



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

MARIA EDUARDA TORRES DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DO GLICOFENÓTIPO DE TECIDOS DE CÂNCER DE MAMA
UTILIZANDO PONTOS QUÂNTICOS CONJUGADOS À LECTINA CRAMOLL**

Recife

2019

MARIA EDUARDA TORRES DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DO GLICOFENÓTIPO DE TECIDOS DE CÂNCER DE MAMA
UTILIZANDO PONTOS QUÂNTICOS CONJUGADOS À LECTINA CRAMOLL**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia

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

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Carvalho, Maria Eduarda Torres de

Avaliação do glicofenótipo de tecidos de câncer de mama utilizando pontos quânticos conjugados à lectina Cramoll / Maria Eduarda Torres de Carvalho - 2019.

44 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientadora: Adriana Fontes

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas. Recife, 2019.

Inclui referências e apêndice.

1. Câncer de mama 2. Nanocristais 3. Carboidratos

I. Correia, Maria Tereza dos Santos (Orient.) II. Fontes, Adriana
(Coorient.) III. Título

616.99449

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-315

MARIA EDUARDA TORRES DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DO GLICOFENÓTIPO DE TECIDOS DE CÂNCER DE MAMA
UTILIZANDO PONTOS QUÂNTICOS CONJUGADOS À LECTINA CRAMOLL**

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

Aprovado em: 29/07/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia
Departamento de Bioquímica – UFPE (Presidente)

Prof^a. Dr^a Dijanah Cota Machado
Departamento de Biofísica e Radiobiologia – UFPE (Examinador 1)

Prof^o. Dr^o. Thiago Henrique Napoleão
Departamento de Bioquímica – UFPE (Examinador 2)

À minha avó,
o grande e eterno amor da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, por me dar força, coragem e saúde para realizar mais este sonho. Toda honra e toda glória pertencem a ti Senhor.

À vida por me ensinar que não fazemos nada sozinhos, que nenhuma culpa vai alterar o passado e nenhuma ansiedade mudará o futuro.

À minha vó, o meu grande amor, obrigada por tanto. “De todo o amor que eu tenho, metade foi tu que me deu, salvando minh'alma da vida, sorrindo e fazendo o meu eu”.

À minha mãe, você que abriu mão dos seus sonhos, para eu ter os meus.

A meu pai, obrigada por me dar a oportunidade de iniciar essa trajetória, sem o senhor, não seria possível.

Agradeço aos meus irmãos, em especial Renata, por me mostrar que se nos mantermos firmes na luta, sempre alcançaremos nossos objetivos e que os obstáculos não são para nos derrubar e sim para nos ensinarmos a ser resilientes.

Thiago, essa fase não seria a mesma sem você, obrigada pelo amor, companheirismo, paciência nas horas difíceis e cuidado. Todo o tempo ao seu lado é de grande aprendizado. Te amo momisão.

Ao presente que o mestrado me deu, meu amigo Wesley, essa jornada não seria possível sem a sua amizade, companheirismo e serenidade em todos os momentos. Os áudios no WhatsApp não irão acabar com o mestrado, você não irá se livrar de mim tão fácil. Muito obrigada por tudo.

À minha orientadora, Prof^a Tereza Correia por confiar em meu trabalho e estar presente não só como orientadora, mas como amiga. Sou muito grata pelo incentivo e oportunidade de trabalhar com a senhora desde o primeiro período da graduação.

À minha co-orientadora, Prof^a Adriana Fontes, obrigada pela dedicação para minha progressão científica. Espero que saiba o quanto faz a diferença na vida das pessoas e como fez na minha.

Ao Prof^o Paulo Euzébio, que tanto me ajudou na execução de experimentos e análises, sem você não seria possível.

À Cassia, pela boa vontade e dedicação nos ensinamentos desde a iniciação científica e não menos importante, por toda prestatividade a sanar as inúmeras dúvidas.

À Bela, por sempre ser luz e calma no meio a tempestade. Conta sempre!

Aos meus amigos, agradeço por ficar ao meu lado nos melhores e piores momentos. Eu amo muito vocês.

Aos que não citei aqui, mas que de alguma forma contribuíram positivamente em algum aspecto da minha vida, vai o meu muito obrigada.

Aos órgãos de fomento CNPq e FACEPE.

“Porque ela é filha desse bioma tão desprezado
que já nos trouxe tantos legados
e ainda hoje nos deixa abismados.
Ela é fruto que só a resistência das plantas pode nos oferecer.
Extraída de sementes da planta forrageira,
tem revelado seu potencial a todos que desejam
entender a linguagem doce da vida com determinação.
Ela é Cramoll, a lectina biotiva do sertão!”
(CUNHA, 2018)

RESUMO

Avaliar o padrão de glicosilação do câncer pode fornecer informações valiosas relacionadas a iniciação, desenvolvimento e progressão tumoral, pois durante a carcinogênese ocorrem alterações no perfil glicídico acarretando mudanças nos processos biológicos como: adesão, reconhecimento imunológico e diferenciação celular. Devido a isso, existe uma demanda por metodologias de alta sensibilidade capazes de detectar e avaliar essas modificações com alta especificidade. Nesse contexto, lectinas conjugadas a pontos quânticos (PQs) têm se destacando como interessantes ferramentas para estudo da glicobiologia associada a processos biológicos, assim como os neoplásicos. Isso se deve às singulares propriedades dos PQs, como sua alta fotoestabilidade e sua superfície ativa para conjugação a biomoléculas e a capacidade das lectinas de interagir com os glicídios de maneira específica. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar o glicocódigo de tecidos de mama humano: normal, diagnosticado com fibroadenoma (FB) e carcinoma ductal invasivo (CDI) utilizando a lectina Cramoll conjugada aos PQs. Para isso, purificamos a lectina Cramoll 1,4, que reconhece resíduos de glicose e manose e a conjugamos por adsorção a PQs de Telureto de Cádmio (CdTe). O conjugado foi analisado através da espectroscopia de absorção e emissão, determinação da atividade hemaglutinante, dicroísmo circular e pela marcação em células de *Candida albicans* e os resultados indicaram que um conjugado com intensa fluorescência, especificidade e funcionalmente ativo foi obtido. As imagens de fluorescência mostraram que as células ductais foram preferencialmente marcadas no tecido mamário normal e no FB, enquanto no CDI tanto as células quanto o estroma foram intensamente marcados pelo conjugado. Além disso, foi proposto um método para avaliar quantitativamente a intensidade da marcação tecidual por meio de um ensaio fluorescente de microplaca (EFM), o qual demonstrou de maneira prática e sensível ser capaz de mensurar a quantidade de biomarcadores, como a glicose e manose, expostos nos tecidos. O EFM também indicou que a quantidade desses carboidratos aumentou de acordo com o grau de malignidade da amostra, corroborando com a análise microscópica. Portanto, o conjugado PQ-Cramoll mostrou-se ser uma ferramenta promissora para estudar e avaliar os perfis de glicídios em tecidos normais e transformados, sendo possível estabelecer comparações entre eles, através de localização morfológica por microscopia de fluorescência e quantificação por meio do EFM.

Palavras-chave: Nanocristais de semicondutores. Câncer de mama. Carboidratos.

ABSTRACT

The evaluation of the glycosylation pattern in cancer can provide valuable information related to initiation, development, and tumor progression because during the carcinogenesis changes occur in the glycode causing modifications in biological processes such as adhesion, immunological recognition, and cell differentiation. Therefore, there is a demand for high sensitivity methodologies capable of detecting and evaluating these modifications with high specificity. In this context, lectins conjugated to quantum dots (QDs) have been highlighted as interesting tools to study the glycobiology associated with biological processes, such as the neoplastic ones. The reasons for that are not only the unique properties of QDs, such as the high photostability and the active surface for conjugation to biomolecules, but also the capacity of lectins to interact with the glycodes in a specific and reversible way. Then, the objective of this study was to investigate the glycode of human breast tissues: normal, diagnosed with fibroadenoma (FB) and invasive ductal carcinoma (IDC) using the Cramoll lectin conjugated to QDs. For this, we purified the lectin Cramoll 1,4, which recognizes residues of glucose and mannose, and we conjugated these proteins with QDs of Cadmium Telluride (CdTe) by adsorption. The conjugate was analyzed by absorption and emission spectroscopy, determination of hemagglutinating activity, circular dichroism, and by labeling *Candida albicans* cells and the results indicated that a conjugate with intense fluorescence, specificity, and functional activity was obtained. Fluorescence images showed that ductal cells were preferentially labeled in normal and FB mammary tissue, whereas, in IDC, both cells and stroma were strongly labeled by the conjugate. Additionally, a method based on a fluorescent microplate assay (FMA) was proposed to quantitatively assess the intensity of the tissue labeling. The FMA demonstrated, in a practical and sensitive way, to be able to measure the level of biomarkers, such as exposed glucose and mannose, in tissues. The FMA also indicated that the amount of these carbohydrates increased according to the degree of malignancy of the sample, corroborating with the microscopy analysis. Therefore, the QDs-Cramoll conjugate showed to be a promising tool to study and evaluate the glycode of normal and transformed tissues, being possible to establish comparisons between them, through morphological localization by fluorescence microscopy and quantification through EFM.

