil citométrico de hemácias adquiridas em escala logarítmica.



Uma vez que uma célula ou partícula passa pelo laser, os sinais de SSC, FSC e os sinais de fluorescência são encaminhados para fotomultiplicadoras (detectores) através de um sistema de espelhos e filtros ópticos. A detecção da fluorescência de um corante particular é aprimorada através da colocação de um filtro na frente da fotomultiplicadora, o qual permite que apenas uma faixa estreita de comprimento de onda atinja o detector. Esta faixa espectral de luz está perto do pico máximo de emissão do corante fluorescente. Esses filtros são chamados *bandpass* (passa banda). Por exemplo, o filtro utilizado para o FITC (Isotiocianato de Fluoresceína) é rotulado 530/30. Este número dá as características da banda espectral transmitida: 530 ± 15 nm. Outros filtros utilizados no citômetro de fluxo são tipo *shortpass* (filtros que transmitem comprimentos de onda da luz igual ou inferior a um determinado comprimento de onda), e o filtro tipo *longpass*, (o qual transmitem comprimentos de onda igual ou superior a um determinado comprimento de onda) (BD Biosciences, 2000).

A incidência do laser sobre fluoróforos causará a emissão de luz de diferentes comprimentos de onda (por exemplo: FITC fluoresce no verde; Ficoeritrina (PE) fluoresce no laranja) que será captada por diferentes detectores/filtros (FL1, FL2, FL3 ou FL4) e a quantidade deles será dependente de cada aparelho (CAVALCANTI JUNIOR et al., 2004), gerando gráficos de resultados chamados de *dot plot* (Figura 25 A) ou histogramas (Figura 25 B).

Caso as células expressem o antígeno em estudo, elas serão detectadas pelo citômetro através da fluorescência emitida pelo marcador ligado ao anticorpo. No caso da expressão de mais que um antígeno de interesse, pode-se efetuar marcação múltipla e as células mostrarão

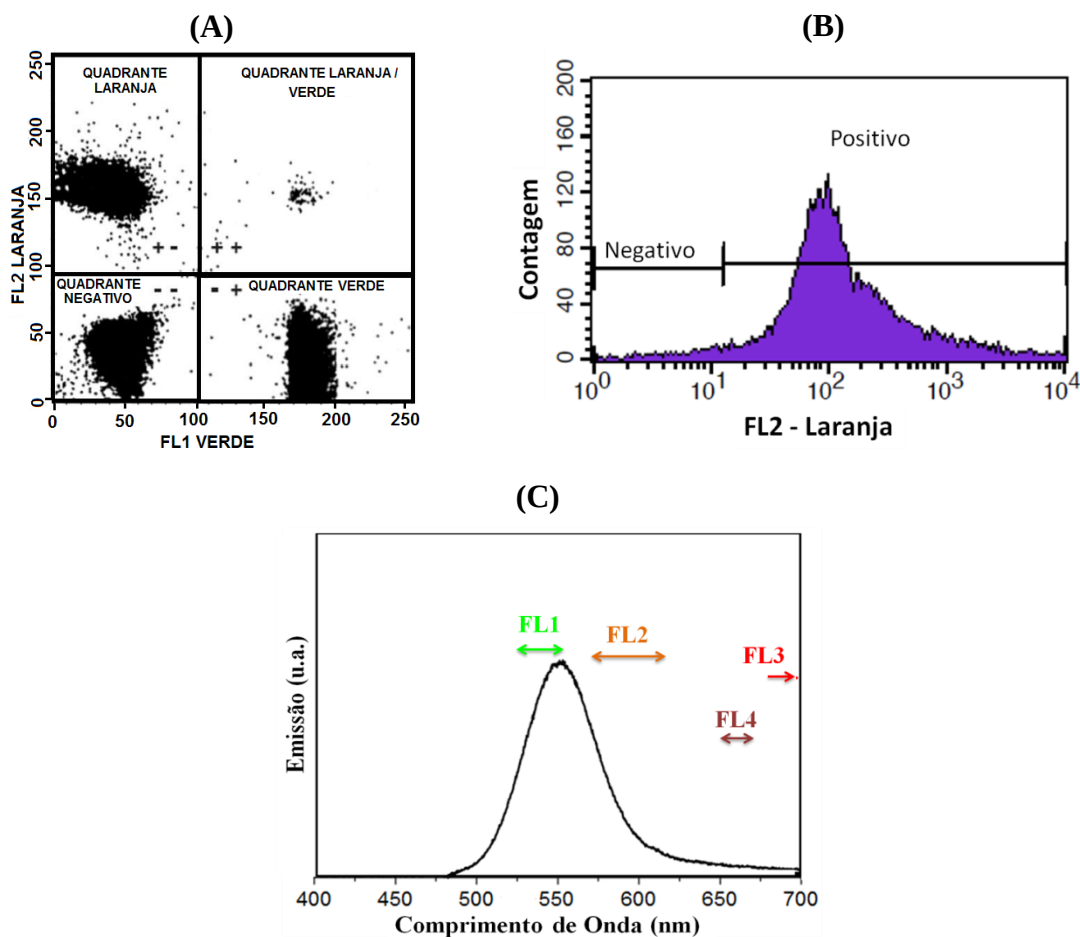
diferentes combinações de anticorpos - fluoróforos, dando o perfil multiparamétrico que a técnica possui, ou seja, várias avaliações podem ser feitas ao mesmo tempo. O *dot plot* é mais usado em casos de marcações duplas, já o histograma em análises de marcação simples – apenas um fluoróforo.

Na Figura 25 (C) pode ser observada a separação dos filtros de emissão do citômetro dependendo do comprimento de onda do fluoróforo. Neste caso da figura o fluoróforo tem emissão na região do verde, portanto o filtro ideal para coletar a fluorescência é o FL1, porém o espectro por ser um pouco largo pode-se também ser detectado um pouco de fluorescência no filtro FL2, por isso é que depende da emissão do fluoróforo a escolha do filtro, o qual deve ser utilizado no equipamento.

Devido a grande aplicabilidade da citometria, têm-se aumentado a oferta de novos equipamentos, inclusive alguns deles menores e, portáteis, que podem ser adquiridos a menores custos. Esta técnica tem sido aplicada no Brasil em diversos projetos científicos relacionados à hematologia (NAKAGE et al., 2005). Além disso, esta técnica é padrão ouro para diversas reações imunofenotípicas, como por exemplo, para investigação de subtipos de leucemia mieloide aguda utilizando corantes orgânicos associados a anticorpos específicos. Além disso, a citometria permite um rastreamento rápido de um grande número de células, e por esta técnica um número pequeno de células defeituosas pode ser detectado entre um grande número de células normais (GUILHERME et al., 2008).

Os eritrócitos podem ser analisados utilizando sangue total com anticoagulante ou com hemácias isoladas após a centrifugação. A citometria geralmente é utilizada na quantificação de reticulócitos, pesquisa de eritroparasitas e detecção de anticorpos antieritrocitários (NAKAGE et al., 2005). A técnica também é utilizada na detecção e quantificação de pequenas populações de eritrócitos com alterações genéticas, de hemácias transfundidas e de hemácias fetais em sangue materno (GARRATTY; ARNDT, 1999).

Figura 25 – Representação esquemática de dot plots, histogramas e filtros de detecção de um citômetro de fluxo. Em (A) *dot plots* mostrando em seus quatro quadrantes a positividade e negatividade de marcação para dois antígenos celulares em filtros FL1 e FL2 (verde e laranja, respectivamente) e em (B) um histograma mostrando a delimitação da positividade e negatividade de marcação para o filtro FL2, sendo a contagem em número de células. Já em (C) representação dos filtros/detectores do citômetro, dependentes do comprimento de onda de emissão.



Fonte: (A) Adaptada de GIVAN, 2001.

2.7 PRINCIPAIS MÉTODOS DE CONFIRMAÇÃO DA CONJUGAÇÃO:

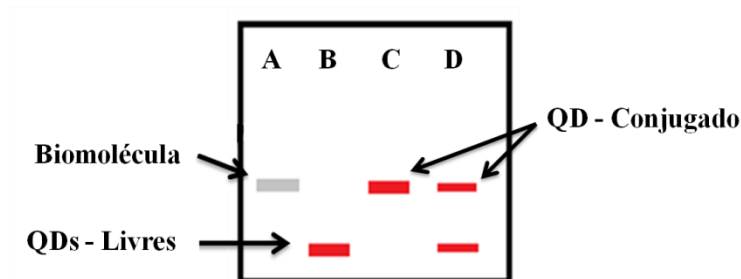
Alguns métodos de confirmação de conjugação vêm sendo rotineiramente utilizados por vários pesquisadores, dentre eles, os mais citados são: a eletroforese e a espectroscopia por correlação de fluorescência (HUANG et al., 2006; AL-JAMAL et al., 2009; SHAO et al., 2009).

2.7.1 Eletroforese

É uma técnica de separação de partículas/moléculas eletricamente carregadas, através da aplicação de uma diferença de potencial. As amostras são aplicadas em um gel, o qual deve ser escolhido de acordo com o tamanho da biomolécula para uma melhor migração e separação dos diferentes fragmentos presentes numa mesma amostra. Portanto, a separação por essa técnica se baseia tanto no tamanho da partícula/molécula, quanto pela sua carga. Esta técnica é bastante utilizada para separação e purificação de proteínas, ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) e nanopartículas (GERION et al., 2001; PARAK et al., 2002; PONS et al., 2006, RADKO; CHRAMBACH, 2005; SONG et al., 2006, LIU; LIN; WU, 2004).

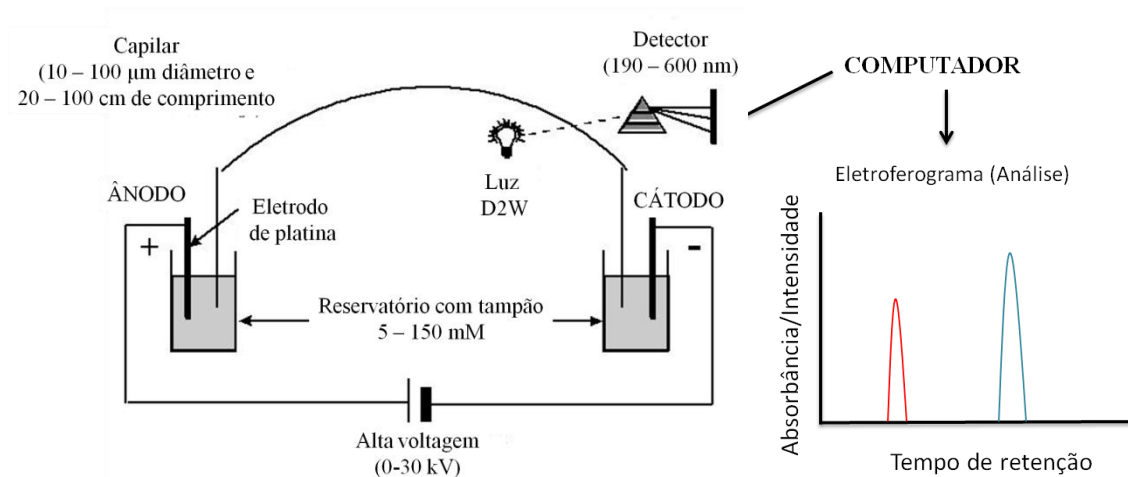
A eletroforese em gel de agarose vem sendo bastante utilizada para separação de QDs conjugados a moléculas de DNA (Parak, 2002), identificação da estabilidade de QDs sozinhos (GERION et al., 2001) e até mesmo para separação de QDs conjugados a anticorpos ou fragmentos de anticorpos (MAHMOUD et al., 2011). Por outro lado, a eletroforese em gel de poliacrilamida é indicada para separação de QDs conjugados a proteínas (PATHAK; DAVIDSON; SILVA, 2007). As eletroforeses em gel são rotineiramente utilizadas como métodos de confirmação da conjugação, pois os QDs sozinhos (Figura 26 B) apresentam migração diferenciada de quando estão conjugados aos anticorpos (Figura 26 A). Essa migração diferenciada é devido ao fato das proteínas serem maiores e mais pesadas que os QDs, e por isso, migram menos (distância) e mais lentamente no gel, enquanto os QDs sozinhos migram mais rápido. No entanto quando os QDs estão ligados às proteínas eles migrarão juntos e consequentemente formarão uma única banda no gel se a conjugação for eficiente (Figura 26 C). Por outro lado, caso essa conjugação não seja tão eficiente, além da banda correspondente a dos QDs conjugados às proteínas, aparecerá outra banda referente aos QDs não conjugados (Figura 26 D). Por isso a eletroforese pode ser também utilizada para confirmar e indicar quão eficiente será a conjugação, mesmo que apenas qualitativamente.

Figura 26 - Esquema de uma eletroforese em gel para confirmação de conjugação. Em (A) podemos observar o perfil de corrida de uma biomolécula com duas bandas e em (B) do QD. Já em (C) observamos o perfil de corrida de um QD conjugado eficientemente a uma biomolécula (sem QD livre) e em (D) um perfil de conjugação ineficiente, pois apresenta uma banda de QD livre.



Outro tipo de eletroforese, que vem sendo rotineiramente e bastante explorada pelos pesquisadores para estudo de conjugação, é a eletroforese capilar. Esta é uma ferramenta de separação e purificação interessante e versátil, devido à alta eficiência de separação e o pequeno volume de amostra (nanolitros) utilizado. A separação eletroforética, nesse caso, ocorre através da diferença de potencial elétrico aplicado nas extremidades de um capilar que conecta dois frascos contendo uma substância eletrolítica (tampão). A amostra é aplicada em um dos lados do capilar e após a aplicação de uma diferença de potencial a amostra se desloca através do tampão, e ao chegar próximo à outra extremidade são detectadas. O detector envia o sinal para um computador e os dados são apresentados como um eletroferograma, o qual se refere ao sinal detectado em função do tempo (Figura 27). Na maioria dos sistemas comerciais de eletroforese capilar o método de detecção utilizado é através da absorbância, mas também pode ser usada a fluorescência, neste último caso é interessante apenas para amostras que possuam propriedades fluorescentes, como é o caso dos QDs.

Figura 27 – Esquema de um sistema de eletroforese capilar e de um eletroferograma. O eletroferograma é a relação da absorbância/intensidade de fluorescência pelo tempo de retenção das moléculas no capilar.



Fonte: *The Swiss Laboratory for Doping Analyses* http://www.doping.chuv.ch/en/lad_home.htm

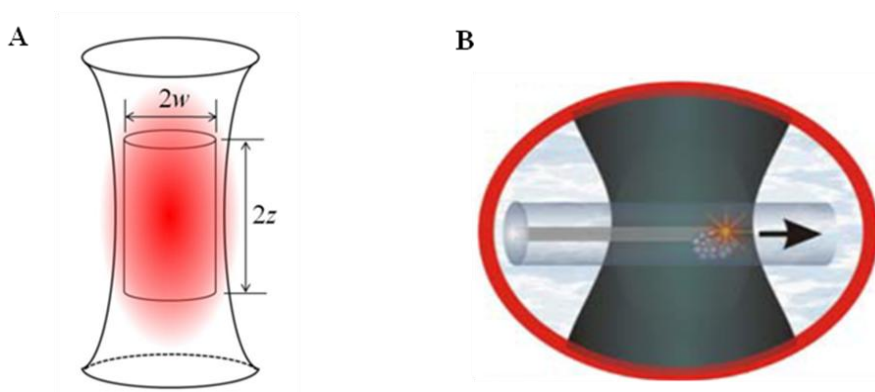
O comportamento da migração pode ser diretamente relacionado ao diâmetro de partículas e a superfície química, como o potencial zeta, a constante dielétrica e a viscosidade da solução (SCHNABEL; FISCHER; KENNDLER, 1997). Os QDs não conjugados atingem o detector em um tempo menor quando comparado aos QDs conjugados, visto que o QD conjugado tem um maior tempo de retenção no capilar, por estar ligado à proteína. Dessa forma através do eletroferograma é possível identificar os QDs conjugados dos não conjugados, se tomarmos como exemplo o eletroferograma da Figura 26 o pico vermelho (menor tempo de retenção) seria referente ao QD não conjugado e o azul (maior tempo de retenção) ao QD conjugado. Comparada à eletroforese convencional, a eletroforese capilar é bem mais sensível e há possibilidade de automação total do processo, que garante maior qualidade e rapidez de resultados. Este tipo de eletroforese vem sendo utilizada para comprovação da conjugação de QDs a diversos tipos de biomoléculas (OSZWAŁDOWSKI et al., 2010; SHI et al., 2009; VICENTE; COLO 2008; SONG et al., 2006).

A Eletroforese é uma técnica de análise de QDs bem padronizada, de baixo custo e rápida de análise. Entretanto, ainda possui algumas desvantagens, por exemplo; análise apenas qualitativa, só permite estudar biomoléculas/partículas eletricamente carregadas e analisa poucas amostras por vez, além de ser uma técnica laboriosa.

2.7.2 Espectroscopia por Correlação de Fluorescência

A técnica de espectroscopia por correlação de Fluorescência (FCS - *Fluorescence Correlation Spectroscopy*) baseia-se na propriedade fluorescente de partículas ou moléculas que passam aleatoriamente por um pequeno volume focal definido por um laser, focalizado em um ponto da amostra. No momento em que cada partícula ou molécula passa pelo foco do laser (Figura 28) gera uma flutuação da intensidade de fluorescência emitida, decorrente do movimento browniano das partículas, que passam aleatoriamente pelo volume focal de excitação (SHAO et al., 2009). Uma fotomultiplicadora detecta o sinal da fluorescência no regime de contagem de fótons, gerando em tempo real um sinal eletrônico, o qual é utilizado para construir uma curva de correlação em função do tempo (THOMAZ, 2013).

Figura 28 - Caminho de uma molécula passando pelo foco do laser.



Fonte: Schwille, 2001, adaptada.

