

Universidade Federal de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

THIAGO VÉRAS CAVALCANTI FIRMINO

**LECTINAS CONJUGADAS A *QUANTUM DOTS* NA AVALIAÇÃO DE
GLICOFENÓTIPOS DAS NEOPLASIAS PROSTÁTICAS**

Recife

2018

THIAGO VERAS CAVALCANTI FIRMINO

**LECTINAS CONJUGADAS A *QUANTUM DOTS* NA AVALIAÇÃO DE
GLICOFENÓTIPOS DAS NEOPLASIAS PROSTÁTICAS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior

Co-orientadora: Profa. Dra. Adriana Fontes

Recife

2018

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

Firmino, Thiago Véras Cavalcanti
Lectinas conjugadas a *Quantum Dots* na avaliação glicofenótipos das neoplasias
prostáticas / Thiago Véras Cavalcanti Firmino. – 2018.

63 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Fontes.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biotecnologia. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde,
Recife, 2018.

Inclui referências e apêndice.

1. Próstata – Câncer. 2. Lectinas. I. Carvalho Júnior, Luiz Bezerra de
(Orientador). II. Fontes, Adriana (Coorientadora). III. Título.

618.152

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 – 425

Thiago Vêras Cavalcanti Firmino

LECTINAS CONJUGADAS A QUANTUM DOTS NA AVALIAÇÃO DE GLICOFENÓTIPOS DAS NEOPLASIAS PROSTÁTICAS

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em 6 Agosto de 2018

Banca examinadora

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Adriana Fontes
Departamento de Biofísica
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Paulo Euzébio Cabral Filho
Departamento de Biofísica e Radiobiologia
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Junior
Departamento de Patologia
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão
Departamento de Patologia
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Maria Julliana Galvão Nunes
Departamento de Patologia
Universidade Federal de Pernambuco

À minha rainha, mãe e dona de tudo que sou.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Virginia Carla Vêras Cavalcanti, por toda dedicação e amor. Por todas noites que me acordou para estudar, por todo esforço incondicional para me oferecer sempre o melhor. Palavras nunca poderão expressar a gratidão e o orgulho que sinto por ser seu filho.

Às minhas irmãs, Amanda Vêras Cavalcanti Firmino e Priscilla Vêras Cavalcanti Firmino, por todas as brigas de irmãos que tivemos. Obrigado por serem minhas companheiras durante todos esses anos.

Às minhas queridas e amadas avós, Aurilete e Dona Rosa, por todo carinho de vó. Guerreiras, mas completamente amáveis. Obrigado por toda dedicação e amor a nossa família.

À professora Dr. Adriana Fontes e ao professor Dr. Paulo Euzébio por toda paciência, gentileza e conhecimento. Vocês são exemplos de amor e dedicação ao trabalho que exercem. Foram dois modelos que me inspiraram a ter coragem de buscar meus novos caminhos.

Aos meus companheiros de laboratório pelas conversas e troca de experiência. Vocês foram um apoio essencial para minha jornada. Sou grato pela existência de cada um de vocês.

Ao professor Dr. Mário Ribeiro por todas conversas. Eu conseguia ver meu potencial através dos seus olhos por meio de sua gentileza. Você sempre me fez acreditar que poderia ir além. Obrigado por todo incentivo, por toda paciência e amizade.

À FACEPE pelo apoio financeiro para o desenvolvimento dessa pesquisa.

A todos pesquisadores que serviram de base para a formação teórica desse trabalho.

"Você não pode ver o que eu vejo porque vê o que você vê. Não pode saber o que sei porque sabe o que você sabe. O que vejo e o que sei não podem ser acrescentados ao que você vê e ao que você sabe porque são coisas diferentes. Também não podem substituir o que você vê e o que você sabe porque isso seria substituir você mesmo." (ADAMS; DUGLAS, 2006, p. 82)

RESUMO

Células neoplásicas frequentemente apresentam alterações nos padrões de glicosilação gerando marcadores para diagnóstico. Neste sentido os *quantum dots* estão emergindo como poderosa ferramenta de grande utilidade na biologia, devido sua capacidade de conjugação às mais diversas biomoléculas e fornecer uma visualização específica e mais detalhada de estruturas celulares e conteúdo molecular. Este trabalho teve como objetivo avaliar a distribuição de carboidratos de tecidos neoplásicos de hiperplasia prostática benigna (HPB) e adenocarcinoma prostático (AP) utilizando *quantum dots* conjugados a lectinas. Foram utilizados *quantum dots* de telureto de cádmio (CdTe) estabilizados com ácido mercaptosuccínico conjugados às lectinas Concanavalina A (Con A), *Aglutinin Wheat Germ* (WGA) e *Peanut Agglutinin* (PNA) para avaliação dos carboidratos α -D-glicose/manose, N-acetil-D-glucosamina/Ácido N-acetil-D-neuramínico e N-acetil-D-galactosamina. Um planejamento fatorial fracionado 2^{5-2} foi desenvolvido para triar os fatores de influência de conjugação de diferentes biomoléculas. Na conjugação referente a WGA os fatores que tiveram maior importância para o processo foi a concentração da proteína e o fator de interação de segunda ordem entre concentração de NHS e o tempo. Já na conjugação referente a PNA os fatores que tiveram maior participação para o processo foi o tempo e a concentração do quantum dot. O padrão de expressão de resíduos de carboidratos reconhecidos pelos conjugados utilizados nesse estudo está associado a região celular dos tecidos, não apresentando marcação dos conjugados a região estromal. A expressão de N-acetil-D-galactosamina não foi significativa em nenhum tecido neoplásico, entretanto observou-se uma maior expressão de D-glicose/manose, N-acetil-D-glucosamina/Ácido N-acetil-D-neuramínico no tecido de adenocarcinoma prostático. Os resultados obtidos neste trabalho indicam um grande potencial na bioconjugação de *quantum dots* a lectinas. Essas sondas nanobiotecnológicas têm alta capacidade de elucidação do microambiente neoplásico celular e extracelular.

Palavras-chave: *Quantum dots*. Telureto de cádmio. WGA. PNA. Con-A. Câncer de próstata.

ABSTRACT

Neoplastic cells often present alterations in glycosylation patterns generating markers for diagnosis. In this sense quantum dots are emerging as powerful tool of great utility in biology due to its ability to conjugate to the most diverse biomolecules and provide a specific and more detailed visualization of cellular structures and molecular content. This work aimed to evaluate the carbohydrate distribution of neoplastic tissues of benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostatic adenocarcinoma (AP) using quantum dots conjugated to lectins. In the present study, the use of quantum of cadmium telluride (CdTe) stabilized with mercaptosuccinic acid conjugated to lectins Concanavalin A (Con A), Agglutinin Wheat Germ (WGA) and Peanut Agglutinin (PNA) were evaluated for α -D-glucose / mannose carbohydrate, N acetyl-D-glucosamine / N-acetyl-D-neuraminic acid and N-acetyl-D-galactosamine. A 2^{5-2} fractional factorial design was developed to screen the influence factors of conjugation of different biomolecules. In the conjugation referring to WGA the factors that had major importance for the process were the protein concentration and the second order interaction factor between NHS concentration and time. In the PNA conjugation, the factors that had the greatest participation in the process were the time and concentration of the quantum dot. The expression pattern of carbohydrate residues recognized by the conjugates used in this study is associated with the cellular region of the tissues, without marking the conjugates to the stromal region. The expression of N-acetyl-D-galactosamine was not significant in any neoplastic tissue, however a higher expression of D-glucose / mannose, N-acetyl-D-glucosamine / N-acetyl-D-neuraminic acid was observed in the tissue of prostatic adenocarcinoma. The results obtained in this work indicate a great potential in quantum dots bioconjugation of lectins. These nanobiotechnological probes have high elucidation capacity of the cellular and extracellular neoplastic microenvironment.

Keywords: Quantum dots. Cadmium telluride. WGA. PNA. Con-A. Prostate cancer.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 OBJETIVOS.....	12
1.1.1 Objetivo geral.....	12
1.1.2 Objetivos específicos.....	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 ANATOMIA DA PRÓSTATA.....	13
2.2 CÂNCER DE PRÓSTATA.....	15
2.3 EPIDEMIOLOGIA.....	16
2.4 FATORES DE RISCO.....	16
2.5 SINTOMAS E DIAGNÓSTICOS.....	17
2.6 DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO.....	19
2.7 GLICOSILAÇÃO E MARCADORES DO CÂNCER.....	21
2.8 LECTINAS.....	22
2.9 QUANTUM DOTS.....	26
2.10 PROPRIEDADES GERAIS DOS SEMICONDUTORES.....	27
2.11 CONFINAMENTO QUANTICO EM SEMICONDUTORES.....	29
2.12 SÍNTESE E PASSIVAÇÃO DE NANOCRISTAIS SEMICONDUTORES.....	30
2.13 QUANTUM DOTS COMO MARCADORES BIOLÓGICOS.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 MATERIAL.....	35
3.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE CdTe-MSA.....	35
3.3 CONJUGAÇÃO DE LECTINA-QD.....	35
3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS CONJUGADOS LECTINA-QD.....	36
3.4.1 Ensaio de fluorescência em microplaca.....	36
3.5 MARCAÇÃO DE TECIDO COM CONJUGADOS DE LECTINA-QD.....	37
3.6 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	39
4 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	40
5 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIA.....	52
APÊNDICE A- ARTIGO.....	63

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte mundialmente; é esperado um crescimento em todo o mundo devido ao aumento do envelhecimento da população. Nos países mais desenvolvidos a predominância do câncer atinge o pulmão, próstata, mama feminina, cólon e reto (TORRE et al., 2015). Com exceção do câncer de pele não melanoma, em 2012 estimou-se 14,1 milhões de casos mundiais de câncer e 8,2 milhões de óbitos. Houve um discreto predomínio do sexo masculino tanto na incidência (53%) quanto na mortalidade (57%) (INCA, 2017a).

As neoplasias malignas caracterizam-se pelo crescimento descontrolado e pela disseminação de células cancerígenas, que se deixamos evoluir em função da sua história natural pode resultar na morte do portador (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). Este processo não é restrito apenas a um único conjunto de células em proliferação, mas sim a um tecido complexo composto por múltiplos tipos distintos de células que interagem entre si e com o microambiente envolvente (ABRANTES, 2013). Existem diversos fatores, tanto externos como internos, que podem conduzir ao desenvolvimento desta doença, entre eles, o tabaco, as dietas pouco saudáveis, as mutações genéticas hereditárias ou as condições imunológicas do hospedeiro (VANDER HEIDEN; DEBERARDINIS, 2017).

O câncer de próstata ocupa a segunda posição entre as neoplasias malignas que acometem os homens atrás apenas do câncer de pulmão. Em 2012, as estimativas revelaram aproximadamente 1,1 milhão de casos novos, constituindo 15% dos cânceres no sexo masculino. Para o Brasil, estimam-se 68.220 casos novos de câncer de próstata para cada ano do biênio 2018-2019 (INCA, 2017a). É uma doença altamente prevalente e foi observada em cerca de três milhões de indivíduos, na população norte-americana, no ano de 2014 (HOWLANDER et al., 2017).

A glicosilação é um fenômeno comumente associado com transformação maligna, invasão e metástase de células do câncer, de modo que, quase todos os tipos de células malignas demonstram alterações em seus padrões de glicosilação quando comparadas as suas contrapartes normais (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011). Embora muitos fatores contribuam para a glicosilação aberrante no câncer, um dos mecanismos mais importante é a expressão de glicosiltransferases e glicosidases,

de modo que, modificações na expressão dessas enzimas resulta na síntese cadeias glicídicas alteradas (ramificadas ou truncadas) (MEANY; CHAN, 2011).

Devido à sua especificidade em relação aos carboidratos, as lectinas podem ser ferramentas valiosas na identificação e monitoramento de aberrações na glicosilação de carboidratos de superfície celular durante a diferenciação celular e transformação neoplásica (FUSTER; ESKO, 2005). 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 superfícies celulares (SHARON; LIS, 2004).

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas que podem se ligar, de forma reversível, a resíduos de açúcares específicos, através de pontes de hidrogênio e interações de Van Der Waals (CUNHA et al., 2018). Um número crescente de lectinas estão sendo empregadas para estudos da glicofenotipagem de neoplasias de mama (ANDRADE et al., 2013), próstata (CORREIA et al., 2010; DA SILVA et al., 2014), pâncreas (ZHAO et al., 2006) entre outros.

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 (ANDRADE, 2013). Nesse contexto, surgem os *quantum dots*, que consistem em nanopartículas emissoras de luz. Os *quantum dots* emergiram como uma nova classe de marcadores fluorescentes com aplicação na biologia e na medicina. Conjugados a anticorpos, peptídeos e outras pequenas moléculas, estes podem ser utilizados para identificar marcadores tumorais com afinidade e especificidade (XING; RAO, 2008).

Com o avanço da nanotecnologia a utilização de quantum dots conjugados a lectinas proporciona uma poderosa ferramenta para o estudo da glicobiologia do câncer. No presente trabalho foram avaliados o perfil de glicanos em neoplasias de próstata empregando conjugados de Concanavalina A (Con-A), *Triticum vulgaris* (WGA) and *Peanut Agglutinin* (PNA) a nanopartículas semicondutoras.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de carboidratos em tecidos de adenocarcinoma prostático e hiperplasia benigna empregando *quantum dots* conjugados a lectinas.

1.1.2 Objetivos específicos

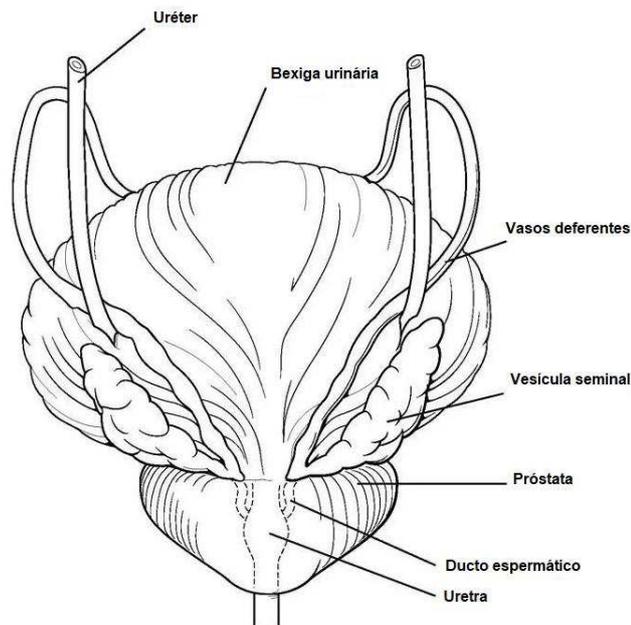
- Sintetizar e caracterizar opticamente *quantum dots* de telureto de cádmio;
- Conjugar Concanavalina A (Con-A), *Peanut Agglutinin* (PNA) e *Agglutinin Wheat Germ* (WGA) aos quantum dots;
- Avaliar os fatores contribuintes no processo de conjugação do nanocristal à biomolécula;
- Quantificar a expressão de carboidratos nos tecidos neoplásicos de próstata utilizando o ensaio fluorescente em microplacas;
- Investigar a distribuição e expressão de carboidratos na superfície celular e na matriz extracelular de tecidos de hiperplasia prostática benigna e adenocarcinoma prostático.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ANATOMIA DA PRÓSTATA

A próstata é uma glândula acessória sexual masculina que está anatomicamente localizada abaixo da bexiga e acima do pênis, bem em frente ao reto como ilustrado na Figura 1 (AARON; FRANCO; HAYWARD, 2016). A glândula juntamente com as vesículas seminais e as glândulas bulbouretrais produzem cerca de 95% do fluido seminal que nutre e protege os espermatozoides provenientes dos testículos. As vesículas seminais e o ducto espermático se abrem para a próstata e, durante a ejaculação, o líquido seminal é espremido na uretra, de onde é expulso (GUPTA; SHARMA; KUMAR, 2017).

Figura 1. Visão posterior da próstata.



Fonte: WebMed (www.webmed.com)

A próstata saudável tem o peso médio de aproximadamente 11 gramas (LEISSNER; TISELL, 1979). Ela é encapsulada por uma camada de tecido fibroelástico, levando a septos se estendendo para dentro e dividindo a próstata em lobos diferentes. Os lóbulos dispõem cerca de cinquenta glândulas saculares irregularmente ramificadas, ductos excretores, estroma, vasos sanguíneos e nervos (GRAHAM et al., 2010). A próstata é revestida com duas camadas de células

epiteliais, a camada externa composta de epitélio cuboidal e a camada interna é composta por epitélios colunares altos. O epitélio de transição ou urotélio tem a capacidade de contrair e expandir de acordo com o volume de fluido dentro (GILBERT, 2017).

Histologicamente, a próstata é composta por epitélio e um estroma fibromuscular. O epitélio forma glândulas consistindo principalmente de células secretoras, mas também podem ser encontradas células neuroendócrinas e células basais (KRUŠLIN et al., 2015). O produto das células secretoras é liberado em espaços luminais que finalmente entram nos dutos ejaculatórios. Circundando as glândulas epiteliais encontra-se o estroma fibromuscular composto por fibroblastos, células musculares lisas e matriz extracelular (TAYLOR; RISBRIDGER, 2008).

As células epiteliais secretoras recebem inervação parassimpática que estimulam a produção secretora através da sinalização muscarínica. As células musculares lisas do estroma fibromuscular são estimuladas pelos nervos simpáticos β -adrenérgicos, o que resulta na expulsão de secreções para o espaço luminal (ISAACS, 2013).

A função principal da próstata é o armazenamento de parte do fluido seminal e auxiliar a ejaculação durante a atividade sexual (PENET et al., 2017). Os músculos lisos da próstata permitem a expulsão do sêmen durante a ejaculação. O fluido levemente alcalino produzido pela próstata perfaz 25% do fluido seminal e permite a motilidade e viabilidade do espermatozoide (RIDER et al., 2016). Um dos principais constituintes da secreção prostática é o antígeno específico da próstata (PSA), juntamente com citrato, zinco, espermina e colesterol (SHAO et al., 2017).