Keywords: Semiconductor nanocrystals. Breast cancer. Carbohydrates.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Aspecto macroscópico (A) e microscópico (B) do fibroadenoma. A seta amarela indica uma célula ductal, enquanto os asteriscos mostram áreas estromais (barra de escala em A = 1 cm e em B = 10 μ m)	18
FIGURA 2- Aspecto macroscópico (A) e microscópico (B) do carcinoma ductal invasivo. A seta amarela indica uma célula ductal, enquanto os asteriscos mostram áreas estromais (barra de escala em A = 1 cm e em B = 10 μ m).	19
FIGURA 3- Representação esquemática das comuns classes de glicoconjugados expressos em células humanas.....	21
FIGURA 4 - Planta (A) e sementes de <i>Cratylia mollis</i> (B) e Estrutura terciária de Cramoll(C).....	24
FIGURA 5 - Etapas para purificação das isoformas de lectinas de <i>Cratylia mollis</i>	24
FIGURA 6 - Representação esquemática das bandas de condução e de valência no bulk e nos PQs, indicando as emissões desses nanocristais de acordo com o tamanho.....	27
FIGURA7- Estrutura química de alguns agentes estabilizantes: (A) ácido mercaptoacético - AMA, (B) ácido mercaptosuccínico - AMS, (C) ácido 3-mercaptopropiônico - AMP, (D) cisteamina - CISTM, (E) cisteína – CIS.	29
FIGURA 8 - Estrutura de um ponto quântico conjugado a uma biomolécula.....	29
FIGURA 9 - (A) Imagens por microscopia confocal de células e hifas de <i>C. Albicans</i> . (B) Imagens por microscopia confocal de varredura a laser de biofilme de <i>C. albicans</i> , ambas marcadas por PQs-ConA. A seta branca indica as hifas, enquanto os asteriscos indicam as células (barra de escala em A = 10 μ m).	31

LISTA DE ABREVISTURAS E SIGLAS

AMA	Ácido Mercaptoacético
AMP	Ácido 3 - mercaptopropiônico
AMS	Ácido Mercaptosuccínico
Anti – A	Anticorpo monoclonal A
Anti – B	Anticorpo monoclonal B
Anti – H	Lectina <i>Ulex europaeus</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BC	Banda de Condução
BV	Banda de valência
CBD	Domínio de ligação a carboidratos
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CdS	Sulfeto de Cádmio
CdSe	Seleneto de Cádmio
CdTe	Telureto de Cádmio
CIS	L-cisteína
CISTM	Cisteamina
ConA	Concavalina A
Cramoll	Lectina de <i>Cratylia mollis</i>
CRD	Domínio de reconhecimento de carboidratos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
e-	Elétron
EA	Éster de acrinidina
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EFM	Ensaio fluorescente de microplaca
Eg	Band Gap
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FB	Fibroadenoma
h+	Espaço vazio na banda de valência
IgG	Imunoglobulina G

INCA	Instituto Nacional do Câncer
MBL	Lectina ligadora de manose
PAAF	Punção aspirativa com agulha fina
pH	Potencial hidrogeniônico
PNA	Lectina aglutinina do amendoim
PQs	Pontos quânticos
QDs	<i>Quantum dots</i>
Sulfo-NHS	N-hidroxisulfosuccinimida
UEA	Lectina <i>Ulex europaeus</i>
ZnS	Sulfeto de zinco
ZnSe	Seleneto de zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS	16
1.1.1	Objetivo geral	16
1.1.2	Objetivos específicos.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	CÂNCER DE MAMA	17
2.2	GLICOSILAÇÃO NO CÂNCER	19
2.3	LECTINAS	21
2.4	PONTOS QUÂNTICOS	26
2.5	ENSAIO FLUORESCENTE DE MICROPLACA	32
3	CONCLUSÕES	34
	REFERÊNCIAS	35
	APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA INTERNACIONAL	
	JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES	43

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o câncer mais comum em mulheres e ocupa a terceira posição entre as neoplasias malignas mais incidentes no mundo (INCA, 2018). A elevada taxa de mortalidade decorrente dessa doença é também consequência de um diagnóstico tardio, o qual pode ser justificado pela necessidade de se ter uma compreensão mais aprofundada da sua biologia (INCA, 2018; BUDZIK et al., 2019). A busca por novos biomarcadores é fundamental para a detecção precoce e para predizer com maior precisão seu prognóstico. Na era pós-genômica, os glicanos começam a se destacar como biomarcadores com valor diagnóstico e prognóstico, visto que a iniciação e o desenvolvimento tumoral, processo conhecido por carcinogênese, promove mudanças na expressão de proteínas e glicoconjugados celulares (glicoproteínas e glicolipídios). Essas alterações incluem a perda, a superexpressão ou o aparecimento de novas estruturas (STOWELL et al., 2015) acarretando em modificações nas vias de sinalização, no microambiente tumoral e no reconhecimento imunológico, os tornando indispensáveis na compreensão dos processos biológicos envolvidos na carcinogênese (VARKI et al., 2017).

Uma ferramenta versátil e bastante utilizada para auxiliar na análise do glicocódigo biológico são as lectinas, devido ao seu reconhecimento específico e reversível de carboidratos, fazendo dessas proteínas, de origem não imune, parte integrante e essencial nos estudos da Glicobiologia (COELHO et al., 2017). Cramoll 1,4 (Cramoll) é uma lectina extraída das sementes de *Cratylia mollis* Mart. ex. Benth que apresenta afinidade por glicose e manose, de forma similar à Concanavalina A (Con A), uma conhecida lectina de sementes de *Canavalia ensiformis* (OLIVEIRA, et al., 2017). Cramoll tem sido amplamente investigada quanto às suas diversas atividades biológicas, entre elas a atividade antitumoral (ANDRADE et al., 2004), a geração de memória imunológica (OLIVEIRA et al., 2013) e como sondas para estudos de câncer de mama e próstata (LIMA et al., 2010; ANDRADE et al., 2013).

Em muitos estudos, as lectinas vêm sendo conjugadas a sondas fluorescentes para aumentar a sensibilidade e propiciar especificidade bioquímica aos ensaios biológicos (ANDRADE et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2018; CUNHA et al., 2018), acarretando no desenvolvimento de ferramentas que ultrapassam a barreira genômica para um maior entendimento dos mecanismos envolvidos no câncer. Dentre essas sondas, vêm se destacando os pontos quânticos (PQs) ou *quantum dots* (QDs), nanocristais fluorescentes

de semicondutores que possuem singulares vantagens, tais como: excepcional fotoestabilidade e superfície ativa para conjugação com biomoléculas e até mesmo outras nanopartículas (CABRAL FILHO et al, 2016). Os conjugados PQs-lectinas já foram utilizados em muitos estudos, como para identificar e analisar o perfil de carboidratos em tecidos de câncer, bem como a fim de investigar infecções microbianas (ANDRADE et al., 2013; TENORIO et al., 2015). Em 2018, o estabelecimento eficiente da conjugação dos PQs de CdTe com a lectina Cramoll, realizado por Cunha e colaboradores, motivou a realização desse atual estudo, pois o bioconjugado mostrou ser uma ferramenta promissora na investigação do perfil glicídico presente na superfície de sistemas biológicos (CUNHA et al., 2018). possibilitando assim avaliar nesta dissertação o glicofenótipo de tecidos de câncer de mama.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi aplicar conjugados de PQs-Cramoll para avaliar os resíduos de glicose e manose em tecidos normais, fibroadenoma (FB) e carcinoma ductal invasivo (CDI). Para isso, a microscopia de fluorescência foi utilizada para avaliar a localização desses carboidratos. Também foi proposto um método baseado em ensaio fluorescente em microplaca não só para mensurar biomarcadores teciduais, como a glicose e a manose nos tecidos mamários analisados nesta dissertação, bem como correlacionar a localização morfológica com dados quantitativos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil de manose e glicose utilizando a lectina Cramoll conjugada a PQs em tecidos mamários humanos normais e transformados benigna e malignamente.

1.1.2 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar opticamente PQs de CdTe estabilizados com o ácido mercaptosuccínico (AMS);
- Purificar a lectina Cramoll;
- Bioconjugar os PQs à lectina Cramoll;
- Caracterizar os conjugados quanto a parâmetros físico-químicos e biológicos;
- Analisar, através da microscopia de fluorescência o perfil de glicose e manose em tecidos mamários humanos normais e diagnosticados com fibroadenoma (FB) e carcinoma ductal invasivo (CDI), empregando histoquímica com lectinas;
- Propor um método quantitativo baseado em ensaio fluorescente em microplacas (EFM) para analisar o perfil glicídico de tecidos, através de bioconjugados de PQs.
- Determinar o padrão de marcação e correlacionar com o nível de transformação celular e tecidual por microscopia e EFM;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER DE MAMA

Atualmente o câncer é definido como um conjunto de doenças em que as células possuem um crescimento desordenado e excessivo determinado pela perda do controle do ciclo celular. O seu início e progressão está relacionado a fatores genéticos e ambientais (ABBAS, 2012). O câncer se desenvolve através de um processo denominado carcinogênese. Esse processo se inicia a nível molecular com mutações não letais. O acúmulo dessas mutações pode levar a atributos genotípicos e fenotípicos relacionados ao aumento da malignidade e do desenvolvimento tumoral (LUTGENDORF; SOOD, 2011).

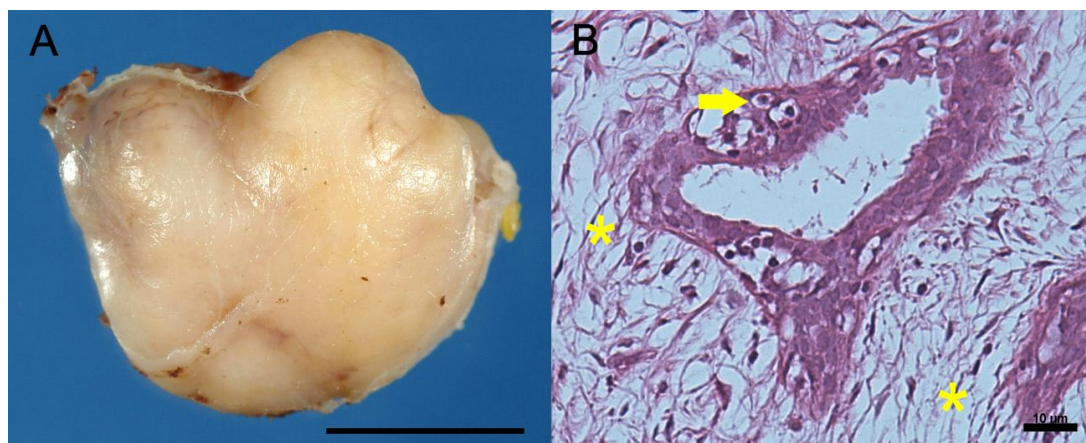
Os tumores podem ser classificados em: (i) benigno, no qual as características macro e microscópicas são semelhantes ao tecido normal, com baixo risco de metástase e bom prognóstico e, (ii) maligno, com aspecto macro e microscópico diferente do tecido normal, com invasão tecidual, angiogênese autossustentada e mau prognóstico. Os tumores possuem dois componentes básicos: o estroma e o parênquima. O estroma é constituído por tecido conjuntivo e vasos sanguíneos que dão sustentação ao tumor e suporte nutritivo, respectivamente; já o parênquima é formado por células transformadas (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

Existem vários tipos de alterações neoplásicas, dentre elas, o câncer de mama é o mais comum entre os indivíduos do sexo feminino no mundo, e no Brasil é a segunda principal causa de óbitos, atrás apenas do câncer de pele não melanoma, sendo estimados 59.700 novos casos para o ano de 2018 (INCA, 2018).