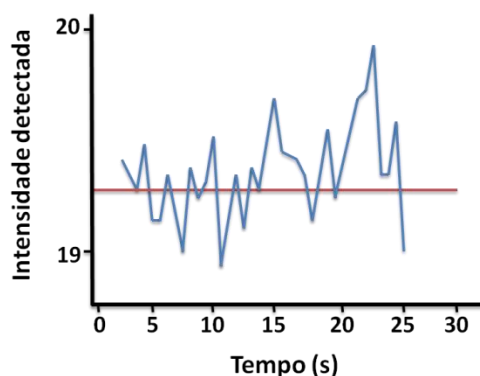
A técnica de FCS é quantitativa e pode medir a velocidade de difusão, tamanho, número de moléculas/partículas fluorescentes, além da sua interação com moléculas vizinhas (HAN et al., 2011). Foi proposta pela primeira vez em 1972 no estudo de difusão e ligação do brometo de etídio na fita dupla de DNA (MADGE; ELSON; WEBB, 1972). Tem sido utilizada, além de estudos do DNA, em imunoenaios e análises de células, podendo também ser empregada para avaliar cinética e parâmetros termodinâmicos de interações de biomoléculas (SHAO et al., 2009).

A função de autocorrelação, $G(\tau)$, de um sinal de fluorescência que varia no tempo pode ser calculada por:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad \text{Eq. 1}$$

Na qual, $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$, é a flutuação da fluorescência, $\langle \rangle$ se refere à média do sinal em um tempo t (Figura 29) e (τ) é um intervalo de tempo (tempo de atraso). A função de autocorrelação $G(\tau)$ corresponde à probabilidade de que uma molécula, a qual emite fluorescência dentro do volume de observação no tempo zero, ainda emita fluorescência dentro desse volume após um intervalo de tempo τ . Se a molécula difunde através do volume, essa probabilidade cairá ao longo do tempo, dependendo da mobilidade da molécula. Moléculas mais rápidas causarão flutuações mais rápidas, resultando em um decaimento mais rápido da $G(\tau)$.

Figura 29 - Representação da contagem de fótons ao longo do tempo. Na medida em que as moléculas/partículas fluorescentes vão passando no volume de observação faz-se o registro temporal das flutuações de fluorescência. A linha vermelha representa a fluorescência média. Intensidade detectada em milhares de contagens por segundo – kcps.

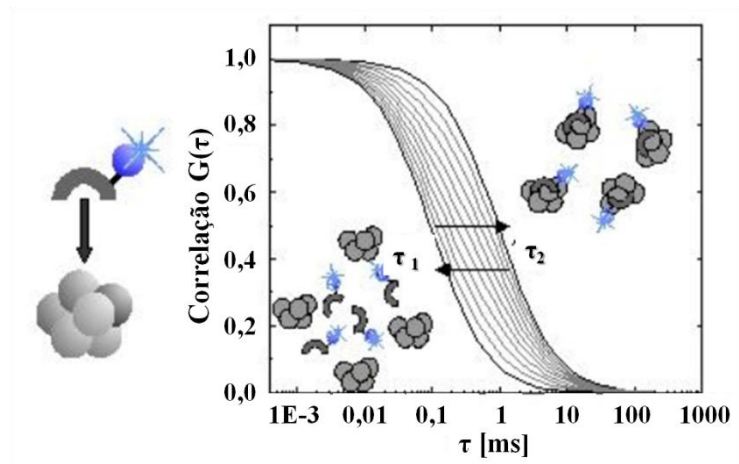


O valor da função para um intervalo de tempo que se aproxima de zero $G_{(0)}$ é proporcional à amplitude das flutuações observadas, enquanto que o tempo em que a função decai para o valor de 1 é proporcional a frequência das flutuações. Portanto, flutuações mais rápidas apresentarão decaimento em tempos menores, (τ) , acarretando em um desvio da curva para esquerda. Por outro lado, flutuações mais lentas desviarão a curva para a direita. Além disso, o tempo médio de decaimento das flutuações será equivalente ao tempo médio de permanência das moléculas no volume de observação ou o tempo médio de difusão τ_D .

Na Figura 30, podemos observar a interação de moléculas a partir do gráfico de correlação x tempo de difusão. Quando as moléculas/partículas fluorescentes passam no foco do laser apresentam um tempo de difusão médio menor (τ_{D1}) do que quando ela interage com

outra molécula (τ_{D2}). Isso ocorre porque as partículas em (τ_{D1}) são menores que em (τ_{D2}), ou seja, se o tamanho da partícula é menor o tempo de difusão é pequeno, portanto a curva será deslocada para esquerda. No entanto, se o tamanho da partícula aumenta maior será o tempo de difusão e mais para direita a curva é deslocada (SCHWILLE; HAUSTEIN, 2001).

Figura 30 – Alterações do tempo de difusão de um pequeno ligante com fluoróforo ao interagir com uma proteína.



(Adaptado de SCHWILLE; HAUSTEIN, 2001).

Através da curva de autocorrelação é possível extrair uma grande quantidade de dados de flutuações de fluorescência originados de eventos de associação/dissociação, processos fotodinâmicos e reações químicas. Mesmo que mais de um processo aconteça simultaneamente é possível separá-los ao descrever as funções de autocorrelações separadamente para cada processo (SCHWILLE; HAUSTEIN, 2001)

No trabalho de 1972, o volume focal era grande e o detector não era sensível para detectar fluorescência de um único fluoróforo. Isso explica o fato de apesar da técnica ter sido demonstrada em 1972, o número de publicações com FCS só disparou após o surgimento dos microscópios confocais com os trabalhos de Rigler et al em 1992-93 (RIGLER, 1993, RIGLER; METS, 1993). Com a utilização de microscópios confocais, a análise de diferentes amostras se tornou possível, desde soluções até células vivas. O microscópio confocal através do *pinhole* (pequena abertura, semelhante a uma íris, no detector) restringe o volume de detecção e de observação e, por isso, a análise é mais precisa.

Por ser uma técnica ultrasensível de moléculas fluorescentes, a FCS vem sendo utilizada para caracterização de QDs e bioconjugados principalmente pela medida do raio

hidrodinâmico (WANG et al., 2012; SHAO et al., 2009; MURCIA et al., 2008; DONG et al., 2006).

Se a partícula que está difundindo pelo volume focal for esférica, podemos associar a ela um raio hidrodinâmico, o qual pode ser calculado a partir da equação de Stokes-Einstein, na qual o coeficiente de difusão é inversamente proporcional ao raio hidrodinâmico (R).

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \Rightarrow R = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad \text{Eq. 2}$$

Sabemos então, que k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, η a viscosidade do meio e D o coeficiente de difusão. No entanto, podemos usar a definição do tempo de difusão médio (Eq. 3) e calcular o raio hidrodinâmico obtendo τ_D da função de autocorrelação (Eq. 1).

$$\tau_D = \frac{\omega_x^2}{D} \quad \text{Eq. 3}$$

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

Nem todas as substâncias tem coeficiente de difusão conhecido, mas ele pode ser obtido a partir de uma calibração utilizando uma substância conhecida, como por exemplo; a Rodamina (SHAO et al., 2009). Com isso, é possível obter o raio lateral ω_x a partir de τ_D , além disso, é possível obter o k , pois o k e o ω_x são constantes que dependem apenas da geometria do feixe (THOMAZ, 2013)

Vale ressaltar, que o raio hidrodinâmico não dá informações sobre o núcleo da partícula, mas sobre todas as moléculas e cargas que estão próximas à superfície dos QDs. Pelo fato dos QDs livres apresentarem raio hidrodinâmico diferente dos QDs conjugados, podemos saber através do FCS se houve ou não conjugação. Isso é possível, pois os QDs conjugados apresentam tempo de difusão médio maior que os QDs livres.

Apesar da maioria dos artigos utilizando QDs e FCS sejam apenas para caracterização e determinação do tamanho de QDs não conjugados (HEUFF; CRAMB; MARROCCO, 2008; MURCIA et al., 2008; DONG et al., 2006), artigos mais recentes como o de SHAO e colaboradores (2009), SHI e colaboradores (2009) e Wang e colaboradores (2012) utilizaram a técnica para demonstrar a conjugação de QDs a proteínas. Nestes trabalhos, a técnica foi

utilizada para demonstrar, através da curva de correlação e do raio hidrodinâmico, a conjugação de QDs a anticorpos monoclonais (SHAO et al., 2009; SHI et al. , 2009; WANG et al., 2012).

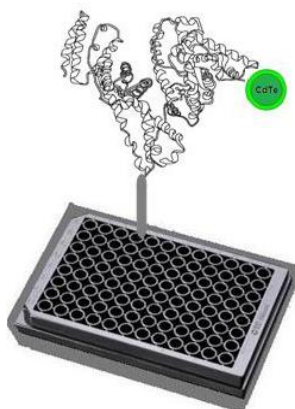
Apesar do uso de pequenas quantidades de material para análise e da sensibilidade da técnica (diferença de pequenas variações no raio hidrodinâmico), é uma técnica de alto custo, pois utilizam microscópios confocal na análise com detectores ultrasensíveis.

2.8 ENSAIO FLUORESCENTE EM MICROPLACAS

Estes métodos de confirmação de conjugação descritos anteriormente, ainda apresentam algumas desvantagens e, portanto, novos métodos de estudar a bioconjugação vêm sendo propostos a fim de complementarem as análises, assim como o estudo da conjugação através do ENSAIO FLUORESCENTE EM MICROPLACAS, proposto nesse trabalho. Esse método é baseado na leitura da fluorescência utilizando-se microplacas de poliestireno, que possuem afinidades por proteínas/anticorpos, para confirmação da bioconjugação.

Através de um fluorímetro de placa é feita a detecção da fluorescência nativa dos QDs conjugados. Como a placa tem afinidade por proteínas/anticorpos, se o QD estiver associado ao anticorpo, este ficará ligado à placa e o sinal de fluorescência será detectado e, caso ele não esteja ligado não haverá sinal – os QDs e os anticorpos não conjugados são os controles negativos, pois os QDs sozinhos não se ligam a placa e serão retirados durante a lavagem, já os anticorpos sem QDs não devem fluorescer (Figura 31).

Figura 31 - Esquema do processo de interação entre QD de CdTe/CdS e modelo representativo da placa de poliestireno empregada nos experimentos.



Fonte: CARVALHO, 2010.

Este método apresenta algumas vantagens frente a outros métodos convencionalmente utilizados. Pois é possível analisar vários tipos de amostras simultaneamente, como: QDs conjugados a diferentes tipos de proteínas. É uma técnica de análise semiquantitativa, reprodutível, mais rápida (cerca de aproximadamente duas horas e meia, da montagem até a leitura) e simples, quando comparada à eletroforese em gel convencional. Além disso, pode dar informações a cerca da eficiência de conjugação, o que não é possível com a FCS.

Para a confirmação da conjugação, os conjugados devem apresentar pelo menos 100% de aumento da intensidade relativa de fluorescência quando comparados aos valores médios dos controles. Esse valor foi adotado, pois para valores de conjugados acima ou igual a 100% de intensidade relativa de fluorescência foi observada marcação específica de células, diferentemente de valores menores que não foi observada marcação de células. Para o cálculo do aumento da intensidade de fluorescência, foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{Fluorescência relativa (FR) (\%)} = \frac{(\text{Fluorescência do bioconjugado} - \text{Fluorescência dos controles})}{\text{Fluorescência do controle}} \times 100$$

Eq. 5

Onde *fluorescência do bioconjugado* corresponde à intensidade de fluorescência emitida pelo conjugado e *fluorescência dos controles* corresponde à média da fluorescência emitida pelos controles (QDs e biomolécula, sozinhos). No ANEXO 1 encontra-se o artigo referente ao método com maiores detalhes.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. *Imunologia celular e molecular*. 5. ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 580 p., 2005.

AKI, K.; IZUMI, A.; HOSOI, E. The evaluation of histo-blood group ABO typing by flow cytometric and PCR-amplification of specific alleles analyses and their application in clinical laboratories. *The journal of medical investigation*, v. 59(1-2), p. 143–51, 2012.

ALIVISATOS, P. et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science*, v. 281, p. 2013-2016, 1998.

ALIVISATOS, P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nature Biotechnology* 22, p. 47-42, 2004.

AL-JAMAL, W. T. et al. Blood Circulation and Tissue Biodistribution of Lipid-Quantum Dot (L-QD) Hybrid Vesicles Intravenously Administered in Mice. *Bioconjugate Chem*, v. 20, p. 1696–1702, 2009.

AMENDOEIRA, M. R. R. Leishmaniose visceral: avaliação dos fatores de risco genético (sistema HLA e sistema sangüíneo ABC-RH) - aspectos imunológicos e outros fatores de risco. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (GENÉTICA). Doutorado, 244p, 1991.

AUDETTE, G.F; VANDONSELAAR, M.; DELBAERE, L.T.J. The 2.2 Å resolution structure of the O(H)-blood-group-specific lectin from *Ulex europaeus*. *Journal of Molecular biology*., v.304, p. 423-433, 2000.

BANGS LABORATORIES, Inc. Adsorption to Microspheres, *techNote* v. 204, p 1- 6, 2008.

BD Bioscience. Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide, manual Part Number 11-11032-01, 2000.

BRUS, L. E. Electron–electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state. *Journal Chemical Physics*, v. 80 (9), p. 4403, 1984.

BATISSOCO, A. C.; NOVARETTI, M. C. Z. Aspectos moleculares do Sistema Sangüíneo ABO. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. [online]. v. 25 (1), p. 47-58, 2003.

CARVALHO, K. H. G. Bioconjugados de nanopartículas semicondutoras fluorescentes de CdTe/CdS com albumina sérica bovina: síntese e caracterização – Recife, Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 59p. 2010.

CASTRO, L.B.R. Imobilização de proteínas sobre superfícies de polissacarídeos. 2008. 114f. Tese (Doutorado em Química). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CAVALCANTI JÚNIOR, G. B. et al. Detecção da proteína p53 em células leucêmicas por citometria de fluxo e Western blot. *Revista Brasileira de Cancerologia*. v. 50 (3), p. 191-202, 2004.

CHANG, S. et al. The combined influence of surface modification , size distribution , and interaction time on the cytotoxicity of CdTe quantum dots in PANC-1 cells, *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* v. 44 (3), p. 241–248, 2012.

CESAR, C.L. et al. Fluorescência. In. Microscopia Óptica: Fundamentos e Aplicações às Ciências Biomédicas/ Adriana fontes ... (et al); Wanderley de Souza - Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2010.

CHAVES, C.R. et al. Application of core–shell PEGylated CdS/Cd(OH)₂ quantum dots as biolabels of Trypanosoma cruzi parasites. *Applied Surface Science*, v. 255, p. 728–730, 2008.

CHAVES, C. R. Síntese e caracterização de nanopartículas de sulfeto de cádmio: aplicações biomédicas. *Dissertação (mestrado)* - Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Ciência de materiais, Recife, 111p, 2006.

DANIELS, G. A century of human blood groups. *Wiener Klinische Wochenschrift*. v. 113, p. 781-786, 2001.

DANIELS, G. L. et al. International Society of Blood Transfusion Committee on Terminology for Red Blood Cell Surface Antigens: Macao report. *Vox Sanguinis*. v. 96, p. 153-156, 2009.

DEL PEON-HIDALGO, L. et al. Frecuencias de grupos sanguíneos e incompatibilidades ABO y RhD, en La Paz, Baja California Sur, México. *Salud pública México* [online]. v. 44, p.406-412, 2002.

DONG, C. et al. Coupling fluorescence correlation Spectroscopy with Microchip Electrophoresis to Determine Effective Surface Charge of Water-Soluble QDs. *Small*, v. 2, p. 534-538, 2006.

FARIAS, P.M.A. et al. Highly fluorescent semiconductor core-shell CdTe-CdS nanocrystals for monitoring living yeast cells activity, *Appl. Phys. A*. v. 89, p. 957-961, 2007.

GAO, X. et al. In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 16, p. 63-72, 2005.

GARRATTY, G.; ARNDT, P. A. Applications of Flow Cytofluorometry to Red Blood Cell Immunology. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)*. v. 38, p. 259- 267, 1999.

GERION, D. et al. Synthesis and Properties of Biocompatible Water-Soluble Silica-Coated CdSe/ZnS Semiconductor Quantum Dots. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 105(37), p. 8861-8871, 2001.

GIEPMANS, B. N. G. et al., 2006. The Fluorescent Toolbox for Assessing Protein Location and Function. *Science*, v. 312, p. 217-224.

GIVAN, A. L. Seeing the light: Lasers, Fluorochromes, and filters. *Flow Cytometry First Principles*. Wiley-Liss, 2. ed, 2001.

GUILHERME, R. S. et al. Exames laboratoriais complementares indicados no apoio ao diagnóstico do linfoma difuso de grandes células B (LDGCB). *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde*, v.33 (3), p.185-194, 2008.

HAN, Y. et al. Measurement of the Diffusion Coefficients of Fluorescence Beads and Quantum Dots by Using Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Journal of the Korean Physical Society*, v. 59 (5), p. 3177-3181, 2011.

HERMANSON, G. T.; Bioconjugate Techniques. *Pierce Biotechnology*. In Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, USA, 2008, 1202p.

HEUFF, R. F.; CRAMB, D. T.; MARROCCO, M. Fluorescence correlation spectroscopy for diffusion of mobile quantum dots in dilute solutions. *Chemical Physics Letters*, v. 454(4-6), p. 257-261, 2008.

HOSOI, E. Biological and clinical aspects of ABO blood group system. *The Journal of Medical Investigation*. v. 55, p 174-182, 2008.

HUANG, X. et al. Characterization of quantum dot bioconjugate by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescent detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1113, p. 251 – 254, 2006.

HULT, A. K.; OLSSON M. L. Many genetically defined ABO subgroups exhibit characteristic flow cytometric patterns. *Transfusion*, v. 50, p. 308-323, 2010.

IDOWU, M.; LAMPRECHT, E.; NYOKONG, T. Interaction of water-soluble thiol capped CdTe quantum dots and bovine serum albumin. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 198(1), p. 7–12, 2008.

JONATHAN, C. A quantum paint box. *Chemistry World*, p. 1–8, 2003. Available from: <http://www.rsc.org/chemistryworld/Issues/2003/September/paintbox.asp>, acesso em 10 de maio de 2013.

KOHLER, G.; MILTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, v. 256, p. 459 – 497, 1975.

LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3 ed., 2006. 954 p.

LANDSTEINER, K. Zur Kenntnis der anti-fermentativen lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. *Zentralbl Bakteriologie*, v. 27, p. 357-362, 1900.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger princípios da bioquímica. 3^o ed. São Paulo. SARVIER, 2002, 179p.

LIRA, R. B. et al. Biocompatible water soluble quantum dots as new biophotonic tools for hematologic cells: Applications for flow cell cytometry. *Proceedings of SPIE (Colloidal Quantum Dots for Biomedical Applications V)*, v 7575, p. 75750-75755, 2010.

