

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



CÁSSIA REGINA ALBUQUERQUE DA CUNHA

DESENVOLVIMENTO DE BIOCONJUGADOS BASEADOS EM PONTOS QUÂNTICOS
E CRAMOLL - APLICAÇÕES PARA O ESTUDO DO PERFIL DE CARBOIDRATOS EM
SISTEMAS BIOLÓGICOS

**Recife
2018**

CÁSSIA REGINA ALBUQUERQUE DA CUNHA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOCONJUGADOS BASEADOS EM PONTOS QUÂNTICOS
E CRAMOLL - APLICAÇÕES PARA O ESTUDO DO PERFIL DE CARBOIDRATOS EM
SISTEMAS BIOLÓGICOS**

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

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

Coorientadora: Prof^a Dr^a Adriana Fontes

**Recife
2018**

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

Cunha, Cássia Regina Albuquerque da
Desenvolvimento de bioconjugados baseados em pontos quânticos e Cramoll –
Aplicações para o estudo do perfil de carboidratos em sistemas biológicos / Cássia
Regina Albuquerque da Cunha. – 2018.

120 f. : il.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia.

Coorientadora: Adriana Fontes.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biotecnologias. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2018.
Inclui referências e anexo.

1. Lectinas 2. Leishmania braziliensis I. Correia, Maria Tereza
(orientadora) II. Fontes, Adriana (coorientadora) III. Título.

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 104

CÁSSIA REGINA ALBUQUERQUE DA CUNHA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOCONJUGADOS BASEADOS EM PONTOS QUÂNTICOS
E CRAMOLL - APLICAÇÕES PARA O ESTUDO DO PERFIL DE CARBOIDRATOS EM
SISTEMAS BIOLÓGICOS**

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

Aprovada em: 28/02/2018

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia
(Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a. Beate Saegesser Santos
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Dijanah Cota Machado
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o Dr^o Thiago Henrique Napoleão
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

“Nunca me deixes esquecer que tudo que tenho, tudo o que sou, o que vier a ser, vem de Ti Senhor” Imensamente grata ao meu Deus pelo privilégio desses 10 anos de UFPE!

À minha mãe, pelo amor, cuidado, investimento e sacrifício para que eu pudesse ter acesso a esse mundo surpreendente chamado EDUCAÇÃO.

À minha família por acreditarem e torcerem por mim.

A Marcos, pelo cuidado em me acompanhar nos fins de semana e feriados para fazer experimentos e por todo o carinho e incentivo ao longo desses anos. Bem como sua família, por todo o orgulho e suporte que sempre me deram quando precisei.

À Eduarda Carvalho, por me acompanhar e crescer ao meu lado ao longo desses anos de doutorado.

A Paulo Euzébio, pela paciência, disponibilidade e por esse ser humano excepcional que alia tanta inteligência e humilde.

À Camila Galvão, pelo auxílio em tantos experimentos e parceria ao longo desses anos.

À Isabela Andrade, por toda a ajuda, conversas, ensinamentos e exemplo de profissionalismo.

À Carina, pela prontidão em ajudar-me e tranquilidade para os dias turbulentos da pesquisa.

À Camila Pereira, pelo suporte na sala de cultura tão essencial para esse trabalho.

À toda equipe NanoBio UFPE, especialmente aqueles que de alguma forma estiveram contribuindo diretamente para a execução dessa tese, como Priscila Marcelino, Thiago Vêras, Aline Pitt, Denise Tenório, Goreti Pereira, Beate Saegesser e todos aqueles que, mesmo não mencionados, participaram pelo simples fato de fazerem parte desse grupo tão unido.

A todo o departamento de Bioquímica, seus alunos-pesquisadores, técnicos e professores que tanto me auxiliaram e, especialmente, ao laboratório de Bioquímica de proteínas que fez parte da minha vida ao longo desses anos.

A todos do LIKA e Aggeu Magalhães, professores, funcionários e alunos.

À toda a compreensão de Aerlem Cynnara, Andrea Alencar e Ana Karina para a execução dessa pesquisa.

À minha querida orientadora Tereza Correia, por me aceitar em sua equipe, orientar e apoiar ao longo desses anos.

E, por fim, à minha coorientadora Adriana Fontes. Estou finalizando essa tese com lágrimas de alegria. Alegria por ter sido direcionada para trabalhar com uma pessoa de caráter ímpar e tão humana. Eu desejo imensamente me tornar 1/10 do que a senhora é hoje. Muito obrigada pelas críticas (sempre tão construtivas), pelos elogios motivadores, pelas orientações e por me mostrar a beleza da HUMILDADE, que nunca pode ser “nano”(rsrsr). Trabalhar com a senhora e com seus alunos foi um prazer e um orgulho de, por 4 anos, poder dizer que fiz parte de seu grupo de pesquisa.

*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!*

RESUMO

As conhecidas propriedades dos pontos quânticos (PQs) os tornam valiosas ferramentas em diversos estudos, especialmente se combinados com biomoléculas, tais como lectinas. Entre as várias aplicações dos conjugados de PQs-lectina, estão seu uso para traçar a rota dessas proteínas e avaliar o perfil de carboidratos em diferentes tipos celulares, que podem providenciar valiosas informações a respeito do padrão de glicosilação do câncer, bem como de micro-organismos patogênicos. Nesse trabalho, foi apresentada uma revisão a respeito das principais estratégias para conjugar PQs à lectina ou a carboidratos, bem como as principais aplicações dessas gliconanopartículas. Esse artigo foi publicado na revista *BBA General Subjects*. Posteriormente, foi avaliada e padronizada a melhor estratégia para conjugar a lectina Cramoll 1,4 (Cramoll) a PQs de CdTe através da marcação fluorescente em células de *Candida albicans* como prova de conceito. Análises de microscopia de fluorescência revelaram que PQ-Cramoll pH 7.0, conjugados tanto por adsorção como por ligação covalente, foram mais eficientes para marcar as células fúngicas. Além disso, os conjugados apresentaram uma alta fluorescência e a atividade biológica para aglutinar eritrócitos foi idêntica antes e após o processo de bioconjugação, como observado pelo ensaio hemaglutinante (512^{-1}). A citometria de fluxo mostrou que cerca de 17% das células foram marcadas depois da incubação com os conjugados covalentes, enquanto que 92% das células foram marcadas com o conjugado por adsorção (ambos no pH 7.0), sendo essa última estratégia escolhida então como a melhor via de conjugação. Esses resultados foram publicados no *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. O conjugado PQ-Cramoll foi utilizado para investigar a expressão de carboidratos na superfície de células HeLa e *Leishmania braziliensis*. O intenso padrão de marcação em células HeLa indicou que estas células exibem uma superfície rica em resíduos de glicose/manose. A especificidade da marcação foi comprovada através do ensaio de inibição com carboidrato específico e saturação com a lectina livre. Em células de *Leishmania*, a Cramoll foi capaz de inibir o crescimento de formas promastigota do parasita [Concentração que inibe 50% dos parasitas (IC50) = 112,0 µg/mL] com baixa toxicidade para células de mamífero [Concentração citotóxica para 50% dos macrófagos (CC50) = 173,5 µg/mL]. O índice de seletividade da lectina revelou maior toxicidade para o parasita [Índice de seletividade (IS) = 1.54] do que para macrófagos. Além disso, a lectina conjugada ao PQ foi capaz de marcar a membrana de células de *L. braziliensis*, enquanto que os PQs sozinhos preferencialmente marcaram a região anterior do promastigota. Dessa forma, o conjugado PQ-Cramoll mostra-se como uma

ferramenta versátil não só para auxiliar à glicobiologia como para fornecer respostas a respeito da rota de ação da lectina, tanto em células do câncer como em parasitas.

Palavras-chave: Pontos quânticos. Lectina. Cramoll. Bioconjugação. Células HeLa. *Leishmania braziliensis*.

ABSTRACT

The known properties of quantum dots (QDs) make them valuable tools in several studies, especially if combined with biomolecules, such as lectins. Among the various applications of QD-lectin bioconjugates are their use to trace the pathways of these proteins and to evaluate the carbohydrate profile in different cell types, which can provide valuable information on glycosylation patterns related to cancer, as well as to pathogenic microorganisms. In this work, was presented a review of the main strategies to conjugate QDs to lectin or carbohydrates, as well as the main applications of these glyconanoparticles. This manuscript was published to *BBA General Subjects* journal. Subsequently, was evaluated and standardized the best strategy to conjugate Cramoll 1,4 lectin (Cramoll) to CdTe QDs using the labeling of *Candida albicans* cells as proof of concept. Fluorescence microscopy analyses revealed that QD-Cramoll pH 7.0, conjugated by both adsorption and covalent binding, were more efficient for labeling fungi cells. In addition, the conjugates preserved a high fluorescence and, the biological activity to agglutinate erythrocytes was identical before and after the bioconjugation process, as observed by the hemagglutinating assay (512^{-1}). Flow cytometry showed that about 17% of cells were labeled after incubation with the covalent conjugate, while approximately 92% of them were labeled with the conjugate by adsorption (both at pH 7.0). The adsorption strategy was then chosen as the best strategy of conjugation. These results were published in *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. The QD-Cramoll conjugate was used to investigate the expression of carbohydrates on the surface of HeLa and *Leishmania brasiliensis*. The intense labeling pattern in HeLa cells indicated that these cells exhibit a surface rich in glucose/mannose residues. The specificity of the labeling was confirmed by the specific carbohydrate inhibition assay and saturation with the free lectin. In *Leishmania* cells, Cramoll was able to inhibit the growth of promastigote forms of the parasite [Concentration for inhibiting 50% of the parasite (IC₅₀) = 112.0 µg/mL], with low toxicity to mammalian cells [Cytotoxic concentration to 50% of the macrophages (CC₅₀) = 173.5 µg/mL]. The lectin selectivity index revealed higher toxicity to the parasite [index selectivity (IS) = 1.54] than to macrophages. In addition, the lectin conjugated to QD was able to label *L. brasiliensis* cell membrane, whereas QDs alone preferentially labeled the anterior portion of promastigotes. Thus, QD-Cramoll conjugates can be considered versatile tools not only to provide a deeper understanding of glycobiology but also to answer questions regarding the route of action of this lectin in both cancer cells and parasites.