O fibroadenoma mamário é o tipo mais comum de tumor benigno de mama, sendo uma alteração proliferativa que acomete o estroma e as células ductais e é geralmente mais incidente em mulheres com idade entre 25 e 30 anos (HUBBARD et al., 2015). Os fibroadenomas são tumores de origem lobular, delimitados, móveis e com diâmetro em torno 1 a 10 cm. Macroscopicamente são lesões com textura rígida, esbranquiçadas com áreas rosadas, que são correspondentes às áreas glandulares. Microscopicamente é constituído pelo: componente epitelial, com epitélio do tipo ductal e o componente estromal, que é um tecido fibroelástico frouxo ao redor das estruturas epiteliais (JESINGER; MSE 2014), como pode ser visualizado nas Figuras 1A e 1B respectivamente. O diagnóstico do fibroadenoma é realizado através da mamografia,

porém como é um exame com baixa especificidade, é necessário a realização da anamnese, ultrassom e em alguns casos, a punção aspirativa com agulha fina (PAAF) para ter um diagnóstico definitivo (HUBBARD et al., 2015).

Figura 1. Aspectos macroscópicos (A) e microscópicos (B) do fibroadenoma. A seta amarela indica uma célula ductal, enquanto os asteriscos mostram áreas estromais (barra de escala em A = 1 cm e em B = 10 μ m).

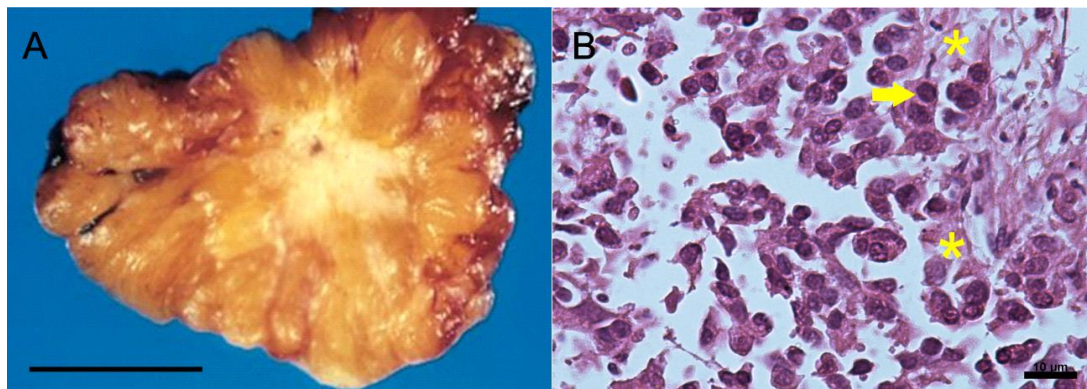


Fonte: RUBIN; STRAYER, 2012; ANDRADE, 2013.

O carcinoma é uma das principais doenças da mama, sendo o carcinoma ductal invasivo (CDI) o tipo mais frequente do câncer. O CDI é desenvolvido por um grupo heterogêneo de lesões nas células epiteliais, e em contraste com o fibroadenoma, possui um comportamento agressivo, invasão tecidual e a possibilidade de metástase (ABBAS, 2012).

Macroscopicamente, como pode ser observado na Figura 2A, o tumor apresenta-se como uma massa palpável com 1 a 3 cm de diâmetro, de consistência firme, coloração acinzentada, com a formação de trabéculas irradiando-se a partir do centro da lesão. Microscopicamente, o tumor é formado pela proliferação de estruturas epiteliais com atipias citológicas acentuadas e com uma tendência a formar estruturas pseudo-glandulares ou semelhantes a ductos (Figura 2B). Para o diagnóstico, é necessária a realização da biópsia com posterior análise e classificação dos tecidos seguindo características histológicas como: formação de túbulos, atipias nucleares e índice mitótico. O diagnóstico é feito por exclusão, quando o tumor não atende as características classificatórias de outros tipos de carcinoma, como carcinoma medular e tubular (BOGLIOLO, 2017).

Figura 2. Aspectos macroscópicos (A) e microscópicos (B) de carcinoma ductal invasivo. A seta amarela indica uma célula ductal, enquanto os asteriscos mostram áreas estromais (barra de escala em A = 1 cm e em B = 10 μ m).



Fonte: RUBIN; STRAYER, 2012; ANDRADE, 2013.

2.2 GLICOSILAÇÃO NO CÂNCER

Os carboidratos ou glicídios são as moléculas orgânicas mais abundantes encontradas nos seres vivos. A maioria dos animais e plantas sintetizam e utilizam os carboidratos para armazenar energia em forma de glicogênio e amido, respectivamente. Quando esses polissacarídeos sofrem hidrólise resultam em monossacarídeos que servirão de combustível na respiração celular, tendo como produto mais importante a adenosina trifosfato (ATP), ou seja, energia para as células sintetizar proteínas, realizar movimentos e o transporte celular (WADE, 2013). Os carboidratos são também abundantes na superfície das células tendo funções no reconhecimento de moléculas, sinalização e adesão celular (VARKI, 2017). Além de muitas funções fisiológicas importantes, como desenvolvimento embrionário, diferenciação, crescimento, inibição por contato, reconhecimento célula-célula, sinalização celular, interação com patógenos, resposta imune, desenvolvimento de doenças, metástase, tráfego e localização intracelular e provem rigidez à membrana celular (SHARON, 2008; SHARON; LIS, 2004; NIMRICHTER *et al.*, 2004; ZACHARA *et al.*, 2006).

Devido aos glicídios serem fundamentais para diversos processos fisiológicos é visto que a mudança no comportamento metabólico das células está diretamente relacionada com o padrão de glicosilação dessas biomoléculas. A glicosilação é a modificação pós-traducional mais abundante nos seres vivos e ocorre através de ligação covalente de um carboidrato a outros carboidratos, proteínas ou lipídeos, usando substratos doadores de açúcar específicos; possui a função de os proteger da degradação

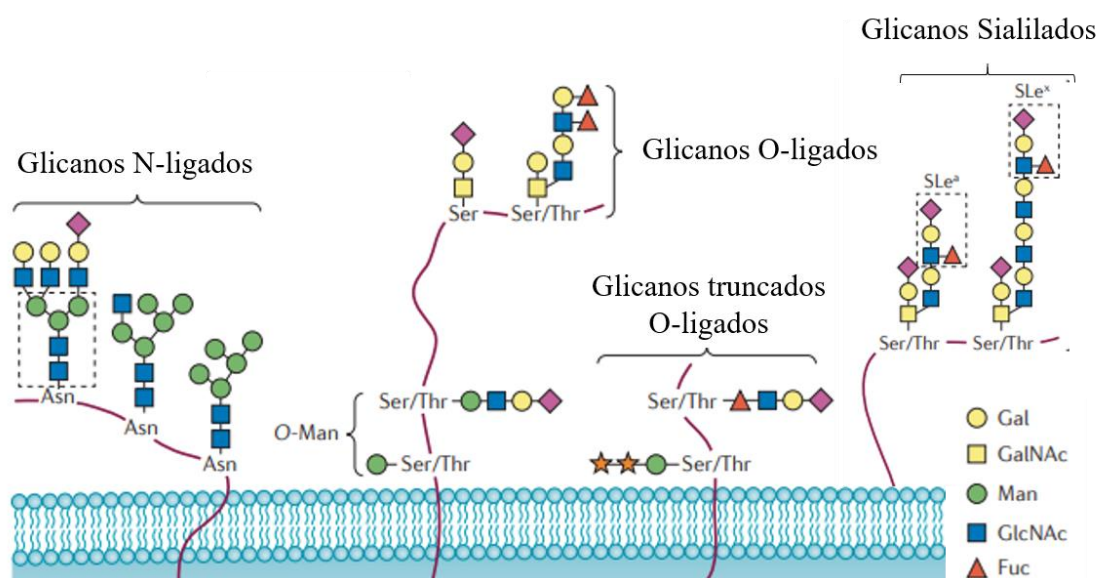
e de melhorar a sua estabilidade (PINHO; REIS 2015). Os glicanos podem ser classificados em diferentes famílias de glicoconjugados, definidas principalmente de acordo com a ligação a sua parte não glicosilada, como por exemplo: glicoproteínas, glicolipídios e proteoglicanos. *In vivo*, 250 a 500 genes são responsáveis por produzir enzimas, dentre elas glicosiltransferases e glicosidases, com as funções de modificar as cadeias de carboidratos de acordo com suas funções biológicas e sintetizar vários glicoconjugados que determinam o padrão glicídico nas células (GABIUS et al, 2011). Essas enzimas são encontradas na membrana do retículo endoplasmático (RE), complexo de Golgi ou no citoplasma (GHAZARIAN et al, 2011; PINHO; REIS 2015).

A glicosilação de proteínas pode ser classificada em dois tipos: O-glicosilação e N-glicosilação, ambas coexistem na mesma proteína e na mesma célula. O primeiro tipo, envolve a ligação de um carboidrato à hidroxila de uma serina e/ou treonina, e ocorre no complexo de Golgi. As mucinas são as principais glicoproteínas que apresentam glicanos O-ligados, pois apresentam regiões ricas em resíduos de serina e treonina (VARKI et al., 2017). Em suma, a primeira etapa desse processo é a transferência de uridina difosfato N-acetilgalactosamina para os resíduos de serina ou treonina das proteínas e é catalisado pelas enzimas pertencentes a família das UDP-N-acetilgalactosaminil transferases; a próxima etapa é o alongamento das cadeias de carboidratos, através da adição de uma galactose à N-acetilgalactosamina. (REIS et al, 2010; PINHO; REIS 2015). O segundo tipo, N-glicosilação, acontece tanto no retículo endoplasmático quanto no complexo de Golgi e envolve a ligação de um núcleo de oligossacarídeos (três moléculas de glicose, nove manoses e duas N-acetilglicosaminas) à cadeia lateral de amida da asparagina geralmente na sequência Asn-X-Ser/Thr, onde X pode ser qualquer aminoácido exceto prolina. Uma segunda fase envolve uma reorganização dos glicídios ligados à proteína, onde há remoção de resíduos de glicose e manose e, adição de outros sacarídeos dependendo da função que a proteína irá desempenhar (POTAPENKO et al, 2010; GHAZARIAN et al, 2011; PINHO; REIS, 2015).