A próstata pode ser classificada por dois sistemas diferentes: zonas ou lobos. A classificação zonal é a mais utilizada pelos patologistas. A zona periférica constitui cerca de 70% da próstata e envolve a uretra. Cerca de 80% das neoplasias prostáticas se desenvolvem na zona periférica (HARVEY et al., 2012). O ducto ejaculatório é circundado pela zona central da próstata, onde a incidência dos cânceres prostáticos é de apenas 2,5%, porém as neoplasias que aqui se formam são mais agressivas (COHEN et al., 2008). O aumento benigno do tecido prostático ocorre na zona de transição que normalmente apresenta um crescimento ao longo do tempo (CAO et al., 2017).

O epitélio prostático é formado por três tipos celulares distintos, as células secretoras, as basais e as neuroendócrinas (JOSHUA et al., 2008). As células secretoras têm como função a secreção fisiológica, as células basais estão posicionadas sobre a membrana basal adjacente das células secretoras e sua ausência pode ser um marcador determinante de carcinoma da próstata (CaP). As células neuroendócrinas estão dispersas por toda a glândula e estão envolvidas na regulação da atividade das células secretoras (SHEN; ABATE-SHEN, 2010; SQUIRE et al., 2011).

A glândula prostática pode ser afetada por diversas patologias, entre as mais comuns encontra-se a prostatite e a hiperplasia benigna prostática (HBP). A hiperplasia é caracterizada pelo aumento do número de células epiteliais e do estroma, conseqüentemente ocorre o aumento do volume da próstata. Essa patologia sucede frequentemente na zona de transição, sendo dependente de androgênios para seu desenvolvimento (CHUGHTAI et al., 2016; THIRUCHELVAM, 2014).

2.2 CÂNCER DE PRÓSTATA

O câncer é um grupo de doenças descrito pelo crescimento desregulado de células com metabolismo anormal (INCA, 2017a). Todos os tipos de célula podem sofrer tais alterações malignas e se tornarem câncer, no entanto, apenas as células epiteliais podem se tornar carcinoma (LOBO et al., 2007). O ciclo celular normal é interrompido e as células tumorais crescem em uma região, se espalhando para os arredores do tecido. Por fim migram para outras partes do corpo através do sistema linfático e sistema vascular (VANDER HEIDEN; DEBERARDINIS, 2017).

No processo de carcinogênese, as células normais são transformadas em células cancerígenas devido a divisão celular descontrolada. A divisão celular normal mantém um equilíbrio entre proliferação e morte celular com processos rigorosamente regulados (WICHA; LIU; DONTU, 2006). Mutações no DNA podem perturbar esses processos, levando a célula se dividir rapidamente. A massa resultante pode ser benigna, não se alastrando para outras partes do corpo, ou maligna que pode invadir órgãos e se espalhar para locais distantes (SHAW et al., 2017).

Um possível precursor do carcinoma prostático é a neoplasia intraepitelial prostática (NIP). NIP envolve o desenvolvimento anormal das células epiteliais que

revestem as glândulas da próstata (SWANSON et al., 2018). O baixo grau de NIP é caracterizado pelo aumento populacional de células epiteliais, espaçamento irregular e os núcleos hipercromáticos e pleomórficos. Em alto grau os núcleos das células apresentam um maior nível de hipercromatismo e pleomorfismo (TANEJA et al., 2013). A presença de NIP sugere um aumento do risco de adenocarcinoma, mas pode levar até dez anos para que essa neoplasia se forme.

2.3 EPIDEMIOLOGIA

O câncer é uma das principais causas mortas do mundo e segundo a União Internacional de Combate ao Câncer, em 2020 será a doença que mais matará pessoas (STEWART; KLEIHUES, 2003). No Brasil, estima-se 68.220 novos casos de câncer de próstata por ano. Segundo o INCA, esses valores correspondem a um risco de 66,12 casos novos para cada 100 mil homens (INCA, 2017a).

As neoplasias prostáticas são as que mais atingem homens em todas as regiões do Brasil com ocorrência de 96,85/100 mil na região Sul, 69,83/100 mil na região Sudeste, 66,75/100 mil na região Centro-Oeste, 55,17/100 mil na região Nordeste e 29,41/100 mil na região Norte (INCA, 2017a).

2.4 FATORES DE RISCO

A incidência do câncer de próstata varia em todo o mundo, sendo mais comum em países ocidentais do que em países do Leste Asiático em desenvolvimento. Entretanto a patogênese e a etiologia dessa neoplasia ainda não está totalmente explicada (EELES et al., 2014). Estudos epidemiológicos que investigam as taxas de incidência do câncer de próstata em populações que migraram entre continentes sugerem que fatores ambientais de risco e estilo de vida são determinantes do risco dessa doença (LEE et al., 2007). Além da idade e da raça, o histórico familiar também é um fator de risco estabelecido para o câncer. Parentes de primeiro grau de homens com câncer de próstata tem aproximadamente quatro vezes mais o risco de desenvolver a neoplasia que homens sem histórico familiar (GOLDGAR et al., 1994).

2.5 SINTOMAS E DIAGNÓSTICOS

Os sintomas mais comuns e relatados em pacientes com câncer de próstata são: dificuldade de urinar, retardo em iniciar e finalizar o ato urinário, presença de sangue na urina, diminuição do jato urinário e necessidade de urinar diversas vezes durante o dia e noite (BRASIL, 2017).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), podem ser abordadas diferentes estratégias para a detecção de um câncer. A primeira estratégia seria o diagnóstico precoce e é destinada a homens que apresentam sinais iniciais da doença. A segunda estratégia é o rastreamento, voltada para homens sem nenhum sintoma e aparentemente saudáveis (MELOROSE; PERROY; CAREAS, 2015).

Atualmente os exames para diagnóstico do câncer de próstata é o exame digital retal que consiste no exame da próstata por meio do toque e também o teste de antígeno específico da próstata (PSA) onde níveis elevados desta molécula no sangue pode indicar infecção, inflamação ou até mesmo o câncer de próstata (MOYER, 2012). Se o exame digital retal e/ou PSA detectarem alguma anomalia, o médico deve recomendar mais testes para determinar se o paciente de fato apresenta alguma neoplasia prostática, como a realização de ultrassonografia da próstata e biópsia (HEIDENREICH et al., 2014).

Ao definir o diagnóstico do câncer de próstata, os pacientes recebem um estágio clínico, que por sua vez descreve a extensão da doença e é um pré-requisito para as futuras decisões sobre o tratamento. O estágio clínico é baseado nos seguintes eixos:

- Estágio T: Extensão do tumor
- Estágio N: Envolvimento de linfonodos
- Estágio M: Ocorre a metástase para órgãos distantes

O estágio clínico T é determinado pelo exame digital retal, no entanto a precisão é baixa e 50% dos homens considerados com doença confinada ao órgão apresentam extensão extraprostática (KHAN, 2011).

Depois de obter biópsias de próstata, os tecidos são fixados em formol e depois são imersos em parafina. Em seguida os blocos parafinizados são cortados em

seções de lâmina e, geralmente, corados com hematoxilina e eosina (H&E)(HUMPHREY, 2007).

Após o processamento, o patologista avalia as seções de biópsia quanto à presença de adenocarcinoma prostático. Os principais critérios para o adenocarcinoma prostático incluem (SÆTER, 2017):

- Padrão de crescimento infiltrativo das glândulas
- Ausência de células basais
- Núcleos atípicos

Outros critérios também podem indicar a presença de adenocarcinoma na próstata, embora não sejam específicos para o câncer. Estes critérios incluem: mucina intraluminal azul, muitas células mitóticas, cristalóides e intraluminais e hiper cromasia nuclear (MONTIRONI et al., 2014).

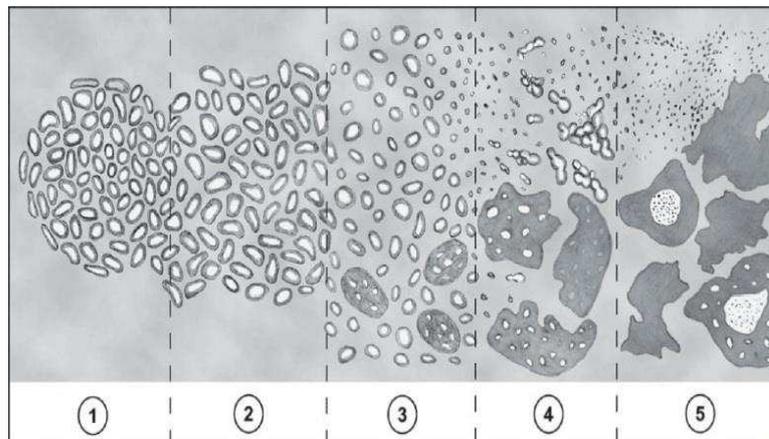
O sistema de classificação de Gleason para o câncer de próstata foi desenvolvido em 1966. O sistema ilustrado na Figura 2 passou por modificações desde a sua criação e atualmente o CP é classificado de acordo com a International Society of Urological Pathology Consensus Conference sobre a classificação de Gleason de Carcinoma Prostático (ISUP 2005). Apesar de 52 anos passados desde o seu desenvolvimento inicial, o sistema de classificação de Gleason continua sendo o melhor preditor do resultado patológico e clínico do câncer de próstata (CAMBRUZZI et al., 2010).

A imunohistoquímica é uma valiosa ferramenta no diagnóstico do adenocarcinoma. A coloração com anticorpos contra células basais pode auxiliar na avaliação da ausência da camada basal. Os anticorpos comumente utilizados a esse respeito incluem 34βE12/CK903 que se liga à citoqueratina de alto peso molecular (HMWCK) expressa no citoplasma da célula basal e p63 que detecta proteínas no núcleo das células basais (HUMPHREY, 2007) .

A maioria dos pacientes que se submetem a uma biópsia da próstata devido a uma elevação moderada do PSA não apresenta evidências de câncer, resultando em um sofrimento desnecessário para os pacientes e uma enorme carga econômica para o Sistema de Saúde (INCA, 2017b). Além disso, em muitos pacientes, o câncer de próstata não é detectado até que o câncer se torne avançado e/ou metastático. Portanto, melhores biomarcadores clínicos são um requisito urgente para o

diagnóstico inicial e estadiamento do câncer de próstata (ROMERO OTERO et al., 2014).

Figura 2. Sistema de classificação de Gleason. O padrão 1-2 consiste em glândulas de tamanho médio bem diferenciadas e moderadas, e raramente são relatadas em biópsias. O padrão 3 tem glândulas moderadamente diferenciadas, ainda reconhecíveis, tipicamente menores que o padrão 1 e 2, mas varia em tamanho e forma, e se infiltra dentro e entre as glândulas. O padrão 4 tem glândulas mal diferenciadas, mal definidas e muitas vezes fundidas, com lumina malformada. Padrão 5 não possuem mais a diferenciação do que seria glândula.



Fonte: (SANDSMARK, 2017)

2.6 DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

A origem das células neoplásicas ainda tem sido alvo de muitos debates. Existe a vertente que apoia o conceito de que a origem do câncer de próstata se origina das células luminiais das glândulas prostáticas. No entanto, também há dados sugerindo que o câncer de próstata surge a partir das células basais das glândulas (YU et al., 2012).

A primeira lesão precursora do câncer de próstata é a atrofia inflamatória proliferativa (AIP). O termo AIP foi proposto por MARZO et al., 2006 para designar focos de epitélio glandular proliferativo com o aspecto morfológico de atrofia simples ou hiperplasia pós-atrótica (PAH), ocorrendo em associação à inflamação. Os mesmos autores explicam que apesar da proliferação, a lesão não cresce em volume devido a uma possível perda celular que compensa a proliferação. Além disso, esses autores acreditam que o epitélio em regeneração suprime a morte celular programada,

ao menos temporariamente, para substituir as células perdidas, o que embasa o conceito de que a AIP é uma lesão regenerativa (TOLEDO et al., 2010).

A inflamação é caracterizada pela presença de células inflamatórias, citocinas, quimiocinas e prostaglandinas. A resposta inflamatória pode desencadear a iniciação e progressão do tumor através do dano genético, promoção da proliferação celular e angiogênese (KNUDSEN; VASIOUKHIN, 2010).

Após a AIP, pode ocorrer neoplasia intraepitelial prostática (NIP). As características do NIP incluem a displasia e núcleos atípicos, porém com lâmina basal de característica regular – o que a distingue do carcinoma. O papel do NIP como precursor do câncer de próstata está bem estabelecido (BARRON; ROWLEY, 2012; EPSTEIN, 2009).

As células de câncer de próstata tem a capacidade de transitar entre os estados epitelial e mesenquimal, o que facilita o desenvolvimento metastático (KALLURI; WEINBERG, 2009). Em primeiro lugar, as células de CP podem sofrer transição epitelial-mesenquimal, que é caracterizada pela perda de moléculas de adesão e aumento da capacidade migratória (DAS et al., 2014). Assim, as células que passam por essa transformação tem a capacidade de deixar o local do tumor primário, entrar na circulação e invadir órgãos distantes (NIETO, 2013). Após a chegada ao sítio metastático, as células tumorais revertem o estado e passam pela transição mesenquimal-epitelial. A plasticidade das células de CP está relacionada às características das células-tronco e é tida como a capacidade de criar lesões metastáticas viáveis (KONG et al., 2010).

O estroma da próstata saudável consiste em células musculares lisas e matriz extracelular. Durante a carcinogênese, o estroma pode ser preenchido por fibroblastos associados ao carcinoma (FACs) e há um aumento da deposição de matriz extracelular (FRANCO et al., 2010). O processo é semelhante ao processo de cicatrização de feridas onde o fibroblasto é ativado como miofibroblastos. Considerando que a cicatrização de feridas é um processo finito e que os miofibroblastos eventualmente sofrem apoptose, as alterações estromais que ocorrem nos carcinomas são perpetuadas e desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do tumor (OLUMI et al., 1999; OSTMAN; AUGSTEN, 2009).

A influência do estroma e FACs na patogênese do CP é multifacetada e não se limita ao sítio neoplásico primário. As células estromais são contribuintes importantes para a metástase pela liberação de fatores solúveis que resultam em aumento da permeabilidade vascular e penetração dos vasos sanguíneos pelas células tumorais (BARRON; ROWLEY, 2012). A interação entre tumor e estroma é mediada pela produção de vários fatores solúveis. De interesse particular, está TGF- β com complexo e paradoxal papel na contribuição da fisiopatologia do CP (HORIMOTO et al., 2012). Por exemplo, o TGF- β pode induzir ao estado de transição epitelial-mesenquimal, estimular a angiogênese e induzir a secreção de fatores de crescimento (FRANCO et al., 2010). Outros fatores envolvidos na sinalização parácrina entre o estroma e o tumor incluem o fator de crescimento insulina 1 (IGF-1) e fator de crescimento do hepatócito ou fator de dispersão (HGF) (OSTMAN; AUGSTEN, 2009).

2.7 GLICOSILAÇÃO E MARCADORES DO CÂNCER

Nas células, há um processo conhecido como glicosilação que é a adição de carboidratos a lipídios ou proteínas, que tem papel fundamental no reconhecimento celular, adesão e proliferação. Mais de 70% das proteínas celulares são glicosiladas (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011)

Modificações de glicosilação podem afetar fortemente a estrutura e função das glicomoléculas. Sem os glicanos a vida multicelular não seria possível. Podemos encontra-los em plantas, animais e microrganismos (LEBRILLA; AN, 2009). Mais da metade de todas as proteínas humanas e quase todas as proteínas de membrana e extracelulares são glicosiladas (APWEILER; HERMJKOB; SHARON, 1999). Diferentes glicanos podem ser ligados a múltiplos locais de glicosilação em uma única proteína, assim cada glicoproteína apresenta numerosas glicofórmulas (LIS; SHARON, 1993).

Devido à natureza da ligação pela qual os glicanos estão ligados a estruturas polipeptídicas, os glicanos são divididos em *N*-glicanos, *O*-glicanos ou *C*-glicanos. O *N*-glicano são oligossacarídeos ligados covalentemente a resíduos de asparagina de uma cadeia polipeptídica que geralmente ocorre na sequência Asn-X-Ser/Thr (VARKI et al., 2009). Esses glicanos são transferidos para a porção proteica no lado luminal da membrana do retículo endoplasmático. Um *O*-glicano é geralmente ligado à cadeia polipeptídica via *N*-acetilglicosamina a um resíduo de serina ou treonina. Os *C*-

glicanos são uma forma rara de glicosilação que envolve a adição de uma α -manopiranosose ao carbono C2 do anel indol do triptofano (KESER, 2016).

Células neoplásicas frequentemente apresentam níveis de glicosilação acima das células normais, gerando estruturas de glicanos que funcionam como marcadores que podem ser utilizados para diagnóstico e tratamento (NIE et al., 2015). Um dos exemplos bem conhecidos é o antígeno específico da próstata das células tumorais, que contém um nível mais elevado de fucose e ausência de ácido siálico em comparação com o PSA das células normais (PERACAULA et al., 2003).

O diagnóstico de neoplasias prostáticas pela medição do PSA pode ser inespecífico e não confiável, podendo resultar em falsos positivos. Entretanto a especificidade do teste pode ser melhorada pela mensuração da alteração de glicosilação do PSA (MEANY et al., 2009).

O PSA contém uma ligação N-oligossacarídeo localizada em Asn45 e tem sido descrita com elevadas cadeias de manose. Os N-glicanos do PSA de homens saudáveis consistem principalmente de cadeias complexas bi-anténaria, enquanto no soro de pacientes com câncer de próstata os N-glicanos apresentam cadeias tri- e tetra-anténaria (TABARES et al., 2006).

Pesquisas voltadas a glicobiologia tem resultado em muitas informações medicinais relevantes, permitindo traçar novas rotas na pesquisa do câncer, relacionado a detecção da doença e manipulação clínica com a intenção de criar novas estratégias para prevenção e terapia (PINHO; REIS, 2015). As lectinas têm sido amplamente utilizadas como ferramenta de detecção e análise do perfil de expressão de carboidratos no câncer devido a eficiente capacidade de reconhecimento de glicanos específicos (HASHIM; JAYAPALAN; LEE, 2017).