Keywords: Quantum dots. Lectin. Cramoll. Bioconjugation. HeLa cells. *Leishmania braziliensis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

FIGURA 1 – Algumas glicosilações relacionadas ao câncer. A. Glicanos *N*-ligados; B. Glicanos *O*-ligados; C. Glicanos sialilados; D. Glicanos truncados.25

FIGURA 2 - Representação da atividade hemaglutinante e inibição da atividade hemaglutinante: (a) lectinas se ligam aos carboidratos específicos da superfície dos eritrócitos (CSE) induzindo a hemaglutinação; (b) a inibição ocorre quando os sítios de afinidade ao carboidrato da lectina são previamente saturados com o carboidrato específico (CE), impossibilitando a formação da malha de aglutinação. 28

FIGURA 3 - Taxonomia de *Cratylia mollis*. A. Flores, B. Árvore, C. Sementes. 30

FIGURA 4 - Etapas principais para extração e purificação das isoformas de lectinas de *Cratylia mollis*..... 31

FIGURA 5 - Estrutura Terciária de Cramoll 1. A - Estrutura mostrando o sítio de ligação a monossacarídeo e aos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} . B- Similaridades vistas utilizando o alinhamento estrutural de Cramoll e Con A..... 32

FIGURA 6 - Lectina de *Cratylia mollis* (Cramoll 1): oligomerização dependente de pH. (a) Monômero, (b) Dímero, (c) Tetrâmero. (D) Eletroforese mostrando o monômero intacto-I e monômeros fragmentados-F..... 33

FIGURA 7 - Diferenças no perfil de dissociação e desnaturação de p e rCramoll. Em condições não desnaturantes, rCramoll só apresenta tetrâmeros intactos diferente de pCramoll que possui tetrâmeros formados tanto por monômeros intactos como fragmentados. Os tetrâmeros (pCramoll) ao serem submetidos a 4 M de ureia apresentam apenas monômeros parcialmente desenovelados, enquanto que rCramoll apresenta tanto monômeros como tetrâmeros parcialmente desenovelados.34

FIGURA 8 - Potencialidades e aplicações de Cramoll..... 35

FIGURA 9 - Efeito de rCramoll e rCramoll encapsulada em lipossomas furtivos (rCramoll-Lipo) no peso dos sarcomas 180 *($p < 0,05$).....	40
FIGURA 10 - Banda de valência e condução separadas pela banda gap com formação do par elétron-buraco e emissão de fluorescência pelos pontos quânticos.....	42
FIGURA 12 - Comparação da fotoestabilidade entre PQs e Alexa 488. Microtúbulos marcados com PQ 630–estreptavidina (vermelho) e antígenos nucleares marcados com Alexa 488 (verde) - anti IgG. Os espécimes foram continuamente iluminados por 3 min com luz 100 W de uma lâmpada de mercúrio em uma objetiva de 100x com óleo de imersão. Um filtro de excitação (485 ± 20 nm) foi usado para excitar Alexa 488 e PQ 630. Imagens a 0, 20, 60, 120, e 180 s. Enquanto os sinais de Alexa 488 tornaram-se indetectados dentro de 2 min, os sinais de PQ 630 não mostraram mudanças por um período de 3 min de iluminação.	44
FIGURA 13 - Tabela periódica simples com realce para os elementos dos grupos IIB e VIA	46
FIGURA 14 - Fórmulas estruturais de alguns agentes estabilizantes: ácido mercaptoacético - AMA, ácido mercaptosuccínico -AMS, ácido 3-mercaptopropiônico -AMP, cisteamina - CISTM, cisteína - CIS	47
FIGURA 15 - Conjugação de uma biomolécula com PQ (núcleo-casca) funcionalizado.	48
FIGURA 16 - Conjugação covalente utilizando EDC e Sulfo-NHS	49
FIGURA 17 - Diferentes tipos de marcação utilizando PQs: a) Marcação de linfonodos sentinelas; b) Imagem de PQs multicoloridos encapsulados em microesferas e injetados no rato vivo. c) Imagem do câncer de próstata.	51
FIGURA 18 - Biosensor para detecção de glicose em amostras de sangue e urina. A. Mecanismo de transferência de energia ressonante (FRET). a) FRET entre PQs-lectina (QDs-ConA) e PQs-carboidrato (QDs-NH ₂ -glu); b) Inibição de FRET após incubação em meios contendo glicose. B. Quantificação visual do nível de glicose em amostra de	52

FIGURA 19 - <i>Trypanosoma cruzi</i> marcado com PQs conjugados à lectina SNA	53
--	-----------

MANUSCRITO 3

FIGURA 1 - CdTe QD absorption (dashed line) and emission (filled line) spectra, $\lambda_{exc} = 488$ nm	88
--	-----------

FIGURA 2 - Emission spectra of QD-Cramoll and QDs bare. QDs bare (filled line) and QD-Cramoll (dashed line). $\lambda_{exc} = 488$ nm	89
---	-----------

FIGURA 3 - <i>Candida albicans</i> cells labeled with QD-Cramoll. Scale bar: 10 μm	89
--	-----------

FIGURA 4 - Labeling HeLa cells: (A) HeLa cells incubated with QD-Cramoll; (B) HeLa cells incubated with QD-Cramoll inhibited; (C) HeLa cells incubated with QD-Cramoll inhibited saturated previously with the lectin. Scale bar: 25 μm.....	90
--	-----------

MANUSCRITO 4

FIGURA 1 – Growth curve of promastigotes of <i>L. braziliensis</i> treated with Cramoll.....	105
---	------------

FIGURA 2 – Cytotoxic effect of Cramoll on mammalian cells.....	106
---	------------

FIGURA 3 – Effect of Cramoll on the production of nitric oxide	107
---	------------

FIGURA 4 – A) CdTe QD absorption (dashed line) and emission (filled line) spectra. B) Emission spectra of QD-Cramoll conjugates (dashed line) and bare QDs (filled line) – $\lambda_{exc} = 488$ nm.....	108
--	------------

FIGURA 5 – Labeling of <i>C. albicans</i> yeast cells with the QD-Cramoll conjugate	108
--	------------

FIGURA 6 – Labeling of <i>L. braziliensis</i> with bare QDs (A); QD-Cramoll (B) and, inhibited QD-Cramoll (C). Scale bar: 10 μm (in A and B), 25 μm (in C).....	109
--	------------

LISTA DE ABREVIATURAS

AMA	Ácido mercaptoacético.
AMP	Ácido mercaptopropiônico.
AMS	Ácido mercaptosuccínico
Anti-A	Anticorpo que reconhece antígeno A em hemácias.
Anti-B	Anticorpo que reconhece antígeno B em hemácias.
Anti-H	Anticorpo que reconhece antígeno H em hemácias.
Anti-VEGFR2	Anticorpo que reconhece receptor-2 do fator de crescimento endotelial vascular.
AuNps	Nanopartículas de ouro.
BSA	Albumina de soro bovino.
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
CA125	Antígeno de carcinoma de ovário
CA19-9	Antígeno de câncer gástrico e de pâncreas
CA15-3	Antígeno de câncer de mama
CC50	Concentração citotóxica para 50% das células de mamífero
CEA	Antígeno carcinoembriônico de colon
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo.
CDIS	Carcinoma Ductal <i>in situ</i> .
CdTe	Telureto de cádmio.
CdS	Sulfeto de cádmio.
CdS/Cd(OH)₂	Sulfeto de cádmio/ Hidróxido de Cádmio.
CdSe	Seleneto de cádmio.

CdSe/ZnS	Seleneto de cádmio/ Sulfeto de zinco.
CdSSe/ZnS	Sulfoseleneto de cádmio/ Sulfeto de zinco.
CIS	Cisteína.
CISTM	Cisteamina.
Con A	Concanavalina A.
COOH-CNTs	Nanotubos de carbono carboxilados.
Cramoll	Lectina de <i>Cratylia mollis</i> .
Cramoll 1,4	Isolectinas 1 e 4 de <i>Cratylia mollis</i> .
DBTRG-05MG	Linhagem celular de glioblastoma recorrente.
DNA	do inglês Desoxiribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico).
DPR	Desvio Padrão Relativo.
DSI	Sorotipo 1 da dengue.
DSII	Sorotipo 2 da dengue.
DSIII	Sorotipo 3 da dengue.
EDC	[1-etil-3- (3-dimetilaminopropil)].
Eg	Banda <i>gap</i> .
EPR	do inglês, <i>Enhanced permeability and retention effect</i> (efeito de aumento de permeabilidade vascular e retenção).
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
h+	Espaço vazio na banda de valência.
HeLa	Linhagem celular de carcinoma cervical epitelial humano.
HUVECs	Células endoteliais da veia de cordão umbilical humano.
IARC	Agência Internacional de Pesquisa para o Câncer .