As alterações da estrutura glicídica de glicoproteínas e glicolipídios presentes na superfície celular estão associadas ao desenvolvimento tumoral, pois em quase todas as células malignas podem ser observadas modificações aberrantes no processo de glicosilação de componentes da superfície celular, como os epítomos oncofetais, que são encontrados em células embrionárias e tumorais e não são encontrados, na sua grande maioria, nas células adultas (VASCONCELOS-DOS-SANTOS et al., 2015; MUNKLEY, 2016). Em 1985, o pesquisador Feize, demonstrou essas alterações experimentalmente pela

primeira vez, através de anticorpos contra células cancerígenas que reconheceram estruturas anormais de glicanos (FEIZE, 1985). As principais alterações encontradas, que são provenientes de disfunções das glicosiltransferases e/ou glicosidases, são a fucosilação, sialilação, além do aumento da exposição de resíduos de carboidratos produzidos pelas *N*- e *O*- glicosilações incompletas que, durante o alongamento da cadeia sacarídica, formam glicoconjugados truncados, como ilustra a Figura 3 (PINHO e REIS, 2015).

Figura 3: Representação esquemática das comuns classes de glicoconjugados expressos em células humanas.



Fonte: Imagem adaptada de PINHO; REIS, 2015.

Os carboidratos não são codificados no genoma e por isso possuem uma variedade muito maior de estrutura e funções, o que torna seu estudo um desafio (VARKI, 2017). O estudo das expressões e a identificação das variações dos glicídios é possível através das lectinas, uma vez que essas biomoléculas reconhecem especificamente os carboidratos, possibilitando a marcação em tecidos e células facilitando o entendimento da sua biologia.

2.3 LECTINAS

O termo lectinas é utilizado para denotar um grupo heterogêneo de proteínas ou glicoproteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico, de origem não-imune,

capazes de se ligar especificamente e reversivelmente a carboidratos específicos sem modificar a estrutura bioquímica dos ligantes (DIAS et al., 2015). A ligação entre a lectina e o glicano é tão específica que, muitas vezes, consegue distinguir seus isômeros. Como exemplo podemos citar a lectina ConA, que se liga ao isômero α da glicose/manose, mas não ao isômero β (JUAN et al., 2017).

A interação na superfície entre glicídios e lectinas dá-se através de seus domínios de reconhecimento a carboidratos (DRC), também conhecido como domínio de ligação a carboidratos (DLC), localizado dentro de sua estrutura polipeptídica, e é realizada por ligações não covalentes como pontes de hidrogênio, coordenação metálica, interações de van der Waals e hidrofóbicas (JUAN et al., 2017). A interação entre carboidratos monoméricos, como por exemplo glicose, frutose e galactose, e as lectinas de forma geral é fraca, pois a interação tem constante de dissociação na faixa do mM. Para superar essa questão, devido a necessidade de ocorrer processos específicos nos sistemas biológicos, os mesmos utilizam-se de uma estratégia multivalente denominada efeito “cluster”, em que existem inúmeros sítios de ligação a carboidratos aglomerados na superfície das células, como polissacarídeos em membranas, tornando a interação entre as lectinas e o sistema biológico mais eficiente (YANG et al., 2010; CUNHA et al., 2017).

As lectinas são classificadas em 12 famílias distintas, de acordo com a estrutura e evolução dos seus domínios, que foram analisados através das técnicas de genômica e transcriptômica. Essas famílias são: homólogas da aglutinina de *Agaricus bisporus*, amarantinas, homólogos de quitinase classe V, família *cianovirina*, família da aglutinina de *Euonymus europaeus*, família da aglutinina de *Galanthus nivalis*, proteínas com domínio de heveína, jacalinas, proteínas com um domínio de lectinas de leguminosas, domínios de lisina, família da aglutinina *Nicotiana tabacum* e família ricina-B (VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011).

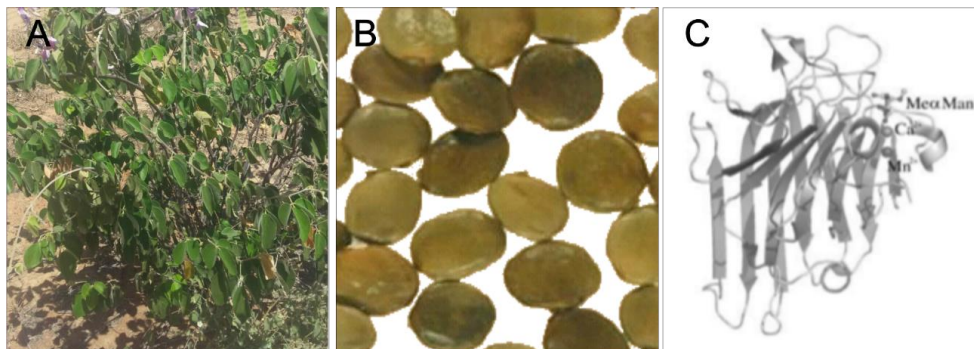
Embora as lectinas tenham sido inicialmente encontradas e descritas em plantas, estas proteínas também são isoladas nos mais diversos seres vivos, como animais (NUNES et al., 2012), microrganismos (REYNOLDS et al., 2012), e fungos (HAMSHOU et al., 2012). Podem, ainda, ser produzidas por técnicas recombinantes (CUNHA et al., 2016). As lectinas encontradas nos animais, participam dos processos biológicos como interações da matriz extracelular, fertilização, desenvolvimento embrionário, apoptose, imunomodulação e inflamação, interação parasita-hospedeiro, indução mitogênica e homeostase (RABINOVICH et al., 2007; CHOU et al., 2009; KERRIGAN; BROWN, 2009; RUSEVA et al., 2009; SARAVANAN et al., 2009;

YAMANAKA et al., 2009; GHAZARIAN et al., 2011). As lectinas de vegetais diferem consideravelmente na especificidade ao ligante e estruturas quaternária; possuem muitas funções, dentre as mais importantes está a proteção contra fitopatogénos (LANNON e VAN DAMME, 2014; ZHENG et al., 2016).

As lectinas possuem essas atividades pois têm a capacidade de se ligarem à membrana das células via sítios glicosilados, levando a uma sinalização celular até culminar em distintas respostas celulares (COELHO et al., 2017). Devido a isso, apresentam uma vasta aplicabilidade na área biotecnológica, de pesquisa médica, biológica, farmacológica e bioquímica (CUNHA et al., 2017). Em 2014, as lectinas ConA, aglutinina de amendoim (PNA) e aglutinina de *Ulex europaeus* (UEA-I), específicas para glicose/manose, galactose e fucose, respectivamente, foram conjugadas ao éster de acridina (lectinas-EA), com o objetivo de avaliar o glicofenótipo em tecidos normais de próstata, hiperplasia prostática benigna e adenocarcinoma prostático por quimiluminescência (SILVA et al., 2014). Albuquerque e colaboradores, estudaram a lectina ligadora de manose (MBL), que reconhece resíduos de *N*- acetilglucosamina e manose, com a finalidade de associar o perfil de polimorfismos do gene da MBL a sua massa molecular em pacientes com hepatite C (ALBUQUERQUE et al., 2018).

Cratylia mollis, popularmente conhecida como feijão camaratu, é uma planta arbustiva, perene, nativa da região semiárida de Pernambuco (Figura 4A). Das sementes de *C. mollis* (Figura 4B) são purificadas quatro isoformas da lectina Cramoll: Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4 com especificidades distintas para monossacarídeos. As isoformas 1, 2 e 4 são específicas para glicose/manose, enquanto a isoforma 3 é específica para a galactose (PAIVA; COELHO, 1992; CORREIA; COELHO, 1995). A estrutura terciária de Cramoll 1 (Figura 4C) apresenta três folhas β conectadas por *loops* e o sítio de ligação ao monossacarídeo metil- α -Dmanopiranosídeo (Me α Man), é constituída de 236 aminoácidos e possui 82% de homologia com a ConA. Os dois sítios de ligação a metais, encontrados na proximidade do sítio de ligação a monossacarídeos, são indispensáveis para ligação do carboidrato, pois interagem diretamente com a cadeia polipeptídica ou por via coordenação de moléculas de água (SOUZA et al., 2003).

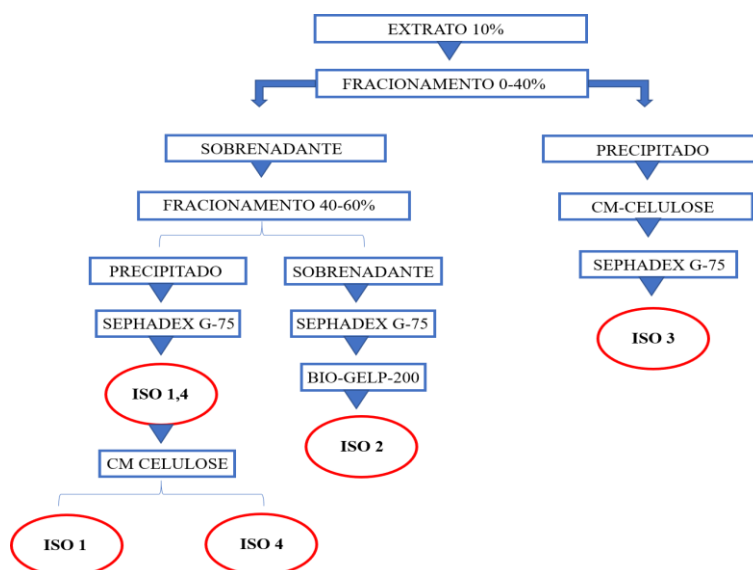
Figura 4: Planta (A) e sementes de *Cratylia mollis* (B) e Estrutura terciária de Cramoll 1 (C).



Fonte: imagens adaptadas de CARDOSO, 2009; SOUZA, 2003.

O protocolo da purificação da Cramoll 1,4 foi estabelecido em 1995 por Correia e Coelho, como detalhado na Figura 5. O processo é iniciado com o fracionamento salino, utilizando sulfato de amônio (40% de saturação), do extrato da semente de *C. mollis* (10%), seguido de uma centrifugação. O sobrenadante obtido passa por um novo fracionamento salino (40 - 60% de saturação) e outra centrifugação, enquanto o precipitado pode ser utilizado para a purificação da isoforma 3. A separação dos componentes do precipitado 40-60% é feita em apenas uma etapa cromatográfica em coluna contendo sephadex G-75 (polímero da glicose), onde são purificadas as isoformas 1,4, as quais podem ser separadas por cromatografia de troca iônica numa coluna de CM-celulose; o sobrenadante 60% é utilizado para purificação da isoforma 2 (PAIVA; COELHO, 1992; CORREIA; COELHO, 1995).