LIU, F.K.; LIN, Y. Y.; WU, C.H. Highly efficient approach for characterizing nanometer-sized gold particles by capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, v. 528(2), p. 249–254, 2005.

LIZ, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*. v. 98, p. 637-674, 1998.

LUDWIG, L.; ZILLY, A. Reações transfusionais ligadas ao sistema ABO. *NewsLab.*, v. 84, p. 102 – 102, 2007.

MADGE, D.E.; ELSON, E.L.; WEBB, W.W. Thermodynamics fluctuations in a reacting system: Measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.* v. 29, p. 705-708, 1972.

MAHMOUD, W. et al. Advanced procedures for labeling of antibodies with quantum dots. *Analytical biochemistry*, v. 416 (2), p. 180–185, 2011.

MATTOS, L. C.; MOREIRA, H. W. Genetic of the ABO blood system and its link with the immune system. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* [online]. v. 26 (1), p. 60-63, 2004.

MEDINTZ, I. L. et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nature Materials*. v. 4, p. 435 – 446, 2005.

MENEZES, F. D. et al. CdTe/CdS core shell quantum dots for photonic applications. *Microelectronics Journal*, v. 36, p. 989–991, 2005.

MENEZES, F. D. Síntese e caracterização de nanocristais Luminescentes baseados em semicondutores II e IV para fins de aplicação como biomarcadores – *Dissertação de Mestrado em Química* – UFPE, 2006, 100p.

MICHALET, X.; BENTOLILA, L.A.; WEISS, S. Molecular imaging: physics and bioapplications of quantum dots, *In: Advances in Medical Physics*, v. II ((Wolbarst A.B., Mossman K.L. and Hendee W.R., Eds) Medical Physics Publishing, Madison, Wisconsin), p.111-127, 2008.

MICHALET, X. F. et al. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*, v. 307, p.538-544, 2005.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 29, p. 168-178, 2007.

MURCIA, M. J. et al. Fluorescence correlation spectroscopy of CdSe/ZnS quantum dot optical bioimaging probes with ultra-thin biocompatible coatings. *Opt Commun*. v. 281(7), p. 1771–1780, 2008.

NAKAGE, A. P. M. et al. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. *Ciencia Rural*. v. 35 (4), p. 966-973, 2005.

NAKAJIMA, N.; IKADA, Y. Mechanism of amid formation by carbodiimides for bioconjugation in aqueous media. *Bioconjugate Chem.* v. 6, p. 123-130, 1995.

OGASAWARA, K. et al. Molecular genetic analysis of variant phenotypes of the ABO blood group system. *Blood*, v. 88 (7), p. 2732- 2737, 1996.

OKAZAKI, H. et al. Difference in *Ulex europaeus* agglutinin I binding activity of decay-accelerating factor detected in stools of patients with colorectal cancer and ulcerative colitis. *Journal of laboratory and Clinical Medicine*, v.143, p. 169-174, 2004.

OLSSON, M.L.; CHESTER, M.A. Polymorphisms at the ABO locus in subgroup A individuals. *Transfusion*, v. 36, p. 309–313, 1996.

OSZWAŁDOWSKI, S. et al. Capillary electrophoretic separation and characterizations of CdSe quantum dots. *Central European Journal of Chemistry*, v. 8(4), p. 806–819, 2010.

PARAK, W. J. et al. Conjugation of DNA to Silanized Colloidal Semiconductor Nanocrystalline Quantum Dots. *Chemistry of Materials*, v. 14(5), p. 2113–2119, 2002.

PATHAK, S.; DAVIDSON, M. C.; SILVA, G. A. Characterization of the functional binding properties of antibody conjugated quantum dots. *Nano letters*, v. 7(7), p. 1839–1845, 2007.

PONS, T. et al. Hydrodynamic dimensions, electrophoretic mobility, and stability of hydrophilic quantum dots. *The journal of physical chemistry. B*, v. 110(41), p. 20308–20316, 2006.

RADKO, S. P.; CHRAMBACH, A. Separation and characterization of sub- μm - and μm -sized particles by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, v. 23, p. 1957–1972, 2005.

RAVEL, R.. Laboratório clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais. *Guanabara Koogan*, ed. 6. Rio de Janeiro, 2005, 616p.

RIBEIRO, R. T. et al. Electrochemical synthetic route for preparation of CdTe quantum-dots stabilized by positively or negatively charged ligands. *Green Chemistry*, v. 15, p. 1061-1066, 2013.

RIGLER, R. Fluorescence Correlation Spectroscopy with high count rate and low-background - analysis of translational diffusion, *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, v. 22, p. 169-175, 1993.

RIGLER, R.; METS, U. Diffusion of single molecules through a Gaussian laser beam, *Proc. SPIE 1921, Laser Spectroscopy of Biomolecules*, v. 239 p. 239-248, 1993.

ROGACH, A. L. et al. Aqueous Synthesis of Thiol-Capped CdTe Nanocrystals : State-of-the-Art, v. 111 (40), p. 14628–14637, 2007.

ROITT, I. M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Imunologia*. 5. ed. São Paulo: Manole, 1999, 423p.

ROSASCO, M. G.; LIPPI, S.; VALVERDE, J. Frecuencia de los Grupos Sanguíneos A1, A2, Aint, B y O en Individuos Normales. *Revista Cubana Hematología Imunología Hemoterapia*, v.17, p. 171-174, 2001.

SAMPEDRO, R. G. et al. Fenotipos débiles del antígeno A (Sistema ABO de grupos sanguíneos) en donantes de sangre. *Revista Cubana Hematología Imunología e Hemoterapia*. v. 14.(2), p. 97-100, 1998.

SAMES, K. H. et al. Lectin and proteoglycan histochemistry of Merkel cells carcinoma. *Experimental Dermatology*, v. 10, p. 100 – 109, 2001.

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

SCHNABEL, U.; FISCHER, C. H; KENNDLER, E. Characterization of colloidal gold nanoparticles according to size by capillary zone electrophoresis. *J. Micro. Sep.*, v. 9, p. 529–534, 1997.

SCHWILLE, P.; HAUSTEIN, E. *Fluorescence Correlation Spectroscopy An Introduction to its Concepts and Applications*, 2001, 33p.

SHAO, L. et al. Studies on interaction of CdTe quantum dots with bovine serum albumin using fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of fluorescence*, v. 19(1), p. 151–157, 2009.

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

SHI, C. et al. Interaction of CdTe/CdS quantum dots with antibodies. *Chinese letters*. v. 20, p. 1119 -1122, 2009.

SILVA, F. O. et al. Effect of surface ligands on the optical properties of aqueous soluble CdTe quantum dots. *Nanoscale research letters*, v. 7(1), p. 536, 2012.

SMITH, A. M. et al. Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, p. 1226–1240, 2008.

SMITH, A. M.; GAO, X.; NIE, S. Invited Review Quantum Dot Nanocrystals for In Vivo Molecular and Cellular Imaging, *Photochemistry and photobiology*, v. 80, p. 377–385, 2004.

SONG, X. et al. Highly efficient size separation of CdTe quantum dots by capillary gel electrophoresis using polymer solution as sieving medium. *Electrophoresis*, v. 27(7), p. 1341–1346, 2006.

STANISAVLJEVIC, M. et al. Study of Streptavidin-Modified Quantum Dots by Capillary Electrophoresis, *Chromatographia*, v. 76, p. 335–343, 2013.

STANLEY, P, CUMMINGS, R. D. Structures Common to Different Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology. 2nd edition. *Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press*; 2009. Chapter 13.

SUKHANOVA, A.; NABIEV, I.; Fluorescent nanocrystal quantum dots as medical diagnostic tools. *Expert Opinion Medical Diagnostic* v. 2 (4), p. 429-447, 2008.

SVENSSON, L. et al. The structural basis of blood group A-related glycolipids in an A3 red cell phenotype and a potential explanation to a serological phenomenon. *Glycobiology*, v. 21, p. 162–174, 2011.

Tabela Periódica dos Elementos Químicos Atualizada

<http://www.tabelaperiodicacompleta.com/> acesso em 15 de maio de 2013.

THAKRAL, B. et al. Importance of weak ABO subgroups. *Labmedicine*, v. 36, p. 32-34, 2005.

The Swiss Laboratory for Doping Analyses: Capillary Electrophoresis

http://www.doping.chuv.ch/en/lad_home.htm acesso em 11 de julho de 2013.

THOMAZ, AA. Plataforma Fotônica Integrada e suas Aplicações em Estudos de Quantum Dots e Processos Biológicos. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação do Instituto de Física “Gleb Wataghin” da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências, 2013, 240p.

TIWARI, D. K. et al. Synthesis and Characterization of Anti-HER2 Antibody Conjugated CdSe/CdZnS Quantum Dots for Fluorescence Imaging of Breast Cancer Cells. *Sensors*, v. 9, p. 9332-9354, 2009.

VICENTE, G.; COLÓN, L. A. Separation of bioconjugated quantum dots using capillary electrophoresis. *Analytical chemistry*, v. 80(6), p. 1988–1994, 2008.

WACHTER, R. M. et al. Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Structure*, v. 6 (10), p. 1267-1277, 1998.

WALLING, M. A., NOVAK, J. A., SHEPARD, J. R. E. Quantum Dots for Live Cell and *In Vivo* Imaging, *Int. J. Mol. Sci.*, v. 10, p. 441-491, 2009.

WANG, J. et al. Studies on bioconjugation of quantum dots using capillary electrophoresis and fluorescence correlation spectroscopy. *Electrophoresis*, v. 33 (13), p. 1987–1995, 2012.

WANG, Y.; CHEN, L. Quantum dots, lighting up the research and development of nanomedicine. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, v. 7 (4), p. 385–402, 2011.

WITTIG, O. L. et al. Producción de anticuerpos monoclonales con especificidad por los grupos sanguíneos A y B. Evaluación de su uso como reactivos hemoclasificadores. *Investigation Clinical*. v. 47, p. 253-264, 2006.

XIAO, Y. et al. Dynamics and mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 8, p. 13, 2010.

ZHANG, H. et al. L-Cysteine capped CdTe-CdS core-shell quantum dots: preparation, characterization and immuno-labeling of HeLa cells. *Luminescence : the journal of biological and chemical luminescence*, v. 26(2), p. 86–92, 2011.

CAPÍTULO III

3. OBJETIVOS:

Dentro do contexto apresentado, o presente trabalho tem os seguintes objetivos:

3.1. OBJETIVO GERAL:

Sintetizar QDs de CdTe e conjugá-los covalentemente aos anticorpos monoclonais anti-A e anti-B, bem como à lectina *Ulex europaeus* (anti-H), além de aplicar os bioconjugados no estudo de grupos e subgrupos sanguíneos através de citometria de fluxo.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Sintetizar QDs de CdTe, estabilizados e funcionalizados com AMS, com emissão no verde e no laranja;
- Realizar a caracterização óptica dos nanocristais;
- Conjugar covalentemente os QDs com emissão no laranja ao anti-A e anti-B;
- Conjugar covalentemente os QDs com emissão no verde ao anti-H;
- Realizar a caracterização óptica dos conjugados;
- Estudar a conjugação através de ensaio fluorescente em microplacas, espectroscopias por correlação de Fluorescência (FCS), eletroforese e ensaios de inibição de carboidratos;
- Analisar a distribuição e quantificar antígenos A, B e H nos grupos A₁, B₁, A₁B₁ e O utilizando QD-(anti-A), QDs-(anti-B) e QD-(anti-H) por citometria de fluxo;
- Analisar a distribuição e quantificar antígenos A e H nos subgrupos A (A₂, A₃, A_x e A_{el}) utilizando QD-(anti-A) e QD-(anti-H) por citometria de fluxo;

CAPÍTULO IV

Artigo em preparação para ser submetido ao *International Journal of Nanomedicine*

ORIGINAL RESEARCH

Investigation of ABO antigens in group and subgroups using conjugated QDs

Cabral Filho et al

Evaluation of ABO Blood Group by Flow Cytometric Analysis Using CdTe Quantum Dots Conjugated to Monoclonal Antibodies and *Ulex europaeus* Lectin

Paulo E. Cabral Filho¹

Maria I. A. Pereira¹,

Heloise P. Fernandes²,

Andre A. Thomaz³,

Rogério T. Ribeiro¹,

Claudilene R. Chaves¹,

Carlos L. Cesar³,

Beate S. Santos⁴,

Maria L. Barjas-Castro²,

Adriana Fontes^{1*}

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

² Centro de Hematologia e Hemoterapia, Universidade Estadual de Campinas, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue, Campinas, São Paulo, Brazil.

³ Departamento de Eletrônica Quântica, Instituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil.

⁴ Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

***Correspondence:** Adriana Fontes, Av. Prof. Moraes Rego, S/N. Departamento de Biofísica e Radiobiologia, CCB, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil, e-mail: adri-fontes@uol.com.br

Abstract: The ABO blood system is considered the most important system when topics as transfusion, organs transplantation and criminal forensics are considered. Usually, molecular biology techniques are employed in order to investigate more minutely ABO groups and subgroups, but they are laborious and can be expensive. Alternative methodologies, such as those based on fluorescence are less laborious, faster and have a high sensibility, allowing biomolecules identification and quantification with high specificity. The aim of this work was to apply dual color MSA CdTe quantum dots (QDs) covalently binded to anti-A or anti-B monoclonal antibodies, as well as the lectin anti-H, to investigate red blood cells (RBCs) membrane antigens of A₁, B₁, A₁B₁, O donors and of A subgroups donors (A₁, A₂, A₃, A_x, and A_e). The QDs-(anti-A) were able to distinguish A subgroups both by fluorescence profile and by the labeling efficiency. Moreover, the QDs-(anti-B) also recognized effectively B₁ antigens and A₁B₁ RBCs were effectively labeled by QDs-(anti-A) and QDs-(anti-B). The QDs-(anti-H) labeled efficiently O RBCs and showed to be an important and complementary tool for analysis of A subgroups, since the fucose recognized by anti-H is not all converted in A antigens, by correlating the A and H carbohydrates distribution on RBCs membrane. Therefore, we believe that methodology developed here can be applied as less laborious, fast, low cost, quantitative and complementary tool for the comprehension of the erythrocyte biology by using direct immunofluorescence in living cells.

KEYWORDS: Erythrocytes, nanoparticles, subgroups, carbohydrates, covalent binding.

Introduction

The comprehension of the interaction between biomolecules and their functions in cells is very important to understand the complexity of organisms. Since fluorescence based techniques present high sensibility that enables the identification and quantification of biomolecules with high specificity, important cells mechanisms can be probed by these techniques.¹ Organic dyes are very used for fluorescence assays, however they present some disadvantages, such as the high photobleaching. Therefore, new methods of analysis by using fluorescent semiconductor nanocrystals (Quantum Dots – QDs) as fluorescent probes have been highlighted in life science.² QDs present some advantages when compared with organic dyes, such as; size tunable emission spectra, broad absorption bands and principally exceptional resistance to photobleaching.³⁻⁶ QDs have been successfully used as

fluorescent probes in biological and medical field for many applications, such as bioimaging (fixed cell, ex vivo live cell and in vivo animal targeting), bioanalytical assays and also as potential photosynthesizers for photodynamic therapy.^{4,5,7}

In order to QDs label specifically structures of biological systems, they need be conjugated with organic molecules, such as; antibodies or lectins. However, effective bioconjugation can still be considered a challenge, because it has to preserve the characteristics of both materials: the fluorescence of QDs and the biochemical functions of biomolecules. Overcoming this challenge, an efficient conjugation of QDs can be applied to recognize ABO antigens and elucidate features related to immunohematology.

The ABO blood group system was discovered in 1900 by Karl Landsteiner⁸ and it's one of 30 blood systems existing.⁹ It is also considered the most important blood system when topics as transfusion and organ transplantation are regarded. Besides, it is important for personal identification on forensics.¹⁰ This system has three different antigens (A, B and/or O (H)), being L-fucose (H) the precursor of A and B antigens.¹¹⁻¹² The phenotyping of ABO antigens is usually performed by red blood cells (RBCs) hemagglutination assays by using tubes and columns containing monoclonal antibodies (anti-A and/or anti-B antibodies) or lectins, as *Ulex europaeus* (anti-H). These techniques are sufficient to laboratorial routines applied to blood transfusion in patients that have never received blood previously. However, recurrent transfusions and organ transplantations require a more detailed evaluation of the antigens for an ABO system classification.¹² By using hemagglutination assays is not possible to quantify RBCs antigens and the identification of subgroups can be inaccurate, for example, both A₃ and A_x subgroups present weak agglutination with anti-A antibody.¹³ The phenotyping of subgroups are very difficult, because the amount of A or B antigens decrease on RBCs membranes.¹⁴ The uncorrected identification of these antigens can lead to severe transfusion incidents.¹⁵ The confirmation of weak phenotype subgroups can be performed by ABO genotype analysis located in chromosome 9q34 through molecular biology techniques.¹⁶⁻¹⁸ However, these techniques do not give information nor about distribution profiles neither about antigen quantifications on RBCs membranes,¹⁹ besides they are laborious and more expensive assays. Thus, the development of less laborious, fast, specific, reproducible and low cost new methodologies are still in focus for subgroups investigations.

In this context, the aim of this work was to apply dual color MSA CdTe quantum dots (QDs) covalently binded to anti-A or anti-B monoclonal antibodies, as well as the lectin anti-H, to investigate

RBCs membrane antigens of A₁, B₁, A₁B₁, O donors and of A subgroups donors (A₁, A₂, A₃, A_x, and A_{el}) by flow cytometric analysis. There are just a few previous and recent works that already investigated ABO antigens in some blood groups and subgroups by flow cytometry.^{10,20} However, these studies with fixed cells and indirect fluoroimmunoassays by using secondary antibodies can make this methodology more expensive. In addition, the process of fixing cells can increase their autofluorescence and can cause loss of the membrane carbohydrates.

Some of us have previously demonstrated the potential of using QDs-(anti-A) bioconjugates to investigate qualitatively A subgroups by applying CdS/Cd(OH)₂ QDs by microscopy.²¹ However, bare CdTe QDs and their bioconjugates (CdTe QDs covalently binded to anti-A) present a considerable higher fluorescence when compared to CdS/Cd(OH)₂ QDs. Therefore, in this present work we applied direct fluoroimmunoassays in living cells, without any fixation agents, to recognize and evaluate quantitatively A, B or H RBCs antigens by flow cytometry by using CdTe QDs directly conjugated to the antibodies or the lectin. To our knowledge, this is the first study that investigated H antigens profile by fluorescence techniques and correlated A and H antigens on A subgroups membrane. Furthermore, our methodology was able to distinguish A subgroups either by profile and labeling efficiency.