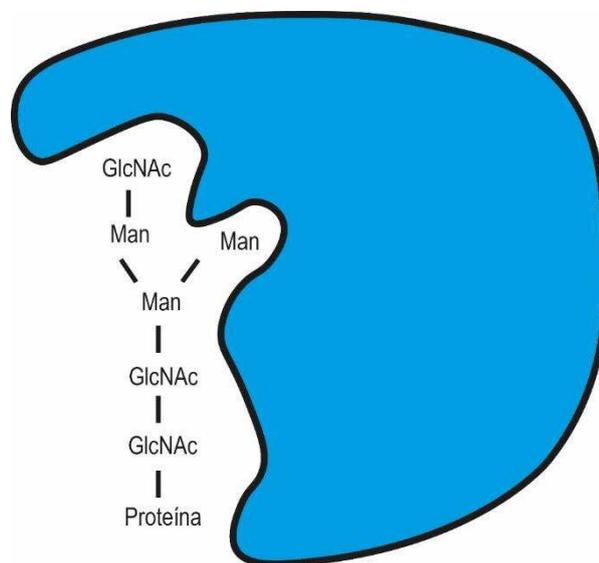
2.8 LECTINAS

Lectinas são proteínas de origem não imunológica que possuem especificidade, por meio de ao menos, dois sítios de ligação por determinados carboidratos como esquematizado na Figura 3 (HASHIM; JAYAPALAN; LEE, 2017).

Essas biomoléculas foram observadas pela primeira vez na Universidade de Dorpat pelo estudante de medicina Hermann Stillmark em 1888 quando trabalhava

em sua tese com *Ricinus communis*. Posteriormente, verificou-se que extratos de plantas não tóxicas como feijão, ervilha e lentilha, também causavam aglutinação de eritrócitos (SHARON; LIS, 2004). Ao identificarem nas aglutininas a propriedade em distinguir hemácias de diferentes tipos sanguíneos, BOYD & SHAPLEIGH, 1954 as denominaram de lectinas, termo que vem do latim *legere* e significa selecionar ou escolher.

Figura 3. Representação hipotética do domínio de reconhecimento de carboidratos de uma lectina e seus carboidratos ligantes. Adaptado de (COLIN HUGHES, 1997)



Fonte: O autor (2018)

Pela sua atividade de reconhecer carboidratos, as lectinas possuem diversas funções biológicas. As lectinas vegetais, que normalmente causam aglutinação de certas células animais, desempenham um papel importante na defesa contra a invasão de vírus, bactérias ou fungos (DE OLIVEIRA DIAS et al., 2015). Acredita-se também que elas medeiam a relação de simbiose entre plantas e microrganismos (DE HOFF; BRILL; HIRSCH, 2009), e algumas podem estar envolvidas em vias reguladoras e de sinalização em células vegetais (CHEN et al., 2002).

As lectinas inicialmente foram classificadas com base na sua ligação com estruturas de glicanos. Elas foram caracterizadas como galactose, *N*-acetilglicosamina, *N*-acetilgalactosamina, glicose, fucose, manose, maltose e ácido siálico (LIS; SHARON, 1986). Mais tarde, elas também foram classificadas com base

nas características e números de seus domínios de sítios de ligação, ou seja, merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (PEUMANS et al., 2001). Com a elucidação mais detalhada das propriedades estruturais das lectinas através do avanço da tecnologia, a classificação foi baseada nos dobramentos da proteína, estruturas e domínios e sua evolução (VAN DAMME; LANNON; PEUMANS, 2008).

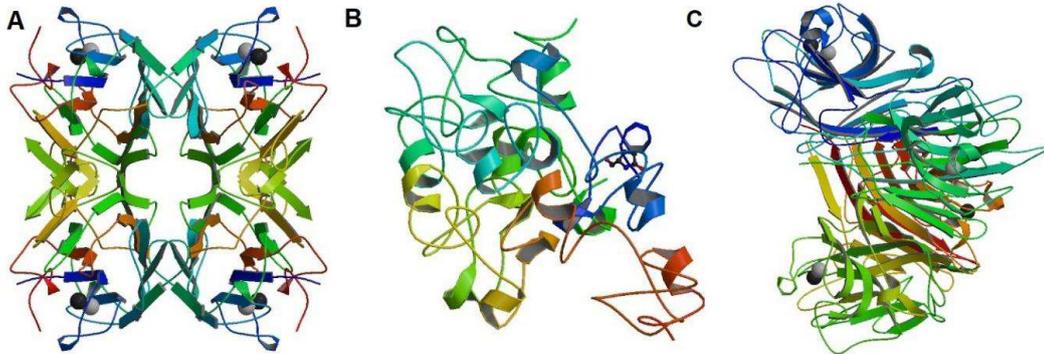
A Con-A é uma lectina vegetal obtida das sementes de *Canavalia ensiformis*, sendo uma das lectinas de leguminosas mais estudada devido as inúmeras aplicações biológicas. Ela reconhece e se liga especificamente à resíduos de α -D-glicose/manose de carboidratos complexos, exibindo alta afinidade por oligossacarídeos de glicoproteínas e glicolipídios de superfície celular. A estrutura molecular é apresentada como um tetrâmero acima de pH 7 e um dímero abaixo de pH 6, com cada monômero de Con A apresentando peso molecular de 26 KDa e um sítio de ligação à carboidratos (CHATTERJEE; MANDAL, 2005; SHARON; LIS, 2004).

A lectina PNA é uma proteína não glicosilada tetraédrica, onde cada monômero tem 25.2 kDa com 236 resíduos de comprimento. Tem especificidade para monossacarídeo galactose e se liga a carboidratos associados ao tumor β -gal(1 \rightarrow 3)galNAc, comumente conhecido como antígeno T (KUNDHAVAI NATCHIAR et al., 2004). A organização estrutural terciária das subunidades monoméricas são semelhantes as que ocorrem entre as lectinas de leguminosas. Todavia, uma característica notável da molécula de PNA é uma incomum 'abertura' na estrutura quaternária sem pontos de simetria (AUDETTE; VANDONSELAAR; DELBAERE, 2000; YOSHIMOTO et al., 2016).

A WGA é uma lectina dimérica, extraída da *Triticum vulgare*, não glicosilada, com as cadeias polipeptídicas associadas covalentemente com pontes de dissulfeto que estabilizam o dímero. Tem afinidade por N-acetil-D-glucosamina/Ácido N-acetil-D-neuramínico e N-acetil-D-galactosamina. Cada monômero da WGA é composto por quatro domínios de reconhecimento de carboidratos, do tipo heveína. Na forma dimérica os domínios de ligação a carboidratos estão localizados na interface entre os monômeros sendo responsáveis pela estabilidade do dímero. Dos oitos sítios de ligação, não mais que quatro são ocupados simultaneamente. Quando as duas cadeias polipeptídicas se separam, o que ocorre em um pH ácido, cada monômero acaba por apresentar um domínio de reconhecimento de carboidratos por domínio

heveína (LAYNEZ et al., 2000). Na Figura 4 estão as estruturas cristalinas das lectinas Con-A, WGA e PNA.

Figura 4. Estrutura cristalina da Con-A (A), WGA (B) e PNA (C).



Fonte: AUDETTE; VANDONSELAAR; DELBAERE, 2000; HARATA; NAGAHORA; JIGAMI, 1995; PARKIN; RUPP; HOPE, 1996

O termo domínio heveína faz menção a uma pequena proteína de 43 aminoácidos, 4,5 kDa, extraída do látex de *Hevea brasiliensis*. Estruturalmente a heveína é especialmente rica em resíduos de cisteína e glicina e está mantida por quatro pontes dissulfeto, o que lhe confere uma estabilidade notável. Esta característica estrutural é observada nas lectinas com este domínio (NEUMANN et al., 2004).

Devido à sua capacidade de interagir com carboidratos de maneira específica, as lectinas têm sido utilizadas como marcadores histoquímicos no estudo de modificações no perfil de expressão de carboidratos de superfície das células tumorais, auxiliando na caracterização e diferenciação de tecidos normais e transformados (COELHO et al., 2017; DA SILVA et al., 2014). A técnica oferece vantagens como: sensibilidade, estabilidade e fácil manipulação, contribuindo com informações sobre o desenvolvimento, estágios de diferenciação, grau de malignidade a partir do estabelecimento do perfil de carboidratos expresso no tecido estudado (BELTRAO et al., 1998, 2003).

Acredita-se que alterações na glicosilação sejam uma característica principal na transformação oncogênica, já se sabe que os glicanos estão continuamente envolvidos em processos de evolução do câncer, como sinalização celular, angiogênese, interações célula-matriz, modulação imunológica, células tumorais dissociação e metástase (PINHO; REIS, 2015). As alterações de glicosilação que são

comumente associadas à transformação do câncer incluem sialilação, fucosilação, aumento da ramificação GlcNAc de N-glicanos e superexpressão de O-glicanos do tipo mucina truncados (LENG et al., 2018). Portanto, não é de surpreender que as abordagens baseadas em lectina estejam se tornando mais populares em estudos de rastreamento de novos biomarcadores de câncer.

A utilização das lectinas como sondas para glicofenotipagem de células tumorais exige o uso de uma substância reveladora. Diversos estudos utilizaram variadas substâncias com esse propósito, tais como os reveladores fluorescentes como isotiocianato de fluoresceína. Existem ainda, os reveladores cromógenos, como a peroxidase, com a qual a lectina pode ser conjugada. Correia et al. 2010, conjugou *Cratylia mollis* (Cramol) conjugadas a peroxidase de rábano para avaliar a expressão de carboidratos de tecidos neoplásicos de próstata. Analisando os mesmos tipos de tecido Silva et al., 2014 conjugaram Con-A, UEA-1 e PNA a éster de acridina.

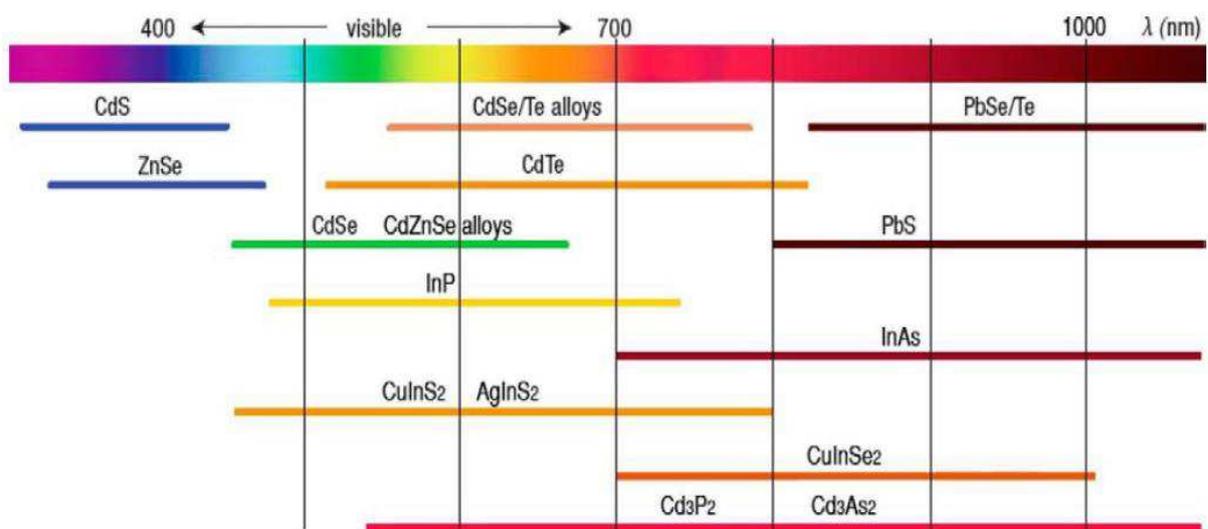
2.9 QUANTUM DOTS

Os *quantum dots* são nanopartículas inorgânicas altamente estáveis e com propriedades fluorescentes compostas de materiais semicondutores nos grupos da tabela periódica de II-VI (CdS, CdSe, CdTe, ZnO, ZnS), III-V (GaAs, GaN, GaP, InAs, InP), ou IV -VI (PbS, PbSe) (MANSUR, 2010). *Quantum dots* possuem tamanhos que variam entre 1 a 10 nm. As propriedades quânticas é observada devido a seus tamanhos nanométricos, onde sua fluorescência está diretamente relacionada aos tamanhos do nanocristal.

Esses nanocristais têm sido extensivamente utilizados para aplicações biológicas após dois estudos publicados em 1998 que relataram o potencial do CdSe/ZnS como marcadores fluorescentes na geração de imagens celulares. Os *quantum dots* mais populares para aplicações biológicas são compostos por CdS, CdSe e CdTe, devido às suas estratégias químicas e de conjugação já estabelecidas. Quando comparados com fluoróforos convencionais, como corantes orgânicos ou proteínas fluorescentes, que têm estreito espectro de excitação, pequenos desvios de Stokes, ampla faixa de fluorescência e mais propensos a fotodegradação, os *quantum dots* apresentam diversas vantagens técnicas, como emissão sintonizável com o tamanho, estreito espectro de emissão, largo espectro de absorção e elevada resistência à fotodegradação.

Estas propriedades únicas dos *quantum dots* atraíram mais e mais atenção na biotecnologia e aplicações médicas, onde se tornaram sondas fluorescentes importantes na pesquisa para bioimagem e diagnóstico clínico *in vitro* e *in vivo* (WANG et al., 2015). A Figura 5 representa a faixa espectral de emissão para os *quantum dots* mais estudados atualmente.

Figura 5. Faixa espectral e propriedades óticas em *quantum dots*. Estão evidentes as famílias de maior interesse nos estudos relacionado as nanopartículas.



Fonte: (REISS et al., 2016).

2.10 PROPRIEDADES GERAIS DOS SEMICONDUTORES

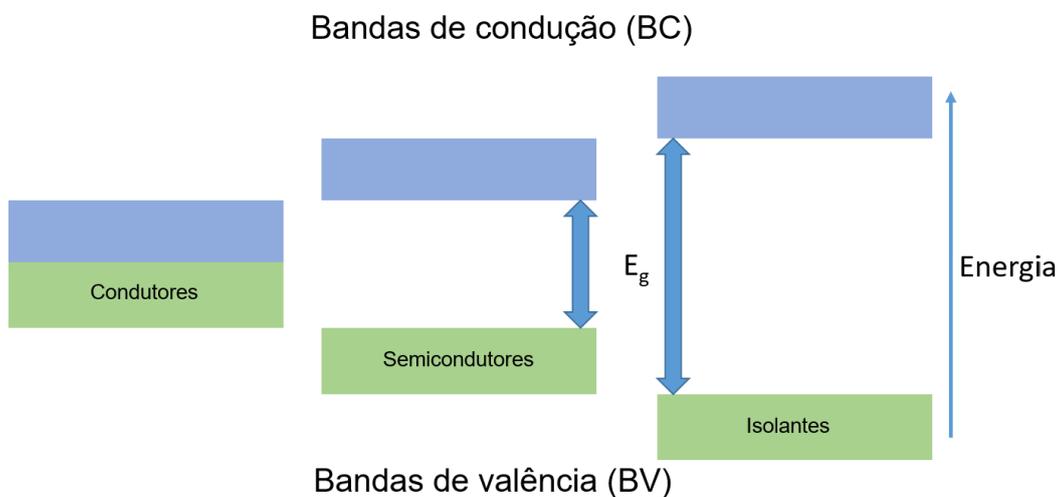
Semicondutores são uma classe de material que possuem como característica principal uma moderada condutividade elétrica, maior que os isolantes e inferior à dos metais. Especificamente os metais apresentam condutividade entre 10^6 e 10^4 (Ωcm)⁻¹ e os materiais isolantes possuem condutividade menor que 10^{-10} (Ωcm)⁻¹. Materiais semicondutores à temperatura ambiente têm condutividade 10^4 e 10^{-10} (Ωcm)⁻¹ (DYAKONOV, 2017). Os semicondutores estão representados na tabela periódica pelos grupos 12 a 16, porém podem também estar em formas compostas (NEAMEN, 2006).

Semicondutores passaram a ter atenção após a descoberta dos transistores em 1947 devido às suas propriedades de condutividade ajustáveis. Em particular, sua condutividade pode ser alterada por diferentes fatores, como por exemplo sua

condutividade aumentar exponencialmente com a elevação da temperatura (SEEGER, 2004).

O confinamento quântico dos pares de elétrons e buracos leva a um aumento da energia entre a banda de valência e a banda de condução (*band gap*) do material em função da diminuição do tamanho das partículas, demonstrado na Figura 6 (MILLER et al., 2016).

Figura 6. Diferença na energia do *bandgap* para diferentes classes de materiais em sólidos.



Fonte: O autor (2018)

Os semicondutores são caracterizados por uma banda de valência (BV) e uma banda de condução (BC) separadas por um *band gap* de baixa energia, $E_g < 3$ eV. (ALIVISATOS, 1996; BASKOUTAS; TERZIS, 2006).

Quando uma radiação eletromagnética com energia superior a E_g é absorvida por um semicondutor, os elétrons se deslocam da BV para a BC (BOXBERG; TULKKI, 2004) e o semicondutor agora exibe estado eletrônico excitado (IRIE et al., 2002). Durante a transição eletrônica, um elétron (e^-) deixa um espaço vazio na BV, denominado buraco (h^+), com o qual interage através de interações coulombicas, formando uma quasipartícula neutra chamada éxciton (e^-h^+); cuja semelhança ao átomo de hidrogênio, também é referido como um par hidrogenóide. Juntos, o elétron e o buraco apresentam movimento livre através do cristal e contribuem na condutividade elétrica e nas propriedades ópticas ou fotônicas dos materiais semicondutores (TENÓRIO, 2012).

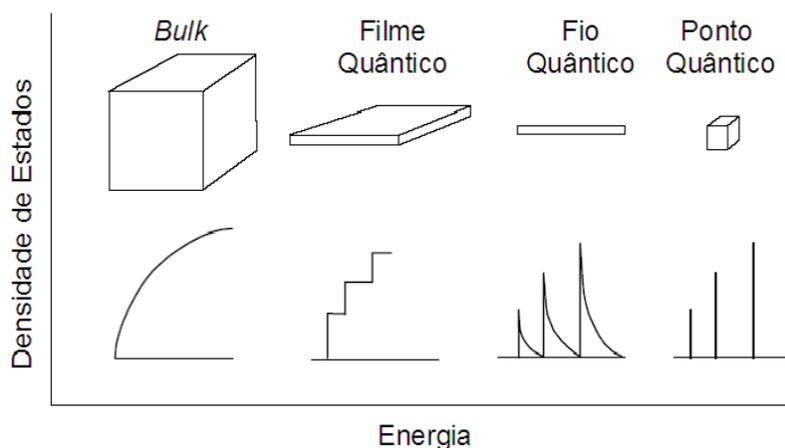
2.11 CONFINAMENTO QUÂNTICO EM SEMICONDUTORES

Características físico-químicas nos semicondutores variam de acordo com seu tamanho. Quando encontram-se em dimensões nanométricas, encontram-se em regime de confinamento quântico (CALLISTER; RETHWISCH, 2007).