Figura 5: Etapas para extração e purificação das isoformas de lectinas de *Cratylia mollis*.



Fonte: Imagem adaptada de CUNHA, 2016

As lectinas de sementes de *C. mollis* vêm sendo estudadas nas mais diversas áreas da biotecnologia. Essas proteínas foram utilizadas na pesquisa do câncer com objetivos diagnósticos, onde já foi conjugada à peroxidase de rábano para diferenciar, por histoquímica, os tecidos da próstata (normal, hiperplásico e carcinoma) (LIMA et al., 2010). No câncer, essa lectina também foi utilizada com fins terapêuticos, apresentando uma capacidade de inibição do crescimento do Sarcoma 180 *in vivo* (40%), intensificando sua ação ao ser encapsuladas em lipossomas convencionais (71%) (ANDRADE et al., 2004). Em 2016, um estudo com a lectina recombinante encapsulada em lipossomas furtivos, também contra Sarcoma 180, demonstrou resultados similares às lectina nativa (75%) (CUNHA et al., 2016). O seu potencial cicatrizante foi estudado em feridas cutâneas em camundongos normais e imunocomprometido, em que se mostrou eficaz para o reparo dessas lesões (MELO et al., 2011b) e em filme de galactomanana, no qual seu uso foi promissor como curativos tópicos (ALBUQUERQUE et al., 2017). No desenvolvimento de biossensores, Silva e colaboradores utilizaram um eletrodo modificado por nanotubos de carbono carboxilados unidos a filme de poli-L-lisina funcionalizado com Cramoll, para a identificação diferencial de pacientes com hiperplasia benigna e câncer de próstata (SILVA et al., 2016). Biossensores baseados em nanotubos de dióxido de titânio funcionalizados com a lectina Cramoll também foram utilizados para estimular a adesão e proliferação celular de osteoblastos, se apresentando como uma plataforma promissora para aplicação em implantes metálicos (OLIVEIRA et al., 2018). Em 2015, o potencial protetor da Cramoll contra a indução de estresse oxidativo foi estudado em células Vero, e o estudo mostrou que essa lectina foi capaz de diminuir a citotoxicidade induzida por estresse oxidativo, prevenindo danos ao DNA, promovendo a sobrevivência celular (SILVA et al., 2015). A sua atividade antiparasitária foi estudada contra as formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*, sendo promissora em aglutinar, inibir a proliferação e causar necrose celular (FERNANDES et al., 2010). Outro estudo envolvendo *T. Cruzi* foi realizado em 2014, no qual foi revelado que a Cramoll estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) na mitocôndria do parasita, deixando-a mais propensa à morte celular (FERNANDES et al., 2014).

Dessa forma, tanto a lectina Cramoll quanto a sua forma recombinante vem se apresentando como ferramentas versáteis para estudos em diversas áreas nas Ciências da Vida. Entretanto, ainda é necessário novos estudos para elucidar as vias moleculares que são ativadas por essa lectina, assim como descobrir novas potencialidades. Visando o melhor entendimento desses processos, marcadores fluorescentes como os pontos

quânticos podem ser explorados para analisar processos biológicos, devido a sua superfície ativa para ligações com diversas biomoléculas, além da sua alta fotoestabilidade (CABRAL FILHO et al., 2016).

2.4 PONTOS QUÂNTICOS

Pontos quânticos (PQs), também conhecidos como *quantum dots* (QDs), descritos muitas vezes como átomos artificiais por apresentar estados energéticos discretos assim como os átomos (CHOU;DENNIS, 2015), são nanocristais fluorescentes de semicondutores, que podem ter diâmetros de 2 a 10 nm, com centenas a milhares de átomos em confinamento quântico tridimensional. Quando comparados ao mesmo material em escala macroscópica, conhecidos como *bulk*, esse regime de confinamento quântico confere aos PQs propriedades físico-químicas únicas, um exemplo é a sintonização da fluorescência de acordo com o tamanho da partícula (FONTES et al., 2012).

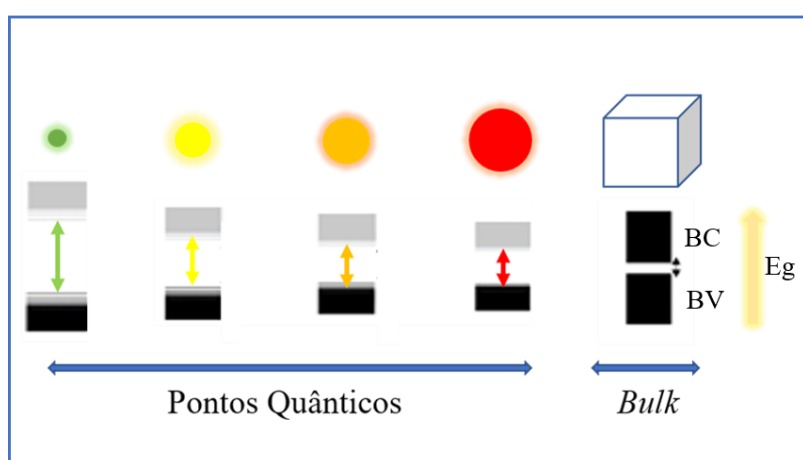
Um sólido pode ser classificado em isolante, condutor ou semicondutor. Essa classificação pode ser realizada de acordo com a energia entre as bandas de condução (BC) e banda de valência (BV) desses materiais, conhecida como *band gap* (E_g). Materiais, como os PQs, são classificados como semicondutores pois possuem um E_g intermediário entre os materiais isolantes e condutores. Após a absorção de luz, um elétron pode ser excitado da BV para a BC, deixando uma lacuna (h^+) na BV, formando um éxciton (par elétron-buraco), quando o elétron retorna para a BV a fluorescência é emitida. Esse processo pode ocorrer tanto no material nanométrico como no *bulk*. Porém, no *bulk* os níveis energéticos são distribuídos de maneira contínua. Essa condição muda na escala nanométrica, quando as três dimensões do semicondutor são reduzidas para poucos nanômetros e as partículas tornam-se menores que o raio de Bohr¹ (CHOU e DENNIS, 2015), pode-se dizer que eles estão em regime de confinamento quântico e nessa situação essas nanopartículas são chamadas de PQs.

Em confinamento quântico, para um nanocristal feito de um mesmo material, com a redução do tamanho da partícula haverá aumento da E_g . Sendo assim, podemos controlar

¹ Em referência ao átomo de hidrogênio, o raio de Bohr, característico de cada semicondutor, é uma distância média entre o elétron (e^-) e o buraco (h^+) do éxciton, criada devido a uma atração eletrostática que os mantém movendo-se juntos.

a região do espectro eletromagnético que os PQs irão emitir apenas variando o tamanho da partícula. Partículas maiores terão um menor E_g e irão emitir mais para a região do infravermelho. Já as partículas menores, terão um E_g maior e irão emitir em comprimentos de ondas menores, ou seja, que tem mais energia, por isso mais próximos da região do azul do espectro eletromagnético (SANTOS *et al.*, 2008). A Figura 6 ilustra as bandas BV e BC no semiconductor *bulk* e nos PQs e as respectivas emissões desses nanocristais de acordo com o tamanho.

Figura 6. Representação esquemática das bandas de condução e de valência no *bulk* e nos PQs, indicando as emissões desses nanocristais de acordo com o tamanho.



Fonte: Imagem adaptada de OLIVEIRA, 2018.

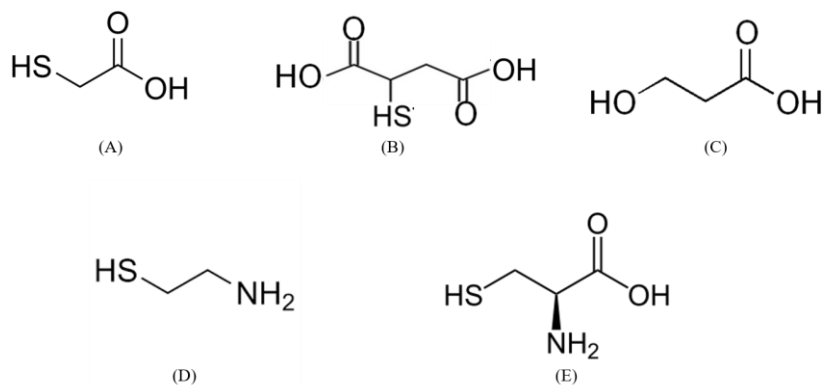
Existem dois tipos de metodologias gerais para a síntese dos PQs: *bottom-up* e *top-down*. Contudo, a abordagem mais utilizada é a *bottom-up*, onde se parte de átomos para se chegar a sistemas maiores como os nanocristais. Geralmente, as nanopartículas crescem a partir de precursores dissolvidos em uma solução contendo um estabilizante, os quais possuem o objetivo de manter as partículas dispersas em suspensão enquanto centros de nucleação são formados (FONTES *et al.*, 2012). De modo geral, os PQs são preparados por uma síntese coloidal, onde há a precipitação controlada em água ou solventes orgânicos (FONTES *et al.*, 2012). A síntese baseada em meio orgânico tem possibilitado a obtenção de PQs de alta qualidade, isto é, com baixa dispersão de tamanho, altos rendimentos quânticos e estabilidade química (SILVA *et al.*, 2010). No entanto, esse método utiliza precursores tóxicos, de custo elevado, além de produzirem PQs hidrofóbicos e, portanto, não compatíveis de imediato com sistemas biológicos, necessitando de procedimentos adicionais para tanto, os quais podem inclusive diminuir a qualidade da fluorescência desses materiais (FONTES *et al.*, 2012; WEGNER e HILDEBRANDT, 2015). A síntese em meio aquoso possui uma grande vantagem em

relação aos PQs sintetizados em meio orgânico, pois os mesmos são hidrofílicos e consequentemente, automaticamente compatíveis com a utilização em ensaios biológicos.