IC50	Concentração que inibe 50% do microorganismo
IFN-γ	Interferon γ .
IHQ	Imunohistoquímica.
IL-1	Interleucina 1.
IL-1β	Interleucina 1 β .
IL-2	Interleucina 2.
IL-4	Interleucina 4.
IL-6	Interleucina 6.
IL-8	Interleucina 8.
IL-17^a	Interleucina 17A.
IL-22	Interleucina 22.
IL-23	Interleucina 23.
INCA	Instituto Nacional do Câncer.
kDa	KiloDaltons.
(kGy)	Kilogray
M	Molaridade (mol.L ⁻¹).
MBP	Proteína que se liga a maltose.
MCF-7	Linhagem celular de câncer de mama.
MIV	Microscopia intra-vital
ML	Lectina de <i>Mistletoe</i> .
MTT <i>bromide.</i>	do inglês 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
OMS	Organização Mundial de Saúde.

PAMPs	do inglês <i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PANI	Polianilina.
PBS	do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i> .
PC3	Linhagem celular de câncer de próstata.
PCL	Lectina de <i>Polygonatum cyrtonema</i> .
pCramoll	Lectina de <i>Cratylia mollis</i> , Cramoll 1.
PDT	do inglês <i>Photodynamic Therapy</i> .
PECs	do inglês <i>Peritoneal Exudate Cells</i> .
pET	vetor para expressão heteróloga pET.
pH	Potencial hidrogeniônico.
pI	Ponto isoelétrico.
PQs	Pontos quânticos.
PSA	do inglês <i>Prostate Specific Antigen</i>
rCramoll	Lectina recombinante de <i>Cratylia mollis</i> .
Ricina	Lectina de <i>Ricinus communis</i> .
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i> .
RPM	Rotações Por Minuto.
R-SH	Grupo funcional tiol.
SI	Índice de seletividade
SLe^a	Antígeno de câncer gástrico e de pâncreas
Sulfo-NHS	N-hidroxisulfosuccinamida.
Th2	do ingles, <i>T helper 2</i> (resposta imune Th2).

TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α .
TP53	do inglês <i>Tumor Protein 53</i> , proteína P53.
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco.
UEA I	Lectina <i>Ulex europaeus</i> .
UH	Unidade Hemaglutinante.
UV	Luz ultra-violeta.
U87	Linhagem celular de glioblastoma.
VEGF-A	Fator de Crescimento Endotelial Vascular.
Vero	Fibroblastos de rins de macacos.
WGA	Lectina do germe de trigo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
2.1 GLICOBIOLOGIA DOS SISTEMAS BIOLÓGICOS	22
2.1.1 Glicobiologia de parasitas	22
2.1.2 Glicobiologia do câncer	24
2.2 LECTINAS.....	26
2.2.1 <i>Cratylia mollis</i> e suas lectinas	29
2.2.2 Cramoll como ferramenta para estudos biomédicos	34
2.2.2.1 Agente imunomodulador	35
2.2.2.2 Proteção contra radicais livres	36
2.2.2.3 Desenvolvimento de biosensores.....	36
2.2.2.4 Agente antiparasitário.....	37
2.2.2.5 Agente cicatrizante	38
2.2.2.6 Ferramentas em estudos do câncer	38
2.3 PONTOS QUÂNTICOS.....	40
2.3.1 Síntese de Pontos Quânticos	45
2.3.2 Bioconjugação	47
2.3.3 Pontos quânticos - sondas fluorescentes para ciências da vida	50
3 OBJETIVOS	54
3.1 Objetivo Geral	54
3.2 Objetivos Específicos	54
4 MANUSCRITO 1: Biomedical applications of glyconanoparticles based on quantum dots.	55
5 MANUSCRITO 2: Quantum dots–Cramoll lectin as novel conjugates to glycobiology...57	57
6 MANUSCRITO 3: Quantum Dot-Cramoll Lectin for Carbohydrate Investigation in HeLa Cells.....	59
7 MANUSCRITO 4: <i>In vitro</i> effect of Cramoll lectin in <i>Leishmania braziliensis</i> and application in cell labeling.....	75
8 CONCLUSÕES.....	92
9 PERSPECTIVAS.....	93
REFERÊNCIAS.....	94
APÊNDICE A – TRABALHOS COMPLEMENTARES.....	118

1 INTRODUÇÃO

O reconhecido papel dos glicídios como macromoléculas importantes na manutenção da homeostasia celular e tecidual, tem levado a crescentes estudos na área da Glicobiologia (VARKI, 2017). Sendo assim, alterações do perfil glicídico de células podem prover informações relacionadas ao desenvolvimento, progressão e resistência tumoral, bem como respostas dos micro-organismos frente ao sistema de defesa do hospedeiro e resistência aos medicamentos. O reconhecimento específico e reversível de carboidratos pelas lectinas, faz dessas proteínas, de origem não imune (SILVA et al., 2014; ZHENG et al., 2016), um instrumento para estudos da Glicobiologia de diversos sistemas biológicos.

As técnicas baseadas em fluorescência têm permitido o desenvolvimento de novas nanossondas, tais como os pontos quânticos ou *quantum dots* (PQs). Essas nanopartículas fluorescentes têm atingido um lugar de destaque em pesquisas no campo da terapia fotodinâmica (MARTYNENKO et al., 2015; HONG et al., 2016), no desenvolvimento de sonda multimodais (FANG et al., 2012; CHHOUR et al., 2015), na elaboração de biosensores (GHRERA et al., 2015) e como sondas fluorescentes para aquisição de imagens celular (LI et al., 2016) e tecidual (WANG et al., 2016). Os PQs apresentam características físico-químicas únicas, principalmente pela sua excepcional resistência à fotodegradação e superfície ativa para bioconjugação. Essa superfície ativa permite a conjugação com biomoléculas, como lectinas. Assim, conjugados PQs-lectinas podem ser aplicados para aquisição de sinais e imagens fluorescentes em vários meios biológicos (células e tecidos) e podem ser ferramentas versáteis no estudo da glicobiologia.

Cramoll 1,4 (Cramoll) é um exemplo de lectina que apresenta potencial (i) no tratamento de queimaduras; (ii) como agente antioxidante; (iii) no desenvolvimento de biosensores para diferenciar os sorotipos e estágios da dengue; (iv) antiparasitário; (v) como sondas moleculares para estudos de câncer de mama e próstata e (vi) antitumoral (PEREIRA et al., 2012; SILVA et al., 2015a; AVELINO et al., 2014; FERNANDES et al., 2010; LIMA et al., 2010; CUNHA et al., 2016). Em 2018, Cunha e colaboradores avaliaram a melhor estratégia para conjugação de Cramoll a pontos quânticos de CdTe, visando desenvolver uma ferramenta fluorescente com potencial para aplicação em diversas áreas da Glicobiologia. Sendo assim, o interesse desse trabalho foi desenvolver bioconjugados baseados em PQs e Cramoll para aplicações em estudos do perfil glicídico em sistemas biológicos. Uma revisão sobre as principais estratégias para conjugar PQs à lectina ou a carboidratos, bem como as

principais aplicações dessas gliconanopartículas foi publicada na revista *BBA General Subjects*. A padronização da conjugação de PQs à Cramoll foi publicada na revista *Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Os resultados da aplicação do bioconjugado PQ-Cramoll para marcar células HeLa serão submetidos às revistas *Micron* e a atividade leishmanicida da lectina livre, bem como seu potencial para, quando conjugada a PQs, marcar células de *Leishmania braziliensis* serão submetidos à revista *Experimental Parasitology*. Esses dados revelaram o versátil potencial dos PQ-Cramoll como uma ferramenta para auxiliar à Glicobiologia.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 GLICOBIOLOGIA DOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

Os hidratos de carbono são macromoléculas indispensáveis para a existência de todos os seres vivos (VARKI, 2011; VARKI, 2017). Caracterizados como simples ou complexos, eles desempenham funções que vão além da construção de estruturas celulares e armazenamento de energia em suas ligações. Os glicídios apresentam um papel metabólico importante em muitos sistemas biológicos, sinalizando e mediando a comunicação intracelular e da célula com o meio extracelular, desempenhando significativa relevância no desenvolvimento da vida e na manutenção de sua homeostasia. A Glicobiologia pode então ser definida como o estudo da estrutura, síntese, função, evolução e as relações dos glicanos com outras macromoléculas como proteínas que reconhecem carboidratos nos vários sistemas biológicos (VARKI, 2017).

2.1.1 Glicobiologia de parasitas

Em micro-organismos, os glicanos exercem papel relevante no processo de reconhecimento e colonização no hospedeiro (RODRIGUEZ et al., 2015). Esse reconhecimento é importante tanto em processos de simbiose e comensalismo como no desenvolvimento de patologias. Glicanos como o polissacarídeo A, produzido pela microbiota do intestino de mamíferos, apresentam um papel relevante na modulação do sistema imune para a tolerância desses micro-organismos (MAZMANIAN et al., 2005; VARKI, 2017). Em contrapartida, processos patológicos podem ser desencadeados por alterações nas interações glicídicas e fragilidade do sistema imune do hospedeiro (VARKI, 2017).

Os parasitas apresentam em comum a capacidade de produção de glicoconjugados e proteínas que reconhecem glicanos do hospedeiro para sua proteção, interação e respostas às modificações do seu ambiente. Dessa forma, esses glicoconjugados também estão relacionados ao sucesso da permanência do parasita em diversos hospedeiros (RODRIGUEZ et al., 2015). Alguns desses glicoconjugados são característicos desses seres, denominados de padrões moleculares associados a patógenos (do inglês *PAMPs*), que podem desencadear uma cascata de ativação de células fagocíticas do sistema imune do hospedeiro por meio de receptores como a lectina tipo C (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002; SFIHI-LOUALIA et al., 2016; SFIHI-LOUALIA et al., 2016; VARKI, 2017).