Quando o número de átomos de um cristal se reduz a algumas dezenas de milhares, seus átomos de superfície passam a participar efetivamente em suas propriedades físicas. Dessa forma, esses átomos contribuem para a maior energia livre e determinam as variações termodinâmicas, como demonstrado na Figura 7 (MITCHELL, 2003).

Nos semicondutores em dimensões nanométricas os elétrons passam a ocupar níveis discretos de energia. O confinamento dos elétrons em uma, duas ou três dimensões, resulta em materiais nanoestruturados, como os poços quânticos ou filmes quânticos (*quantum well* – 2D), que apresentam duas dimensões livres do confinamento; os fios quânticos (*quantum wire* – 1D); e os pontos quânticos (*quantum dots* – 0D), cujo confinamento ocorre nas três dimensões (HASSAN, 2016; SMITH; NIE, 2010).

Figura 7. Densidade de estados eletrônicos em cristais macroscópicos, e em regime de confinamento em uma (filme quântico), duas (fio quântico) e três dimensões (ponto quântico)



Fonte: (TENÓRIO, 2012).

2.12 SÍNTESE E PASSIVAÇÃO DE NANOCRISTAIS SEMICONDUTORES

A obtenção de materiais nanométricos em regime de confinamento nas três dimensões é realizada através de técnicas especiais, como métodos de crescimento epitaxial, métodos litográficos e métodos de crescimento espontâneo, classificados como métodos *top-down* (como os métodos físicos) ou *bottom-up* (química coloidal) (TENÓRIO, 2012).

Os métodos que utilizam a química coloidal são mais acessíveis porque dispensam os suportes ou substratos para a obtenção das nanoestruturas, ao contrário dos métodos baseados na deposição de vapor ou plasma organometálicos ("MOVPE, *metallorganic vapor phase epitaxy*") (LEONELLI et al., 1993), ou no crescimento homo ou heteroepitaxial de feixe molecular ("BEM, *molecular beam epitax*") (DASHIELL et al., 2002). A química coloidal tem a vantagem de não necessitar dos dispendiosos equipamentos e reagentes utilizados nos outros métodos.

Um colóide é uma mistura de pelo menos duas substâncias em fases diferentes. A fase dispersa, que pode ser sólida, líquida ou gasosa, deve ser finamente dividida, com pelo menos uma das dimensões entre 10 μm e 1 nm. A fase contínua, também pode ser sólida, líquida ou gasosa e é denominada meio de dispersão (CUSHING; KOLESNICHENKO; O'CONNOR, 2004).

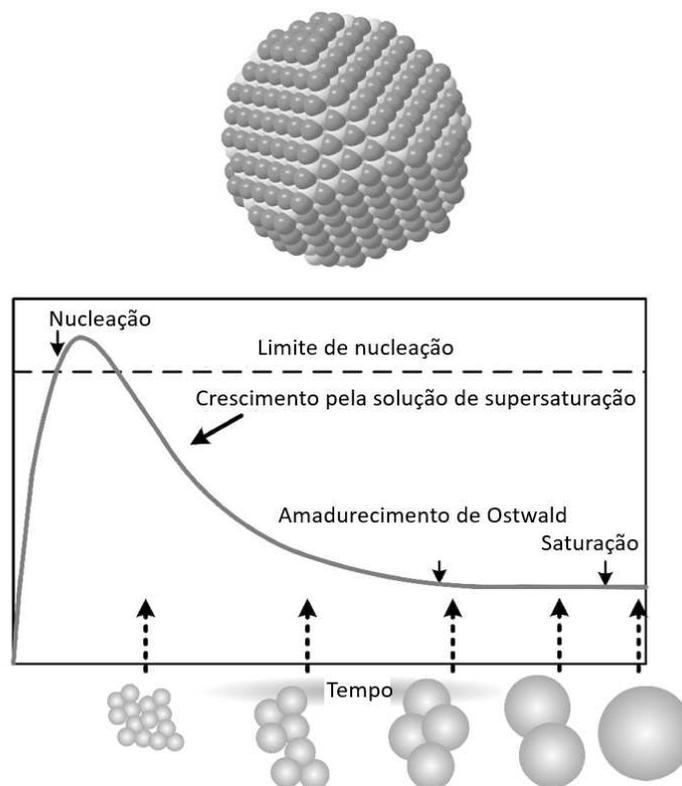
A síntese em meio aquoso é mais reprodutível, de menor custo e menos tóxica, além de que produz *quantum dots* hidrofílicos e, mais compatível com o sistema biológicos. Entretanto apresentam a desvantagem de baixo rendimento quântico, quando comparados com sínteses realizadas em meio orgânico (H. R; SCHIFFMAN; BALAKRISHNA, 2018).

A principal dificuldade que o crescimento do *quantum dot* em solução aquosa apresenta é o fato de não ser conhecida, com detalhe, a relação que existe entre os diferentes parâmetros de reação e o tamanho médio das partículas que vão sendo formadas ou a respectiva distribuição destas pela solução (DE MELLO DONEGÁ, 2014; H. R; SCHIFFMAN; BALAKRISHNA, 2018).

Entretanto, sabe-se que o crescimento de um sólido em solução pode ser explicado pela Teoria da Nucleação. De acordo com esta teoria, o crescimento de nanocristais em solução envolve dois processos, a nucleação propriamente dita, seguida do crescimento dos cristais (ZAD; MOGHADDAM; ESKANDARIAN, 2014). O diagrama de *LaMer* ilustra o processo de nucleação e crescimento das nanopartículas.

Quando a concentração do soluto aumenta em função do tempo, nenhuma nucleação ocorreria mesmo acima da solubilidade de equilíbrio (HASSAN, 2016). A nucleação ocorre somente quando a supersaturação atinge um certo valor que corresponde à barreira de energia para o começo da nucleação. Após a nucleação a concentração do soluto diminui e a variação da energia livre de *Gibbs* por unidade de volume também diminui (HU; ZHU, 2015). Quando a concentração decresce até ultrapassar a energia crítica, a nucleação cessa, porém, o sistema evolui até que a concentração do soluto atinja o equilíbrio. Os núcleos existentes agregam material da fase líquida, dando início à fase de crescimento da partícula. Os estágios de nucleação está representado na Figura 8.

Figura 8. Representação dos estágios de nucleação e crescimento de nanocristais monodispersos segundo o modelo de *La Mer*



Fonte: (BODNARCHUK; KOVALENKO, 2013)

Para as sínteses de nanopartículas com distribuição de tamanhos uniformes, seria ideal se todos os núcleos se formassem ao mesmo tempo e com o mesmo tamanho, e para que isso ocorra é desejável que o período de nucleação ocorra num intervalo curto de tempo (VREELAND et al., 2015). Na prática isso é obtido aumentando

abruptamente a concentração do soluto a um patamar de alta supersaturação e logo a seguir, diminuindo-a para abaixo do patamar de nucleação.

Desde sempre, a literatura aponta o método de síntese coloidal, como sendo aquele que permite obter melhores resultados para quantum dots de elementos dos grupos 12 e 15 da tabela periódica. Apesar de se encontrarem publicações de trabalhos sobre a preparação e estudos de quantum dots desde 1982 (ALFASSI; BAHNEMANN; HENGLEIN, 1982), a síntese de nanocristais de CdTe só surgiu por volta da década de 90 (MENDONÇA, 2008).

A principal dificuldade encontrada na preparação de CdTe foi a obtenção de fontes estáveis de Te^{2-} . Isto deve-se à reatividade que o telúrio sólido apresenta, em solução aquosa, na presença do oxigênio do ar, formando o respectivo óxido, TeO , fato que dificulta a redução de telúrio sólido a Te^{2-} . Para ultrapassar este problema, é necessário utilizar atmosferas inertes nesta fase da síntese.

Além disso, os processos mais utilizados na obtenção de *quantum dots* de CdTe durante alguns anos foi apenas em meio orgânico, utilizando os reagentes trioctilfosfina (TOP) e óxido de trioctilfosfina (TOPO) (BRUS, 1991; HINES; GUYOT-SIONNEST, 1998). Isto dificultava muito, como citado anteriormente, a aplicação destes nanocristais em sistemas biológicos ou aquosos em geral. Além disso, apresentava problemas relacionados com o alto custo que envolvia a aquisição dos reagentes utilizados (TSOI et al., 2013). Atualmente se conhece melhor os processos que permitem a produção destes *quantum dots* com alto rendimento quântico, sintetizados diretamente em meio aquoso e com custos muito mais baixos (SINGH et al., 2017).

O processo mais utilizado nesta síntese passa pela utilização de NaBH_4 como agente redutor do telúrio metálico e pela utilização de funcionalizantes que possuem um grupo tiol na extremidade que liga à superfície do *quantum dot* e um outro grupo funcional na outra extremidade, que lhe permite estabelecer ligações, de acordo com a aplicação em vista.

Esses estabilizantes contendo grupos SH são bastante utilizados nas sínteses de *quantum dots* em meio aquoso. Isso deve-se ao fato do enxofre apresentar uma grande afinidade química com íons de Cd^{2+} . Além disso, sabe-se que as suspensões de quantum dots sintetizadas com um pequeno excesso de tiois, em condições alcalinas, produzem a hidrólise parcial destes grupos, fato que vai resultar na incorporação dos átomos de enxofre na interface dos *quantum dots* com o meio.

2.13 QUANTUM DOTS COMO MARCADORES BIOLÓGICOS

Os trabalhos pioneiros que utilizaram as características dos *quantum dots* para finalidades como marcadores biológicos, foram publicados simultaneamente em 1998 (BRUCHEZ et al., 1998; CHAN; NIE, 1998), onde foi estudado o uso de nanocristais CdSe no sistema *core-shell*.

Bruchez e colaboradores produziram nanocristais semicondutores para aplicação como sondas fluorescentes na coloração biológica e diagnóstica. Já Chan e Nie, acoplaram biomoléculas aos *quantum dots* para a detecção ultrasensível de materiais biológicos específicos. Desde então, surgiram diversas aplicações de diferentes *quantum dots* como marcadores de estruturas biológicas. Esses novos métodos vêm apresentando inúmeras vantagens em relação aos corantes orgânicos, que podem ser tóxicos e sofrer rápida degradação, além de serem excitados em curto comprimento de onda. Entre as vantagens para utilização de *quantum dots* como marcadores pode-se citar: 1) emissão em vários comprimentos de onda para o mesmo material; 2) elevada fotoestabilidade; 3) marcação simultânea de diversos componentes e estruturas celulares e 4) material biológico pode ser analisado no próprio meio de cultura e podem se dirigir a alvos moleculares específicos no interior das células (MARSH et al., 2007; SZENT-GYORGYI et al., 2008).

Wu e colaboradores foram os primeiros a demonstrar que *quantum dots* podiam ser usados para reconhecer, com eficiência e especificidade, alvos moleculares. Nesse estudo, os *quantum dots* foram encapsulados dentro de um polímero de casca e foram biofuncionalizados com moléculas (imunoglobulina e estreptavidina) e aplicados ao alvo receptor de superfície celular, componentes do citoesqueleto (actina e microtúbulos) e o antígeno nuclear, ambas as células foram fixadas vivas. Foram utilizados simultaneamente *quantum dots* de duas cores diferentes (630 nm e 535 nm), os quais foram comparados com o corante comercial Alexa. Os resultados demonstraram que os *quantum dots* eram consideravelmente mais fotoestáveis que o corante Alexa. As propriedades ópticas únicas dos *quantum dots*, incluindo a fotoestabilidade estendida e a excitação multicolor, indicam sua capacidade como novos fluoróforos para serem aplicados *in vivo* e *in vitro* (JIN et al., 2011; WU et al., 2003; XING; RAO, 2008).

Muitas estratégias foram desenvolvidas e utilizadas para acoplar biomoléculas aos *quantum dots*, que dependem dos grupos reativos presentes em sua superfície. Existem basicamente duas estratégias usadas para conjugar *quantum dots* a biomoléculas (BLANCO-CANOSA et al., 2014):

- Adsorção: baseada nas interações não-covalentes entre *quantum dots* e biomoléculas tais como interações eletrostáticas e hidrofóbicas (KARAKOTI et al., 2015);
- Ligação covalente: quando os grupos funcionais da superfície do *quantum dots* são covalentemente ligados à biomolécula (CABRAL FILHO et al., 2015a);

As técnicas comumente utilizadas para a bioconjugação de *quantum dots* à moléculas biológicas incluem adsorção não específica e ligação covalente (H. R; SCHIFFMAN; BALAKRISHNA, 2018). Alguns estudos utilizaram proteínas adsorvidas na superfície de *quantum dots* solúveis em água. Essa adsorção é diretamente influenciada pela força iônica, pH, temperatura e a carga de superfície da molécula (XING; RAO, 2008).

O processo de bioconjugação não é simples, pois as propriedades dos *quantum dots* e da biomolécula precisam ser mantidos. Assim, a estratégia de conjugação mais eficaz precisa ser otimizada para manter ou melhorar a estabilidade de ambos (BILAN et al., 2015). Além disso, devido à alta relação superfície/volume, é possível combinar diferentes biomoléculas em um único *quantum dot*, fornecendo uma sonda multifuncional e multi-alvo (BOLES et al., 2016).

Devido às propriedades únicas destes nanocristais fluorescentes, a conjugação para biomoléculas cria uma ferramenta poderosa para o diagnóstico molecular de doenças (LIN et al., 2014). Os bioconjugados desenvolvidos podem (i) promover a elucidação de processos celulares, (ii) agir como sondas para compreender a biologia celular, e (iii) permitir a aprendizagem durante a entrega de drogas e processos cirúrgicos (BILAN et al., 2015; LIN et al., 2014). Ou seja, a conjugação de lectinas a *quantum dots* permitiu o desenvolvimento de novas sondas fluorescentes para investigar a distribuição e expressão de carboidratos/lectinas em células e tecidos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Ácido mercaptosuccínico (MSA), perclorato de cádmio ($\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$), boridreto de sódio (NaBH_4), telúrio (Te^0), cloridrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), lectinas Con-A, WGA e PNA foram obtidos pela Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

3.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE CdTe-MSA

Quantum dots de CdTe estabilizados com MSA foram sintetizados de acordo com a metodologia previamente descrita (CABRAL FILHO et al., 2015b). A razão molar da síntese foi de 2:1:2,4 de cádmio, telúrio e MSA respectivamente. Para o crescimento da nanopartícula a reação foi mantida sob agitação constante por 8 horas à 90°C. A caracterização ótica foi realizada por espectros de absorção e emissão por UV-Vis (Shimadzu) e fotoluminescência (Fluorímetro LS 55 - Perkin Elmer).

3.3 CONJUGAÇÃO LECTINA-QD

O *quantum dot* foi covalentemente ligado ao WGA e a PNA. Embora a conjugação de biomoléculas fosse conduzida separadamente, o protocolo usado para ambas proteínas foi o mesmo. Um planejamento fatorial fracionado 2^{5-2} (Tabela 1) foi aplicado para verificar os efeitos de interação do número de nanopartículas de *quantum dots*, concentração de cloridrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC), concentração de N-hidroxisuccinimida (NHS), concentração de proteína e o tempo de conjugação (dias). A conjugação das biomoléculas tomou como base o protocolo de Cabral Filho et al., 2015 realizando poucas adaptações. Em primeiro lugar, o pH do *quantum dot* foi ajustado para 5,5 com MSA (4,9% p/v), em seguida foi adicionado 500 μL de EDC (4,0 – 0,8 mg mL^{-1}) e 500 μL de NHS (5 - 10 mg mL^{-1}) ao sistema. Finalmente, 200 μL de WGA ou PNA (0,5 – 1,0 mg mL^{-1}) foram incubados aos *quantum dots*.

Tabela 1. Variáveis independentes, concentração de *quantum dots*, concentração de EDC, concentração de NHS, concentração de proteína e tempo de conjugação, bem como os níveis avaliados. Para a análise foi utilizado o software STATISTICA 10.0.

Variáveis	-1	1
Nanopartícula de Quantum dot	1×10^{15}	2×10^{15}
Concentração de EDC	1 μ M	2 μ M
Concentração de NHS	5 μ M	10 μ M
Concentração de proteína	0.5 mg/mL	1 mg/mL
Tempo de conjugação (dias)	7	15

Fonte: O autor (2018)

A Con-A foi conjugada ao *quantum dots* de CdTe-MSA pelo método de adsorção de acordo com a metodologia previamente relatada (TENÓRIO et al., 2015) aplicando a razão de 1000:1 (QDs:ConA). Para conjugação pelo método de adsorção, o pH do *quantum dot* foi ajustado a 8,0 e incubado com ConA durante 2 horas a 25 °C, sob agitação constante. Para 3 mL de solução contendo concentração de *quantum dots* a 5×10^{-6} mol L⁻¹, ConA foi adicionado a 280 μ g mL⁻¹. Esses conjugados foram caracterizados por espectroscopia de absorção, emissão e ensaio fluorescente por microplaca (revestida com manose para o conjugado de ConA) para avaliar as propriedades ópticas dos conjugados e a efetividade da conjugação (Carvalho et al., 2014).

A fim de se obter o espectro de absorção, foi realizada uma varredura na faixa de 400-700 nm. Esta análise foi realizada no Espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu). Para obtenção do espectro de emissão, foi fixado o comprimento de onda de excitação em 365 nm e realizada a espectroscopia de emissão, utilizando o Espectrofluorímetro LS55 (Perkin Elmer, Fremont, USA). Para tal, foi feita uma varredura na faixa de 400-700 nm.