A interrupção do crescimento dos nanocristais quando estes atingem o tamanho desejado leva ao surgimento de ligações atômicas não compartilhadas (também chamadas de defeitos de superfície) que induz também a formação de níveis de energia intermediários entre BV e BC fazendo com que o elétron vá perdendo energia durante o percurso de relaxação excitônica, pois dessa forma ele não vai diretamente da BC para a BV, levando a uma emissão de luz de menor intensidade. Para existir uma maior fluorescência e fotoestabilidade dos PQs sintetizados por esse método, é necessário crescer uma camada externa (*shell*), constituída também por semicondutores, sobre o núcleo dos nanocristais, por um processo chamado de passivação, dando origem às estruturas do tipo núcleo/casca (*core/shell*) (SILVA et al., 2010; WEGNER; HILDEBRANDT, 2015). Para os estudos biomédicos em que se faz necessário a fluorescência na região do visível e PQs hidrofílicos, tanto o núcleo como a casca são usualmente compostos por elementos dos grupos IIB e VIA da tabela periódica, como CdSe/ZnS, CdTe/CdS e ZnSe/ZnS (SANTOS et al., 2008; FONTES et al., 2012).

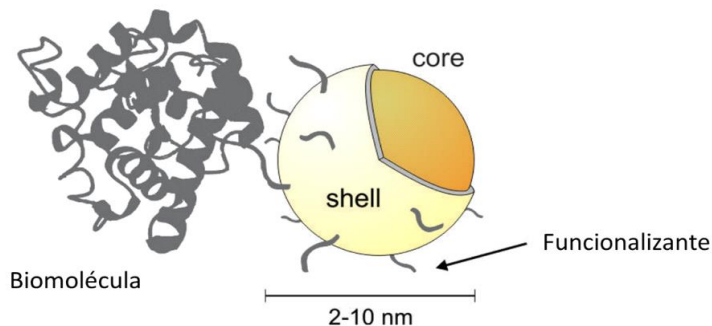
Os estabilizantes, utilizados durante a síntese dos PQs hidrofílicos, são precursores dessa fina camada em torno do núcleo (*shell*), pois possuem grupamentos tiol (-SH) que ajudam a compô-la, a qual possui o objetivo de refazer ligações não compartilhadas e reduzir os defeitos de superfície que surgem na formação dessas nanopartículas. Os agentes estabilizantes podem ainda conter na sua composição terminais carboxílicos (-COOH) e/ou aminado (-NH₂) que podem conferir carga negativa e positiva às nanopartículas, respectivamente. Esses terminais também podem agir como grupos funcionais para a conjugação com biomoléculas, como por exemplo anticorpos e carboidratos, através de ligações covalentes e não covalentes (FONTES et al., 2012; PROBST et al., 2013). Devido a essa característica, os agentes estabilizantes também podem ser considerados agentes funcionalizantes. Os agentes estabilizantes mais utilizados em sínteses hidrofílicas são: o ácido mercaptoacético (AMA), o ácido 3-mercaptopropiônico (AMP), o ácido mercaptosuccínico (AMS), a L-cisteína (CIS) e a cisteamina (CISTM), assim como pode-se observar na Figura 7 (FONTES et al., 2012).

Figura 7. Estrutura química de alguns agentes estabilizantes: (A) ácido mercaptoacético - AMA, (B) ácido mercaptosuccínico - AMS, (C) ácido 3-mercaptopropiônico - AMP, (D) cisteamina - CISTM, (E) cisteína - CIS.



Após a síntese, a nanopartícula será composta de um núcleo, responsável pelas propriedades ópticas, como por exemplo o comprimento de onda no qual os PQs irão emitir; uma casca ou camada de passivação que determinará quão eficiente será a fluorescência da nanopartícula e uma camada funcionalizante, à qual serão ancoradas moléculas que conferirão a funcionalidade biológicas aos PQs, como pode ser visto na Figura 8 (KARAKOTI et al., 2015).

Figura 8: Estrutura de um ponto quântico funcionalizado conjugado a uma biomolécula.



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

O estudo direcionado e específico é essencial para uma melhor compreensão de processos biológicos, devido a isso, é necessário a conjugação de biomoléculas à superfície dos PQs, através de um processo conhecido como bioconjugação (Figura 8) (FONTES et al., 2012), para conferir especificidade para aplicações biológicas (YANG et al., 2013). Uma conjugação ideal deve manter as propriedades funcionais das biomoléculas e as propriedades ópticas dos PQs.

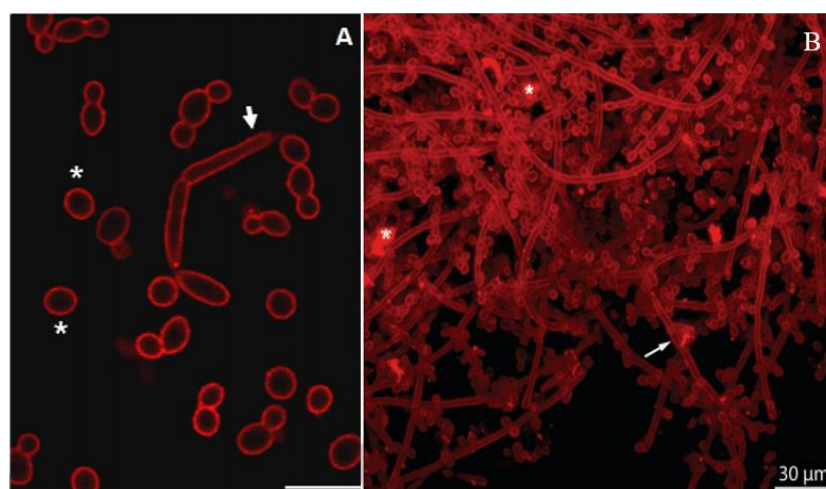
As biomoléculas podem ser conjugadas aos PQs através de alguns métodos: i – conjugação covalente utilizando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e a N-hidroxisuccinimida (Sulfo-NHS) ou glutaraldeído; ii – funcionalizar os PQs com moléculas de avidina ou estreptavidina que vão interagir com biomoléculas biotiniladas e iii – ligações não covalentes, como adsorção. No primeiro método, os agentes de acoplamento EDC e Sulfo-NHS possibilitam a formação de ligações amidas entre o PQ e a biomolécula que se deseja conjugar. O glutaraldeído é uma molécula que contém dois grupamentos aldeídos, esses grupos possibilitam a ligação de PQs aminados com moléculas propiciando em geral uma ligação amina-amina. No segundo método, a molécula de estreptavidina possui elevada afinidade pela biotina e esta por sua vez pode ligar-se especificamente a uma imunoglobulina ou proteína celular, podendo ser aplicadas em imunomarcações ou em diagnósticos de doenças imunológicas (KARAKOTI et al., 2015). No terceiro método, para as ligações não covalentes acontecerem, não há necessidade de um agente químico para intermediar a ligação, as interações entre as biomoléculas e grupos terminais expostos na superfície do PQs ocorrem, por meio, por exemplo, de interações eletrostáticas, hidrofóbicas ou de Van der Waals, portanto é considerado um método simples e versátil para conjugação, no entanto, pode ser sensível ao pH e à força iônica do meio biológico (KARAKOTI et al., 2015).

Os PQs estão sendo muito utilizados nas pesquisas em Ciências da Vida, tanto na área biomédica quanto na biofísica (TANIMOTO et al., 2016; ZHOU et al., 2016), devido as suas propriedades únicas, destacando-se: (i) um estreito espectro de emissão; (ii) um amplo espectro de absorção e (iii) emissão sintonizável com o tamanho da nanopartícula, característica que possibilita utilizar apenas uma fonte de luz para excitar uma grande variedade de tamanhos de PQs (BILAN et al., 2015). Outra vantagem é a alta resistência à fotodegradação, fornecendo imagens com boa intensidade de fluorescência por tempos prolongados (WEGNER; HILDEBRANDT, 2015). Além disso PQs apresentam uma superfície ativa para conjugação com diversas biomoléculas que permitem o direcionamento ativo e específico dos nanossistemas (KARAKOTI et al., 2015).

PQs conjugados as biomoléculas têm sido aplicados em vários estudos. Andrade e colaboradores utilizaram os PQs conjugados a lectinas UEA e ConA para obter imagens de tecidos de câncer de mama transformados benigno e malignamente através de microscopia de fluorescência para analisar o glicocódigo desses sistemas biológicos durante o processo de carcinogênese (ANDRADE *et al.*, 2013). Em 2017, He e colaboradores, utilizaram PQs conjugados a lectinas para fazer imagens de células

cancerígenas (HE *et al.*, 2017). Conjugados de PQs-ConA foram também utilizados para investigar o glicídico em hifas e leveduras de *Candida albicans* em suspensão e biofilme, Figura 9 (TENÓRIO *et al.*, 2015). Infecções bacterianas como a *Serratia marcescens* também foram investigadas empregando o biconjugado PQs-ConA para a detecção dos lipolissacarídeos que compõem a membrana externa dessas bactérias (EBRAHIM *et al.*, 2015). PQs de CdSe/ZnS funcionalizados com colistina também foram utilizados na microbiologia para reconhecer o lipídio A que constitui a membrana externa da *Escherichia coli* (CARRILLO *et al.*, 2011). PQs conjugados a lectina UEA, e anticorpos Anti-A e Anti-B foram utilizados como ferramentas para estudar e quantificar o padrão de antígenos do grupo ABO e sub-grupo A na superfície dos eritrócitos (CABRAL FILHO *et al.*, 2015). Em 2017, os PQs de CdS conjugados a jacalina, lectina purificada das sementes de *Artocarpus integrifoli*, reconheceram os antígenos T presentes nas células humanas de leucemia mieloide crônica (K562), enquanto as células saudáveis de linfócitos periféricos não sofreram marcação, indicando o reconhecimento específico de células cancerígenas pelo bioconjugado (AHMED *et al.*, 2017). Assim, PQs associados a biomoléculas, tais como as lectinas vêm se mostrando ferramentas versáteis, práticas e valiosas para avaliar o metabolismo e a expressão de marcadores em microorganismos, células e tecidos tumorais, a fim de contribuir para um entendimento da sua biologia (CUNHA *et al.*, 2018).

Figura 9: (A) Imagens por microscopia confocal de células e hifas de *C. Albicans*. (B) Imagens por microscopia confocal de varredura a laser de biofilme de *C. albicans*, ambas marcadas por PQs-ConA. A seta branca indica as hifas, enquanto os asteriscos indicam as células (barra de escala em A = 10 μ m e em B = 30 μ m).