Therefore, QDs conjugated to anti-A, anti-B or anti-H can provide not only a complementary methodology of analysis of the erythrocyte biology, but also can contribute to the safety and efficacy of pre-transfusion and biocompatibility tests for organ transplantation and recurrent transfusions purposes.

Experimental Procedures

Synthesis and Characterization of CdTe/CdS-MSA QDs

Aqueous colloidal dispersion of orange and green CdTe/CdS-MSA core/shell QDs were synthesized by adapting a previously reported method.^{22,23} Briefly, QDs were prepared by the addition of Te²⁻ (obtained from metallic tellurium at 10⁻⁴ mol – Sigma Aldrich) in a 0.01 M CdCl₂ or Cd(ClO₄)₂ (Sigma Aldrich) solution with pH >10 in the presence of MSA (3-mercaptopsuccinic acid - Sigma Aldrich) as stabilizing agent.

We used a 2:1:2.4 molar ratio of Cd/Te/MSA in PBS (0.01 M) solution for orange emission QDs and 5:1:6.0 in ultrapure water for green emission QDs. The Te^{2-} aqueous solution was prepared by reducing metallic tellurium with NaBH_4 (Sigma Aldrich) in a 1:30 molar ratio of Te/NaBH_4 , respectively, at a high pH using NaOH and under nitrogen-saturated atmosphere.

The growth of the QDs proceeded, in inert atmosphere, under stirring at 90 °C during 8 h or 2 h for orange or green emission QDs, respectively. After synthesized, absorption and emission spectra were obtained, correspondingly, by UV-Vis absorption (Evolution 600 UV-Vis, Thermo Scientific) and photoluminescence experiments (Spectrometer LS 55 - Perkin Elmer). The emission spectra were obtained at 365 nm excitation.

Blood Samples

Red blood cells (RBCs) from A, B and O blood donors, as well as from A weak phenotypes blood subgroups were obtained at the Hematology and Transfusion Center of UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil. RBCs pre-phenotyped samples (A_1 , n = 13; A_2 , n = 6; A_3 , n = 1; A_x , n = 2; A_{el} , n = 1; B_1 , n = 10; A_1B_1 , n = 1 and O, n = 6) were collected in a 4 mL EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) anticoagulant tube from healthy donors who had their blood, serologically and/or genotyped, previously typed.

The phenotyping of RBCs was performed by using monoclonal anti-A antibody (Clone: 9113D10, Lot: 71EF01EA - Fresenius Kabi), anti-B (Clone: 9621A8, Lot: 08D01A21 – Fresenius Kabi) anti- A_1 or *Dolichos biflorus* lectin (Reference: 116005, Lot: 11691-B3 – Lorne Laboratories) and anti-H or *Ulex europaeus* lectin (Reference 115002, Lot: 11568-A1 – Lorne Laboratories).

Type A_2 weak phenotype blood subgroup was differentiated from A_1 group by using anti-A antibody and anti- A_1 lectin, since the A_2 group presents agglutination with anti-A antibody, but not with anti- A_1 lectin.²⁴ The other subgroups were identified using molecular biology.

QDs Bioconjugation

Orange QDs were conjugated with anti-A or anti-B by using N-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC – Fluka) and N-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (Sulfo-NHS – Sigma Aldrich) as coupling reagents.

Firstly, we adjusted the pH of the amount of 2 mL of CdTe QDs (3 μ M) to 5.5 by using MSA at 4.9 % (w/v). Then, we added 1 mL of EDC (at 0.4 mg/ml) and after 5 minutes 1 mL of Sulfo-NHS at 1.1 mg/ml to the QDs sample.^{2,25} Then, 15 minutes later, we added 40 μ L of anti-A antibody or anti-B antibody to the system (the same antibodies described in section Blood Samples).

Green QDs were also covalently bonded to the anti-H lectin (*Ulex europaeus* agglutinin I) by using EDC and Sulfo-NHS. For this, we used EDC (at 4.0 mg/mL) and Sulfo-NHS (at 10 mg/mL). At the end of the process we inserted 200 μ L of anti-H (at 0.5 mg/mL -Sigma Aldrich) to the system.

Before RBCs labeling, the systems were incubated with 50 μ L of TRIS base (at 1 mM) for 2 hours under slow agitation. This procedure was used to quench the free carboxyl groups of non-conjugated QDs to minimize unspecific targets.

QDs Bioconjugation Characterization

Fluorescence Correlation Spectroscopy Analysis

Fluorescence Correlation Spectroscopy analysis (FCS) was performed in a confocal microscopy (Zeiss, LS 780 equipped with the software ZEN) by using 40X water immersion objective (NA = 1.0, WD = 2.5 mm). In order to obtain the correlation curves, bare orange QDs and their bioconjugated to anti-A (or anti-B,) as well as bare green QDs and their conjugated to anti-H were, respectively, excited by a green and a blue laser operating at 514 nm and 488 nm, both with 1 μ W. The pinhole aperture, in both cases, was set as 35 μ m. It was obtained 10 correlation curves for each sample.

Then, from the correlation curves and by using the following equation (Eq. 1), we obtained the hydrodynamic radius (R) for each system:

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

where, k_B is a Boltzman Constant, η is the medium viscosity and T is the temperature. The diffusion time τ_D is extracted from the correlation curves and the lateral radius ω_x of the focal volume was obtained by calibrating the system with a solution of rhodamine 6G (at 10 nM).²⁶

As the conjugated QDs show diffusion times larger when compared to bare QDs, it was possible to use the hydrodynamic radius measurements to confirm the bioconjugation.

Electrophoresis

QDs conjugations to anti-A were also confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) technique. For this, it was used a native and discontinuous PAGE with stacking gel of 6% and main gel of 9%.

After polymerization, aliquots of the each sample of anti-A, QDs and QDs-(anti-A), were mixed with glycerol in ratio 5:1 (v/v), respectively, and then, loaded into the wells of the gel. The systems were immersed in electrophoresis running buffer and PAGE proceed at constant voltage (100 V) for 90 minutes. We evaluated the conjugation by comparing the running profiles of the samples by observing fluorescence signals under a Trans-illuminator L·PIX EX (Loccus Biotecnologia), and after, by using the Comassie blue dye (R 250, Sigma Aldrich) that binds to proteins. The same procedures were performed to anti-B and their conjugates.

Fluorescent Microplate Assay

This method, developed by some of us, is based on the presence or absence of fluorescence signals of samples placed in a Fluorescence Plate Reader.²⁷ For this, the QDs with coupling agents (EDC and Sulfo-NHS), the proteins (anti-A and anti-B antibodies) and the bioconjugated QDs (QD-(anti-A) and QD-(anti-B)) were placed in a polystyrene microplate (black 96-well Optiplate F HB microplates – PerkinElmer). All the systems were added in triplicate and the plate was incubated for 2 hours in an incubator (water bath, humid chamber) at 37 °C. After incubation the plate was washed three times by using PBS 0.01 M.

The fluorescence measurements were performed using a WALLAC 1420 Plate Reader with the software Victor² (PerkinElmer). The excitation band pass filter was the F405 (405 nm/5 nm) and the emission band pass filter was the F595 (595 nm/30 nm). The acquisition time was 1 s, the lamp was set to 20,000 and normal slits were used for the excitation of the samples and for collecting the emission.

In this method, as the non-conjugated QDs do not have affinity for polystyrene, they are removed after the washes. On the other hand, the proteins are not removed, however they do not present a significative fluorescence under the conditions used in the experiment. Thus, only bioconjugated QDs can show a significative detected signal. Due to this reason, the QDs with coupling

agents and the proteins were used as our controls and the QDs conjugated to the different proteins were the system to be tested. The intensity of this signal is proportional to the bioconjugation efficiency. As higher is the signal, more efficient was the bioconjugation.

The Relative Fluorescence Intensity (RF) of QDs bioconjugated was calculated by using the following equation (Eq. 2):

$$RF (\%) = \frac{\text{Bioconjugated FL} - \text{Control FL}}{\text{Control FL}} \times 100\% \quad (\text{Eq. 7})$$

where, Bioconjugated FL is the average fluorescence intensity of the QDs-biomolecules conjugates and Control FL is the average controls detected signal. According to Carvalho et al.,²⁷ the bioconjugation was considered efficient if the systems showed a RF higher than 100% when compared to their controls.

Inhibition of lectin assay

In order to prove that labeling results were due to the lectin carbohydrate specificity, lectin binding inhibition assays were accomplished by incubating QDs-(anti-H) with 0.3 M L-fucose for 1 h at 25°C prior to their incubation with O RBCs.

Flow Cytometric Analysis of RBCs Samples

In order to obtain the RBCs, the blood collected in EDTA tubes was centrifuged at 17Xg for 5 minutes. After, the pellet was further washed three times in saline at 4Xg for 2 minutes. Then, it was prepared a solution containing RBCs in saline at 1 % (v/v) for all samples analyzed.

Then, type A and O RBCs were incubated with QDs-(anti-A) for one hour at 37°C using a proportion of 3:1 v/v (QDs conjugated: cells). Likewise, type B and O RBCs were incubated with QDs-(anti-B) using the same procedure. Type O RBCs were used as the negative control, since they do not present A or B antigens in their membranes.

In addition, type O, A and B RBCs were incubated with QDs-(anti-H) using a proportion of 1:1 v/v (conjugated QDs:cells). In this case, type A and B were used as controls, because these types showed very low H antigen expression.

Then, A subgroups were incubated with QDs-(anti-A) and QDs-(anti-H) to analyses the N-acetylgalactosamine and the L-fucose carbohydrates expression on RBCs membranes.

The RBCs were analyzed by flow cytometry (FACSCalibur or Accuri - C6 Becton Dickinson). The software used for data processing was Cell Pro or BD Accuri C6 Software (Becton Dickinson). Around 20,000 events (gated) were acquired. The fluorescence was excited at 488 nm and measured with FL1 filter (530 nm/15 nm) or FL2 filter (585 nm/21 nm) for green and orange QDs, respectively.

Results and Discussion

QDs optical characterization

All QDs employed in the experiments were characterized by absorption and emission spectra which are shown in Figure 1. Green and orange QDs presented a maximum emission at 548 nm (FWHM = 53 nm) and 610 nm (FWHM = 48 nm), respectively. By using the first maxima of the absorption spectra, the average diameters were estimated as 2.6 nm and 3.1 nm for green and orange QDs, respectively.^{28,29} By using the average sizes, the Beer-Lambert law, the first maxima of absorption and extinction coefficient obtained by YU and co-authors, we also estimated the concentration of the particles as 4.5 μM for green QDs and 3 μM for orange QDs.³⁰

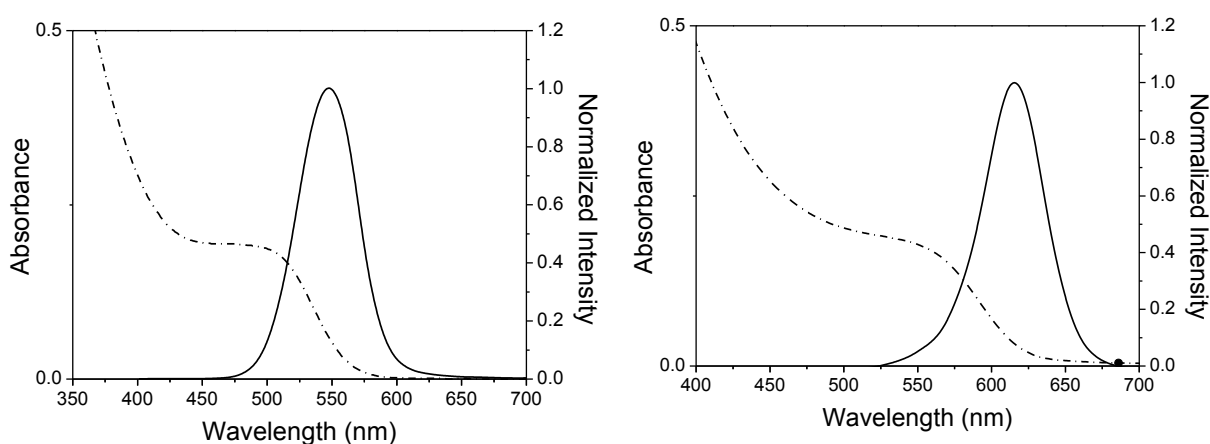


Figure 1 - Emission and absorption (dashed line) spectra of green (left) and orange (right) QDs – Excitation at 365 nm.

The Figure 2 shows that neither orange QDs-(anti A) nor QDs-(anti B) presented considerable changes in the optical properties when compared to bare QDs. Green QDs-(anti H) presented a red shift of around 20 nm and orange QDs with anti-A and anti-B showed a small blue shift of 5 nm approximately. This is probably due to some modifications on the QDs' surfaces caused by the binding

of these biomolecules and EDC in excess more than 20x when compared those used with anti-A or anti-B conjugation.

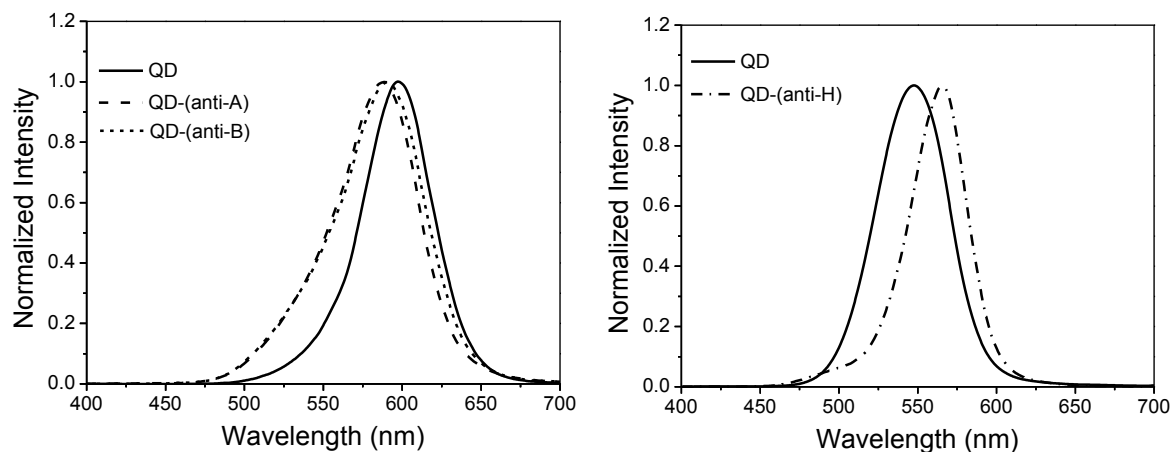


Figure 2 - Optical characterization of QDs-bioconjugates (dashed lines) and QDs. Orange QDs, QDs-(anti-A) and QDs-(anti-B) on the left. Bare green QDs and QDs-(anti-H) on right. The proteins show no fluorescence in this range (400 – 700 nm). Excitation at 365 nm.

Bioconjugation Analysis

In previous cytometric analysis to study initial bioconjugation procedures, we observed that the labeling of A RBCs presented more specificity when unblocked QDs-(anti-A) of 15 days were used, indicating that with this time the bioconjugation was more efficient. Then, we decided to use all conjugates with 15 days and also blocked by TRIS.

QDs bioconjugated to monoclonal antibodies

In the Fluorescent Microplate Assay the control 1 (anti-A/anti-B antibodies) and control 2 (QDs with coupling agents) showed a signal of 296 arbitrary units, while the QDs-(anti-A) and QDs-(anti-B) showed average signal of 9261 and 7836 arbitrary units. These results correspond to RF of 3023% (QDs-(anti-A) and 2547% (QDs-(anti-B), indicating that the bioconjugation was efficient.

After bioconjugation analysis by Fluorescent Microplate Assay, we also confirmed it by electrophoresis experiments. The proteins (Figure 3 A) exhibit differential migration from non-conjugated QDs (Figure 3 B). Furthermore, QDs conjugated with anti-A antibody (Figure 3 C) presented a slowly migration when compared with non-conjugated QDs. The electrophoresis gel also

demonstrated that QDs were successfully conjugated to anti-A antibody. The same profile was observed when orange QDs were conjugated with anti-B (data not shown).

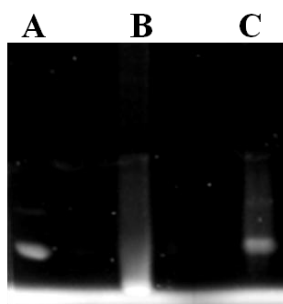


Figure 3 - PAGE electrophoresis under UV Transiluminator. Samples: (A) anti-A; (B) QDs-with coupling agents (negative control); (C) QDs-(anti-A).

Although, Fluorescent Microplate Assay and electrophoresis indicate a successful conjugation to QDs-(anti-A) and QDs-(anti-B), the bioconjugations were also analyzed by FCS measurements. From the correlation curves showed in Figure 4, the average diffusion time for bare orange QDs was calculated as 152.30 μ s, while for the QDs-(antiA) and QDs-(anti-B) were 824.64 μ s and 747.02 μ s, respectively. By using these diffusion times and Eq. 1 (see section Fluorescence Correlation Spectroscopy.) we obtained the hydrodynamic radius. Bare orange QDs showed an average hydrodynamic radius of $D = 3.6$ nm, QDs-(anti-A) of $D = 20.0$ nm and QDs-(anti-B) of $D = 19.0$ nm. The bare QDs sizes obtained by FCS analysis were higher than the diameter obtained by absorption spectra. This occurs because hydrodynamic radius gives information about the charges on the QDs surfaces, while the absorption is an optical property related to the QDs core. All conjugated QDs presented diameters higher than bare QDs, these results suggest that anti-A and anti-B antibodies were binded to QDs, a further confirmation of the efficacy of the bioconjugation.

QDs bioconjugated to anti-H lectin

Bare green QDs showed the average diffusion time calculated as 70.8 μ s and QDs-(anti-H) was 688 μ s. Bare green QDs had average hydrodynamic radius $D = 2.9$ nm and QDs-(anti-H) of $D = 28.9$ nm, showing that anti-H was also well conjugated to QDs.