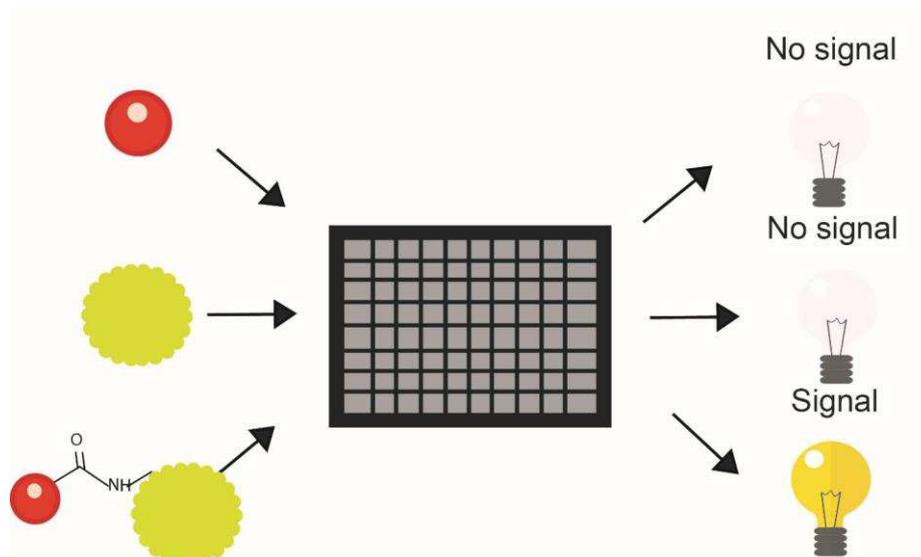
3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS CONJUGADOS LECTINA-QD

3.4.1 Ensaio de fluorescência em microplaca

Este método foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa e baseia-se na quantificação da ausência ou presença de sinais de fluorescência de amostras colocadas em um

Leitor de Placa de Fluorescência (Carvalho et al., 2014), assim como descrito na Figura 1. Os *quantum dots*, as lectinas e os bioconjugados foram incubados em uma microplaca de poliestireno (microplacas Black Optiplate F HB de 96 poços - PerkinElmer). A microplaca foi incubada por 2 horas em banho-maria a 37 °C. Após a incubação, a microplaca foi lavada três vezes utilizando PBS pH 7,2 - 0,01 M. Todos os ensaios experimentais foram realizados em triplicata com 100µL das amostras. O filtro de excitação foi o F405 (405 nm/5nm) e o filtro de emissão foi o F595 (595 nm/30nm).

Figura 9. Esquema do ensaio realizado em microplacas de poliestireno. *Quantum dot* saem na lavagem não gerando fluorescência e lectinas apresentam baixa autofluorescência. Entretanto o conjugado de lectina-QD produzem sinal de fluorescência evidenciando a conjugação da biomolécula à nanopartícula.



Fonte: O autor (2018)

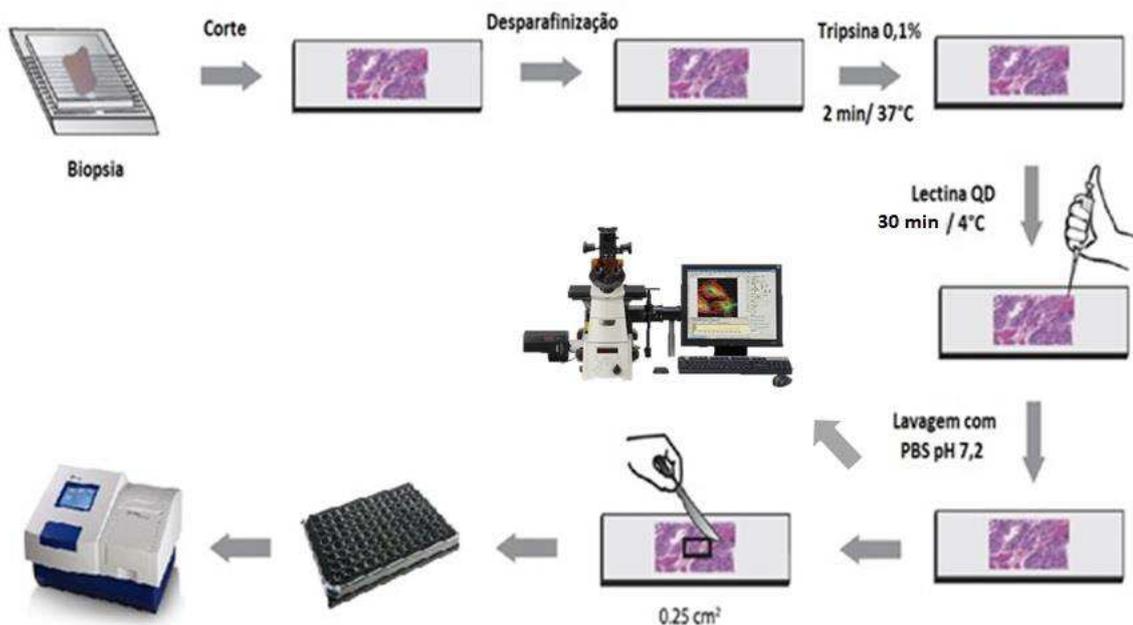
3.5 MARCAÇÃO DE TECIDO COM CONJUGADOS DE LECTINA-QD

As amostras parafinizadas foram obtidas do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas – UFPE, sendo os mesmos blocos histológicos utilizados no trabalho de Silva et al., 2014. Nesse trabalho foram utilizados 15 lâminas de tecido de hiperplasia benigna prostática e 15 lâminas de adenocarcinoma prostático. As idades dos pacientes para HBP e CaP variaram entre 47 e 89 anos e 58 e 84 anos, respectivamente. A preparação das lâminas foi realizada com cortes de 4 µm dos blocos de tecido. As lâminas foram então desparafinizadas e reidratadas através do uso de soluções de xilol e soluções de álcool em diferentes concentrações (100% e 70%). Após a desparafinização, os cortes foram tratados com uma

solução de tripsina 0,1% (m/v), durante 2 minutos a 37 °C. Em seguida, os tecidos foram incubados com 100 µL do conjugado lectina-QD por 30 minutos, a 4 °C. Nas lâminas controle, incubou-se os tecidos com 100 µL de conjugado inibido com uma solução 0,3 M do carboidrato específico para conjugados de Con-A. Foi feito também o controle utilizando para marcação apenas o *quantum dot*, com o propósito de verificar se haveria alguma marcação inespecífica. As lâminas foram então lavadas com PBS pH 7,2 - 0,01 M. Posteriormente, foram adicionados 50 µL de PBS pH 7,2 - 0,01 M sobre a lâmina e esta foi coberta com laminula para realização da leitura em microscópio.

Para a quantificação da fluorescência da marcação tecidual de neoplasia prostática pelos conjugados de lectinas aos *quantum dots*, foi realizado cortes de 0,25 cm² nas lâminas e depositado no fundo do poço da microplaca preta Optiplate F HB de 96 poços (PerkinElmer) juntamente com 100 µL de PBS pH 7,2 - 0,01 M, assim como ilustra a Figura 2.

Figura 10. Esquema da marcação tecidual com lectina-QD. Após o processo de desparafinização, a lâmina seguirá para análise de microscópio para obtenção das imagens, ou uma área em forma de 0,25cm² da seção de tecido será cortada e transferida para uma microplaca de poliestireno para quantificação da expressão da fluorescência como intensidade relativa.

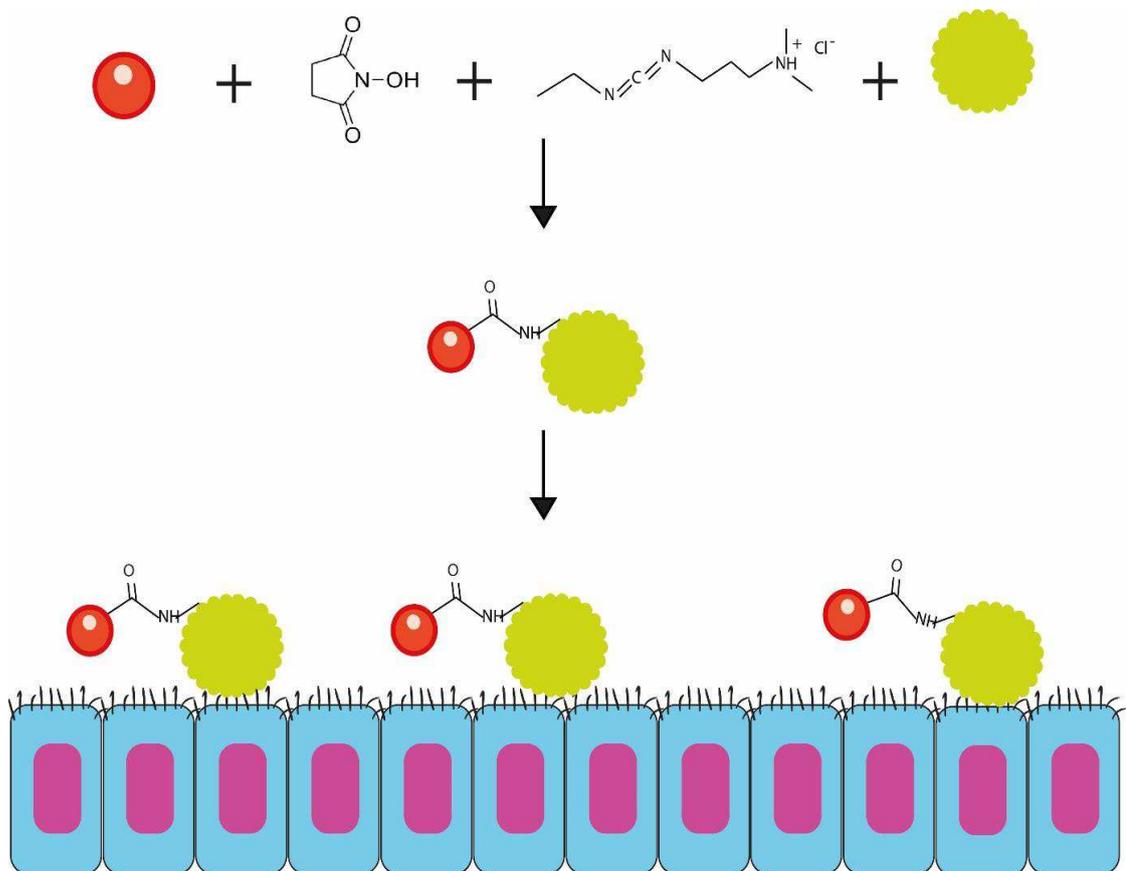


Fonte: SILVA et al., 2014 Modificado

3.6 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

As lâminas foram analisadas no microscópio de fluorescência (Leica DMI4000B, Leica, Alemanha) utilizando o filtro com excitação passa banda (340-380 nm) e coleta de emissão passa alta, acima de 425 nm, para que fosse detectada a autofluorescência emitida pelo tecido (visualizada na faixa do azul-verde), assim como a fluorescência emitida pelos *quantum dots* (visualizada na faixa do laranja-avermelhado). Os tecidos foram observados usando a objetiva de 20 e 40x. As imagens foram adquiridas utilizando a câmera PCO Pixelfly (PCO-TECH Inc., Michigan, USA). Todas as imagens foram coletadas utilizando os mesmos parâmetros de aquisição. A Figura 3 ilustra esquematicamente o processo de conjugação da biomolécula ao *quantum dot* e a aplicação ao tecido para análise de microscopia de fluorescência.

Figura 11. Esquema da conjugação das lectinas aos *quantum dots* utilizando o EDC e o NHS e marcação dos tecidos neoplásicos da próstata.



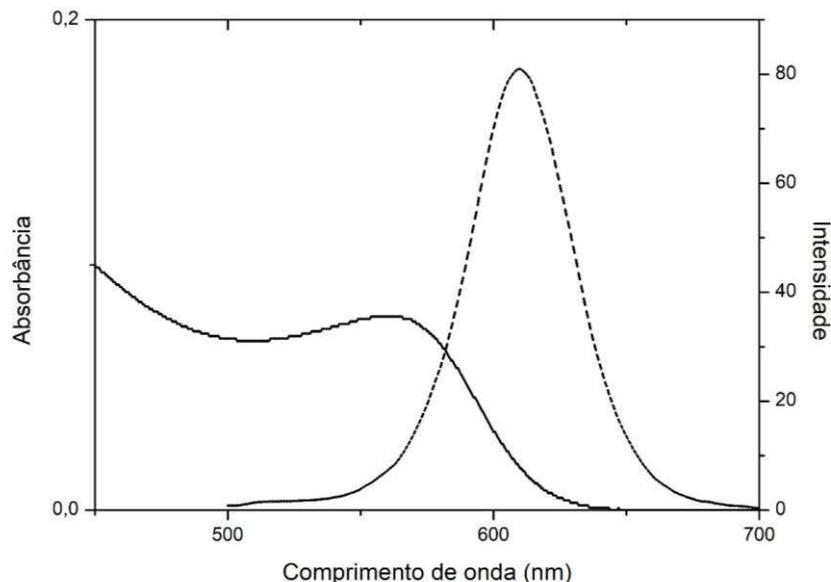
Fonte: O autor (2018)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A combinação das propriedades ópticas dos *quantum dots* e a especificidade das lectinas pelos carboidratos se torna uma ferramenta para o estudo da glicobiologia do câncer. Esses bioconjugados são utilizados para diversos estudos de glicobiologia, com potencial para auxiliar na avaliação de funções de lectinas, identificação e monitoramento de alterações em estruturas biológicas ricas em carboidratos, e pode fornecer informações valiosas por técnicas baseadas em fluorescência (CUNHA et al., 2018).

Os *quantum dots* foram caracterizados por espectroscopia de absorção e emissão com a finalidade de avaliar o tamanho e a qualidade de fluorescência dos nanocristais. As análises ópticas do *quantum dot*, como ilustra a Figura 4, revelaram um pico de absorção de aproximadamente $\lambda = 565$ nm e o máximo da banda de emissão a $\lambda = 599$ nm. Os conjugados de ConA, PNA e WGA não modificaram o padrão de comportamento do *quantum dot* sem conjugado a nenhuma biomolécula.

Figura 12. Caracterização óptica do *quantum dot* de CdTe. O espectro de absorção em linha cheia e espectro de emissão em pontilhado. Excitação em 488 nm



Fonte: O autor (2018)

Segundo a literatura, os pontos quânticos sintetizados e utilizados neste trabalho possuem aproximadamente 3.2 nm de diâmetro (DAGTEPE et al., 2007). Usando as

informações descritas no espectro de absorção, é possível, através da Lei de *Lambert-Beer*, obter a concentração de nanopartículas presentes na amostra (YU et al., 2003).

Foi estabelecido que, para a confirmação da conjugação da ConA aos *quantum dots*, os conjugados deveriam apresentar pelo menos 100% de aumento da intensidade de fluorescência quando comparados aos valores médios dos controles no ensaio fluorescente em microplaca (Carvalho et al., 2014). O sinal do conjugado com ConA foi cerca de 549% maior que os controles, indicando que houve conjugação.

A conjugação das lectinas aos *quantum dots* foi avaliada usando planejamento fatorial 2^{5-2} com a finalidade de investigar as principais variáveis que afetam o processo de conjugação. A Tabela 2 exhibe o efeito das variáveis independentes tendo como resposta a fluorescência relativa. O ensaio de maior significância para a conjugação com WGA confirma a resposta encontrada no gráfico de normalidade, onde o nível de menor quantidade de proteína afetou positivamente no processo de conjugação. Já no ensaio de maior relevância para a conjugação da PNA demonstra que a melhor condição para tal é a maior concentração de *quantum dots* e maior tempo para o processo de conjugação.

As técnicas utilizadas no processo de bioconjugação são inteiramente dependentes das propriedades da biomolécula e das propriedades do material. As técnicas de modificação de superfície do material e as propriedades químicas da biomolécula devem ser estudadas e escolhidas com extremo cuidado, pois metodologias podem definir o sucesso ou o fracasso da bioconjugação (HERMANSON, 2013). Diversas técnicas químicas podem ser utilizadas para o acoplamento de uma proteína a *quantum dots* como o junção por meios de ligação covalente entre a proteína e o QD, ou até mesmo adsorção por meio das interações eletrostáticas forças de van der Waals e outros (STEPHANOPOULOS; FRANCIS, 2011).

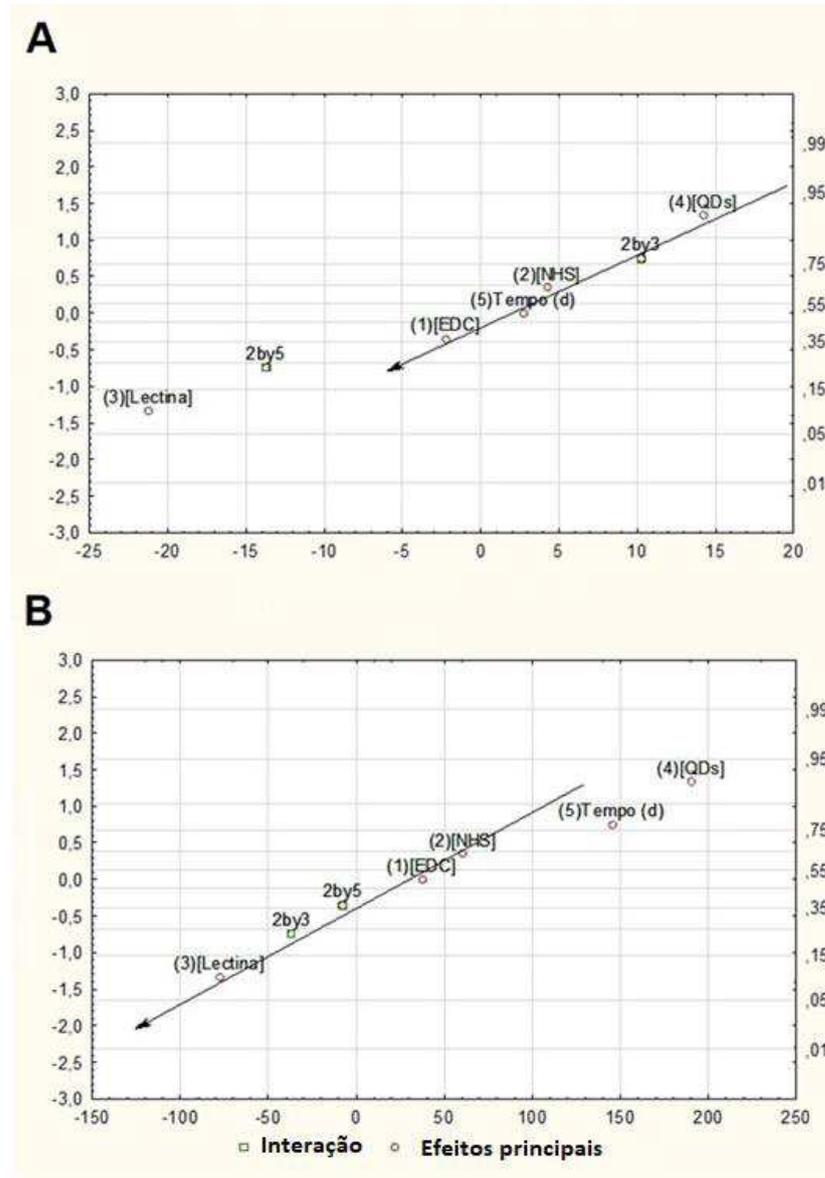
Tabela 2. Variáveis independentes usadas no planejamento fatorial fracionado 2^{5-2} , apresentando as combinações das variáveis e em resposta a fluorescência relativa obtida pelo ensaio de microplaca de poliestireno.