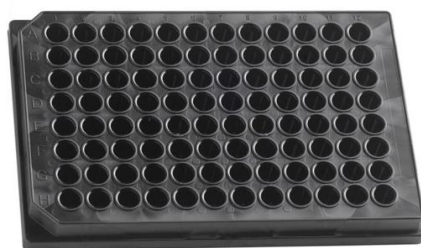


Fonte: TENORIO, 2015

2.5 ENSAIO FLUORESCENTE DE MICROPLACA

O ensaio fluorescente de microplaca é um método óptico analítico, que utiliza um fluorímetro e microplacas de poliestireno (Figura 10), as quais usualmente possuem afinidade por proteínas/anticorpos, para detectar a fluorescência emitida por marcadores fluorescentes sozinhos ou conjugados a alguma biomolécula e compará-la aos controles, para os quais espera-se um baixo sinal (CARVALHO et al., 2014). A configuração mais básica desse equipamento consiste de uma lâmpada que é utilizada para excitar a fluorescência das amostras nas microplacas e filtros que selecionam respectivamente os comprimentos de onda de excitação e emissão. As microplacas pretas são utilizadas nos equipamentos que detectam a fluorescência por retroespalhamento. Esse equipamento é utilizado rotineiramente em imunoenaios para estudar as interações de antígeno-anticorpo empregando marcadores fluorescentes (corantes orgânicos ou pontos quânticos) (SILVA et al., 2018;). Recentemente, foi empregado para desenvolver um ensaio de imunofluorescência baseado em conjugados de PQs para detecção de anticorpos IgG anti-ZIKV, e se mostrou uma plataforma promissora para detectar infecções passadas pelo Zika e/ou monitorar a resposta imune na prospecção de vacinas (RIBEIRO et al., 2019).

Figura 10: Exemplo de uma microplaca de poliestireno de 96 poços utilizada no leitor fluorescente de coleta por retroespalhamento.



Fonte: PERKIN ELMER, 2019

Uma nova abordagem para o uso do fluorímetro de microplacas foi proposta por Carvalho e colaboradores (2014). Os autores utilizaram o leitor para avaliar a eficiência da bioconjugação de PQs com proteínas, visto que se ter uma boa eficiência de conjugação leva a aplicações bem-sucedidas dos bioconjugados (CARVALHO et al., 2014). Esse método é baseado na detecção da fluorescência dos PQs conjugados. Quando a bioconjugação é eficiente, as proteínas/anticorpos conjugadas aos PQs ficarão ligadas à placa de poliestireno e o sinal de fluorescência será detectado, caso os PQs não estejam

conjugados a essas moléculas, não haverá sinal, pois, os PQs sozinhos não se ligam a microplaca e serão retirados na lavagem. As proteínas não são removidas, porém não apresentam fluorescência significativa nas condições utilizadas no experimento. Por esse motivo, são utilizados os PQs e as proteínas/anticorpos não conjugados como controles negativos. De modo geral, é uma análise rápida, simples e reprodutível para avaliar a conjugação quando comparada com outros métodos convencionais, como a eletroforese. Esse ensaio já foi utilizado para avaliar a conjugação dos anticorpos Anti-A, Anti-B e Anti-H aos PQs, que possuíam o objetivo de analisar a distribuição e quantificar antígenos A, B e H nos grupos ABO e subgrupos A (CABRAL FILHO et al., 2016).

O método proposto neste trabalho é também uma adaptação do ensaio fluorescente de microplacas e objetiva o desenvolvimento de uma ferramenta para avaliar a fluorescência emitida pelos tecidos marcados por bioconjugados, a fim de analisar e diferenciar a expressão de moléculas nesses sistemas biológicos de forma quantitativa.

3 CONCLUSÃO

- Os PQs de CdTe estabilizados com AMS apresentaram intensa fluorescência na região espectral do vermelho. Mesmo após a conjugação, os PQs continuaram com suas propriedades ópticas preservadas.
- A marcação do modelo biológico *Candida albicans* foi eficiente (maior que 90%), indicando uma conjugação efetiva entre os PQs e a Cramoll. Além disso esse ensaio ainda indicou que as propriedades ópticas dos PQs bem como a atividade biológica da lectina foram mantidas após a bioconjugação.
- A preservação da estrutura secundária da Cramoll após a ligação com os PQs foi confirmada pelo dicroísmo circular.
- A especificidade da marcação do conjugado PQs-Cramoll foi comprovada através de ensaio de inibição com carboidrato específico e saturação com a lectina livre.
- As imagens adquiridas por microscopia indicaram uma marcação intensa pelo conjugado PQs-Cramoll nas células ductais no tecido normal e FB, enquanto no CDI houve um maior brilho tanto nas células ductais como no estroma.
- O método quantitativo baseado em EFM proposto nesse trabalho para avaliar a marcação dos glicídios em tecidos, se mostrou sensível e eficiente.
- As análises por EFM corroboraram com os dados obtidos por microscopia, pois indicaram altos níveis de resíduos de glicose e manose expostos no CDI, quando comparado com o tecido normal e o FB.
- Os conjugados PQs-Cramoll podem ser considerados ferramentas efetivas, específicas e versáteis capazes de serem aplicados para investigar e diferenciar o glicocódigo de tecidos normais e transformados, tanto por microscopia de fluorescência como por quantificação por EFM.

REFERÊNCIAS

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

ALBUQUERQUE, D.A.P. Molecular profile of mannan-binding lectin in hepatitis C patients with MBL gene polymorphisms by a modified mannan-coated nitrocellulose assay. **Journal of Immunological Method**. v. 460, p. 101 – 106, 2018.

ALBUQUERQUE, P. B. S. et al. Healing activity evaluation of the galactomannan film obtained from *Cassia grandis* seeds with immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 749 – 757, 2017.

ANDRADE, C. A. S. et al. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **Int. J. Pharma**. v. 278, n. 2, p. 435 – 445, 2004.

ANDRADE, C. G. et al. Evaluation of glycophenotype in breast cancer by quantum dot-lectin histochemistry. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 4623 – 4629, 2013.

ARAÚJO, S.N. et al. Análises das sementes de *Cratylia argentea*: cultura potencial para adubação verde e forragem/ Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo,.18 p.: il. -- (**Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo**, ISSN 1679-0154; 36), 2011.

BILAN, R. et al. Quantum Dot Surface Chemistry and Functionalization for Cell Targeting and Imaging. **Bioconjugate Chem**. v. 26, p. 609 – 624, 2015.

BRASILEIRO FILHO, Geraldo. Bogliolo patologia. 9. ed. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**, 2017.

BUDZIK, M.P. et al. Clinicopathological characteristics of metaplastic breast cancer e analysis of the basic immunohistochemical profile and comparison with other invasive breast cancer types. **The Breast**, v. 43, p. 135-141, 2019.

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, 2015.

CABRAL FILHO, P. E. et al. CdTe quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1860, p. 28 – 35, 2016.

CARRILLO, C. et al. Colistin-functionalised CdSe/ZnS quantum dots as fluorescent probe for the rapid detection of *Escherichia coli*. Biosens. **Bioelectron**, v. 26, p. 4368 – 4374, 2011.

CARVALHO, K.H.G. Fluorescence plate reader for quantum dot–protein bioconjugation analysis. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 5, p. 3320 – 3327, 2014.

CHOU, F.C.; SHIEH, S.J.; SYTWU, H.K. Attenuation of Th1 response through galectin-9 and T-cell Ig mucin 3 interaction inhibits autoimmune diabetes in NOD mice. **Eur J Immunol**, v. 39, p. 2403 – 11, 2009.

CHOU, K. F.; DENNIS, A. M. Förster Resonance Energy Transfer between Quantum Dot Donors and Quantum Dot Acceptors, **Review. Sensors**, v. 15, n. 6, p. 13288-13325, 2015.

CHRISTIANSEN, M. N. et al. Cell surface protein glycosylation in cancer. **Proteomics**, v. 14, p. 525 – 546, 2014.

COELHO, L.C.B.B. et al. Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1 – 22, 2017.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of glucose / manose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Appl Biochem Biotechnol**, v. 55, p. 261 – 273, 1995.

CUNHA, C. R. A. et al. Encapsulation into Stealth Liposomes Enhances the Antitumor Action of Recombinant *Cratylia mollis* Lectin Expressed in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*. v. 7, 2016.

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

CUNHA, C.R.A. et al. Biomedical applications of glyconanoparticles based on quantum dots. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1862, n. 3, p. 427 – 439, 2017.

DIAS, R. O. et al. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 519 – 541, 2015.

EBRAHIM, S. et al. CdTe quantum dots as a novel biosensor for *Serratia marcescens* and lipopolysaccharide, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc*, v.150, p. 212 – 219, 2015.

FEIZI, T. et al. Carbohydrates and glycoconjugates: glycomics: the new era of carbohydrate biology. **Curr Opin Struct Biol**. n 13, p 602 – 604, 1985.

FERNANDES, M. P. et al. *Cratylia mollis* Seed Lectin Induces Membrane Permeability Transition in Isolated Rat Liver Mitochondria and a Cyclosporine A-Insensitive Permeability Transition in *Trypanosoma cruzi* Mitochondria. **J. Eukaryot. Microbiol.** v. 61, n. 4, p. 3818, 2014.

FERNANDES, M. P. et al. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. **J. Bioenerg. Biomembr.** v. 42, n. 1, p. 69 – 78, 2010.

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

GABIUS, H. J. et al. From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. **Trends Biochem Sci**, v. 36, p. 298 – 313, 2011.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta histochemica**. v. 113, p. 236 – 247, 2011.

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

HE, D. et al. Simultaneous fluorescence analysis of the different carbohydrates expressed on living cell surfaces using functionalized quantum dots. **Royal Society of Chemistry**. v. 7, p. 12374 – 12381, 2017.

HUBRARD, J.L. et al. Criteria for excision of suspected fibroadenomas of the breast. **Am J Surg**, v. 209, p. 297 – 301, 2015.

INCA. Ministério da Saúde do Brasil. <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>, 2012 (Access in: 10/04/2019).

JESINGER, R.A.; MSE, MD. Breast anatomy for the interventionalist. **Techniques in vascular and interventional radiology**, v. 17, p. 3 – 9, 2014.

JUAN, L. L. et al. Pharmaceutical applications of lectins. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, p. 1 – 8, 2017.

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.

KERRIGAN, A.M.; BROWN, G.D. C-type lectins and phagocytosis. **Immunobiol.** v. 214, p. 562– 75, 2009.

LANNOO, N.; VAN DAMME, E. J. M. Lectin Domains at the Frontiers of Plant Defense. **Frontiers in Plant Science**. v. 5, n. 397, 2014.