Detentores de complexos ciclos de vida que, muitas vezes, envolvem mais de um hospedeiro, os parasitas precisaram desenvolver formas que permitissem sua sobrevivência ao sistema imune, desenvolvimento e manutenção de sua ação no hospedeiro. Muito do sucesso de sua colonização se deve às interações fundamentadas em reconhecimento de carboidratos. Alguns desses carboidratos são adquiridos ou sintetizados pelo parasita e mimetizam os do hospedeiro, em um processo denominado de *glycan gimmickry* (VAN DIE e CUMMINGS, 2010; RODRIGUEZ et al., 2015). Esses carboidratos desempenham uma função crucial no ciclo de vida do parasita em seu hospedeiro (RODRIGUEZ et al., 2015).

Alguns carboidratos podem desempenhar diversas funções para o sucesso da colonização do parasita em diferentes organismos. Em espécies de *Leishmania*, por exemplo, o lipofosfoglicano desempenha uma relevante função para o início da infecção em vertebrados, mas não desempenham papel crucial para a persistência da patologia, já no intestino médio dos invertebrados, esse glicoconjugado parece influenciar na ligação à galectinas das células do hospedeiro (SPATH et al., 2003; VARKI, 2017). Doenças causadas por parasitas como protozoários e helmintos representam mais de 1 milhão de mortes por ano, além de poderem causar transtornos que afetam a qualidade de vida desses pacientes ao longo dos anos (HOTEZ et al., 2014; RODRIGUEZ et al., 2015).

Um importante grupo de parasitas são os fungos. Esses micro-organismos apresentam parede celular que, assim como os vegetais, é composta por uma rede de carboidratos. Entretanto, essa parede celular está diretamente ligada à membrana plasmática e é composta por outros polissacarídeos como quitina, mananas e galactomanaas, sendo a manose um dos principais monossacarídeos que compõe a parede. Os carboidratos da parede celular permitem uma adaptação às diferentes condições de crescimento de forma flexível e dinâmica e favorecem uma estabilidade mecânica. A presença e quantidade desses carboidratos difere entre os fungos, sendo o crescimento da parede controlado durante o ciclo celular, e define a forma como esses micro-organismos se apresentam (hifas e leveduras) (SFIHI-LOUALIA et al., 2016).

Candida albicans é um importante fungo de interesse médico encontrado em nossa microbiota normal, entretanto, pode provocar desde micoses a infecções sistêmicas. Ele é responsável por cerca de mais de 400.000 infecções por ano no mundo, com altas taxas de mortalidade (BROWN et al., 2012; POPOLO et al., 2017). A parede celular desse micro-organismo é composta de glicanos e quitina unidos por ligações β 1-3-e β 1-6 e mananas. Deficiências genéticas na adição de O-manoses podem ser letais para esse fungo, mostrando a

importância que os carboidratos representam para esses seres. Os carboidratos da parede fúngica auxiliam no processo de antigenicidade e de adesão em células e tecidos do hospedeiro (SFIHI-LOUALIA et al., 2016).

Alterações na composição da parede celular podem ser decorrentes do ambiente, formas como esse fungo pode se apresentar (leveduras e hifas), em respostas às situações de estresse como ação do sistema imune do hospedeiro ou a fármacos anti-fúngicos como o que inibe a síntese de glicanos β 1-3, importantes para a manutenção da parede fúngica, sendo usado no tratamento de infecções (FONZI, 1999; CALDERONE E FONZI, 2001; LATGE, 2007; POPOLO et al., 2017; GOW e YADAV, 2017).

Dessa forma, encontrar novas estratégias para estudar o perfil glicídico de diferentes parasitas e o impacto de suas alterações no ciclo de vida desses seres e em seu potencial de virulência é de fundamental relevância para o diagnóstico e terapia dessas patologias.

2.1.2 Glicobiologia do câncer

A expressão de alguns tipos de glicanos em diferentes tecidos e estágios do desenvolvimento podem estar relacionados a diversas funções (Rodrigues et al., 2015). Dessa forma, a glicosilação é um dos mecanismos regulatórios-chave para manutenção da homeostasia celular e tecidual (VASCONCELOS-DOS-SANTOS et al., 2015; PINHO e REIS, 2015). Entretanto, mudanças na glicosilação, causadas por disfunções de glicosiltransferases e/ou glicosidases, têm uma considerável relevância em processos patológicos como no câncer, estando relacionadas a eventos como proliferação, angiogênese, invasão e metástase das células cancerígenas (VARKI et al., 2009; TANG et al., 2015; FUSTER e ESKO, 2005; VASCONCELOS-DOS-SANTOS et al., 2015).

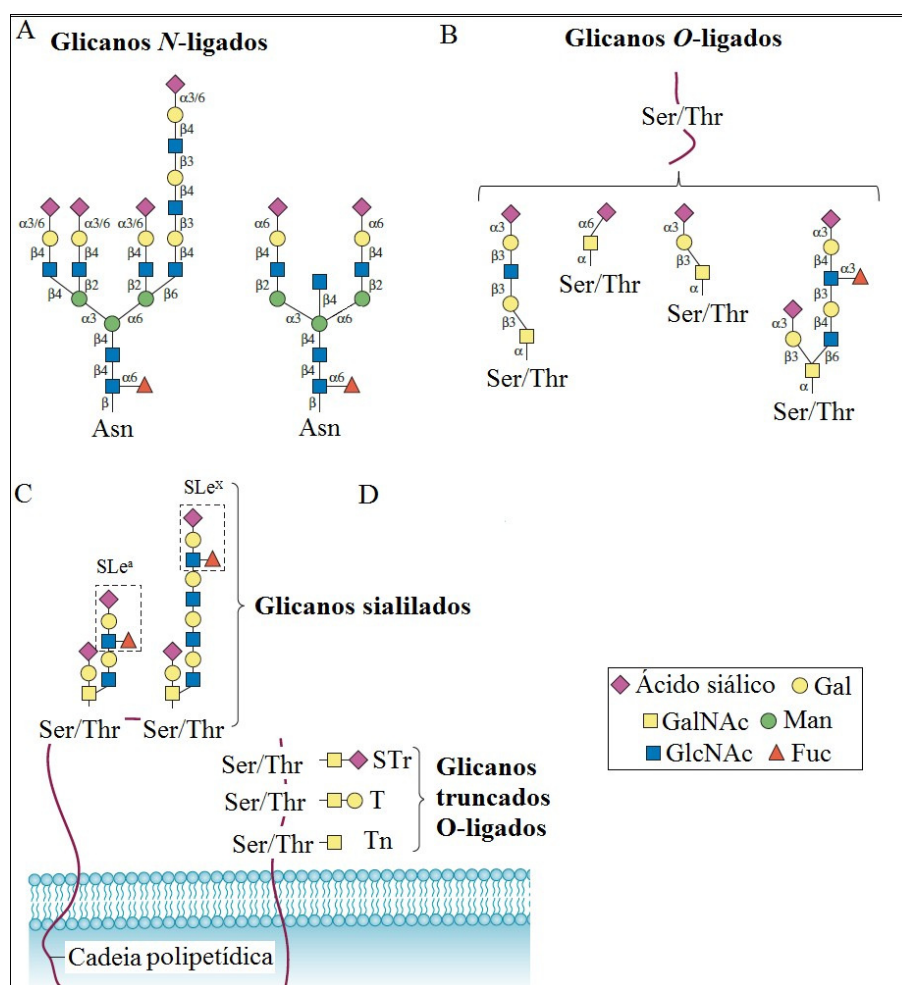
As principais mudanças na glicosilação são fucosilação, glicanos *O*-ligados truncados, sialilação e ramificações de glicanos *N* e *O* ligados, Figura 1 (HAKOMORI, 2002; ARNOLD et al., 2008; CHRISTIANSEN et al., 2014; PINHO e REIS, 2015). Essas modificações estão relacionadas, muitas vezes, com o aumento da invasividade e malignidade do tumor (KIM e VARKI, 1997; HÄUSELMANN e BORSIG, 2014).

As alterações glicídicas propiciam interações entre as células do câncer e: (i) outras células do microambiente tumoral; (ii) matriz extracelular, (iii) receptores encontrados na vasculatura que favorecem a disseminação da célula do câncer e (iv) lectinas endógenas, tais como: as siglecs, expressas em células hematopoiéticas; as galectinas expressas nas células do

câncer; e as selectinas. Essas interações facilitam o desprendimento da matriz e o acionamento de mecanismos de invasão, adesão e colonização em outros órgãos (KANNAGI, 1997; HÄUSELMANN e BORSIG, 2014).

No processo de transformação da célula do câncer, epítomos oncofetais são expressos. Eles são denominados dessa forma por serem expressos em células embrionárias e tumorais, não sendo encontrados na grande maioria das células adultas (HAKOMORI, 1985; HÄUSELMANN e BORSIG, 2014). Esses epítomos podem ser potenciais biomarcadores do tumor e a sua biossíntese tem se tornado alvo para elaboração de terapias antitumorais (HÄUSELMANN e BORSIG, 2014; VASCONCELOS-DOS-SANTOS et al., 2015).

Figura 1 - Algumas glicosilações relacionadas ao câncer. A. Glicanos *N*-ligados; B. Glicanos *O*-ligados; C. Glicanos sialilados; D. Glicanos truncados.



Fonte: Adaptado de PINHO e REIS (2015).

Alguns biomarcadores encontrados no soro de pacientes com câncer são glicoproteínas amplamente utilizadas no diagnóstico e monitoramento da progressão do tumor, como o antígeno específico da próstata (PSA), o antígeno de carcinoma de ovário (CA125), o antígeno carcinoembrionário de cólon (CEA); o antígeno de câncer de mama CA15-3; e os antígenos de câncer gástrico e de pâncreas (SLe^a e CA19-9, respectivamente) (GILGUNN et al., 2013; ZURAWSKI et al., 1988; GOLDSTEIN et al., 2005; LOCKER et al., 2006; SAFI et al., 2007; REIS et al., 2010; PINHO e REIS, 2015). Entretanto, esses biomarcadores apresentam limitações para detecção precoce, o que tem atraído pesquisas para descoberta de novos biomarcadores com maior especificidade para detecções iniciais (PINHO e REIS, 2015).