ENSAIO	Concentração de EDC	Concentração de NHS	Concentração de proteína	Nanopartícula de Quantum dot	Tempo	Fluorescência relativa (WGA)	Fluorescência relativa (PNA)
1	-	-	-	+	+	490%	429%
2	+	-	-	-	-	160%	123%
3	-	+	-	-	+	150%	328%
4	+	+	-	+	-	380%	418%
5	-	-	+	+	-	100%	235%
6	+	-	+	-	+	100%	235%
7	-	+	+	-	-	150%	76%
8	+	+	+	+	+	160%	441%

Fonte: O autor (2018)

A utilização do planejamento fatorial é eficiente, principalmente devido ao menor número de amostras necessárias em comparação a testes realizados separadamente. Métodos estatísticos também podem ser incorporados para analisar as interações entre os fatores estudados. Com isso é possível reduzir os custos e o tempo de experimento (PANDIS et al., 2014). O planejamento fatorial já tem sido utilizado nas mais diversas áreas de pesquisa como a conjugação de oligomicina à quitosana (ZU et al., 2011), invertase imobilizada à nanopartículas de terra diatomáceas (CABRERA et al., 2017), purificação da lectina de sementes de *Canavalia grandiflora* (PORTO et al., 2011) e entre muitos outros. As lectinas, apesar de possuírem afinidade por carboidratos, apresentam uma vasta gama de diferenças em suas estruturas. Por isso o estudo de suas propriedades e as metodologias de bioconjugação são tão importantes. Atualmente ainda existe a carência de estudos utilizando planejamento fatorial como ferramenta positiva para otimização de conjugação de lectinas aos *quantum dots*.

Figura 13. Gráficos de normalidade da conjugação da WGA (A) apresentando fatores de maior influência para o processo de conjugação foi a concentração da proteína e o fator de interação de segunda ordem entre concentração de NHS e o tempo; e PNA (B) fatores que tiveram maior participação para o processo de conjugação foi o tempo e a concentração do *quantum dot*.



Fonte: O autor (2018)

Na Figura 5 observa-se os gráficos de normalidade da conjugação do *quantum dot* à WGA e PNA, respectivamente. Na conjugação referente a WGA os fatores que tiveram maior importância para o processo foi a concentração da proteína e o fator de interação de segunda ordem entre concentração de NHS e o tempo. Já na conjugação referente a PNA os fatores que tiveram maior participação para o processo foi o tempo e a concentração do *quantum dot*. Apesar de utilizar os mesmos parâmetros para

montagem dos ensaios de conjugação, as respostas para os conjugados foram bem diferentes. Interessantemente essa triagem revelou um excesso de uso da proteína WGA, sugerindo que menores concentrações são mais adequadas para uma melhor conjugação. Dessa forma tornando o processo menos dispendioso.

A lectina WGA possui oito sítios de ligação à carboidratos, sendo dois nos sítios primários e dois nos sítios secundários, localizados na interface de duas moléculas subunitárias (HARATA; NAGAHORA; JIGAMI, 1995). Em pH ácido (abaixo de pH 3), esta lectina é um monômero com peso molecular de 17 kDa. No entanto com pH neutro, é um dímero com peso de 35 kDa (NAGATA; BURGER, 1974). Entretanto a lectina PNA é um tetrâmero com peso molecular de 25,2 kDa para o monômero, dessa forma, o tetrâmero nativo teria o peso molecular de 100,8 kDa. Não é imprevisível que os grupos NH₂ na superfície da molécula de lectina participam na conjugação com os grupos COOH dos *quantum dots* hidrofílicos (ZHELEV et al., 2005). Essas diferenças moleculares e estruturais são de extrema importância para determinar os melhores parâmetros de metodologia para a conjugação com *quantum dots*.

Apesar da conjugação por meio de ligação covalente ser considerada mais estável, a interação do *quantum dot* com a ConA se deu por meio da adsorção. A interação por adsorção é baseada em atrações hidrofóbicas ou por interação eletrostática, sendo, dessa forma, um método simples, flexível, amplamente utilizado. O conjugado de ConA-*quantum dot* precipitava instantes após a conjugação covalente. Imaginávamos que o pH do processo de conjugação alterava o estado tridimensional da proteína, tornando-se inadequado para a conjugação. Entretanto Hu et al., 2012 conjugou ConA a CdTe sintetizados com ácido tioglicólico. Além da diferença de estabilizante, o *quantum dot* utilizado tinha diferença no tamanho da nanopartícula utilizada pelo nosso grupo de pesquisa. Outra metodologia de conjugação de *quantum dots* a ConA utilizou sínteses de CdTe/GSH (WANG et al., 2010). Dessa forma a redução do pH para conjugação não foi necessário, utilizando o glutaraldeído como agente de acoplamento.

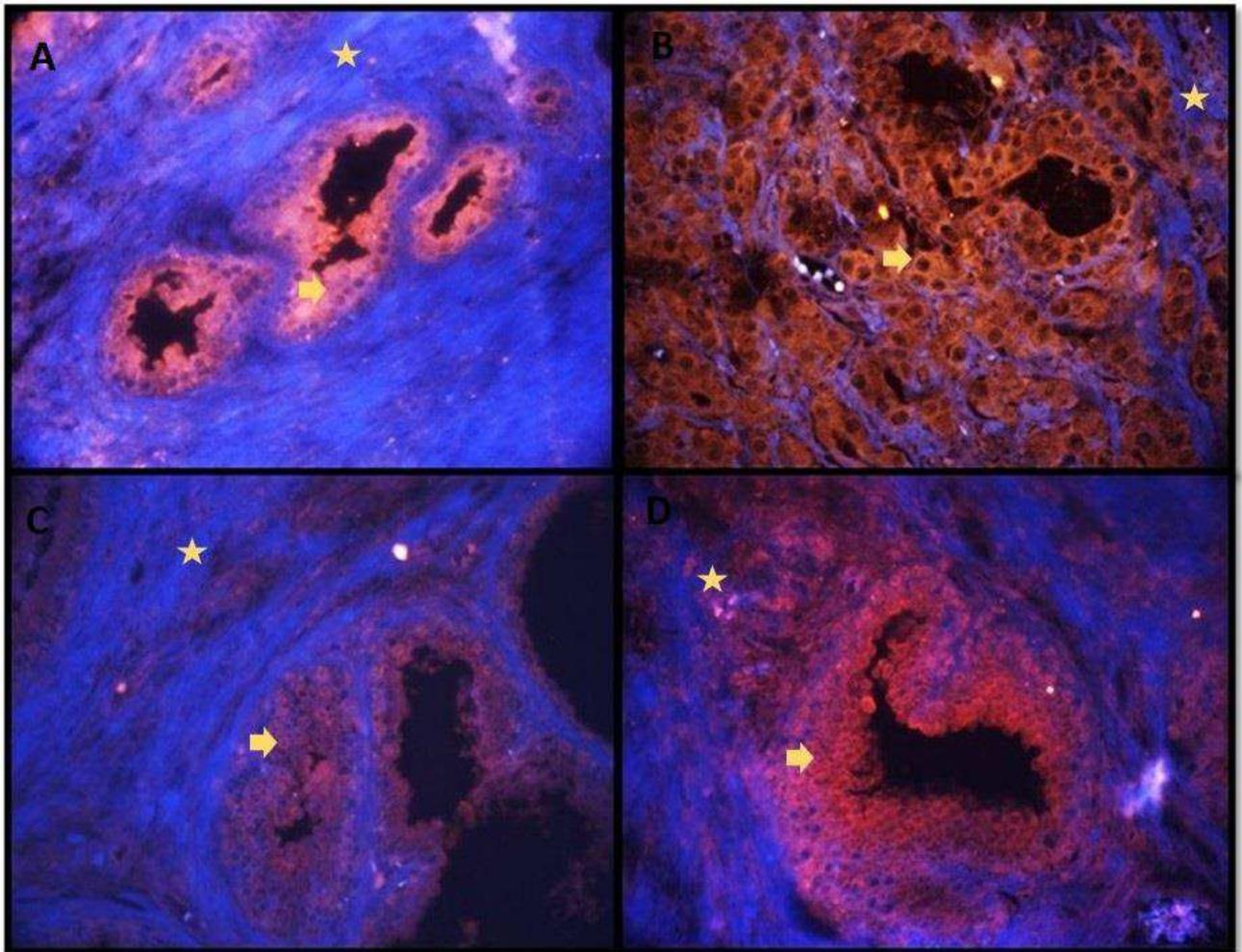
Com a finalidade de demonstrar a especificidade da marcação obtida, foram realizados ensaios de inibição utilizando carboidratos específicos e *quantum dot* sem a presença da lectina. Dessa forma, em paralelo aos ensaios de marcação, o conjugado de ConA foi inibido com metil α -D-manopiranosídeo antes de serem

aplicado nos tecidos, enquanto para o conjugado de WGA e PNA foi utilizado apenas o *quantum dot* sem a biomolécula. A incubação prévia com o carboidrato faz com que este ocupe os sítios de ligação a carboidratos presentes nas lectinas e assim, ao ser aplicado no tecido, o conjugado não é capaz de reconhecer os glicoconjugados localizados na superfície celular. O resultado dos testes de inibição da marcação é mostrado na Figura 7.

Como esperado, após o conjugado ConA-QD ser inibido com seu carboidrato específico, ocorreu redução quase total da marcação das amostras hiperplasia benigna prostática e adenocarcinoma prostático. O mesmo comportamento foi verificado ao utilizar apenas o *quantum dot* para marcação tecidual. Uma vez que os sítios de reconhecimento a carboidratos da lectina estejam ocupados, não ocorre interação dos conjugados com os açúcares presentes na superfície das células. Este resultado indica que a marcação obtida pelos conjugados das lectinas aos quantum dots nas amostras de hiperplasia benigna prostática e adenocarcinoma prostático foi, de fato, específica.

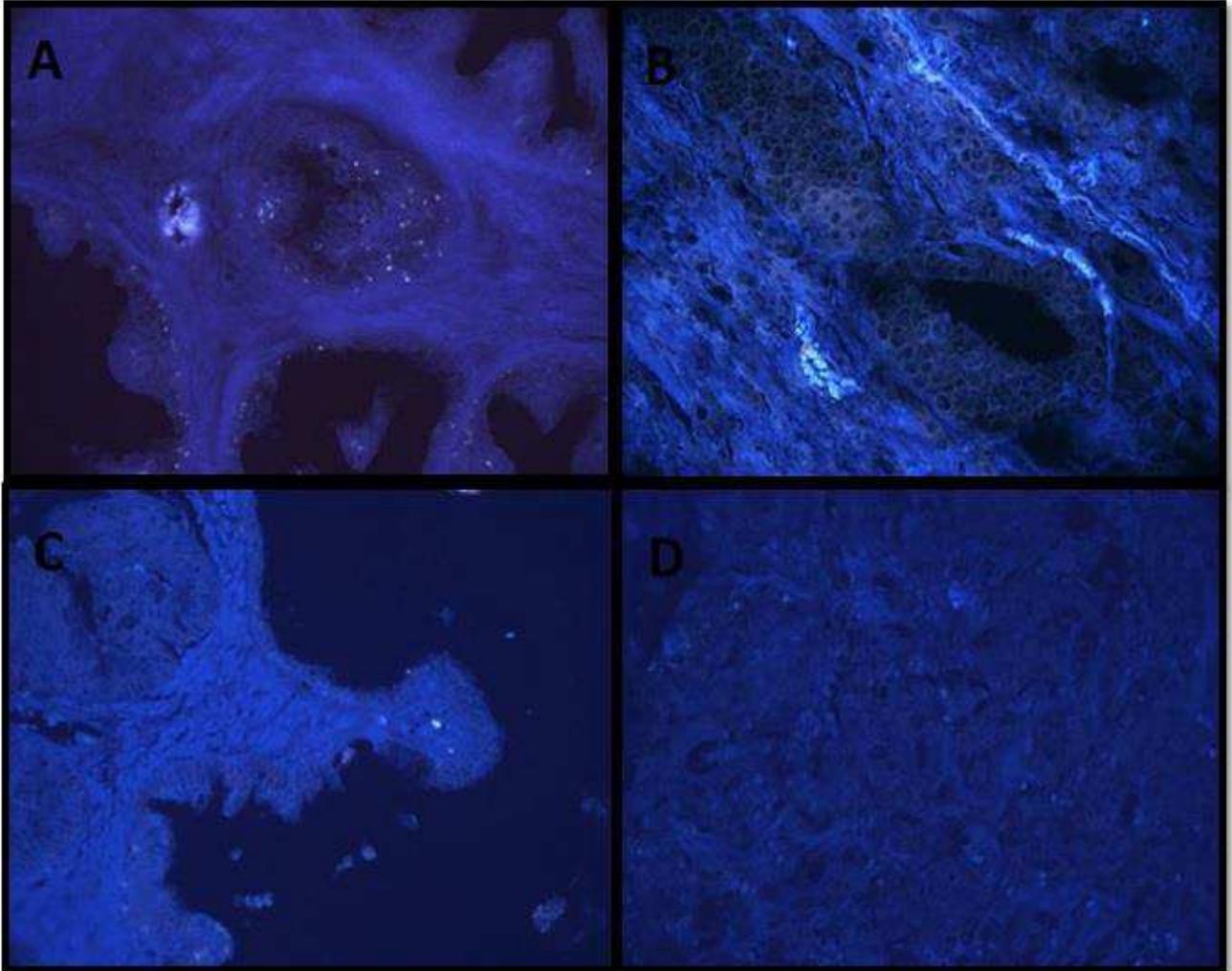
Na Figura 6 fica evidente a capacidade dos conjugados de ConA-QD e WGA-QD na marcação tecidual prostático, revelando uma alta expressão de resíduos de α -D-glicose/manose e N-acetil-D-glicosamina/Ácido N-acetil-D-neuramínico na região celular em todos os tecidos. É possível observar na imagem uma forte marcação celular, porém uma fraca afinidade dos conjugados pelo estroma. Apesar da importância do estroma tumoral para o desenvolvimento, promoção e invasão do câncer, revelando considerável papel como fonte de novos biomarcadores de câncer (SUND; KALLURI, 2009), nos tecidos prostáticos não foi observado afinidade pelos conjugados de lectinas-QD pela região estromal.

Figura 14 Marcação de tecidos prostáticos com ConA-QD (400x). Em A, tecido de hiperplasia benigna prostática, em B, adenocarcinoma prostático. Marcação de tecido prostático com WGA-QD. Em C, tecido de hiperplasia benigna prostática, em D, adenocarcinoma prostático.



Fonte: O autor (2018)

Figura 15 Confirmação da especificidade dos conjugados (400x). Em A e B a inibição com metil α -D-manopiranosídeo dos conjugados ConA-*quantum dot*. Em C e D tecidos incubados com *quantum dots* sem biomoléculas.



Fonte: O autor (2018)

Modificações nos padrões de glicosilação é uma característica universal das células cancerígenas (VARKI; KANNAGI; TOOLE, 2009). O crescimento do tumor está associado a alterações na estrutura dos resíduos de glicano pertencentes às glicoproteínas e glicolipídios da superfície celular. Esta glicosilação aberrante é causada por uma disfunção de glicosiltransferases e glicosidases (SILVA-FILHO et al., 2017). Com ampla aplicações em diferentes áreas, o uso das lectinas têm atraído a atenção para a compreensão da glicobiologia do câncer, seja para investigar mudanças na expressão de glicoproteínas ou devido a sua potencial atividade antitumoral (XU et al., 2015; YOON et al., 2003). Lectinas conjugadas a *quantum dots*

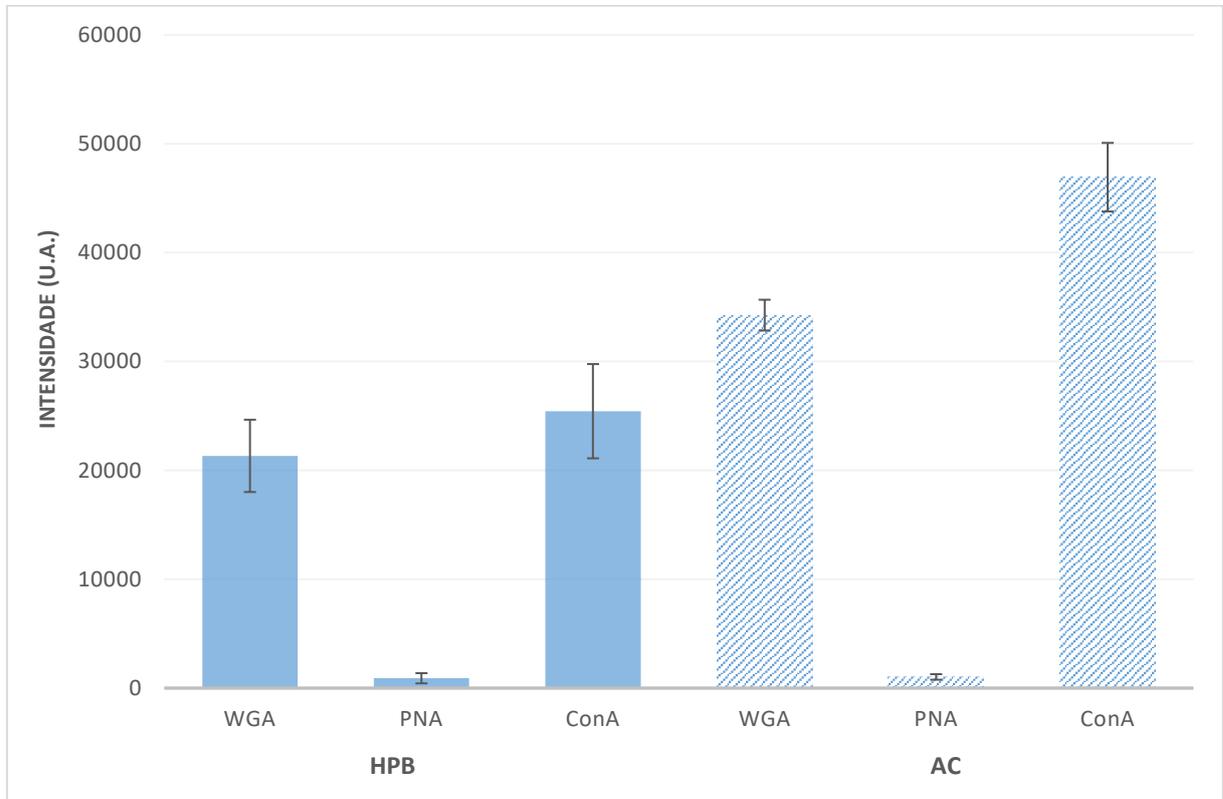
podem ser usadas como sondas fluorescentes para monitorar mudanças na expressão de glicoproteínas em células ou tecidos (CUNHA et al., 2018).