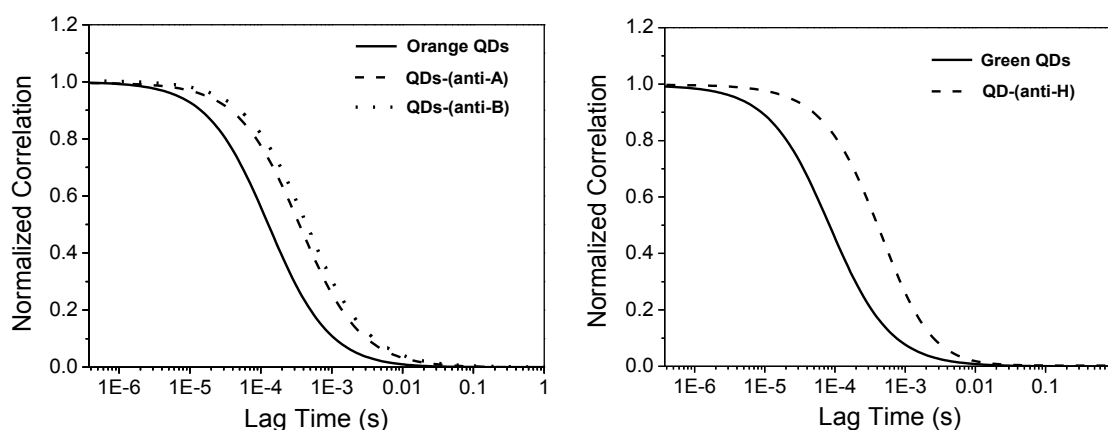


Figure 4 – Normalized FCS correlation curves of bare and conjugated QDs. On the left, FCS curves of bare Orange QDs, QDs-(anti-A) (dashed line) and QDs-(anti-B) (dot line), while on the right, FCS curves of bare green QDs and QDs-(anti-H) (dashed line).

The inhibition carbohydrates assays showed that QDs-(anti-H) were not able to label O RBCs confirming the bioconjugation. In fluorescent microplate assay with QDs-(anti-H) it was not possible to observe difference between bare QDs and conjugated QDs, probably because this lectin has different interactions with polystyrene. Furthermore, in the electrophoresis, with QDs-(anti-H), it was not possible to visualize the bands of the QDs with coupling agents. Further studies are needed to completely understand these results. However, both FCS analysis as well as the inhibition carbohydrates assays demonstrated that QDs-(anti-H) were successfully conjugated to the QDs.

Flow Cytometric Analysis of RBCs Samples

ABO blood group incubated with QDs-(anti-A) and QDs-(anti-B)

Initially, we applied the bioconjugates (QD-(anti-A) or QD-(anti-B)) to label A_1 , B_1 , A_1B_1 and O RBCs. In Table 1 we can verify the percentage of RBCs labeled with their correspondent conjugated. Our results demonstrated that O RBCs did not present considerable labeling with none of monoclonal antibodies. In both cases, using QDs-(anti-A) or QDs-(anti-B), labeled O RBCs were smaller than 5%. These results suggest that conjugated QDs were successfully blocked and the labeling was specific and reproducible.

A_1B_1 RBCs presented in their membranes two types of carbohydrates, (N-acetylglucosamine – B antigen) and (N-acetylgalactosamine – A antigen), so A_1B_1 showed 95% of cells labeled with QDs-(anti-A) and 80% with QDs-(anti-B). The cytometry showed that an average of 96.7% (varying at

95 to 98.5%) of A₁ RBCs were labeled with QDs-(anti-A). For B₁ RBCs incubated with QDs-(anti-B), the analysis showed an average of 94.6% (varying at 91 to 98.6 %) of cells labeled by these bioconjugates.

Bare QDs did not label cells unspecifically. All results demonstrated that the conjugates were specific and efficient to label ABO blood groups.

Table 1 – Average percentage of ABO blood groups RBCs labeled with conjugated QDs.

Blood Samples	Bioconjugates	QDs-(anti-A)	QDs-(anti-B)	QDs-(anti-H)
		(%)	(%)	(%)
O type		< 5	< 5	85 (80 – 95)
A₁ type		96.7 (95 - 98.5)	*	8 (4 - 10)
B₁ type		*	94.6 (91 - 98.6)	7.93 (4 – 12)
A₁B₁ type		95	80	< 5

* We did not incubate A₁ type with QDs-(anti-B) and B₁ type with QDs-(anti-A).

In Figure 5 we showed typical flow cytometric profile of A₁, B₁, A₁B₁ and O RBCs when incubated with QDs-(anti-A) or QDs-(anti-B). Type O RBCs incubated with QDs-(anti-A) or QDs-(anti-B) showed the same pattern presented by control RBCs (RBCs without QDs – data not shown). These results agree with those presented by Aki, Izumi and Hosoi¹⁰ and by Hult and Olsson²⁰ about ABO groups using a secondary antibody conjugated to organic dyes. With our methodology, by using nanotechnology for direct immunofluorescence assay, it was possible to differentiate these ABO groups.

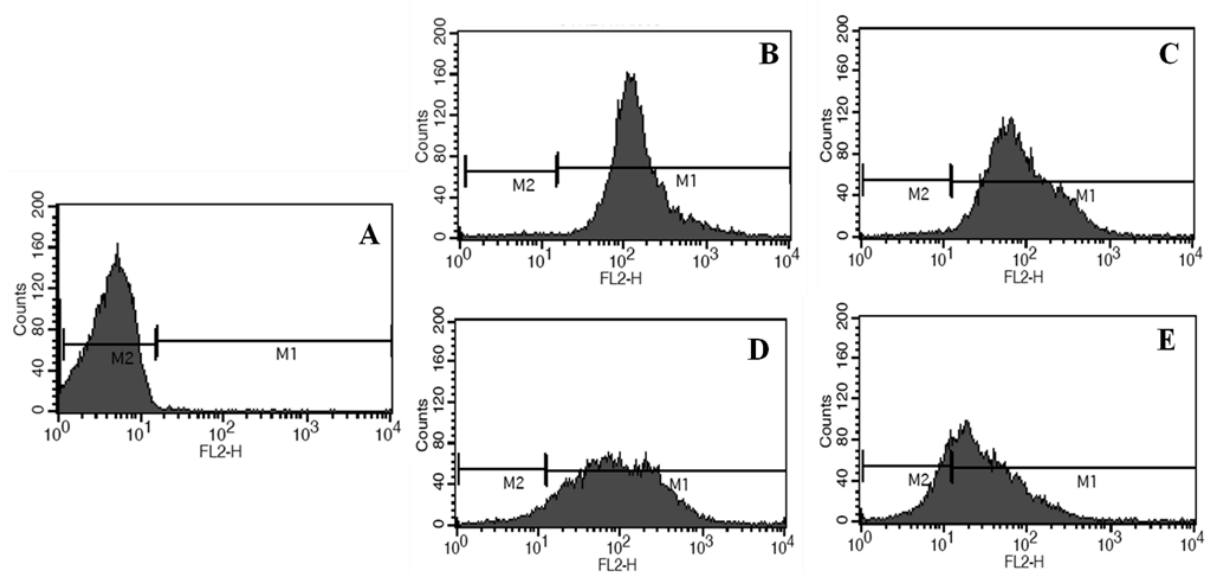


Figure 5 - Typical flow cytometric histogram profile of RBCs when incubated with QDs conjugated to monoclonal antibodies. In A histogram, O RBCs incubated with QDs-(anti-A) or QDs-(anti-B), in B histogram A_1 RBCs, C histogram B_1 RBCs (A_1 and B_1 RBCs were incubated with QDs-(anti-A) or QDs-(anti-B), respectively). In D and E histograms A_1B_1 RBCs incubated with QDs-(anti-A) and QDs-(anti-B), respectively. M1 represents the positive populations (labeled cells) and M2 no labeled cells, x axis represents FL2 filters of flow cytometer and y axis represents cell counts.

ABO blood group incubated with QDs-(anti-H)

We also investigated the presence or absence of H antigens (L-fucose) in ABO blood group. The average percentage of cells labeling are represented by Table 1. O type RBCs had the highest amount of L-fucose expressed on the membrane, about 85% (varying at 80 to 95%) of the cells presented these antigens on cells surface. Another set of O RBCs 15% (5 – 20%) expressed a smaller amount of this antigen. Then, O RBCs showed a heterogeneous distribution of L-fucose on cells membrane. In A_1 , B_1 and A_1B_1 groups all or the most portion of L-fucose is converted in A or B antigens, in this way a small labeling < 10% [A_1 – 8% (varying at 4 to 10%), B_1 – 7.93% (4 to 12%) and A_1B_1 <5%] was observed. Typical histogram profiles are shown in Figure 6. As A_1 , B_1 and A_1B_1 showed similar cytometric results, we presented only the data for A_1 group.

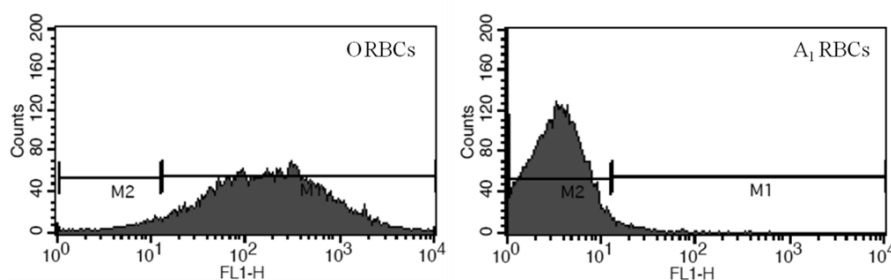


Figure 6 - Histogram profile of RBCs when incubated with QDs-(anti-H). A₁ and O RBCs are represented in histograms. M1 represents the positive populations (labeled cells) and M2 no labeled cells, x axis represents FL1 filters of flow cytometer and y axis represents counts of cells.

Type A subgroup incubated with QDs-(anti-A)

After, some A subgroups (A₂, A₃, A_x and A_{el}) were incubated with QDs-(anti-A). Type A₂ subgroups have an average percentage of cells labeled of 68% (varying at 66 to 70%), A₃ about 11% cells labeled, A_x 5% and A_{el} presented the similar quantities of A_x subgroups. These results are presented in Table 2. In Figure 7 we can observe typical histograms of A subgroups.

Table 2 – Average percentage of A subgroups RBCs labeled with QDs-(anti-A).

Bioconjugates	QDs-(anti-A)
Blood Samples	(%)
A ₂	68 (66 – 70)
A ₃	12
A _x and A _{el}	5

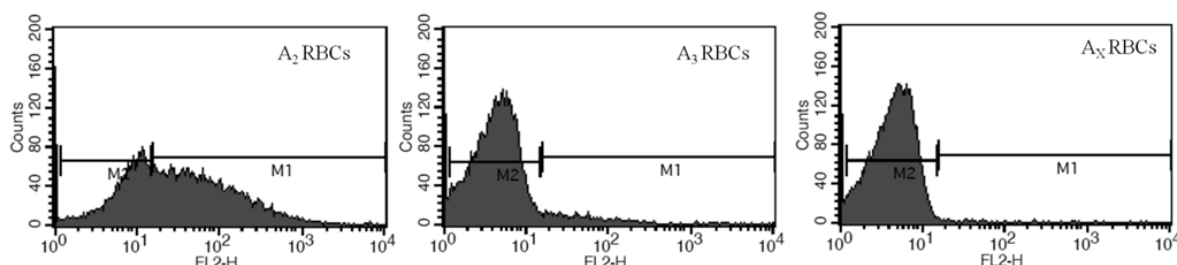


Figure 7 - Histogram profile of A₂, A₃ and A_x subgroups when incubated with QDs-(anti-A). M1 represents the positive populations (labeled cells) and M2 no labeled cells, x axis represents FL2 filters of flow cytometer and y axis represents counts of cells.

According to histogram profile of A₂ subgroups two populations were observed: (1) a set of no labeled cells (about 35%), probably RBCs with very little or without A antigens on cell surface and (2)

a set of cell population labeled (about 65%) that present A antigens on cell surface. When we evaluated the subgroup A_3 with QDs-(anti-A), a most expressive no labeled cells population (about 88%) was found, while a smaller amount of cells showed a discrete labeling (12%, approximately). The subgroup A_x and A_{el} showed a similar profile of type O RBCs when incubated with QDs-(anti-A). In this case we could not differentiate them by flow cytometer analysis. But, we could differentiate them from the others subgroups.

These results for A_1 , A_x and A_{el} agree with those presented by Hult and Olsson²⁰ and with the hemagglutination tests.¹³ On the other hand, our results for A_2 and A_3 are different from those presented by Hult and Olsson, however they agree with serological hemagglutination reactions.¹³ Hult and Olsson showed that A_1 and A_2 have a similar labeling profile, while we could distinguish them by direct immunofluorescence. The same authors observed two populations labeled for A_3 while we observed only one population weakly labeled. Our results are consistent with the mixed-field pattern displayed after reaction of A_3 RBCs with anti-A monoclonal antibody.^{13,19} The differences found between our and Hult and Olsson's²⁰ study could be because they used cells fixed with glutaraldehyde while we worked with living cells.

Type A subgroup incubated with QDs-(anti-H)

When we investigated the H antigen expression in A subgroups, we could observe different average percentage of cell labeling. According to flow cytometry analysis, A_2 subgroups showed around 70% of RBCs target by the conjugates (varying at 60 to 80%), while the A_x and A_{el} subgroups presented only 30%, approximately. We did not show the results for A_3 subgroups incubated with QDs-(anti-H), because the blood donors did not attend when we called.

The flow cytometric patterns of A subgroups are represented in Figure 8. Type A_2 subgroup showed a similar profile of O RBCs, with heterogeneous distribution of H antigens on cells membrane. On the other hand, A_x showed a similar profile of A_{el} , with a smaller amount of cells labeling with QDs-(anti-H). These results agree with agglutination tube reactions.¹³ However, with serological hemagglutination reactions it is not possible to quantify the presence and absence of H or A antigens in these cells. To our knowledge this is the first study that used anti-H to investigate antigens in A subgroups by flow cytometry.

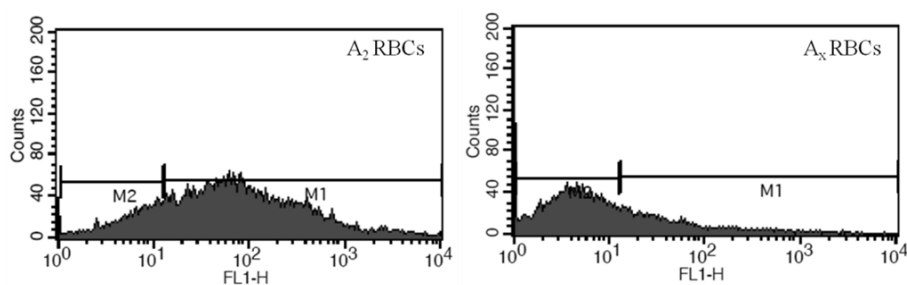


Figure 8 - Histogram profile of A_2 and A_x subgroups when incubated with QDs-(anti-H). M1 represents the positive populations (labeled cells) and M2 no labeled cells, x axis represents FL1 filters of flow cytometer and y axis represents counts of cells.

Final considerations about RBCs labeling

We were able to differentiate the ABO groups with QDs-(anti-A), QDs-(anti-B) and QDs-(anti-H). Likewise we were also able to differentiate some A subgroups. The QDs-(anti-H) were an important tool to correlate the A and H antigens in A subgroups membranes.

Type A_2 subgroup was less labeled by QDs-(anti-A) when compared with type A_1 subgroup and for QDs-(anti-H) the results showed the opposite. In other words, the A_2 RBCs did not have all H antigens converted in A antigens, while in type A_1 subgroup all H antigens were converted in A antigens. Furthermore, our results still suggest that RBCs from A_x and A_{el} have fewer amounts of both H and A antigens. In A subgroups the amount of A antigens seem to decrease in this order $A_1 > A_2 > A_3 > A_x = A_{el}$. On the other hand, the H antigens seem to decrease in this order $A_2 > A_x = A_{el} > A_1$.

The bioconjugates remained fluorescent and agglutinating RBCs after three months and in our experimental procedures it was possible to differentiate A_1 and A_2 subgroups without use *Dolichos biflorus* lectin, usually used in laboratorial routine tests of blood groups.¹³

CONCLUSION

The analysis of the conjugates showed that the conjugation process did not change the optical properties of the QDs. The anti-A, anti-B and anti-H conjugated to QDs did not lose their ability to recognize efficiently antigens on RBCs surface. In this work, we also used commercials and routinely applied monoclonal antibodies to label living RBCs, without any fixation procedures, resulting in a less expensive methodology. Moreover, conjugates of three months remained stable and labeling specifically the cells. We also could differentiate and correlated A and H carbohydrates expression in

A subgroups by using QDs-(anti-A) and QDs-(anti-H). Taking together, these results demonstrated a simple methodology that can be used as complementary analysis in blood banks or any blood analysis laboratory.

These conjugated QDs can still be applied to improve the comprehension about ABO antigens distribution in cancer cells or tissues. These studies may indicate the correlation between the presence of ABO antigens and the malignancy degree of the transformed cells and tissues. Moreover, these conjugates can also be employed to understand the differentiation and ABO antigens formation in stem cells, since they have great potential to engineering of tissues.

Acknowledgments

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for financial support and student fellowships. We are also grateful to the National Institute of Science in Photonics (INFo) for financial resources. Additionally, we would like to thank the Aggeu Magalhães – FIOCRUZ and Dr^a Irene of Centro de Hemoterapia e Transfusão da Universidade de Campinas for the flow cytometry measurements and Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE).

Disclosures

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Giepmans BNG, Adams SR, Ellisman ME, Tsien RY. The Fluorescent Toolbox for Assessing Protein Location and Function. *Science*. 2006; 312:217-224.
2. Wang Y, Chen L. Quantum dots, lighting up the research and development of nanomedicine. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2011; 7(4):385–402.
3. Sukhanova A, Nabiev I. Fluorescent nanocrystal quantum dots as medical diagnostic tools. *Expert Opinion Medical Diagnostic*. 2008; 2(4):429-447.