LIMA, A. L. R. et al. Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1 – 6, 2010.

LUTGENDORF SK, SOOD AK. Biobehavioral Factors and Cancer Progression: Physiological Pathways and Mechanisms. **Psychosomatic Medicine**, v. 73, n 9, p. 724 – 730, 2011.

MELO, C. M. L. et al. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 1631-1636, 2011b.

MUNKLEY, J. et al. The role of glycans in the development and progression of prostate cancer. **Nat Rev Urol**, v. 13, n. 6, p 324 – 33, 2016.

NIMRICHTER, L. et al. Intact cell adhesion to glycan microarrays. **Glycobiology**, v. 14, p. 197–203, 2004.

OLIVEIRA, P. S. S. et al. *Cratylia mollis* 1, 4 Lectin: A New Biotechnological Tool in IL-6, IL-17A, IL-22, and IL-23 Induction and Generation of Immunological Memory. **Biomed Research International**, v. 2013, 2013.

OLIVEIRA, W. F. et al. Functionalization of titanium dioxide nanotubes with biomolecules for biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 81, p. 597 – 606, 2017.

PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Purification and Partial Characterization of two lectins isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, p. 113 – 118, 1992.

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

POTAPENKO, I.O. et al. Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. **Mol Oncol, Holanda**, v. 4, p. 98 – 118, 2010.

PROBST, C. E. et al. Quantum dots as a platform for nanoparticle drug delivery vehicle design. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 703 – 718, 2013.

RABINOVICH, G.A. et al. Functions of cell surface galectin–glycoprotein lattices. **Curr Opin Struct Biol**, v. 17, p. 513 – 20, 2007.

REIS, C. A. et al. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. **J. Clin. Pathol**, v. 63, p. 322 – 329, 2010.

RUSEVA, M. Mannan-binding lectin deficiency modulates the humoral immune response dependent on the genetic environment. **Immunology**, v. 127, p. 279 – 88, 2009.

SANTOS, B. S.; FARIAS, P. M. A.; FONTES, A. Semiconductor Quantum Dots for Biological Applications. In: Mohamed Henine (Editor Chefe) (Org.). Handbook of Self Assembled Semiconductor Nanostructures Novel Devices in Photonics and Electronics. Amsterdam: **Elsevier**, p. 773-798, 2008.

SARAVANAN, C.; CAO, Z.; HEAD, S.; PANJWANI, N. Detection of differentially expressed wound healing-related glycogens in galectin-3-deficient mice. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 50, p. 5690 – 6, 2009.

SHARON, N. et al. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1760, p. 527 – 537. 2008.

SHARON, N. et al. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, p. 53 – 62, 2004.

SILVA, F. O. et al. O estado da arte da síntese de semicondutores nanocristalinos coloidais. **Quim. Nov.**, v. 33, n. 9, p. 1933 – 1939, 2010.

SILVA, L. C. N. et al. *Cratylia mollis* lectin: a versatile tool for biomedical studies. **Current Bioactive Compounds**, v. 10, n. 1, p. 44 – 54, 2014.

SILVA, L. C. N. et al. pCramoll and rCramoll as New Preventive Agents against the Oxidative Dysfunction Induced by Hydrogen Peroxide. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, 2015.

SILVA, P. M. S. et al. Cratylia mollis lectin nanoelectrode for differential diagnostic of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia based on label-free detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, p. 171–177, 2016.

SOUZA, G. A. et al. Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin. **Glycobiology**, v. 13, p. 961 – 972, 2003.

STOWELL, S.R. Cummings, Protein glycosylation in cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 10, p. 473 – 510, 2015.

TANIMOTO, R. et al. Detection of Temperature Difference in Neuronal Cells. **Scientific Reports**, v. 6, p. 22071, 2016.

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.

VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1538 – 1550, 2011.

VARKI, A. Biological roles of glycans. **Glycobiology**, v. 27, n. 1, p. 3 – 49, 2017.

VASCONCELOS-DOS-SANTOS, A. et al. Biosynthetic machinery involved in aberrant glycosylation: promising targets for developing of drugs against cancer. **Front. Oncol.** v. 5, p. 13 – 20, 2015

WADE, L.G. Organic chemistry. 8ª edição. United states of America. **Editora Pearson**. p. 1326, 2013.

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

YAMANAKA, M.; KATO, Y.; ANGATA, T.; NARIMATSU, H. Deletion polymorphism in siglec14 and its functional implications. **Glycobiology**. v. 19, p. 841–6, 2009.

YANG, C. et al. Direct and rapid quantum dots labelling of Escherichia coli cells. *Journal of Colloid and Interface Science*. v. 393, p. 438 – 444, 2013.

YANG, Y. et al. Characterization of multivalent lactose quantum dots and its application in carbohydrate–protein interactions study and cell imaging. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 18, n. 14, p. 5234 – 5240, 2010.

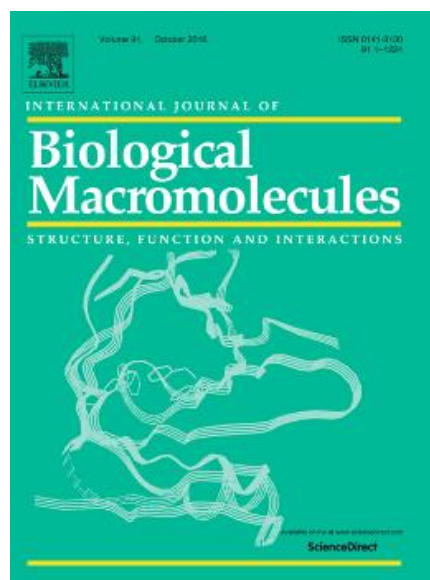
ZHACARA, N.E. et al. Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc, **Biochim Biophys Acta**, v. 1761, n. 5-6, p. 599 – 617, 2006.

ZHENG, J. et al. Dietary Plant Lectins Appear to Be Transported from the Gut to Gain Access to and Alter Dopaminergic Neurons of *Caenorhabditis elegans*, a Potential Etiology of Parkinson's Disease. **Front. Nutr.** v. 3, n. 7, 2016.

ZHOU, L. et al. Quantum Dot-based Immunohistochemistry for Pathological Applications. **Cancer Transl. Med.** v. 2, p. 21 – 8, 2016.

**APENDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA INTERNACIONAL
JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES**

**EVALUATING THE GLYCOPHENOTYPE ON BREAST CANCER TISSUES
WITH QUANTUM DOTS-CRAMOLL LECTIN CONJUGATES**



Artigo publicado na International journal of biological macromolecules

Fator de impacto: 4.784

Qualis: A1



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>

Evaluating the glycophenotype on breast cancer tissues with quantum dots-Cramoll lectin conjugates

Maria Eduarda T. Carvalho^{a,b}, Wesley F. Oliveira^{a,b}, Cássia R.A. Cunha^c, Luana C.B.B. Coelho^b, Márcia V. Silva^b, Luiz B. Carvalho Junior^d, Beate S. Santos^e, Paulo E. Cabral Filho^a, Adriana Fontes^{a,*,1}, Maria Tereza S. Correia^{b,*,*,1}

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

^b Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^c Laboratório Federal de Defesa Agropecuária em Pernambuco – LFDA, Recife, PE, Brazil

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 May 2019

Received in revised form 11 July 2019

Accepted 11 July 2019

Available online 12 July 2019

Keywords:

Semiconductor nanocrystals

Fluorescence

Proteins

Carbohydrates

ABSTRACT

During carcinogenesis, changes in the glycosylation can modulate many biological processes. Thus, the interest in exploring and understanding the roles of carbohydrates as cancer biomarkers has been increasing. Lectins have been applied as useful tools in glycobiology, especially when associated with fluorescent reporters. Therefore, to take advantage of the physicochemical properties of quantum dots (QDs), herein, we conjugated Cramoll, a lectin that recognizes glucose/mannose residues, with those nanoparticles. We applied the conjugates to investigate the glycode of normal, fibroadenoma (FB), and invasive ductal carcinoma (IDC) human breast tissues. Additionally, we proposed a method to quantitatively evaluate the tissue labeling intensity by a fluorescence microplate assay (FMA). Conjugates showed intense fluorescence and specificity. The lectin activity and secondary structure were also preserved after the conjugation with QDs. Moreover, fluorescence images showed that ductal cells of normal and FB tissues were preferentially labeled by conjugates, whereas both cells and stroma were strongly labeled in IDC. FMA showed in a quantitative, practical, and sensitive way that the level of exposed glucose/mannose residues increased accordingly to the sample malignancy degree. In conclusion, QDs-Cramoll conjugates can be considered effective, specific, and versatile probes to evaluate glycan profiles in normal and transformed tissues, by fluorescence microscopy as well as FMA quantification. Furthermore, FMA showed to be a potential method that can be applied with other fluorescent conjugates.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Breast cancer is the most common invasive cancer in women and occupies the third position among the most incident malignant neoplasms in the world [1]. In non-invasive breast cancers (also named carcinoma *in situ*), the abnormal cells are limited to the ducts or lobules and do not invade the tissues surrounding the breast [2]. Nevertheless, invasive ductal and invasive lobular breast cancer account for >70% of cases of

breast neoplasms [3]. When diagnosed early, breast cancer has a good prognosis, however, despite the significant advance of cancer diagnosis and treatment, there is still a need for a deeper understanding of the fundamental biology associated to this disease, since the mortality rate is a still concern [1,3]. Breast cancer can be classified molecularly by immunohistochemistry since biomarkers can determine the treatment and prognosis of this neoplasm. These molecular subtypes are based, for instance, on the presence or absence of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), progesterone receptors (PR), and estrogen receptors (ER) [4].

Nevertheless, different epigenetic cell alterations contribute to neoplastic transformation, including an aberrant glycosylation pattern of proteins [5]. Carbohydrate profiles have been associated to changes in the cellular metabolism that occurs in cancer, favoring the progress of the tumor, metastasis, and consequently a worse prognosis [6]. In an attempt to study the changes in glycobiology and have a better understanding of which occurs in the different breast tissues, including

* Correspondence to: A. Fontes, Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife, PE, Brazil.

** Correspondence to: M.T. S. Correia, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife, PE, Brazil.

E-mail addresses: adriana.fontes@ufpe.br (A. Fontes), mcorreia@ufpe.br (M.T.S. Correia).

¹ Adriana Fontes and Maria Tereza S. Correia jointly supervised this work.