Todas as amostras de tecidos humanos apresentam autofluorescência própria, que é em grande parte devido as fibras de colágeno (YUEYUE et al., 2017). O colágeno está presente em grande quantidade nas membranas basais dos tecidos e possui forte emissão na região do azul-violeta.

Esse padrão de marcação seguiu para os tecidos de hiperplasia benigna prostática e adenocarcinoma prostático, corroborando com os resultados obtidos por (SÖDERSTRÖM, 1987) que utilizou isotiocianato de fluoresceína conjugado a sete distintas lectinas, entre elas a ConA, WGA e PNA. Na próstata humana, a marcação tecidual de ConA e WGA foi relatada para epitélio normal, hiperplásico e carcinoma bem diferenciado. Entretanto, assim como foi observado nos ensaios realizados nesse trabalho a PNA tem ligação ausente no tecido prostático e diminui mais ainda no avançar da idade do paciente (MCNEAL et al., 1988). A utilização de metodologias quantitativas de lectinas conjugadas a éster de acridina na marcação de tecidos neoplásicos de próstata revelam a diferença de expressão de α -D-glicose/manose, onde conjugados de ConA tiveram uma alta marcação em tecidos normais quando comparados aos seus tecidos neoplásicos (DA SILVA et al., 2014). Entretanto esses resultados são exatamente opostos relatados por estudos anteriores (CORREIA et al., 2010). Os métodos quantitativos aplicados em (DA SILVA et al., 2014) confirmam a baixa expressão de N-acetil-D-glicosamina/Ácido N-acetil-D-neuramínico.

Na quantificação da fluorescência de marcação tecidual com lectinas-QD, como representado na figura 8, observou-se maior expressão de resíduos de α -D-glicose/manose e N-acetil-D-glicosamina/Ácido N-acetil-D-neuramínico, reconhecidos por ConA-*quantum dot* e WGA-*quantum dot*, entre os tecidos de hiperplasia benigna prostática e adenocarcinoma prostático. As marcações com conjugados de PNA-QD demonstraram baixa marcação tecidual.

Figura 16. Ensaio de microplaca de fluorescência na avaliação da marcação dos conjugados WGA-QD, PNA-QD e ConA-QD na investigação do glicofenótipo em tecidos de hiperplasia prostática benigna e adenocarcinoma prostático.



Fonte: O autor (2018)

No estudo de Silva et al., 2014 foi demonstrado que os tecidos prostáticos neoplásicos apresentavam uma expressão de α -D-glicose/manose significativamente inferior em comparação com os tecidos prostáticos normais. No entanto, não existia diferença entre a expressão desses carboidratos nas condições malignas e benignas. Entretanto o presente trabalho, ao utilizar os mesmos blocos de estudos que Silva et al., 2014, porém utilizando conjugados de lectinas aos *quantum dots* demonstrou uma moderada diferença entre expressão desses carboidratos. Estes resultados discordam dos relatados por Correia et al., 2010 onde observaram um aumento da expressão de α -D-glicose/manose em tecidos hiperplásicos em comparação com os tecidos normais e de adenocarcinoma prostático.

Os *quantum dots* possuem propriedades óticas melhores que os corantes orgânicos tradicionais, como a alta intensidade de fluorescência, fotoestabilidade, comprimento de onda de emissão ajustável com o tamanho do nanocristal e possível

marcação múltipla. Por causa dessas vantagens ópticas, as imagens baseada em *quantum dots* têm sido amplamente aplicada em pesquisas sobre o câncer (WANG et al., 2015). Os tipos de câncer mais incidentes no mundo estão as neoplasias de próstata e as de mama (INCA, 2017a). Essa é a razão do crescente estudo da glicobiologia dessas neoplasias utilizando *quantum dots* conjugados a lectinas. Ao compararmos imagens de marcação de ConA-*quantum dot* entre tecidos de neoplasia prostática e de mama, a região estromal dos tecidos de próstata possuem uma expressão de α -D-glicose/manose extremamente inferior que os tecidos de mama (ANDRADE et al., 2013). A região do estroma na próstata é composto por um tecido mais colagenoso e com muitos linfócitos residentes, células neuroendócrinas e menos vascularizado. Na mama temos um estroma menos fibroso, entremeado de adipócitos além das células mioepiteliais, com menos linfócitos residentes e com isso conjugados de lectinas a *quantum dots* são capazes de interagir com os resíduos de carboidratos presentes nessa região.

5 CONCLUSÃO

A conjugação de lectinas aos *quantum dots* não mudaram significativamente as propriedades óticas das nanopartículas, bem como não interferiram na capacidade de reconhecimento dos carboidratos pelas lectinas. Tais conjugados possibilitaram a investigação da expressão de glicanos em hiperplasia benigna prostática e adenocarcinoma prostático. Como mostrado pelos ensaios de inibição, a interação entre os conjugados e as moléculas de superfície celular é muito específica.

O padrão de expressão de resíduos de α -D-glicose/manose e N-acetil-D-glicosamina/Ácido N-acetil-D-neuramínico está associado a região celular do tecido, apresentando marcação ausente dos conjugados a porção estromal.

Tecidos de hiperplasia benigna prostática e adenocarcinoma prostático apresentaram expressão de carboidratos específicos para lectinas ConA e WGA conjugados aos *quantum dots*. Entretanto esses tecidos não apresentaram expressão de N-acetil-D-galactosamina, dessa forma não tiveram marcação pela PNA. Os resultados obtidos neste trabalho indicam um grande potencial na bioconjugação de *quantum dots* à lectinas. Os resultados também são um complemento do trabalho publicado por SILVA et al., 2014 revelando as regiões de marcação das lectinas nos tecidos prostáticos. Essas sondas nanobiotecnológicas têm alta capacidade de elucidação do microambiente neoplásico celular e extracelular.

REFERÊNCIAS

- AARON, L.; FRANCO, O.; HAYWARD, S. W. Review of prostate anatomy and embryology and the etiology of BPH. v. 70, n. 12, p. 773–779, 2016.
- ABRANTES, A. . **Hipoxia Tumoral-Metabonômica e Imagem. Estudo Experimental.** [s.l.] Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2013.
- ALFASSI, Z.; BAHNEMANN, D.; HENGLEIN, A. Photochemistry of colloidal metal sulfides. 3. Photoelectron emission from cadmium sulfide and cadmium sulfide-zinc sulfide cocolloids. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 86, n. 24, p. 4656–4657, 1 nov. 1982.
- ALIVISATOS, A. P. Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots. **Science**, v. 271, n. 5251, p. 933–937, 1996.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts and Figures 2017. **Genes and Development**, v. 21, n. 20, p. 2525–2538, 2017.
- ANDRADE, C. G. et al. Evaluation of glyco-phenotype in breast cancer by quantum dot-lectin histochemistry. **International journal of nanomedicine**, v. 8, p. 4623–4629, 2013.
- ANDRADE, C. G. DE. **Análise da expressão de carboidratos em tecidos mamários humanos empregando lectinas conjugadas a pontos quânticos.** [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2013.
- APWEILER, R.; HERMJAPOB, H.; SHARON, N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1473, n. 1, p. 4–8, dez. 1999.
- AUDETTE, G. F.; VANDONSELAAR, M.; DELBAERE, L. T. The 2.2 Å resolution structure of the O(H) blood-group-specific lectin I from *Ulex europaeus*. **Journal of molecular biology**, v. 304, n. 3, p. 423–433, dez. 2000.
- BARRON, D. A.; ROWLEY, D. R. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. **Endocrine-related cancer**, v. 19, n. 6, p. R187-204, dez. 2012.
- BASKOUTAS, S.; TERZIS, A. F. Size-dependent band gap of colloidal quantum dots. **Journal of Applied Physics**, v. 99, n. 1, p. 13708, 1 jan. 2006.
- BELTRAO, E. I. et al. Binding evaluation of Isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 125–134, set. 1998.
- BELTRAO, E. I. C. et al. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumour. **European journal histochemistry**, v. 47, n. 2, p. 139–142, 2003.
- BILAN, R. et al. Quantum Dot Surface Chemistry and Functionalization for Cell Targeting and Imaging. **Bioconjugate Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 609–624, 15 abr.

2015.

BLANCO-CANOSA, J. B. et al. Recent progress in the bioconjugation of quantum dots. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 263–264, p. 101–137, 2014.

BODNARCHUK, M. I.; KOVALENKO, M. V. Engineering colloidal quantum dots. In: SARGENT, E. H.; KONSTANTATOS, G. (Eds.). . **Colloidal Quantum Dot Optoelectronics and Photovoltaics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2013. p. 1–29.

BOLES, M. A. et al. The surface science of nanocrystals. **Nature Materials**, v. 15, p. 141, 22 jan. 2016.

BOXBERG, F.; TULKKI, J. Quantum Dots : Phenomenology , Photonic and Electronic Properties , Modeling and Technology. In: LAKHTAKIA, A. (Ed.). . **Handbook of Nanotechnology: Nanometer Structure Theory, Modeling, and Simulation**. [s.l: s.n.]. p. 107–118.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). **Science (New York, N.Y.)**, v. 119, n. 3091, p. 419, mar. 1954.

BRASIL. Protocolos de encaminhamento da atenção básica para a atenção especializada. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**, v. VI, 2017.

BRUS, L. Quantum crystallites and nonlinear optics. **Applied Physics A**, v. 53, n. 6, p. 465–474, 1991.

CABRAL FILHO, P. E. et al. Blood group antigen studies using CdTe quantum dots and flow cytometry. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 4393–4404, 2015a.

CABRAL FILHO, P. E. et al. Blood group antigen studies using CdTe quantum dots and flow cytometry. **Int J Nanomedicine**, v. 10, p. 4393–4404, 2015b.

CABRERA, M. P. et al. High sucrolytic activity by invertase immobilized onto magnetic diatomaceous earth nanoparticles. **Biotechnology Reports**, v. 14, n. January, p. 38–46, 2017.

CALLISTER, W.; RETHWISCH, D. **Materials science and engineering: an introduction**. [s.l: s.n.]. v. 94

CAMBRUZZI, E. et al. Relação entre escore de Gleason e fatores prognósticos no adenocarcinoma acinar de próstata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 61–68, 2010.

CAO, N. et al. The Characteristics of the Transitional Zone in Prostate Growth With Age. **Urology**, v. 105, p. 136–140, 1 jul. 2017.

CHATTERJEE, A.; MANDAL, D. K. Quaternary association and reactivation of dimeric concanavalin A. **International journal of biological macromolecules**, v. 35, n. 1–2, p. 103–109, mar. 2005.

CHEN, Y. et al. Jasmonic acid methyl ester induces the synthesis of a

cytoplasmic/nuclear chito-oligosaccharide binding lectin in tobacco leaves. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 8, p. 905–907, 23 abr. 2002.

CHUGHTAI, B. et al. Benign prostatic hyperplasia. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 1–15, 2016.

COELHO, L. C. B. B. et al. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2017, p. 1594074, 2017.

COHEN, R. J. et al. Central Zone Carcinoma of the Prostate Gland: A Distinct Tumor Type With Poor Prognostic Features. **Journal of Urology**, v. 179, n. 5, p. 1762–1767, 2008.

COLIN HUGHES, R. Lectin histochemistry — a concise practical handbook. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 8, p. 322–323, 1 ago. 1997.

CORREIA, M. T. D. S. et al. Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

CUNHA, C. R. A. et al. Biomedical applications of glyconanoparticles based on quantum dots. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1862, n. 3, p. 427–439, 2018.

CUSHING, B. L.; KOLESNICHENKO, V. L.; O'CONNOR, C. J. Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 9, p. 3893–3946, 1 set. 2004.

DA SILVA, L. P. B. G. et al. Evaluation of glycophenotype in prostatic neoplasm by chemiluminescent assay. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 7, p. 3800–3808, 2014.

DAGTEPE, P. et al. Quantized Growth of CdTe Quantum Dots; Observation of Magic-Sized CdTe Quantum Dots. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 41, p. 14977–14983, 1 out. 2007.

DAS, R. et al. Epithelial plasticity in prostate cancer: Principles and clinical perspectives. **Trends in Molecular Medicine**, v. 20, n. 11, p. 643–651, 2014.

DASHIELL, M. W. et al. Photoluminescence of ultras-small Ge quantum dots grown by molecular-beam epitaxy at low temperatures. **Applied Physics Letters**, v. 80, n. 7, p. 1279–1281, 14 fev. 2002.

DE HOFF, P. L.; BRILL, L. M.; HIRSCH, A. M. Plant lectins: The ties that bind in root symbiosis and plant defense. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 282, n. 1, p. 1–15, 2009.

DE MARZO, A. M. et al. A Working Group Classification of Focal Prostate Atrophy Lesions. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 30, n. 10, 2006.

DE MELLO DONEGÁ, C. **Nanoparticles: Workhorses of nanoscience**. [s.l.: s.n.]. v. 9783662448

- DE OLIVEIRA DIAS, R. et al. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 519–541, 2015.
- DYAKONOV, M. I. Basics of Semiconductor and Spin Physics BT - Spin Physics in Semiconductors. In: DYAKONOV, M. I. (Ed.). . Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 1–37.
- EELES, R. et al. The genetic epidemiology of prostate cancer and its clinical implications. **Nature Reviews Urology**, v. 11, n. 1, p. 18–31, 2014.
- EPSTEIN, J. I. Precursor lesions to prostatic adenocarcinoma. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 454, n. 1, p. 1–16, jan. 2009.
- FRANCO, O. E. et al. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 21, n. 1, p. 33–39, fev. 2010.
- FUSTER, M. M.; ESKO, J. D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. 7, p. 526–542, jul. 2005.
- GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**, v. 113, n. 3, p. 236–247, 2011.
- GILBERT, B. Urologic Ultrasound Protocols BT - Practical Urological Ultrasound. In: FULGHAM, P. F.; GILBERT, B. R. (Eds.). . Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 287–339.
- GOLDGAR, D. E. et al. A systematic population based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. **J Natl Cancer Inst**, v. 86, n. 21, 1994.
- GRAHAM, E. et al. Anatomy of the Prostate. **U.S. National Institutes of Health, National Cancer insitute**, p. 6–11, 2010.
- GUPTA, S.; SHARMA, M.; KUMAR, A. Seminal Vesicles BT - Basics of Human Andrology: A Textbook. In: KUMAR, A.; SHARMA, M. (Eds.). . Singapore: Springer Singapore, 2017. p. 37–46.
- H. R. C.; SCHIFFMAN, J. D.; BALAKRISHNA, R. G. Quantum dots as fluorescent probes: Synthesis, surface chemistry, energy transfer mechanisms, and applications. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 258, p. 1191–1214, 2018.
- HARATA, K.; NAGAHORA, H.; JIGAMI, Y. X-ray structure of wheat germ agglutinin isolectin 3. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 51, n. 6, p. 1013–1019, 1995.
- HARVEY, C. J. et al. Applications of transrectal ultrasound in prostate cancer. **The British Journal of Radiology**, v. 85, n. Spec Iss 1, p. S3–S17, 23 nov. 2012.
- HASHIM, O. H.; JAYAPALAN, J. J.; LEE, C.-S. Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers. **PeerJ**, v. 5, p. e3784, 2017.
- HASSAN, Y. **Synthesis of New Nanocrystal Materials**, 2016.
- HEIDENREICH, A. et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: Screening, diagnosis, and local treatment with curative intent - Update 2013. **European**

Urology, v. 65, n. 1, p. 124–137, 2014.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate Techniques: Third Edition**. [s.l: s.n.].

HINES, M. A.; GUYOT-SIONNEST, P. Bright UV-Blue Luminescent Colloidal ZnSe Nanocrystals. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 19, p. 3655–3657, 1 maio 1998.

HORIMOTO, Y. et al. **Emerging roles of the tumor-associated stroma in promoting tumor metastasis** **Cell Adhesion & Migration**, maio 2012.

HU, B. et al. The inhibition of fluorescence resonance energy transfer between quantum dots for glucose assay. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 32, n. 1, p. 82–88, 2012.

HU, M. Z.; ZHU, T. Semiconductor Nanocrystal Quantum Dot Synthesis Approaches Towards Large-Scale Industrial Production for Energy Applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 10, p. 469, 4 dez. 2015.

HUMPHREY, P. A. Diagnosis of adenocarcinoma in prostate needle biopsy tissue. **Journal of clinical pathology**, v. 60, n. 1, p. 35–42, jan. 2007.