4. Medintz IL, Tetsuo Uyeda H, Goldman ER, Mattoussi H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nature Materials*. 2005; 4:435 – 446.
5. Michalet XF, Pinaud F, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Sundaresan G, Wu AM, Gambhir SS, Weiss S. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*. 2005; 307:538-544.
6. Alivisatos P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nature Biotechnology* 2004; 22:47-42.
7. Santos BS, Farias PMA, Fontes A. Semiconductor quantum dots for biological applications, in *Handbook of Self Assembled Semiconductor Nanostructures Novel Devices in Photonics and Electronics*, M. Henini, Ed. Elsevier, Amsterdam, 2008; 1:771–798.
8. Landsteiner, K. Zur Kenntnis der antifermentativen lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. *Zentralbl Bakteriologie*. 1900; 27:357-362.
9. Daniels GL, Castilho L, Flegel WA, Fletcher A, Garratty G, Levene C. International Society of Blood Transfusion Committee on Terminology for Red Blood Cell Surface Antigens: Macao report. *Vox Sanguinis*. 2009; 96:153-156.
10. Aki K, Izumi A, Hosoi E. The evaluation of histo-blood group ABO typing by flow cytometric and PCR-amplification of specific alleles analyses and their application in clinical laboratories. *The journal of medical investigation : JMI*. 2012; 59(1-2):143–151.
11. Cooling LLW, Kelly K, Barton J, Hwang D, Koerner TAW, Olsson JD. Determinants of ABH expression in Human platelets. *Blood*. 2005; 105:3356-3364.
12. Sant'Anna Gomes BM, Estalote AC, Palatnik M, Pimenta G, Pereira BDB, Do Nascimento EM. Prevalence, serologic and genetic studies of high expressers of the blood group A antigen on platelets. *Transfusion medicine (Oxford, England)*. 2010; 20(5):303–314.
13. Thakral B, Saluja K, Bajpai M, Sharma RR., Marwaha N. Importance of weak ABO subgroups. *Labmedicine*. 2005; 36:32-34.
14. Daniels, G. A century of human blood groups. *Wiener Klinische Wochenschrift*. 2001; 113:781-786.
15. Ludwig L, Zilly A. Reações transfusionais ligadas ao sistema ABO. *NewsLab*. 2007; 84:102 – 102.
16. Hosoi E. Genetic analysis of the ABO blood groups and application of the clinical laboratories. *Jpn J Clin Pathol*. 1997; 45(2):148-156.

17. Hosoi E. Biological and clinical aspects of ABO blood group system. *The Journal of Medical Investigation*. 2008; 55:174-182.
18. Ogasawara K, Yabe R, Uchikawa M, Saitou N, Bannai M, Nakata K, Takenaka M, Fujisawa K, Ishikawa Y, Juji T, Tokunaga K. Molecular genetic analysis of variant phenotypes of the ABO blood group system. *Blood*. 1996; 88(7):2732- 2737.
19. Svensson L, Bindila L, Angström J, Samuelsson BE, Breimer ME, Rydberg L, Henry SM. The structural basis of blood group A-related glycolipids in an A3 red cell phenotype and a potential explanation to a serological phenomenon. *Glycobiology*. 2011; 21(2):162–74.
20. Hult AK, Olsson ML. Many genetically defined ABO subgroups exhibit characteristic flow cytometric patterns. *Transfusion*. 2010; 50(2):308–23.
21. Farias PMA, Santos BS, Menezes FD, Ferreira RC, Barjas-Castro ML, Castro V, Lima PRM, Fontes A, Cesar CL. Core-shell CdS/Cd(OH)₂ quantum dots: synthesis and bioconjugation to target red cells antigens. *Journal of microscopy*. 2005; 209:103-108.
22. Santos BS, Farias PMA, Menezes FD, New highly fluorescent biolabels based on II–VI semiconductor hybrid organic–inorganic nanostructures for bioimaging. *Appl Surf Sci*. 2008; 255:790–792.
23. Menezes FD, Brasil Jr AG, Moreira WL, Barbosa LC, Cesar CL, Ferreira RC, de Farias PMA, Santos BS. CdTe core shell quantum dots for photonic applications. *Microelectr J*. 2005; 36:989–991.
24. Batissoco AC, Novaretti MCZ. Aspectos moleculares do Sistema Sangüíneo ABO. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. [online]. 2003; 25(1):47-58.
25. Hermanson GT. Bioconjugate Techniques. *Pierce Biotechnology*. In Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, USA, 2008, 1202p.
26. Shao, L., Dong, C., Sang, F., Qian, H., & Ren, J. Studies on interaction of CdTe quantum dots with bovine serum albumin using fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of fluorescence*. 2009; 19(1):151–157.
27. Carvalho KHG, Brasil Jr. AG, Cabral Filho PE, Tenório DPLA, Siqueira ACA, Leite ES, Fontes A, Santos BS. *Fluorescence plate reader for quantum dot–protein bioconjugation analysis*. accepted to *Journal Nanoscience and Nanotechnology* in 07.12.2013.

28. Rogach AL, Franzi TA, Feldmann J, Gaponik KN, Lesnyak V, Shavel A, Eychmuller A, Rakovich YP, Donegan JF. Aqueous synthesis of thiol-capped CdTe nanocrystals: State-of-the-art, *Journal of physics Chemistry*. 2007; 111:14628 - 14637.
29. Dagtepe P, Chikan V, Jasinski J, Leppert VJ. Quantized Growth of CdTe Quantum Dots; Observation of Magic-Sized CdTe Quantum Dots. *Journal of Physical. Chemistry*. 2007; 111: 14977-14983.
30. Yu WW, Qu L, Guo W, Peng X. Experimental determination of the extinction coefficient of the CdTe, CdSe and CdS nanocrystals. *Chemical materials*. 2003; 15: 2854 – 2860.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSÕES

- Os QDs de CdTe funcionalizados com AMS foram sintetizados com boa estabilidade, apresentando cores no verde e no laranja;
- Além disso, a caracterização óptica indicou que os QDs possuíam tamanhos nanométricos e boa intensidade de fluorescência. Portanto, os QDs foram compatíveis com os equipamentos de análise de fluorescência, podendo ser aplicados nas marcações celulares de interesse. Além disso, mesmo após a conjugação, os QDs continuaram com emissão suficiente para marcação celular e praticamente não houve alteração nos espectros de emissão e absorção;
- Os testes de confirmação da conjugação realizados por eletroforese, FCS e por ensaio fluorescente em microplaca indicaram que os QDs com emissão no laranja foram conjugados eficientemente com os anticorpos monoclonais anti-A e anti-B.
- O estudo da conjugação feito por FCS e por ensaios de inibição de carboidratos indicaram que QDs com emissão no verde foram conjugados eficientemente à lectina anti-H.
- Os conjugados QDs-(anti-A) e QDs-(anti-B) conseguiram marcar de forma eficiente e diferenciar os grupos sanguíneos ABO, através da marcação específica de hemácias A₁, B₁, A₁B₁. Além disso, o conjugado QDs-(anti-H) pode ser utilizado para analisar a distribuição de fucose nos grupos A₁, B₁, A₁B₁ e O.
- Os conjugados conseguiram também diferenciar subgrupos A (A₂, A₃, A_x e A_{el}) tanto pelo perfil de expressão como pela quantidade de células marcadas. Além disso, esses subgrupos apresentaram diferenças na distribuição de antígenos A e H na membrana;
- Mesmo após o processo de conjugação as suspensões permaneceram estáveis por pelo menos três meses com bom perfil de marcação celular;
- Os conjugados mostraram-se uma ferramenta que pode ser aplicada em células vivas de forma menos laboriosa, rápida, de baixo custo, quantitativa e complementar para a análise da biologia eritrocitária.

6. PERSPECTIVAS

Esta metodologia poderá ser usada, como análise complementar, em bancos de sangue ou laboratórios de análise para identificação e confirmação dos subgrupos de doadores e/ou pacientes.

Esses conjugados podem ainda ser aplicados para uma melhor compreensão da distribuição de antígenos ABO em células ou tecidos cancerosos. Estes estudos podem indicar a correlação entre a presença desses antígenos, em células e tecidos neoplásicos, com o seu grau de malignidade. Além disso, podem ajudar a elucidar os processos de metástases, através dos níveis de expressão de antígenos ABO nos tumores sólidos.

Os conjugados podem também ser empregados para um melhor entendimento da diferenciação das células troncos e da formação dos antígenos ABO, já que estas células podem ser usadas na engenharia de tecidos e destinadas a pacientes com diferentes grupos e subgrupos sanguíneos. No mais, os QDs podem ainda ser conjugados a outros anticorpos para investigação de antígenos de detecção mais laboriosa.

ANEXO I

**Artigo Aceito para publicação no Journal of Nanoscience and
Nanotechnology**

Artigo Aceito para publicação no Journal of Nanoscience and Nanotechnology

Carta de aceite para publicação no Journal of Nanoscience and nanotechnology

----- Mensagem Original -----

Assunto: Status of Manuscript Submission

De: nalwa@mindspring.com

Data: Sex, Julho 12, 2013 8:22 pm

Para: adrianaf@ifi.unicamp.br

Hi Adriana:

This is to inform you that your manuscript has been accepted for publication in the Journal of Nanoscience and Nanotechnology.

1. Kindly insert Date of Submission, Date of Acceptance, and Email Address on the FIRST page of your manuscript.

2. Please send manuscript as a single file in MS Word format having Graphical Abstract in the end and a signed "COPYRIGHT TRANSFER AGREEMENT" (please print from www.aspbs.com/jnn) to both David Tebera at angpub@covad.net and Harleen Rai at aspbs2000@gmail.com.

IMPORTANT NOTE: Publisher will not publish any manuscript until a signed Copyright Transfer Agreement has not been received.

Please do not send anything to me.

Thank you very much for publishing your research work in JNN.

Best regards,

H. S. Nalwa,
PhD Editor-in-Chief

Dr. Hari Singh Nalwa | Editor-in-Chief: Journal of Nanoscience and Nanotechnology | Web: www.aspbs.com/jnn Editor: Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology (25-Volume set) | Web: www.aspbs.com/enn American Scientific Publishers | 26650 The Old Road, Suite 208, Valencia, California 91381-0751, USA Phone: (661) 799-7200 | Fax: (661) 799-7230 | Email: nalwa@aspbs.com | Web: www.aspbs.com

FLUORESCENCE PLATE READER FOR QUANTUM DOT-PROTEIN BIOCONJUGATION ANALYSIS

Kilmara H. G. Carvalho^{1,2}, Aluizio G. Brasil Jr.^{1,2}, Paulo E. Cabral Filho^{2,3}, Denise P. L. A. Tenório^{2,4}, Ana C. A. de Siqueira², Elisa S. Leite^{2,5}, Adriana Fontes^{2,3,*}, Beate S. Santos^{1,2,*}

¹ Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

² Grupo de Pesquisa em Nanotecnologia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

³ Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

⁵ Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

Date of Submission: April 7th, 2013

Date of Acceptance: July 12th, 2013

*** Corresponding Authors:** Beate S. Santos, Av. Artur de Sá, S/N. Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, UFPE, 50740-120, Recife, PE, Brazil - Phone: +55 81 21267818 - Fax: +55 81 21268510, email address: beate_santos@yahoo.com.br and Adriana Fontes, Av. Prof. Moraes Rego, S/N. Departamento de Biofísica e Radiobiologia, CCB, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil, email address: adri-fontes@uol.com.br

ABSTRACT

We present here a new and alternative method that uses a Fluorescence Plate Reader in a different approach, not to study protein-protein interactions, but to evaluate the efficiency of the protein bioconjugation to quantum dots (QDs). The method is based on the QDs' native fluorescence and was successfully tested by employing two different QDs-proteins conjugation methodologies, one by promoting covalent binding and other by inducing adsorption processes (phenomena mainly mediated by electrostatic and hydrophobic/hydrophilic interactions). We obtained bioconjugates between carboxyl coated CdTe QDs and bovine serum albumin, concanavalin A lectin and anti-A antibody. Flow cytometry and fluorescence spectroscopy studies corroborated the results. This kind of analysis is important because poor conjugation efficiency leads to unsuccessful applications of the fluorescent bioconjugates. We believe that our method presents the possibility of performing semi-quantitative

and simultaneous analysis of different samples with accuracy taking the advantage of the high sensitivity of optical based measurements.

KEYWORDS: Quantum dots, CdTe, Bioconjugation, Fluorescence, Biomolecule.

1. INTRODUCTION

Quantum dots (QDs) are colloidal semiconductor nanocrystals which show unique physicochemical properties due to their quantum confinement regime in three dimensions. Some of the main optical features observed for these systems are: wide excitation bands, narrow emission spectra, size-controlled emission at different regions of the visible-light spectra and great photostability. These properties offer significant advantages for QDs when compared with conventional organic dyes, which are commonly used as fluorescent probes [1-3]. Additionally, the fluorescence of organic dyes tends to quench rapidly, so they are not suitable for long term analysis [4].

QDs are nanocrystals made up of elements from the II-VI (e.g. CdSe, CdTe, CdS, and ZnSe), III-V (e.g. InP and InAs) or IV-VI (e.g. PbSe) group. As their surface atoms render a greater part of their structure, compared to bulk crystals, they show intrinsic electronic defects that have to be overcome. This is usually accomplished by chemically coating the nanocrystal core with monolayers of a semiconductor that usually has a higher bandgap (a process called passivation). These core-shell nanostructured systems may be synthesized using different chemical approaches. For biological applications they are prepared using colloidal chemistry either in organic or in aqueous media. When compared to organometallic routes, water-based QDs's preparation method is less toxic, applies low-cost precursors and is intrinsically biocompatible to applications in biological fields [1].

Due to the improvement of the colloidal synthesis methodologies (especially the aqueous based) in the last 15 years, QDs have been successfully used as fluorescent probes in biological and medical field. In this time lapse we observed an exponential growth of the use of this new class of fluorophores in bioimaging (fixed cell, *ex vivo* live cell and *in vivo* animal targeting), bioanalytical assays, in immunofluorescence assays, as potential photosynthesizers for photodynamic therapy and as probes to trace the pharmacological routes of some drugs [1-3].

In almost all of these applications, the coating of QDs with proteins or antibodies plays an important role, because they form inorganic-biological hybrid nanoparticles that combine characteristics of both materials, which are the fluorescence properties of QDs with the biochemical functions of the proteins. This process called *bioconjugation* is an important step for promising biological applications and needs to be characterized

independently of the conjugation approaches employed (covalent binding or adsorption). The characterization and evaluation of the QDs bioconjugation (after the reaction process) is still a current critical problem for successfully using these new optical probes.

Many research groups have been reporting different methods to characterize QDs bioconjugates. Sapsford *et al.* (2011) [13] in a recent review article compiled bioconjugation characterization approaches for various nanomaterials and classified them as separation, scattering, microscopy and spectroscopy techniques. Among the most cited methods are the gel and capillary electrophoresis [5], the dynamic light scattering (DLS) [7] and fluorescence correlation spectroscopy (FCS) [12]. However, the methods currently used still present one or other disadvantages: laborious methodologies, lack of standardization for interpreting the results or the use of expensive equipments. Electrophoresis, for example, is a laborious technique, and despite to be able to analyze and compare bioconjugation for various samples at same time, it can be applied only for qualitative analyses of charged specimens, moreover if the conjugated molecule has low or medium weight, the electrophoresis is no more appropriate [38, 39]. DLS can answer qualitatively if there was bioconjugation for one sample at a time based on their average sizes, but has poor resolution and can only resolve particle populations (within the same sample) if they differ in size by at least a factor of 3 [13]. FCS is similar to DLS, although it is more sensitive for discriminating similar sizes, it needs a confocal microscopy, so it is an expensive technique. Moreover, the FCS can answer if there was a bioconjugation, it cannot give much information about the efficiency. Therefore, new and complementary methods are always welcome to evaluate bioconjugation process.

We present here an alternative optical method to confirm QDs bioconjugation by using a Fluorescence Plate Reader. This analytical approach is based on the native QDs' fluorescence detection of samples containing the bioconjugates and the absence of signal in all other samples named controls. The Fluorescence Plate Reader is routinely applied in immunoassays to detect (with accuracy) antigen-antibody interactions as already described in the literature [40]. This detection is possible because one of the proteins (antigen or antibody) was previously conjugated to a fluorescent marker, which can also be a quantum dot [41]. However, in this work, we propose the use of the Fluorescence Plate Reader not to study protein-protein interaction, but instead, for a different approach: to evaluate the efficiency of the protein bioconjugation to QDs. This analysis of bioconjugation is important because poor efficiency leads to unsuccessful applications of the fluorescent bioconjugates.

Among the methods used to evaluate bioconjugation, electrophoresis is, by far, the most used approach. When compared to the most applied methods, especially with electrophoresis, our approach has the advantages to be able to evaluate and discriminate semi-quantitatively a great number of different types of bioconjugates

simultaneously (in each microplate there are 96 wells). Moreover, it is a simple, practical, fast and sensitive method. Besides, it is not limited by size or charge of the bioconjugates. Therefore, why do not use this method as a complementary approach to detect and evaluate the QDs-protein bioconjugation? In order to demonstrate this alternative method, we tested CdTe QDs bioconjugated to different proteins: bovine serum albumin (BSA), anti-A antibody and concanavalin A lectin (ConA). We employed two different conjugation methodologies, one by using covalent binding [39] and other by adsorption (a phenomenon mainly mediated by electrostatic and hydrophobic/hydrophilic interactions) [42].

2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

2.1 General Experimental Details:

All reagents for the QDs synthesis were purchased from Sigma Aldrich and used as received. Microplate-based fluorescence measurements were performed using a WALLAC 1420 microplate reader with the software Victor² (PerkinElmer). Black 96-well Optiplat F HB microplates were purchased from PerkinElmer. The biomolecules used were BSA (Sigma Aldrich), ConA (Sigma Aldrich) and anti-A antibody (DiaMed - Minas Gerais - Brazil). Absorption spectra of isolated and conjugated QDs were collected on a DU 7500 UV/VIS spectrophotometer (Beckman) or in a HR 4000 spectrophotometer (Ocean Optics) in the range of 200 to 600 nm. Emission spectra of isolated and conjugated QDs (excited at 365 nm) were recorded using a PC1, (a photon-counting fluorescence spectrometer from ISS with a xenon lamp of 300 W as excitation source), employing excitation and emission slits of 1 mm and voltage = 15 V.