Diante disso, são necessários novos estudos que visem elucidar o papel das alterações glicídicas e sua interação com lectinas endógenas no desenvolvimento, progressão e metástase tumoral. Além disso, a Glicobiologia também se propõe a auxiliar na descoberta de novos biomarcadores tumorais, objetivando a detecção cada vez mais precoce e específica. Com esse suporte, será possível a elaboração de novas estratégias para o diagnóstico e terapia que visem interferir na progressão tumoral (HÄUSELMANN e BORSIG, 2014).

Diferentes das proteínas, os carboidratos não são produtos diretos dos genes e possuem uma variedade muito maior de suas formas, que torna seu estudo um desafio de considerável importância na ciência (LANDHUIS, 2017; VARKI, 2017). Devido a esse gargalo, o estudo do glicoma (conjunto de carboidratos de uma estrutura ou organismo) se torna difícil por apenas uma técnica. A utilização de técnicas complementares como enzimas, lectinas e outras proteínas que se ligam a carboidratos ganharam um papel de destaque por entender não apenas a estrutura, mas a função desempenhada por esses glicídios. Marcações em tecidos e células utilizando lectinas ou anticorpos específicos podem ajudar a entender as possíveis variações dentro de um mesmo tecido e entre células (VARKI, 2017).

2.2 LECTINAS

Desconfortos intestinais após a ingestão de algumas leguminosas não cozidas ou com cozimento insatisfatório podem estar relacionados à presença de um grupo especial de proteínas, as lectinas. Essas macromoléculas são caracterizadas pela afinidade específica e reversível a resíduos de carboidratos (SILVA et al., 2014; CUNHA et al., 2016). Sua

marcante estabilidade térmica e resistência às enzimas digestivas e ácidos (KUMAR et al., 2012) acarretaram a atenção para o estudo e aplicação dessas macromoléculas ao longo dos anos.

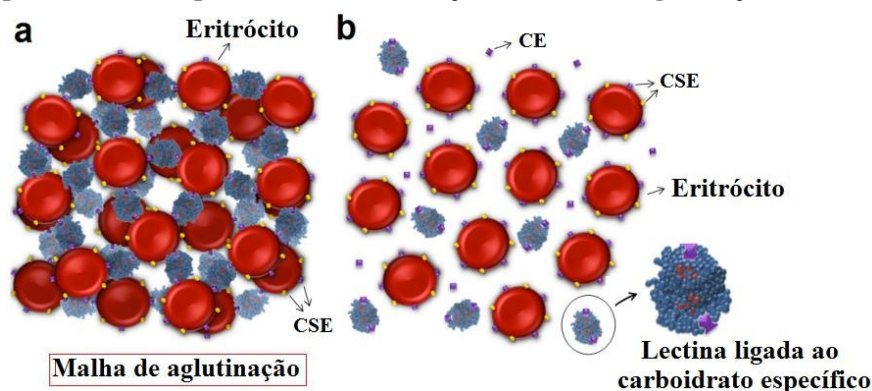
Alguns trabalhos têm avaliado estratégias para diminuir a alergenicidade dessas macromoléculas utilizando radiação ionizante, como apresentado por Vaz e colaboradores (2011) ao exporem a lectina da casca de *Sebastiania jacobinensis* à radiação acima de 1 Kilogray (kGy), revelando uma diminuição significativa da atividade hemaglutinante e sugerindo também uma redução da alergenicidade dessa proteína.

Em 2012, Vaz e colaboradores verificaram que essa mesma radiação era capaz de mudar o estado conformacional da lectina do gérmen de trigo (WGA) e provocar uma redução de citocinas típicas das reações alérgicas e diminuição do infiltrado linfocitário no estômago de camundongos, mostrando a eficácia do uso da radiação para o combate de reações alérgicas e imunológicas provocadas pela lectina.

Em uma análise mais detalhada em 2013, Vaz e colaboradores verificaram que pequenas doses da radiação gama podem resultar no aumento da alergenicidade, enquanto que altas doses promovem a quebra de estruturas moleculares cruciais para eliminar o efeito alergênico (VAZ et al., 2013).

A despeito da potencial toxicidade que essas proteínas apresentam, estudos têm revelado diversos benefícios das lectinas como ferramentas para fins diagnóstico e terapêutico nas mais diversas áreas (SYED et al., 2016; POLLI et al., 2016). Stillmark (1888) foi o primeiro a comprovar, experimentalmente, que a fração proteica do feijão castor *Ricinus communis* (Ricina) era capaz de aglutinar células vermelhas, Figura 2 (GORAKSHAKAR e GHOSH, 2016). A especificidade para determinados eritrócitos foi observada por Landsteiner (1936) e melhor analisada por Boyd e Shapleigh (1954) que denominaram essas proteínas como -Lectinas, derivado do latim -legerel que significa escolher, selecionar.

Figura 2 - Representação da atividade hemaglutinante e inibição da atividade hemaglutinante: (a) lectinas se ligam aos carboidratos específicos da superfície dos eritrócitos (CSE) induzindo a hemaglutinação; (b) a inibição ocorre quando os sítios de afinidade ao carboidrato da lectina são previamente saturados com o carboidrato específico (CE), impossibilitando a formação da malha de aglutinação.



Fonte: Adaptado de SANTOS et al. (2013).

As lectinas são encontradas nos mais diversos seres como micro-organismos, plantas e animais (YAU et al., 2015). Lectinas endógenas medeiam processos biológicos como reconhecimento célula-célula, interações da matriz extracelular, fertilização gamética, desenvolvimento embrionário, crescimento celular, diferenciação celular, sinalização celular, adesão e migração celular, apoptose, imunomodulação e inflamação, interação parasita-hospedeiro, enovelamento e direcionamento de glicoproteína, indução mitogênica e homeostase (MODY; JOSHIB; CHANEY, 1995; GORELIK; GALILI; RAZ, 2001; MINKO, 2004; NIMRICHTER et al., 2004; SHARON e LIS, 2004; WORMALD e SHARON, 2004; RABINOVICH et al., 2007; CHOU; SHIEH; SYTWU, 2009; KERRIGAN e BROWN, 2009; RUSEVA et al., 2009; SARAVANAN et al., 2009; YAMANAKA et al., 2009; GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011; PANG et al., 2016).

Devido aos diversos potenciais que as lectinas apresentam como antitumoral (Cunha et al., 2016), imunomodulador (SILVA et al., 2015b), antibacteriano, antifúngico (CHANDRASEKARAN et al., 2016), antiparasitário (VIEIRA et al., 2008) e antiviral (Woodrum et al., 2016), essas proteínas têm sido alvo de inúmeros estudos. As lectinas extraídas de plantas são costumeiramente encontradas em muitos desses trabalhos. Nos vegetais, elas desempenham uma notória participação na proteção contra fitopatógenos, entre outras funções (LANNOO e VAN DAMME, 2014; ZHENG et al., 2016).

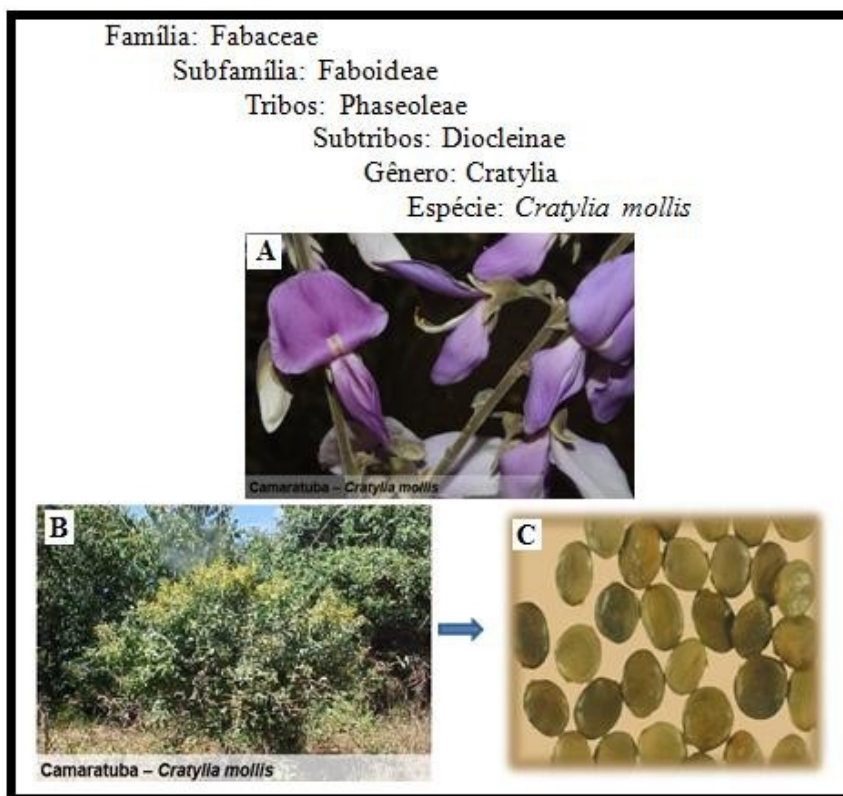
Algumas classificações são feitas para melhor estudar essas proteínas. Uma das classificações utilizadas para lectinas de plantas é fundamentada na sua arquitetura e capacidade de ligação a carboidratos, sendo dividida em quatro grupos principais: um

domínio de ligação a carboidrato (merolectinas), dois ou mais domínios de ligação idênticos (hololectinas), no mínimo dois domínios de ligação a carboidratos diferentes (superlectinas), um ou mais domínios de ligação a carboidratos e um domínio que exerce atividade biológica independente do domínio de ligação a carboidratos (quimerolectinas). Com exceção das merolectinas, todas são capazes de aglutinar células (VAN DAMME et al., 1998; CAVALCANTE et al., 2014).