INCA. **Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil**. [s.l: s.n.].

INCA. **Monitoramento das ações de controle do câncer de próstata** Ministério da Saúde, , 2017b. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/informativo-deteccao-precoce-numero2-2017.pdf>>

IRIE, M. et al. A digital fluorescent molecular photoswitch. **Nature**, v. 420, p. 759, 19 dez. 2002.

ISAACS, J. T. Prostate Cancer Takes Nerve. **Science**, v. 341, n. 6142, p. 134 LP-135, 12 jul. 2013.

JOSHUA, A. M. et al. Prostatic preneoplasia and beyond. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1785, n. 2, p. 156–181, 2008.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420–1428, 2009.

KARAKOTI, A. S. et al. Surface functionalization of quantum dots for biological applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 215, p. 28–45, 2015.

KESER, T. **Influence of Genetic and Environmental factors on N-glycosylation of immunoglobulin G and total plasma proteins determined by twin study**. [s.l.] University of Zagreb, 2016.

KHAN, H. **DETERMINANTS OF PROSTATE CANCER : The Birmingham Prostatic Neoplasms Association Study Unit of Urologic and Genetic Epidemiology**. [s.l.] University of Birmingham, 2011.

KNUDSEN, B. S.; VASIOUKHIN, V. Chapter 1 - Mechanisms of Prostate Cancer Initiation and Progression. In: VANDE WOUDE, G. F.; KLEIN, G. B. T.-A. IN C. R. (Eds.). . [s.l.] Academic Press, 2010. v. 109p. 1–50.

- KONG, D. et al. Epithelial to mesenchymal transition is mechanistically linked with stem cell signatures in prostate cancer cells. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, 2010.
- KRUŠLIN, B. et al. Prostate cancer stroma: an important factor in cancer growth and progression. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 15, n. 2, p. 1–8, 2015.
- KUNDHAVAI NATCHIAR, S. et al. Structural plasticity of peanut lectin: An X-ray analysis involving variation in pH, ligand binding and crystal structure. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 60, n. 2, p. 211–219, 2004.
- LAYNEZ, Â. et al. NMR investigations of protein - carbohydrate interactions Binding studies and refined three-dimensional solution structure of the complex between the B domain of wheat germ agglutinin and N,N',N''-triacetylchitortiose. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 3978, p. 3965–3978, 2000.
- LEBRILLA, C. B.; AN, H. J. The prospects of glycan biomarkers for the diagnosis of diseases. **Molecular bioSystems**, v. 5, n. 1, p. 17–20, jan. 2009.
- LEE, J. et al. Cancer incidence among Korean-American immigrants in the United States and native Koreans in South Korea. **Cancer Control**, v. 14, n. 1, p. 78–85, 2007.
- LEISSNER, K. H.; TISELL, L. E. The weight of the human prostate. **Scandinavian journal of urology and nephrology**, v. 13, n. 2, p. 137–142, 1979.
- LENG, Q. et al. An integromic signature for lung cancer early detection. **Oncotarget**, v. 9, n. 37, p. 24684–24692, maio 2018.
- LEONELLI, R. et al. Optical and structural properties of metalorganic-vapor-phase-epitaxy-grown InAs quantum wells and quantum dots in InP. **Phys. Rev. B**, v. 48, n. 15, p. 11135–11143, 1993.
- LIN, Z. et al. A novel aptamer functionalized CuInS₂ quantum dots probe for daunorubicin sensing and near infrared imaging of prostate cancer cells. **Analytica Chimica Acta**, v. 818, p. 54–60, 2014.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins as Molecules and as Tools. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, n. 1, p. 35–67, 1 jun. 1986.
- LIS, H.; SHARON, N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. **European journal of biochemistry**, v. 218, n. 1, p. 1–27, nov. 1993.
- LOBO, N. A. et al. The Biology of Cancer Stem Cells. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 23, n. 1, p. 675–699, 18 out. 2007.
- MANSUR, H. S. Quantum dots and nanocomposites. **Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology**, v. 2, n. 2, p. 113–129, 2010.
- MCNEAL, J. E. et al. Differential lectin staining of central and peripheral zones of the prostate and alterations in dysplasia. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 89, n. 1, p. 41–48, 1988.
- MEANY, D. L. et al. Glycoproteomics for prostate cancer detection: changes in serum

PSA glycosylation patterns. **Journal of proteome research**, v. 8, n. 2, p. 613–619, fev. 2009.

MEANY, D. L.; CHAN, D. W. Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers. **Clinical proteomics**, v. 8, n. 1, p. 7, 3 jun. 2011.

MELOROSE, J.; PERROY, R.; CAREAS, S. Instituto Nacional de Câncer Rastreamento do Câncer de Próstata Novembro de 2013. **Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015**, v. 1, p. 7, 2015.

MENDONÇA, M. DA C. M. P. **Síntese e Caracterização de Quantum Dots de CdTe**. [s.l.] Universidade do Porto, 2008.

MILLER, E. M. et al. Revisiting the Valence and Conduction Band Size Dependence of PbS Quantum Dot Thin Films. **ACS nano**, v. 10, n. 3, p. 3302–3311, mar. 2016.

MITCHELL, B. S. **Materials Engineering and Science an Introduction To Materials Engineering and Science for Chemical and Materials Engineers**. [s.l.: s.n.].

MONTIRONI, R. et al. Contemporary update on pathology-related issues on routine workup of prostate biopsy sectioning, tumor extent measurement, specimen orientation, and immunohistochemistry. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, v. 36, n. 2, p. 61–70, 2014.

MOYER, V. A. Screening for Prostate Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. **Annals of Internal Medicine**, v. 157, n. 2, 2012.

NAGATA, Y.; BURGER, M. M. Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. **The Journal of biological chemistry**, v. 249, n. 10, p. 3116–3122, maio 1974.

NEAMEN, D. A. **Semiconductor physics and devices**. [s.l.: s.n.]. v. 9

NEUMANN, D. et al. Computational modeling of the sugar-lectin interaction. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 4, p. 437–457, 2004.

NIE, H. et al. Specific N-glycans of Hepatocellular Carcinoma Cell Surface and the Abnormal Increase of Core-alpha-1, 6-fucosylated Triantennary Glycan via N-acetylglucosaminyltransferases-IVa Regulation. **Scientific reports**, v. 5, p. 16007, nov. 2015.

NIETO, M. A. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 342, n. 6159, p. 1234850, nov. 2013.

OLUMI, A. F. et al. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. **Cancer research**, v. 59, n. 19, p. 5002–5011, out. 1999.

OSTMAN, A.; AUGSTEN, M. Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players. **Current opinion in genetics & development**, v. 19, n. 1, p. 67–73, fev. 2009.

PANDIS, N. et al. Factorial designs: An overview with applications to orthodontic

clinical trials. **European Journal of Orthodontics**, v. 36, n. 3, p. 314–320, 2014.

PARKIN, S.; RUPP, B.; HOPE, H. Atomic resolution structure of concanavalin A at 120 K. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 52, n. 6, p. 1161–1168, 1996.

PENET, M. F. et al. Structure and function of a prostate cancer dissemination-permissive extracellular matrix. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 9, p. 2245–2254, 2017.

PERACAULA, R. et al. Altered glycosylation pattern allows the distinction between prostate-specific antigen (PSA) from normal and tumor origins. **Glycobiology**, v. 13, n. 6, p. 457–470, jun. 2003.

PEUMANS, W. J. et al. Classification of Plant Lectins in Families Of Structurally and Evolutionary Related Proteins BT - The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates —2. In: WU, A. M. (Ed.). . Boston, MA: Springer US, 2001. p. 27–54.

PINHO, S. S.; REIS, C. A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. **Nature reviews. Cancer**, v. 15, n. 9, p. 540–555, set. 2015.

PORTO, C. S. et al. Partition of lectin from *Canavalia grandiflora* Benth in aqueous two-phase systems using factorial design. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, n. 2, p. 165–171, 2011.

REISS, P. et al. Synthesis of Semiconductor Nanocrystals, Focusing on Nontoxic and Earth-Abundant Materials. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 18, p. 10731–10819, 28 set. 2016.

RIDER, J. R. et al. Ejaculation Frequency and Risk of Prostate Cancer: Updated Results with an Additional Decade of Follow-up. **European Urology**, v. 70, n. 6, p. 974–982, 2016.

ROMERO OTERO, J. et al. Prostate cancer biomarkers: an update. **Urologic oncology**, v. 32, n. 3, p. 252–60, abr. 2014.

SÆTER, T. **Prognostic factors in prostate cancer biopsies: A population-based cohort study**. [s.l.] Oslo University Hospital, 2017.

SANDSMARK, E. **Multi-Level Molecular Characterisation of Prostate Cancer**. [s.l.] Norwegian University of Science and Technology, 2017.

SEEGER, K. **Semiconductor Physics Advanced Texts in Physics Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH**. Ninth ed. [s.l.: s.n.].

SHAO, X. et al. Evaluation of expressed prostatic secretion and serum using surface-enhanced Raman spectroscopy for the noninvasive detection of prostate cancer, a preliminary study. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 13, n. 3, p. 1051–1059, 1 abr. 2017.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R–62R, nov. 2004.

SHAW, J. A. et al. Mutation analysis of cell-free DNA and single circulating tumor

cells in metastatic breast cancer patients with high circulating tumor cell counts. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 1, p. 88–96, 2017.

SHEN, M.; ABATE-SHEN, C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. **Genes & development**, n. 212, p. 1967–2000, 2010.

SILVA-FILHO, A. F. et al. Glycobiology modifications in intratumoral hypoxia: The breathless side of glycans interaction. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1801–1829, 2017.

SILVA, L. P. B. G. et al. Evaluation of glycophenotype in prostatic neoplasm by chemiluminescent assay. **International Journal of Clinica & Experimental Pathology**, v. 7, n. 7, p. 3800–3808, 2014.

SINGH, S. et al. Easy, one-step synthesis of CdTe quantum dots via microwave irradiation for fingerprinting application. **Materials Research Bulletin**, v. 90, p. 260–265, 2017.

SMITH, A. M.; NIE, S. Semiconductor Nanocrystals: Structure, Properties, and Band Gap Engineering. **Acc Chem Res.**, v. 43, p. 190–200, 2010.

SÖDERSTRÖM, K. O. Lectin binding to prostatic adenocarcinoma. **Cancer**, v. 60, n. 8, p. 1823–31, 1987.

SQUIRE, J. A. et al. Prostate Cancer as a Model System for Genetic Diversity in Tumors. In: GISSELSSON, D. B. T.-A. IN C. R. (Ed.). . [s.l.] Academic Press, 2011. v. 112p. 183–216.

STEPHANOPOULOS, N.; FRANCIS, M. B. Choosing an effective protein bioconjugation strategy. **Nature Chemical Biology**, v. 7, p. 876, 15 nov. 2011.

STEWART, B. W.; KLEIHUES, P. International Agency for Research on Cancer. **International Agency for Research on Cancer**, v. 133, n. 9, p. 845–846, 2003.

SUND, M.; KALLURI, R. Tumor stroma derived biomarkers in cancer. **Cancer metastasis reviews**, v. 28, n. 1–2, p. 177–183, jun. 2009.

SWANSON, G. P. et al. High Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia and the Risk of Prostate Cancer. p. 67–76, 2018.

TABARES, G. et al. Different glycan structures in prostate-specific antigen from prostate cancer sera in relation to seminal plasma PSA. **Glycobiology**, v. 16, n. 2, p. 132–145, fev. 2006.

TANEJA, S. S. et al. Prostate cancer diagnosis among men with isolated high-grade intraepithelial neoplasia enrolled onto a 3-year prospective phase III clinical trial of oral toremifene. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 5, p. 523–529, 2013.

TAYLOR, R. A.; RISBRIDGER, G. P. Prostatic tumor stroma: a key player in cancer progression. **Current cancer drug targets**, v. 8, n. 6, p. 490–497, set. 2008.

TENÓRIO, D. P. L. A. et al. CdTe quantum dots conjugated to concanavalin A as potential fluorescent molecular probes for saccharides detection in *Candida albicans*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 142, p. 237–243,

2015.

TENÓRIO, D. P. L. DE A. **Aplicação de Pontos Quânticos de CdTe e Conjugados a Concanavalina A e Antigalectina-3 em Protocolos de Marcação Histoquímica de Lesões da Mama.** [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2012.

THIRUCHELVAM, N. Benign prostatic hyperplasia. **Surgery - Oxford International Edition**, v. 32, n. 6, p. 314–322, 1 jun. 2014.

TOLEDO, D. C. et al. Caracterização histomorfológica da atrofia inflamatória proliferativa na próstata canina. **Ciência Rural**, v. 40, n. 6, p. 1372–1377, 2010.

TORRE, L. A. et al. Global Cancer Statistics, 2012. **CA: a cancer journal of clinicians.**, v. 65, n. 2, p. 87–108, 2015.

TSOI, K. M. et al. Are Quantum Dots Toxic? Exploring the Discrepancy Between Cell Culture and Animal Studies. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 3, p. 662–671, 19 mar. 2013.

VAN DAMME, E. J. M.; LANNOO, N.; PEUMANS, W. J. Plant Lectins. In: KADER, J.-C.; DELSENY, M. B. T.-A. IN B. R. (Eds.). . [s.l.] Academic Press, 2008. v. 48p. 107–209.

VANDER HEIDEN, M. G.; DEBERARDINIS, R. J. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 657–669, 2017.

VARKI, A. et al. **Essentials of Glycobiology.** 2nd editio ed. [s.l: s.n.].

VARKI, A.; KANNAGI, R.; TOOLE, B. P. Glycosylation Changes in Cancer. In: VARKI, A. et al. (Eds.). . Cold Spring Harbor (NY): [s.n.].

VREELAND, E. C. et al. Enhanced Nanoparticle Size Control by Extending LaMer's Mechanism. **Chemistry of Materials**, v. 27, n. 17, p. 6059–6066, 2015.

WANG, J.-H. et al. Bioconjugation of concanavalin and CdTe quantum dots and the detection of glucose. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 364, n. 1, p. 82–86, 2010.

WANG, L.-W. et al. Quantum dots-based tissue and in vivo imaging in breast cancer researches: current status and future perspectives. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 151, n. 1, p. 7–17, 2015.

WICHA, M. S.; LIU, S.; DONTU, G. Cancer Stem Cells: An Old Idea{\textemdash}A Paradigm Shift. **Cancer Research**, v. 66, n. 4, p. 1883–1890, 2006.

XING, Y.; RAO, J. Quantum dot bioconjugates for in vitro diagnostics & in vivo imaging. **Cancer biomarkers : section A of Disease markers**, v. 4, n. 6, p. 307–319, 2008.

XU, X.-C. et al. Antiviral and antitumor activities of the lectin extracted from *Aspidistra elatior*. **Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences**, v. 70, n. 1–2, p. 7–13, 2015.

YOON, T. J. et al. Antitumor activity of the Korean mistletoe lectin is attributed to activation of macrophages and NK cells. **Archives of pharmacal research**, v. 26, n.

10, p. 861–867, out. 2003.

YOSHIMOTO, J. et al. Ulex Europaeus Agglutinin-1 Is a Reliable Taste Bud Marker for In Situ Hybridization Analyses. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 64, n. 3, p. 205–215, mar. 2016.

YU, C. et al. Prostate cancer stem cell biology. **Minerva urologica e nefrologica = The Italian journal of urology and nephrology**, v. 64, n. 1, p. 19–33, 2012.

YU, W. W. et al. **Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals**. [s.l: s.n.]. v. 15

YUEYUE, J. et al. Label-free imaging and spectroscopy for early detection of cervical cancer. **Journal of Biophotonics**, v. 11, n. 5, p. e201700245, 5 dez. 2017.

ZAD, S.; MOGHADDAM, J.; ESKANDARIAN, M. R. **LaMer diagram approach to study the nucleation and growth of Cu₂O nanoparticles using supersaturation theory**. [s.l: s.n.]. v. 31

ZHAO, J. et al. Comparative Serum Glycoproteomics Using Lectin Selected Sialic Acid Glycoproteins with Mass Spectrometric Analysis: Application to Pancreatic Cancer Serum. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 7, p. 1792–1802, 1 jul. 2006.

ZHELEV, Z. et al. Fabrication of quantum dot-lectin conjugates as novel fluorescent probes for microscopic and flow cytometric identification of leukemia cells from normal lymphocytes. **Chemical Communications**, n. 15, p. 1980–1982, 2005.

ZU, Y. et al. Process optimization for the preparation of oligomycin-loaded folate-conjugated chitosan nanoparticles as a tumor-targeted drug delivery system using a two-level factorial design method. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 3429–3441, 2011.

APÊNDICE A – ARTIGO

Artigo de revisão publicado descreve as estratégias, relatadas na literatura, para conjugar *quantum dots* a lectinas ou carboidratos. Contém informações valiosas para a elaboração, melhoria e aplicação desses nanoconjugados. Apresenta também as principais aplicações desses nanosistemas em glicobiologia, como o potencial para o estudo de microrganismos, o desenvolvimento de doenças como o câncer e o desenvolvimento de biossensores.

Como objetivo principal da elaboração do artigo foi produzir uma fonte de referência rápida sobre os principais avanços alcançados na gliconanotecnologia usando *quantum dots* como sondas fluorescentes.

BBA General Subjects é uma revista que aceita a submissão de estudos ou revisões originais, baseados em hipóteses, abrangendo assuntos em bioquímica e biofísica que são considerados de interesse geral para um público amplo. Fator de impacto 2017: 3.679

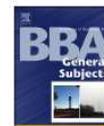
BBA - General Subjects 1862 (2018) 427–439



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - General Subjects

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



Review

Biomedical applications of glyconanoparticles based on quantum dots

C.R.A. Cunha^{a,b,f}, A.D.P.R. Oliveira^{a,f}, T.V.C. Firmino^{c,g}, D.P.L.A. Tenório^a, G. Pereira^d, L.B. Carvalho Jr.^c, B.S. Santos^c, M.T.S. Correia^d, A. Fontes^{b,y}

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

^b Departamento de Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^c Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^d Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^e Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^f Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^g Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:
Quantum dots
Lectin
Carbohydrate
GlycoBiology
Fluorescence

ABSTRACT

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

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

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

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