2.2. General Procedure for CdTe QDs Synthesis:

Aqueous colloidal dispersion of CdTe core/shell QDs were synthesized by adapting a previously reported method [43]. Briefly, QDs were prepared by the addition of Te^{2-} in a $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ solution of $\text{pH} > 10$ in the presence of TGA (thioglycolic acid), MPA (3-mercaptopropionic acid) or MSA (mercaptosuccinic acid) (Sigma Aldrich) as stabilizing agents in a 2:1:4.2/4.6/2.4 ratio of Cd:Te:TGA/MPA/MSA respectively. The Te^{2-} aqueous solution was prepared using tellurium metallic (Sigma Aldrich) and NaBH_4 (Sigma Aldrich), at a high pH and under argon or nitrogen saturated inert atmosphere. The reaction proceeded, in argon or nitrogen, under constant stirring and heating at 80 °C during 1 hour for TGA and 7 and 15 hours at 100 °C for MPA and MSA.

2.3. Plate Reader Bioconjugation Detection Method:

The method described here proposes to analyze and to verify the QDs-protein bioconjugation based on the fluorescence intensities of samples placed in a Fluorescence Plate Reader. It is known that proteins have affinity for polystyrene, which is one of the most used plastic in microplates employed for protein immobilization in immunoassays [44-46]. Isolated QD samples do not efficiently link to the polymer because they do not have enough specific groups required for a strong interaction. So, after washing the microplate with a buffer solution such as PBS (phosphate buffered saline), the QDs are removed and no fluorescence signal is detected. The biomolecules alone do not present fluorescence in the same wavelength region of the QDs employed. So, in the case of a well succeeded QD-protein bioconjugation, the Fluorescence Plate Reader will give a fluorescence signal indicating that QDs are bound to the proteins attached to the well. Based on these features, the adsorptive or covalent conjugation between carboxylate QDs and amine groups of biomolecules such as peptides, proteins and DNA [1] can be confirmed by the comparison of the fluorescence intensities values of the conjugate in focus and some controls, according to Figure 1 and 2 respectively.

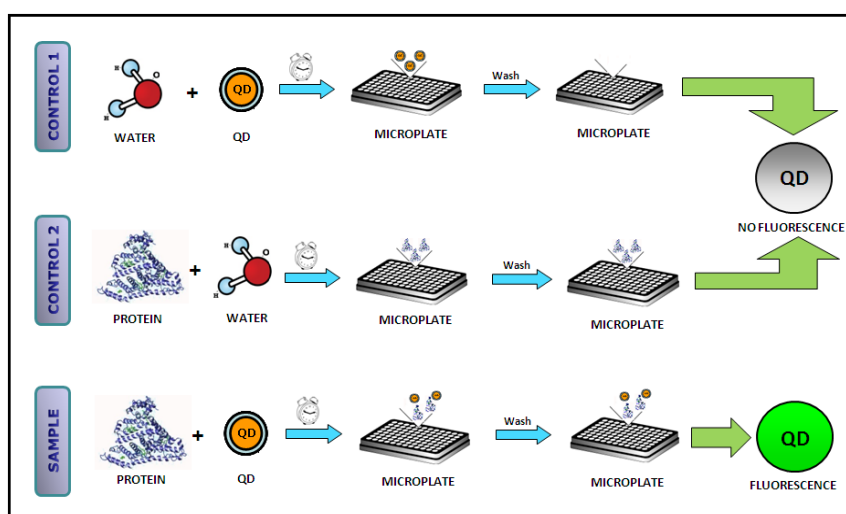


Figure 1. Experimental procedure used in the Fluorescence Plate Reader method for QDs-protein interaction by adsorption. The scheme shows the interaction process between the microplates with different samples: the controls used in the experiment present no fluorescence and the QDs-protein bioconjugates present fluorescence indicating conjugation. This scheme should be used to interpret Table 1.

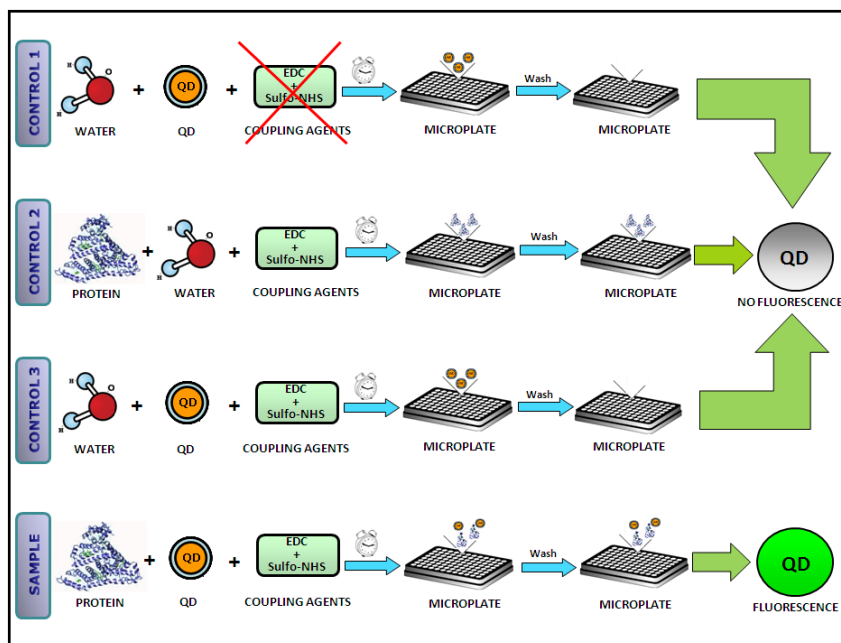


Figure 2. Experimental procedure used in the Fluorescence Plate Reader method for QDs-protein covalent binding bioconjugates. The scheme shows the interaction process between the microplates with different samples: the controls used in the experiment present no fluorescence and QDs-protein bioconjugates present fluorescence indicating conjugation. This scheme should be used to interpret Table 2.

Each sample set consisted of three/four components: two/three negative controls and the QD-biomolecule conjugates. The first control was called QDs control, which consisted of the isolated colloidal QDs. The second control was called molecule control, consisting on the protein molecule alone and the third control (used only for conjugation by covalent binding) consisted in all reagents used in the conjugation process, except the QDs, submitted to the same process.

If the fluorescence intensity of the QDs-biomolecules sample was at least 50% higher than the average values of the controls, this was considered a good indication of a successful conjugation. On the other hand, if the fluorescence intensity was of the same order as the signal of the controls, the conjugation was considered unsuccessful. These methodologies are summarized in Figure 1 (adsorption) and Figure 2 (covalent bond) and the correspondent results are presented in Tables 1 and 2, respectively.

2.4. Conjugation by Covalent Binding:

TGA-coated CdTe QDs were conjugated with BSA protein using EDC and Sulfo-NHS as coupling reagents [39, 38]. Firstly, 20 nmol of CdTe was added to the activation buffer at 0.1 M MES (2-[morpholino] ethanesulfonic acid) at pH 6.0. After 15 minutes, 0.4 mg/ml EDC and 1.1 mg/ml Sulfo-NHS in ultrapure water were added to the system. Then, 1.4 μ l of 2-mercaptoethanol (20 mM) were used to quench the EDC. After that,

we added 1 mg/mL of BSA in a hydroalcoholic solution (80:20). All this processes were performed in inert atmosphere up to 4 hours at room temperature.

2.5. *Conjugation by Adsorption:*

The MPA-coated or MSA-coated CdTe conjugation by adsorption with anti-A, BSA and ConA was performed by adjusting the QDs pH to 8.0 and placed the molecules in contact with QDs for 2 h at room temperature without stirring. The proportion between QD:anti-A was 50:1 (v/v). For ConA (0.2 mg/mL) the proportion of QD:ConA was 7:1 (v/v) and QD:BSA (0.01 g/mL) was 60:1 (v/v). Con A is a lectin that targets sugars such as mannose and glucose. These systems and the negative controls (QDs alone in water and/or in PBS (1X) and biomolecules in PBS (1X) in the same concentration used in the conjugation) were incubated in microplates for 2 h at 37°C.

2.6. *Procedure for Immobilized Bioconjugates and Analysis:*

A solution of PBS at pH 7.4 was employed as the wash buffer. All samples were measured in triplicate. The control samples (described as - QDs in water or in PBS and biomolecules in PBS, both in the same concentration used in the conjugation) and conjugated samples were incubated in the microplate wells (200 µL in each well) for 2 hours in an incubator (water bath, humid chamber) at 37 °C. After this time, the wells were washed 3 times with PBS. Then, the microplate was immediately placed in the Plate Reader to measure the fluorescence intensity in each well (with controls and QDs-biomolecules samples). The fluorescence signal of conjugated and control samples were analyzed under F480 (480 nm/ 15.5 nm) or F485 (485 nm/7 nm) excitation filters, F535 (535 nm/12.5 nm) or F595 (595 nm/30 nm) emission filters, the acquisition time was 1 s, the lamp was set to 20,000 or 60,000 and normal slits were used for excitation and emission.

2.7. *General Procedure for Alternative Confirmation of the Bioconjugation:*

The covalent conjugation with BSA was alternatively confirmed by analysis of the emission spectra. The adsorption conjugation of anti-A antibody was confirmed by the labeling of red blood cells (RBCs) with the QDs-conjugates. RBCs were analyzed by flow cytometry (FACSCalibur - Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). The software used for data processing was Cell Pro (Cell Quest™ Software, Becton Dickinson immunocytometry system, San Jose, CA, USA). Around 10,000 events per second were acquired. The fluorescence in cells was excited at 488 nm and measured with FL1 filter (530 nm/15 nm) or FL2 filter (585 nm/21 nm). RBCs type A and type O collected in EDTA tubes were used to prepare a 5% diluted suspension of cells using saline solution. After that, RBCs were incubated with QD-(anti-A) conjugates for one hour at 37°C

using a proportion of 3:1 v/v (QDs conjugate:cells). RBCs type O were the negative control, since they do not present A antigens in their membranes.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Initially, all QDs employed in the experiments were characterized by absorption and emission spectra which are showed in Figure 3 and 4. According to optical and structural characterizations (data no shown), CdTe-TGA, CdTe-MPA and CdTe-MSA nanoparticles emission was 540 nm (FWHM = 35 nm), 550 nm (FWHM = 53 nm), 604 nm (FWHM = 50 nm) and the average diameter were 2.7 nm, 2.6 nm and 3.3 nm respectively [47, 48]. The QDs concentration used was 1 μ M for CdTe-TGA, 13 μ M for CdTe-MPA and 6 μ M for CdTe-MSA [49].

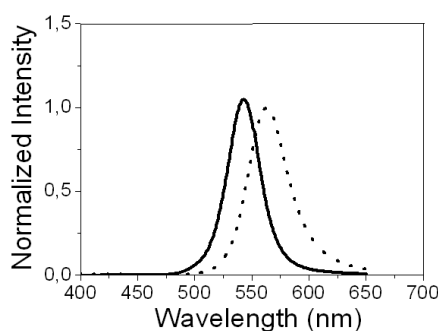


Figure 3. Comparative emission spectra of isolated CdTe-TGA (dashed line) QDs and CdTe-TGA-BSA. The protein BSA shows no fluorescence in the wavelength range of the QD employed. Excitation at $\lambda = 365$ nm.

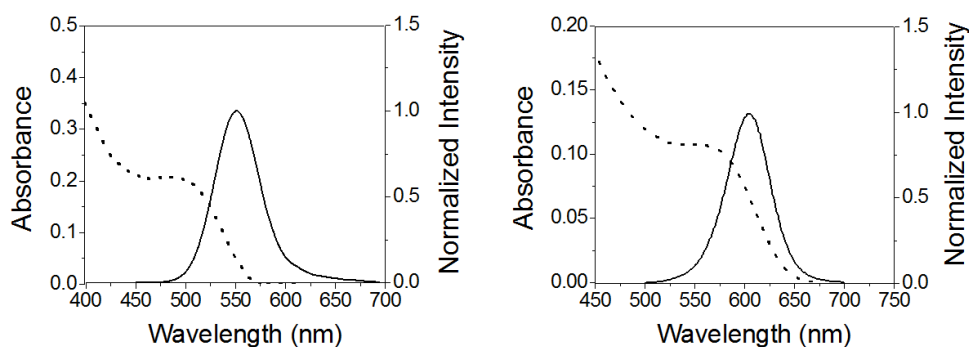


Figure 4. Emission and absorption (dashed line) spectra of CdTe-MPA (left) and CdTe-MSA (right) QDs.

The measurements of the intensity for QDs conjugated to proteins obtained by adsorption and covalent binding, together with the control 1 (QDs alone), control 2 (proteins alone) and control 3 (see Experimental Procedure Section) for each experiment obtained on the Fluorescence Microplate Reader are shown in Tables 1 and 2. The appropriate interpretation of this table can be performed by understanding the experimental procedure in detail (Figure 1 and 2).

The relative fluorescence intensity of the bioconjugates was obtained by applying Equation 1.

$$RelativeFL(\%) = \frac{(BioconjugateFL - ControlFL)}{ControlFL} \times 100\% \quad (Eq. 1)$$

where *BioconjugatedFL* is the fluorescence intensity of the QDs-biomolecules and *ControlFL* is the average control detected signal.

Tables 1 and 2 show that the relative intensity detected for all the bioconjugated samples was higher than for the controls (higher than 50% in all cases). If there were no difference in the relative intensity (corresponding to low signal measurements in bioconjugated wells), the conjugation was not successful and only the proteins would be in the wells. The low signals for the controls are due to stray light coming from the excitation source and being scattered by the wells. The standard errors in the tables represent the contributions of the errors associated with the adsorption process of protein-microplate interactions plus the errors related to the fluorescence signal detection by the photomultiplier of the equipment. The wells can present some differences in the absolute signal depending on the conditions of the experiment (filters and QDs used, for example). Microplate assays are considered reliable methods and are usually applied for diagnosis purposes. Values for the relative fluorescence intensity show quantitative reproducibility (with standard errors smaller than 10%) when the same samples of bioconjugates were used, evidencing the effectiveness of this detection method.

Table 1 – Fluorescence intensity measurements obtained (in triplicate) in the Fluorescence Microplate Reader for the detection of free and bioconjugated QDs systems by adsorption interaction.

System	Fluorescence Intensity (a. u.) ^a	Relative Fluorescence Intensity (%)
Control 1 (QDs-MPA)	705 ± 3%	
Control 2 (anti-A)	837 ± 6%	
Average Control	771 ± 3.5%	
QDs-MPA-(anti-A)	2037 ± 6%	164% ± 7.7%
Control 1 (QDs-MSA)	200 ± 2.4%	
Control 2 (anti-A)	218 ± 6%	
Average Control	209 ± 3.2%	
QDs-MSA-(anti-A)	886 ± 9%	325% ± 10%
Control 1 (QDs-MSA)	312 ± 5%	
Control 2 (ConA)	435 ± 3%	
Average Control	374 ± 2.7%	
QDs-MSA-ConA	1078 ± 7%	188% ± 7.4%
Control 1 (QDs-MSA)	429 ± 6.2%	
Control 2 (BSA)	383 ± 10%	
Average Control	406 ± 6%	
QDs-MSA-BSA	884 ± 6%	117% ± 7.4%

^a Measurements performed with F480 excitation filter and F535 or F595 emission filters, acquisition time of 1 s, 20,000 and normal slits for excitation and emission. QDs employed were CdTe-MPA and CdTe-MSA.

Table 2 – Fluorescence Microplate Reader results of fluorescence intensity from triplicate detection of free and bioconjugated QDs systems by covalent binding.

Systems	Fluorescence Intensity (a. u.) ^a	Relative Fluorescence Intensity (%)
Control 1 (QDs)	260 ± 2%	-
Control 2 (BSA)	299 ± 2%	-
Control 3	320 ± 6%	-
Average Control	293 ± 2.2%	-
QDs-BSA 2h	560 ± 5%	91% ± 6%
QDs-BSA 4h	1,483 ± 2%	406% ± 3.7%

^a Acquisition with the F485 nm excitation filter and F535 emission filter, acquisition time of 1 s, 60,000 and normal slits for excitation and emission. QDs employed were TGA capped CdTe.

By comparing the analysis for QDs-BSA obtained by different time periods (2 and 4 h) of covalent binding reaction, the results show relative fluorescence intensities of 91% and 406% respectively. Therefore, an increase in the conjugation reaction time is clearly followed by an increase in the relative intensity value, indicating that this method is semi-quantitative and can help to monitor and to improve the bioconjugation process. However, considering that the fluorescence intensity is given in arbitrary units only relative comparisons can be made. In our experiments, the highest intensity values were obtained after 4 h of bioconjugation reaction time, indicating that the bioconjugation was more effective after 4 h of reaction, but after this period of time it is important to test the functionality of the biomolecule. A good reaction time has to promote an efficient conjugation between QDs and proteins and also preserve the biomolecule activity. Moreover, it is important to highlight that QDs can be efficiently bioconjugated to proteins, however this process can cause changes in the biomolecule properties. In this way a good result obtained in a bioconjugation analysis is a good indicative but is not a complete guaranty of a successfully biological application.

In Figure 3, we present emission spectra for CdTe-TGA alone and CdTe-TGA-BSA bioconjugate. The blue shift of the maximum emission peak from 560 to 540 nm (excitation at $\lambda = 365$ nm) confirms the bioconjugation. Both CdTe-TGA isolated QDs and CdTe-TGA-BSA QDs presented symmetric and narrow emission spectra. BSA shows no fluorescence in the wavelength range employed. The BSA fluorescence is related to tryptophan residues which provide major contribution to the intrinsic fluorescence of this protein near 340 nm [37, 50]. Also, it was observed a small decay in the fluorescence emission spectra intensity for bioconjugated QDs which may be explained by the effect of the surrounding environment pH. Previous study [51] reported the effect of various factors, including pH, in the conjugation of QDs-BSA. Their results showed

that the maximum relative fluorescence intensity (RFI) occurred at pH 6.83 and that for lower pH values the RFI decreases. The authors described that this decay is also probably caused by depassivation, where the protonation of the surface-binding thiolates results in the deconstruction of the Cd^{2+} -TGA complexes. This prior study corroborates with our results because we employed pH 6.0 in the covalent bioconjugation process (with EDC plus Sulfo-NHS) and obtained a small decrease in the intensity of the emission spectra when compared to the isolated QDs.