Em uma classificação baseada na sequência de dados disponíveis do genoma/transcriptoma, existem doze famílias de lectinas de plantas com domínios relacionados estruturalmente e evolucionariamente (VAN DAMME; LANNOO; PEUMANS et al., 2008; SHI et al., 2016). Dentre esses grupos, vale destacar o com domínio lectina de leguminosa, compreendendo lectinas de *Canavalia ensiformis* (Con A) e de *Cratylia mollis* (Cramoll).

2.2.1 *Cratylia mollis* e suas lectinas

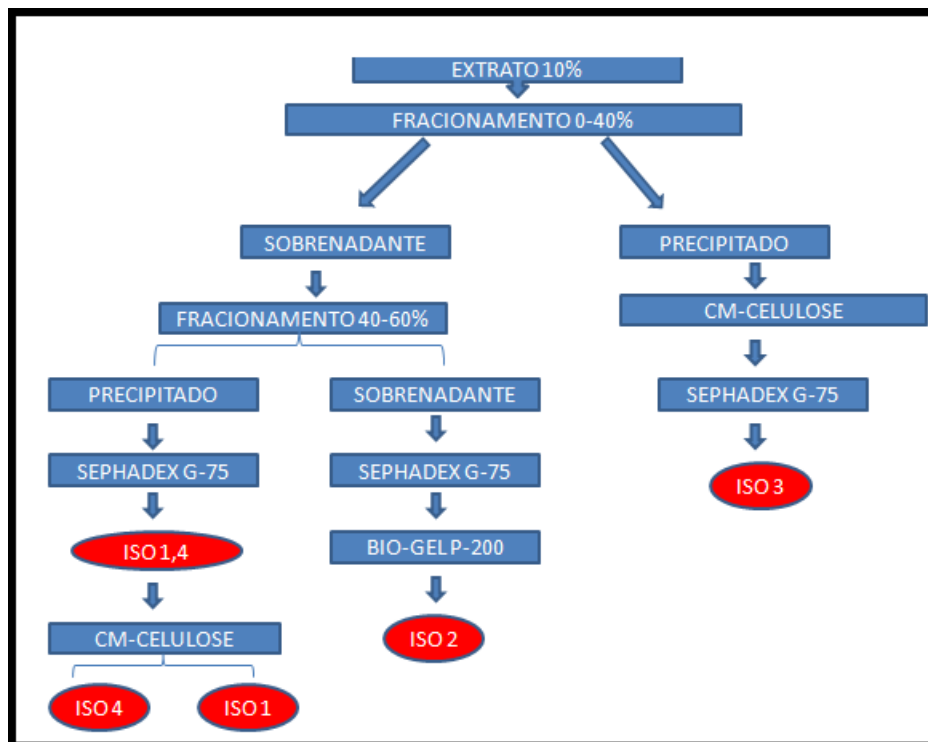
Popularmente conhecida como feijão Camaratu ou Camaratuba, *Cratylia mollis*, Figura 3, é uma espécie autóctone do semiárido do nordeste do Brasil (L. C. N. da Silva et al., 2014; Souza et al., 2003). *Cratylia*, que pertence à família Fabaceae ou leguminosa, Figura 3, é uma planta arbustiva, tolerante à seca e a solos ácidos e tem potencial para adubação verde e forrageamento (ARAÚJO et al., 2011). Desde a sua utilização como recurso forrageiro até a purificação das lectinas de suas sementes na década de 90 (PAIVA e COELHO, 1992; CORREIA e COELHO, 1995), *Cratylia mollis* tem atraído, ao longo dos anos, a atenção de inúmeros pesquisadores que visam descobrir as diversas atividades biológicas de suas lectinas.

Figura 3 - Taxonomia de *Cratylia mollis*. A. Flores, B. Árvore, C. Sementes

Fonte: Adaptado de CARDOSO (2009).

Quatro isoformas de lectinas podem ser extraídas e purificadas das sementes de *C. mollis*, que são separadas pelos diferentes estágios do processo de fracionamento com sulfato de amônio e etapas cromatográficas, Figura 4 (PAIVA e COELHO, 1992; CORREIA e COELHO, 1995). Em 1992, Paiva e Coelho purificaram as isoformas 2 (60 kDa) e 3 (31 kDa), presentes no sobrenadante da fração 40-60% (rendimento de 2.6%) e precipitado da fração 0-40% (rendimento de 3.3%), respectivamente. A isoforma 2 se liga a resíduos de glicose/manose enquanto que a isoforma 3, que é uma glicoproteína, se liga à galactose (PAIVA e COELHO, 1992).

Três anos depois, Correia e Coelho (1995) publicaram o artigo apresentando as outras duas isoformas (1 e 4) purificadas em apenas uma etapa cromatográfica com sephadex G-75. Essas isoformas foram separadas através de mais uma etapa cromatográfica com CM-celulose, gerando um rendimento de 94% para a isoforma 1 (31 kDa). As isoformas 1, 2, e 3 apresentam diferenças de migração eletroforética, sendo Cramoll 1 (ponto isoelétrico-pI 8.5-8.6), Cramoll 2 (pI 4.15-6.7) e Cramoll 3 (pI 5.25-5.8) (PAIVA e COELHO, 1992; CORREIA e COELHO, 1995).

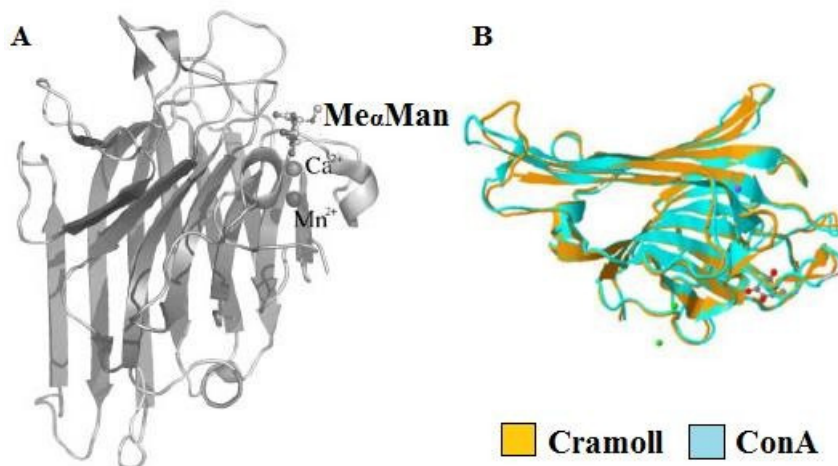
Figura 4 - Etapas principais para extração e purificação das isoformas de lectinas de *Cratylia mollis*.

Fonte: CUNHA et al. (2014).

As isolectinas 1 e 3 encontram-se majoritariamente na matriz amorfa de corpos proteicos e nas paredes celulares do eixo embrionário. Essas isolectinas têm sido relacionadas com uma possível função de proteção contra predadores e, no eixo embrionário, elas parecem estar associadas à necessidade mitogênica para o processo germinativo ou como uma reserva proteica para a dormência da semente. Dessa forma, essas proteínas podem ser metabolicamente ativas para seu uso em momento oportuno (SANTOS; PEIXOTO; COELHO, 2004).

A lectina Cramoll 1 possui o maior rendimento e é constituída de 236 resíduos de aminoácidos, dentre os quais, quatro são triptofanos, com 82% de identidade com Con A, apresentando um sítio de ligação idêntico para metil- α -manopiranosídeo Mn^{2+} e Ca^{2+} , Figura 5. Todavia, são observadas diferenças de ligação a oligossacarídeos e glicoproteínas entre essas duas lectinas. Os dois sítios de metal são encontrados na proximidade do sítio de ligação a monossacarídeo. A região de ligação a metais é indispensável para ligação do carboidrato, pois os metais interagem com a cadeia polipeptídica tanto diretamente como via coordenação de moléculas de água (SOUZA et al., 2003).

Figura 5 – Estrutura Terciária de Cramoll 1. A - Estrutura mostrando o sítio de ligação a monossacarídeo e aos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} . B- Similaridades vistas utilizando o alinhamento estrutural de Cramoll e Con A.



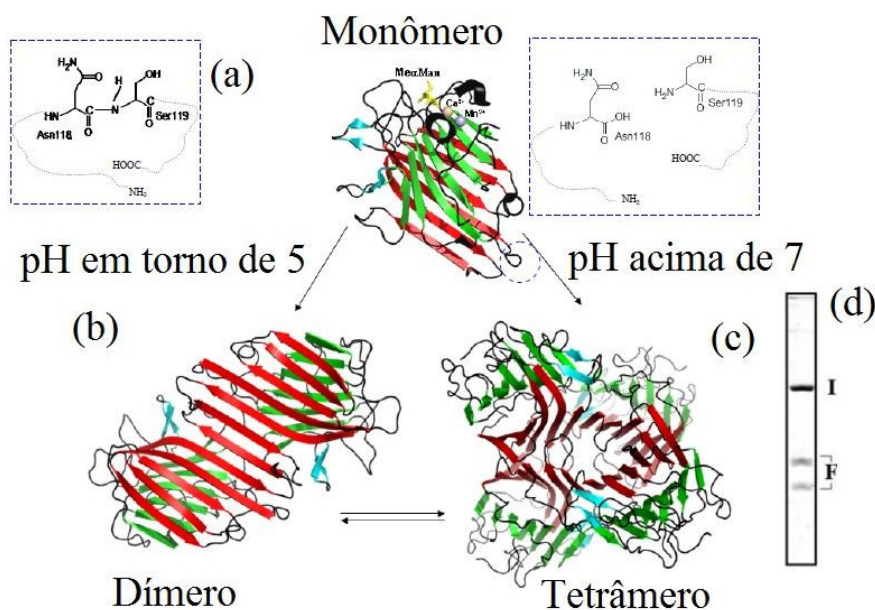
Fonte: Adaptado de SOUZA et al.(2003) e SILVA et al. (2014).

Em 2010, Varejão e colaboradores propuseram a produção de uma proteína recombinante a partir de DNA quimicamente sintetizado que codificava a sequência da proteína madura, gerando uma lectina funcional homóloga à Cramoll 1 (rCramoll) em *Escherichia coli*. Mesmo tendo como obstáculo o aprisionamento da lectina em agregados insolúveis chamados de corpos de inclusão, foi possível obter um rendimento de aproximadamente 6 mg/L da lectina ativa, preservando as mesmas propriedades da lectina nativa Cramoll 1, tais como: massa molecular, densidade de carga, estruturas secundárias e terciárias e capacidade para aglutinar eritrócitos de coelho e células epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Ademais, vale ressaltar que a lectina recombinante apresentou-se mais estável frente às situações adversas como altas temperaturas, alta pressão hidrostática e acidez (VAREJÃO et al., 2010; VAREJÃO; CORREIA; FOGUEL 2011).

Essas diferenças podem ser devido à ausência de uma ligação peptídica específica em alguns monômeros fragmentados de Cramoll 1, o que pode ocasionar a diminuição da estabilidade dos tetrâmeros, como sugerido por Varejão, Correia e Foguel (2011), Figura 6. Eles observaram que, ao submeter Cramoll 1 e rCramoll ao pH 7, as duas lectinas apresentavam-se em sua forma tetramérica, contudo, em pH 6, houve o aparecimento de 26% da forma dimérica de Cramoll 1, diferente da recombinante que manteve sua forma original. Com o aumento da acidez (pH 5) foi possível observar 100% de dímeros de pCramoll,

enquanto que 50% de rCramoll ainda apresentava-se como tetrâmero, sendo possível obter 100 % da forma dimérica apenas em pH 4.2 (VAREJÃO et al., 2010).

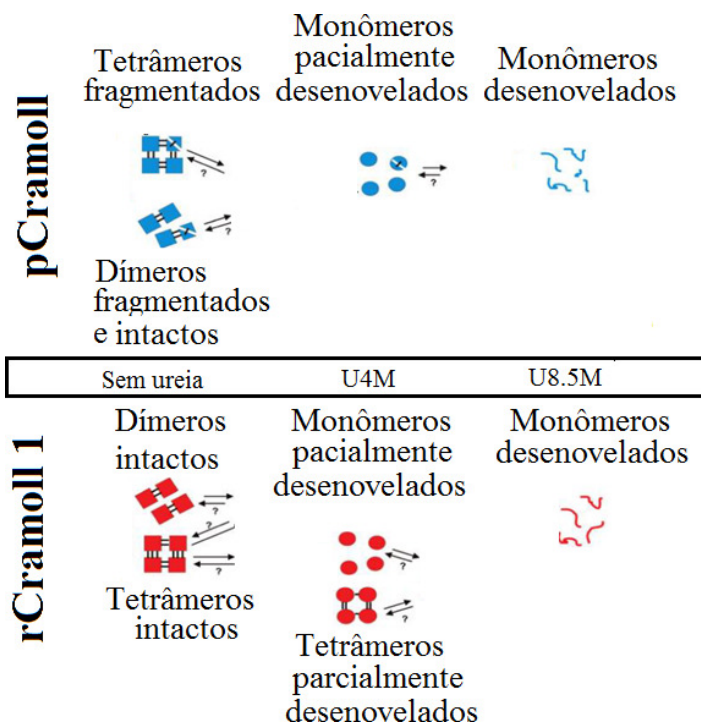
Figura 6 - Lectina de *Cratylia mollis* (Cramoll 1): oligomerização dependente de pH. (a) Monômero, (b) Dímero, (c) Tetrâmero. (D) Eletroforese mostrando o monômero intacto-I e monômeros fragmentados-F.



Fonte: Adaptado de VAREJÃO et al. (2010).

Na presença do agente desnaturante uréia (4 M), os tetrâmeros da lectina da planta foram dissociados em monômeros, enquanto que rCramoll ainda iniciava seu desenovelamento. Quando esse mesmo agente desnaturante foi colocado nos dímeros, as duas lectinas apresentavam-se como monômeros parcialmente desenovelados, Figura 7. Para a planta, essas instabilidades de Cramoll 1 podem disponibilizá-la também como uma importante fonte de nutrição na semente, favorecendo o desenvolvimento do embrião (VAREJÃO; CORREIA; FOGUEL, 2011).

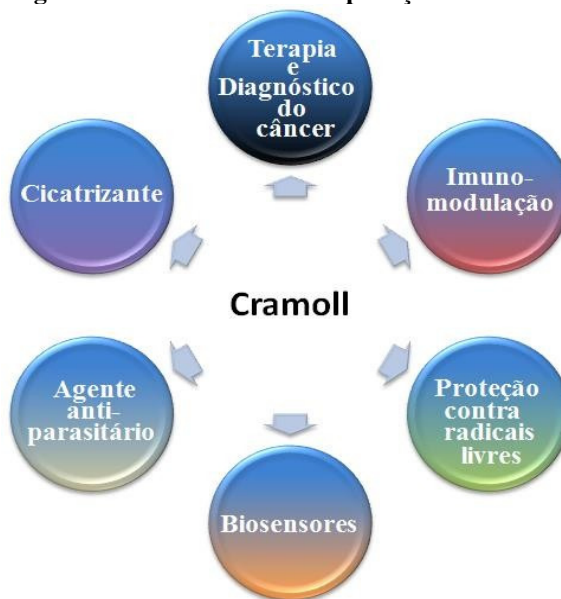
Figura 7 - Diferenças no perfil de dissociação e desnaturação de p e rCramoll. Em condições não desnaturantes, rCramoll só apresenta tetrâmeros intactos diferente de pCramoll que possui tetrâmeros formados tanto por monômeros intactos como fragmentados. Os tetrâmeros (pCramoll) ao serem submetidos a 4 M de ureia apresentam apenas monômeros parcialmente desnovelados, enquanto que rCramoll apresenta tanto monômeros como tetrâmeros parcialmente desnovelados.



Fonte: Adaptado de VAREJÃO; CORREIA; FOGUEL (2011).

2.2.2 Cramoll como ferramenta para estudos biomédicos

Cramoll 1 apresenta muitas similaridades com Con A, entretanto, alguns estudos têm revelado o potencial das isoformas 1 e 4 combinadas como ferramentas para aplicações biomédicas. Entre algumas dessas potencialidades, é possível citar seu uso na pesquisa do câncer com propósitos diagnósticos e terapêuticos, como agente imunomodulador, antiparasitário, cicatrizante, protetor contra radicais livres e no desenvolvimento de biosensores, Figura 8 (SILVA et al., 2014).

Figura 8 - Potencialidades e aplicações de Cramoll.

Fonte: Próprio autor.

2.2.2.1 Agente imunomodulador

O efeito mitogênico de Cramoll 1,4 e Cramoll 1 em linfócitos foi avaliado mostrando que essas lectinas podem ser usadas como ferramentas para proliferação dos linfócitos e não há diferença significativa na utilização dessas isolectinas. Além disso, essa atividade biológica está diretamente relacionada ao sítio de ligação a carboidratos dessas lectinas (MACIEL et al., 2004).

Cramoll 1,4 também está associada a um aumento da proliferação de esplenócitos. Tanto Cramoll 1,4 como Con A induziram altos níveis de IL-2, IL-6, IFN- γ e de óxido nítrico. Além disso, Cramoll 1,4 não induziu apoptose e estimulou o aparecimento de um número significativo de células na fase S do ciclo celular, mostrando que essa lectina pode ser usada como agente mitogênico nos ensaios de imunoestimulação (MELO et al., 2011a). Cramoll 1,4 também apresentou atividade modulatória nos linfócitos do baço e estimulou a resposta imune Th2 (MELO et al., 2011b). Essa lectina foi hábil para induzir a expressão *in vitro* de IL-6, IL-17A, IL-22, e IL-23 melhor do que a lectina comercial Con A, além de gerar memória imunológica (OLIVEIRA et al., 2013).

Silva e colaboradores (2015b) avaliaram o potencial imunomodulador de Cramoll 1,4 e rCramoll em células de exsudado peritoneal (do inglês PECs) infectadas ou não com *Staphylococcus aureus*. As lectinas aumentaram, de forma significativa, os níveis de óxido nítrico, superóxido e citocinas (IL-1, IL-6, IFN- γ e TNF- α). Já nas células infectadas com *S.*

aureus as lectinas regularam negativamente a expressão de TNF- α e IL-6, que pode auxiliar a atenuar os efeitos deletérios das respostas inflamatórias persistentes no sítio da infecção. Elas também foram capazes de regular positivamente a expressão de IL-1 β e IFN- γ . A fagocitose de *S. aureus* pelas células PECs aumentou em 27,1% e 22,47% para Cramoll 1,4 e rCramoll, respectivamente, mostrando que Cramoll 1,4 induziu efeitos mais fortes do que a forma recombinante.