As it may be observed in Table 1, an increase of 332% for the relative intensity demonstrated a more effective conjugation for QDs-MSA-(anti-A), while for QDs-MPA-(anti-A) it was observed a value of 164%. The flow cytometry analysis corroborated the results obtained using the Plate Reader. Figure 5 shows the labeling of approximately 60% of A erythrocytes by QDs-MSA-(anti-A), in contrast to around 30% for QDs-MPA-(anti-A). Erythrocytes type O did not present fluorescence, confirming the specific labeling (Figure 5.2). These results indicate that, when the properties of proteins are preserved, a greater signal obtained by our method can be related to a more efficient bioconjugation process. In fact, we believe that the flow cytometry and the Fluorescence Plate Reader approach are complementary. The analysis with the Plate Reader indicates if the bioconjugation of proteins to QDs was efficient or not and, on the other hand, flow cytometry results can be used as a contra proof to validate the methodology based on the Plate Reader to evaluate the bioconjugation. When a high signal is observed in the Plate Reader, it indicates an efficient conjugation of QDs and, then, one can expect a good labeling detection for these samples.

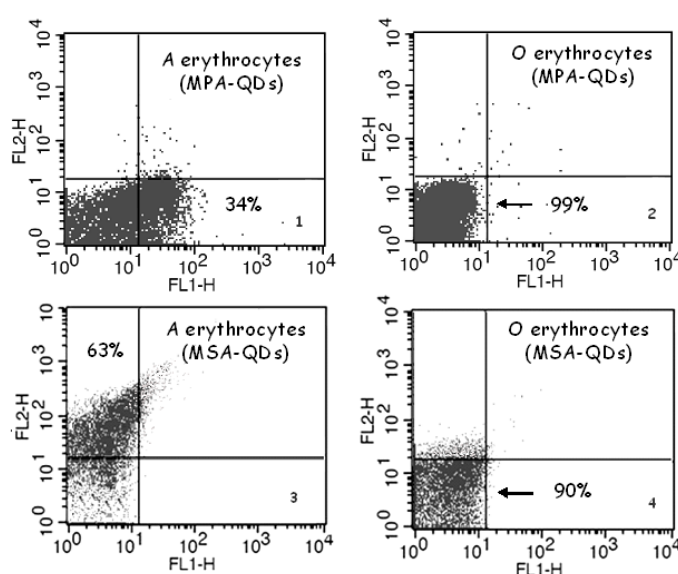


Figure 5. Dot plots of A and O erythrocytes: (1) “A” cells labeled with MPA-(anti-A) QDs, (2) O erythrocytes presented quite no labeling after incubation with MPA-anti-A QDs, (3) “A” cells labeled with MSA-(anti-A) QDs and (4) The same as (2) for O erythrocytes and MSA-(anti-A) QDs.

The flow cytometry results were performed more than five times and were all reproducible. The analysis showed that we could label specifically only A erythrocytes. Although this results were reproductive, 100% of the cells were not labeled probably due to the conjugation process used. The adsorption is driven by electrostatic forces and may be not totally effective because it does not promote a connection among all antibodies to all QDs of the sample, so some QDs are not covered by antibodies and QDs alone do not label RBCs. The labeling of cells incubated with MSA-QDs was more efficient than the labeling of cells incubated with MPA-QDs, probably because the MSA agent presents two free carboxyl groups promoting a better interaction with biomolecules, while MPA has only one carboxyl group.

4. CONCLUSION

The alternative Plate Reader bioconjugation method here proposed was successfully tested and confirmed by flow cytometry and spectroscopic analysis. This bioconjugation detection method consists in a fast semi-quantitative analysis showing sensitivity and reproducibility. By using this method it is possible to analyze multiple types of samples (QDs associated to different proteins or QDs associated to molecules by different conditions such as pH and stoichiometric proportion) at the same time. It is an alternative bioconjugation detection method for researchers especially working in the optical field. Moreover, small amount of samples and reagents are required and the method is semi-quantitative, taking advantage of the native fluorescence of QDs. Therefore, this method could be used as a complementary approach to analyze QD-protein bioconjugation using a microplate well with Fluorescence Plate Reader. Additionally, we limited this optical method in this work to QD-protein bioconjugate detection, but the same idea shows a great potential to be extrapolated for other fluorophores and for other kind of biomolecules, including uncharged biomolecules as well as uncharged pegylated QDs, which are hard to detect by standard non optical methods.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for financial support and student fellowships. We are also grateful to the National Institute of Science in Photonics (INFo) for financial resources. Additionally, we would like to thank the Non-Conventional Polymer Group of Physics Department of UFPE for the spectroscopic analysis, Aggeu Magalhães – FIOCRUZ for the flow cytometry measurements and Fundação de Hematologia e

Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE). We would like to dedicate this work *in memorian* of Prof. Benício de Barros Neto.

REFERENCES

- [1] I. L. Medintz, H.T. Uyeda, E. R. Goldman and H. Mattoussi, *Nature materials*, 4, 435-446 (2005).
- [2] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolia, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir and S. Weiss, *Science*, 307, 538-544 (2005).
- [3] B. S. Santos, P. M. A. Farias and A. Fontes, in *Handbook of Self Assembled Semiconductor Nanostructures Novel Devices in Photonics and Electronics*, M. Henini, Ed. Elsevier, Amsterdam, (2008) vol.1, p. 771–798.
- [4] C. Chornokur, S. Ostapenko, E. Oleynik, C. Phelan, N. Korsunskaya, T. Kryshchuk, J. Zhang, A. Wolcott and T. Sellers, *Superlattices and Microstructures*, 45, 240-248 (2009).
- [5] X. Huang, J. Weng, F. Sang, X. Song, C. Cao and J. Ren, *Journal of Chromatography A*, 1113, 251 – 254 (2006).
- [6] Y. Shan, L. Wang, Y. Shi, H. Zhang, H. Li, H. Liu, B. Yang, T. Li, X. Fang and W. Li, *Talanta*, 75, 1008-1014 (2008).
- [7] W. T. Al-Jamal, K. T. Al-Jamal, A. Cakebread, J. M. Halket and K. Kostarelos, *Bioconjugate Chem.* 20, 1696–1702 (2009).
- [8] J. W. Park, A. Park, S. Lee, N. Yu, S. Lee and B. Kaang, *Bioconjugate Chem.* 21, 597–600 (2010).
- [9] N. Mamedova, N. A. Kotov, A. Rogach and J. Studer, *Nano Letters*, 1(6), 281-286 (2001).
- [10] S. Wang, N. Mamedova, N. A. Kotov, W. Chen and J. Studer, *Nano Letters*, 2 (8), 817-822 (2002).
- [11] R. S. Chouhan, A. C. Vinayaka and M. S. Thakur, *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 1467-1475 (2010).
- [12] L. Shao, C. Dong, F. Sang, H. Qian and J. Ren, *J. fluoresce.* 19, 151-157 (2008).
- [13] K. E. Sapsford, K. M. Tyner, B. J. Dair, J. R. Deschamps and I. L. Medintz, *Anal. Chem.* 83, 4453–4488 (2011).
- [14] V. Sigot, D. J. Arndt-Jovin and T. M. Jovin, *Bioconjugate Chem.* 21, 1465–1472 (2010).
- [15] H. A. Gussin, I. D. Tomlinson, N. J. Muni, D. M. Little, H. Qian, S. J. Rosenthal, R. David and D. R. Pepperberg, *Bioconjugate Chem.* 21, 1455-1464, (2010).
- [16] S. V. Dezhurov, I. Y. Volkova and M. S. Wakstein, *Bioconjugate Chem.* 22, 338–345 (2011).
- [17] H. Y. L. System and X. Gao, *Bioconjugate Chem.* 22, 510–517 (2011).
- [18] I. L. Medintz, T. Pons, J. B. Delehanty, K. Susumu, F. M. Brunel, P. E. Dawson and H. Mattoussi, *Bioconjugate Chem.* 19, 1785–1795 (2008).
- [19] M. R. Warnement, I. D. Tomlinson, J. C. Chang, M. A. Schreuder, C. M. Luckabaugh, S. J. Rosenthal, *Bioconjugate Chem.* 19, 1404–1413 (2008).
- [20] H. Lee, I. Kim and T. G. Park, *Bioconjugate Chem.* 21, 289–295 (2010).
- [21] R. Mittal, P. Marcel and M. P. Bruchez, *Bioconjugate Chem* 22, 362–368 (2011).
- [22] H. Mok, J. W. Park and T. G. Park, *Bioconjugate Chem.* 19(4), 797-801 (2008).

- [23] R. Koole, M. M. Van Schooneveld, J. Hilhorst, K. Castermans, D. P. Cormode, G. J. Strijkers, C. M. Donegá, D. Vanmaekelbergh, A. W. Griffioen, K. Nicolay, Z. A. Fayad, A. Meijerink and W. J. M. Mulder, *Bioconjugate Chem.* 19, 2471–2479 (2008).
- [24] G. Xu, K. Yong, I. Roy, S. D. Mahajan, H. Ding, S. A. Schwartz and P. N. Prasad, *Bioconjugate Chem.* 19, 1179–1185 (2008).
- [25] F. Ducongé, T. Pons, C. Pestourie, L. Hérin, B. Thézé, K. Gombert, B. Mahler, F. Hinnen, B. Kühnast, F. Dollé, B. Dubertret and B. Tavitian, *Bioconjugate Chem.* 19, 1921–1926 (2008).
- [26] B. Barat, S. J. Sirk, K. E. McCabe, J. Li, E. J. Lepin, R. Remenyi, A. L. Koh, T. Olafsen, S. S. Gambhir, S. Weiss and A. M. Wu, *Bioconjugate Chem.* 20, 1474–1481 (2009).
- [27] P. Babu, S. Sinha and A. Surolia, *Bioconjugate Chem.* 18, 146–151, (2007).
- [28] J. B. Delehanty, I. L. Medintz, T. Pons, F. M. Brunel, P. E. Dawson and H. Mattoussi, *Bioconjugate Chem.* 17, 920–927 (2006).
- [29] B. Ballou, L. A. Ernst, S. Andreko, T. Harper, J. A. J. Fitzpatrick, A. S. Waggoner and M. P. Bruchez, *Bioconjugate Chem.* 18, 389–396 (2007).
- [30] A. M. Derfus, A. A. Chen, D. Min, E. Ruoslahti and S. N. Bhatia, *Bioconjugate Chem.* 18, 1391–1396, (2007).
- [31] A. Jayagopal, P. K. Russ and F. R. Haselton, *Bioconjugate Chem.* 18, 1424–1433 (2007).
- [32] G. A. F. van Tilborg, W. J. M. Mulder, P. T. K. Chin, G. Storm, C. P. Reutelingsperger, K. Nicolay, G. J. Strijkers, *Bioconjugate Chem.* 17(4), 865–868 (2006).
- [33] C. Walther, K. Meyer, R. Rennert and I. Neundorff, *Bioconjugate Chem.* 19, 2346–2356, (2008).
- [34] A. Bernardin, A. Cazet, L. Guyon, P. Delannoy, F. Vinet, D. Bonnaffé and I. Texier, *Bioconjugate Chem.* 21, 583–588 (2010).
- [35] S. I. Jung, H. Y. Yeo, I. Yun, J. Y. Leem, I. K. Han IK, Kim JS, Lee JI. *J Mater Sci: Mater Electron* 18, 195–199 (2007).
- [36] V. R. Hering, G. Gibson, R. I. Schumacher, A. Faljoni-Alario and M. J. Politi, *Bioconjugate Chem.* 18, 1705–1708 (2007).
- [37] N. N. Mamedova, N. A. Kotov, A. L. Rogach and J. Studer, *American Chemical Society* 1, 281–285 (2001).
- [38] H. Mattousi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Mikulec and M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* 122, 12142–12150 (2000).
- [39] Hermanson, *Bioconjugate techniques*, Elsevier, Amsterdam, (2008) vol. 2, p. 215.
- [40] M. G. Warnera, J. W. Gratea, A. Tyler, R. M. Ozanicha, Millera KD, Loub J, Marks JD, Bruckner-Lea CJ *Biosensors and Bioelectronics*, 25, 179–184 (2009)
- [41] H. Li, Z. Cao, Y. Zhang, C. Lau and J. Lu, *Analyst.* 136, 1399–1405 (2011).
- [42] Bangs Laboratories, Inc. Adsorption to Microspheres, *TechNote*, 204, 1–6 (2008).
- [43] B. S. Santos, P. M. A. Farias, F. D. de Menezes, A. G. Brasil Júnior, R. Ferreira, M. A. Motta, A. G. Castro Neto, A. A. S. Vieira, D. C. N. Silva, A. Fontes and C.L. Cesar, *Applied Physics A, Materials Science & Processing* 89, 957–961 (2007).

- [44] A. J. Pesce, D. J. Ford, M. Gaizutis and V. E. Pollak, *Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure*, 492, (2), 399-407 (1977).
- [45] L. A. Cantarero, J. E. Butler and J. W. Osborne, *Analytical Biochemistry*, 105(1), 375-382 (1980).
- [46] B. D. Fair and A. M. Jamieson, *Journal of Colloid and Interface Science*, 77 (2), 525-534 (1980).
- [47] P. Dagtepe, V. Chikan, J. Jasinski and V. J. Leppert, *J. Phys Chem C*, 111, 14977-14983 (2007) .
- [48] A. L. Rogach, I. T. Franz, T. A. Klar, J. **Feldmann**, **N. Gaponik**, **V. Lesnyak**, A. Shavel, A. Eychmüller, Y. P. Rakovich and J. F. Donegan, *J. Phys. Chem. C*, 111, 14628-14637 (2007).
- [49] W. W. Yu, L. Qu, W. Guo and X. Peng, *Chem. Mater.* 15, 2854-2860 (2003).
- [50] D. Wu, Q. Wei, Y. Li, B. Du and G. Xu, *International Journal of Biological Macromolecules* 37, 69-72 (2005).
- [51] Y. Yu, Y. Lai, X. Zheng, J. Wu, Z. Long and C. Liang, *Spectrochimica Acta Part A*, 68, 1356-1361 (2007).

ANEXO II

**Normas para Submissão ao Internacional Journal of
Nanomedicine**

Template para formatação do artigo a ser submetido ao International Journal of Nanomedicine.

[This is a document template that you can use to ensure that your paper can be read and typeset with ease:

- Heading levels and text layout have been prepared for you.
- The red text explains each element.
- You will need to delete the red text and/or replace the text with required details prior to submitting your paper.
- For typesetting it is preferable if you prepare your manuscript using Styles, eg.

Heading 1, Normal, etc.]

REVIEW ORIGINAL RESEARCH CASE REPORT RAPID COMMUNICATION
METHODOLOGY PERSPECTIVES EXPERT OPINION [These are paper types. Please choose one and delete the rest.]

Short running header [This is a summary of the manuscript title and should only be six to ten words]

[First author] et al

Manuscript title in sentence case

Author name [Please list all authors here and do not include abbreviated qualifications]¹

Author name²

¹Author affiliations [list all author affiliations in the form of department, institution, city, state, country]; ²Author affiliations

Correspondence: [Full name of corresponding author.]

[Include full postal address here.]

Tel [Full international phone number, eg, +1 404 234 5433]

Fax [Full international fax number.]

Email

Abstract: [There are two types of abstract. One is structured and the other is not. Both should be no more than 300 words. Unstructured abstracts should be given in one paragraph and outline the purpose of the paper, results obtained, and conclusions. Review articles commonly have unstructured abstracts. Original research articles commonly have a structure as follows in the below example. Please see <http://www.dovepress.com/> for examples.]

Purpose:

Patients and methods:

Results:

Conclusion:

Keywords: [Choose four to six keywords. They should not repeat words given in the title.]

Introduction

[This is an example of text formatting. Please note that citations are in superscript numerals following the punctuation. Abbreviations are defined in full at their first instance.]

Subdermal contraceptive implants have been studied and used in humans for over twenty years.^{1,2} Contraceptive implants provide long-acting, highly effective reversible contraception. The most recently introduced subdermal implant, Implanon[®] (N.V. Organon, Oss, the Netherlands), also referred to as the etonogestrel (ENG) implant, is a single rod implant that offers three years of contraceptive efficacy.³⁻⁶ The ENG implant has been used in more than 30 countries, including Australia, Indonesia, and the Netherlands, and was approved by the United States Food and Drug Administration (FDA) in 2006. The ENG implant is an excellent option for women with contraindications to estrogen in addition to any woman who desires long-acting reversible contraception.

The ENG implant is a single rod implant measuring 40 mm long and 2 mm in diameter with a solid core of ethylene vinyl acetate (EVA) impregnated with 68 mg of etonogestrel, the biologically active metabolite of desogestrel.^{7,8} The EVA copolymer allows controlled release of hormone over three years of use.⁹ Each implant is provided in a disposable sterile inserter for subdermal application.

[Generally each major section of your manuscript should have a heading. The most common breakdown of a paper is given below, with some subheadings related to the above example text. Please delete or include as needed.]

Material and methods

Etonogestrel implant [This is an example of a level 2 heading.]

Efficacy [This is an example of a level 3 heading.]

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgments/Disclosures

The author reports no conflicts of interest in this work. [Each manuscript needs include a disclosure of financial interest or other conflict of interest statement. This is where these statements go. Acknowledgments are also included here.]

References

[The following are examples of our reference style. Please see

http://www.dovepress.com/author_guidelines.php?folder_id=208 for more details.]

1. Burnier M, Fricker AF, Hayoz D, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of YM087, a combined V1/V2 vasopressin receptor antagonist in normal subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. 1999;55:633–637.
2. Decaux G. Long-term treatment of patients with inappropriate secretion of antidiuretic hormone by the vasopressin receptor antagonist conivaptan, urea, or furosemide. *Am J Med*. 2001;110:582–584.
3. Fried LF, Palevsky PM. Hyponatremia and hypernatremia. *Med Clin North Am*. 1997;81:585–609.
4. Gheorghiade M, Konstam MA, Burnett JC Jr, et al; Efficacy of Vasopressin Antagonism in Heart Failure Outcome Study With Tolvaptan (EVEREST) Investigators. Short term clinical effects of tolvaptan, an oral vasopressin antagonist,

in patients hospitalized for heart failure: the EVEREST Clinical Status Trials. *JAMA*. 2007;297:1332–1343.

5. Vaprisol (conivaptan HCl injection) [package insert]. Deerfield IL: Astellas Tokai Co.; February 2006.

Table 1 [Table titles are in sentence case and do not end with a full-stop.]

Notes:

Abbreviations: AUC, area under the curve; LS, least squares; NE, not estimable. [These are examples of format.]

Figure 1 [Title of figure is in sentence case and ends in a full stop. Please see http://www.dovepress.com/author_guidelines.php for our Figure requirements.]

[Insert figure here if it is small enough. If large (1MB or more) please send in a separate Word document/PDF/.tiff/.jpg file.]