2.2.2.2 Proteção contra radicais livres

Silva e colaboradores (2015a) avaliaram o potencial protetor contra a indução de estresse oxidativo provocado pelo peróxido de hidrogênio em células Vero (fibroblasto de rins de macacos) por Cramoll 1,4 e rCramoll. Eles revelaram que as lectinas significativamente atenuaram a citotoxicidade induzida pelos radicais peróxidos de forma dependente da concentração. O máximo de efeito protetor ($96,85 \pm 15,59\%$) e ($59,48 \pm 23,44\%$) foi verificado para rCramoll e Cramoll 1,4, respectivamente. Também foi observada uma redução da porcentagem de células mortas de $65,04 \pm 3,29\%$ (H_2O_2) para $39,77 \pm 2,93\%$ (Cramoll 1,4) e $13,90 \pm 9,01\%$ (rCramoll), bem como redução dos efeitos deletérios causados pelo H_2O_2 para os níveis de 10,83% (pCramoll) e 24,17% (rCramoll). Em suma, eles mostraram que as lectinas foram capazes de diminuir a citotoxicidade induzida por estresse oxidativo por meio da diminuição de espécies reativas de oxigênio no meio, restaurando o potencial mitocondrial, prevenindo danos no lisossomo e fragmentação do DNA, promovendo sobrevivência e a proliferação celular.

2.2.2.3 Desenvolvimento de biosensores

Estudos imobilizando Cramoll 1,4 em diversas matrizes são realizados para os mais distintos fins. Em 2008, OLIVEIRA e colaboradores imobilizaram essa lectina em nanopartículas de ouro adsorvidas em eletrodos e verificaram que ela mantém sua atividade biológica e interage com ovalbumina, demonstrando que esse sistema pode ser usado na construção de um biossensor sensível à glicoproteínas em solução.

Em 2011 um novo sensor utilizando Cramoll 1,4 foi desenvolvido com alta sensibilidade e seletiva discriminação de lipossacarídeo bacteriano (OLIVEIRA et al., 2011a). Essa lectina também mostrou ser um potencial biossensor para detectar padrões anormais de glicoproteínas no soro de pacientes com dengue (OLIVEIRA et al., 2011b). Em 2014,

Avelino e colaboradores realizaram a imobilização de Cramoll 1,4 em nanopartículas de ouro (AuNps) com polianilina (PANI) para a identificação do perfil glicoproteico de pacientes infectados com os três sorotipos de dengue (DSI, DSII, DSIII). O biossensor mostrou-se com boa sensibilidade e reprodutibilidade e foi capaz de discriminar os diferentes sorotipos e estágios da infecção (AVELINO et al., 2014; SILVA; COELHO; CORREIA, 2016).

Silva e colaboradores (2016) utilizaram um eletrodo formado pela união de nanotubos de carbono carboxilados (COOH-CNTs) e filme de poli-L-lisina funcionalizado com Cramoll 1,4, objetivando a identificação diferencial de pacientes com hiperplasia benigna e câncer de próstata. Eles verificaram que o nanoeletrodo exibiu um padrão linear de detecção para fetuína em amostras de PBS na faixa de 0,5 a 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, com um alto coeficiente de correlação ($r=0,994$, $p<0,001$), limite de detecção de 0,017 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, boa repetibilidade (1,24% de desvio padrão relativo, DPR) e reprodutibilidade (4,24% DPR). Mintz e colaboradores (2015) revelaram que a fetuína pode ser um potencial marcador nesse tipo de câncer como indicador de metástase e agressividade do tumor. A análise de um pool de pacientes com hiperplasia benigna e câncer de próstata mostrou que o nanoeletrodo reconheceu glicoproteínas do soro de forma diferencial, aumentando a marcação de acordo com a elevação do -Gleason score que, segundo Pierorazio e colaboradores (2013), está relacionado ao aumento da metástase e recorrência do câncer após o tratamento.

2.2.2.4 Agente antiparasitário

Compostos isolados de diversas plantas da região semiárida brasileira têm revelado atividade tripanocida contra as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (VIEIRA et al., 2008). Cramoll 1,4 também revelou potencial de aglutinação, inibição da proliferação e morte celular por necrose dessas formas de *T. cruzi* (FERNANDES et al., 2010). Em 2014, Fernandes e colaboradores investigaram o mecanismo de alteração mitocondrial de *T. cruzi* induzido por Cramoll 1,4 usando como controle mitocôndria isolada de fígado de rato. Os resultados revelaram que a lectina liga-se a glicoconjugados da membrana plasmática, é internalizada e posteriormente liga-se à mitocôndria. Ela estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, *Reactive oxygen species*) na mitocôndria do parasita e do controle em um meio contendo Ca^{2+} , sendo a mitocôndria do parasita mais propensa à morte celular mediada pela transição da permeabilidade de membrana por ROS associada às alterações da homeostase do Ca^{2+} .

2.2.2.5 Ação cicatrizante

O efeito cicatrizante de Cramoll 1,4 foi avaliado no reparo das lesões experimentais de camundongos normais e imunocomprometidos, mostrando seu potencial como futuro composto cicatrizante (MELO et al., 2011c). O tratamento regular de queimaduras de segundo grau em camundongos utilizando hidrogel contendo Cramoll 1,4 acelerou a granulação, o processo de reepitelização e retração da ferida, mostrando também o potencial dessa lectina para ser utilizada com outros bioprodutos para o tratamento de queimaduras de segundo grau (PEREIRA et al., 2012).

Baseado no potencial cicatrizante de Cramoll 1,4, Albuquerque e colaboradores (2016) imobilizaram essa lectina em um gel de galactomanana e verificaram que a matriz (gel/Cramoll 1,4) apresentou-se estável por até 30 dias. A lectina imobilizada na matriz reteve 90% de sua atividade hemaglutinante durante 20 dias, diminuindo para 60% após 60 dias, sem ocorrência de contaminação microbiana durante o período de 90 dias de estocagem. Esses resultados revelaram o potencial uso desta matriz para aplicações tópicas de interesse farmacêutico e para a indústria de cosméticos, visando aumentar a penetração de fármacos através da pele.

2.2.2.6 Ferramentas em estudos do câncer

Estudos clínicos requerem volumes pequenos de amostras, medidas de alta precisão e habilidade para processar tais amostras (TANG et al., 2015). A espectrometria de massas é uma técnica usualmente utilizada para análises estruturais de glicoproteína e é considerado o método padrão ouro na glicômica, entretanto, essa é uma análise que pode gerar incertezas a respeito de possíveis variações em ligações glicídicas (ADAMCZYK; THARMALINGAM; RUDD, 2011; PAN et al., 2011; TANG et al., 2015), além de demandar um volume de amostra maior e múltiplas etapas para preparação do material (BOSQUES; RAGURAM; SASISEKHARAN, 2006; ZHU e DESAIRE 2015; SHANG; ZENG, YUN; ZENG, YONG, 2016).

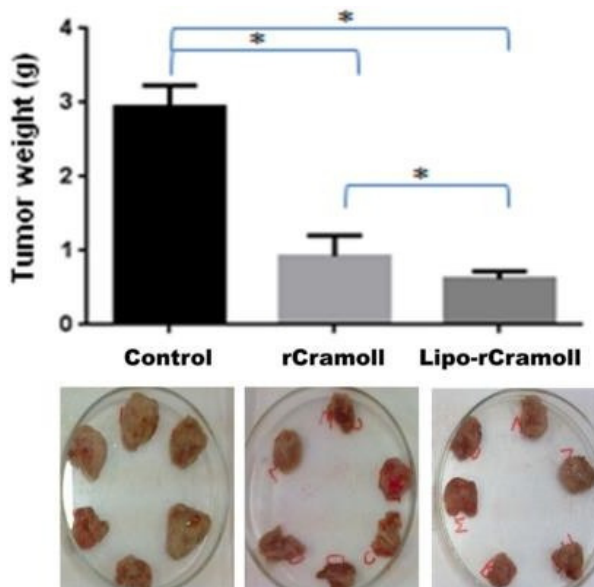
Como alternativa, as lectinas têm sido utilizadas como ferramentas para auxiliar à Glicobiologia. Lectinas de diversas origens são empregadas para investigar alterações no perfil glicídico de células tumorais. Além disso, algumas lectinas podem induzir a morte dessas células, sendo o estudo das interações lectina-carboidrato uma etapa importante para a

criação de novas técnicas diagnósticas e seleção de novas vias terapêuticas (CUNHA et al., 2016; LICHTENSTEIN e RABINOVICH, 2013).

Cramoll tem sido usada como ferramenta com potencial diagnóstico e terapêutico em estudos sobre o câncer. Em 1998, Beltrão e colaboradores verificaram que Cramoll 1 foi eficiente para marcar, de forma diferencial, tecidos normais e transformados de mama. Essa lectina apresentou uma maior marcação dos tecidos neoplásicos em relação aos sadios quando comparada à Con A. Em tecidos de próstata (normal, hiperplásico e carcinoma), Cramoll 1,4 também marcou de forma diferencial, apresentando padrão de marcação mais intenso no tecido hiperplásico em relação ao tecido normal também quando comparando com Con A. Essas duas lectinas mostraram uma diminuição na intensidade de marcação com o aumento do grau de malignidade, entretanto, Cramoll 1,4 apresentou um valor diagnóstico maior para doenças na próstata do que a lectina comercial Con A (LIMA et al., 2010).

O potencial terapêutico das lectinas de *C. mollis*, em especial Cramoll 1,4, também foi avaliado. Essa lectina mostrou sua capacidade de inibição do crescimento do Sarcoma 180 *in vivo* (40%), que foi intensificada ao ser encapsulada em lipossomas convencionais (71%) (ANDRADE et al., 2004). Em 2016, Cunha e colaboradores formularam lipossomas furtivos encapsulando a lectina recombinante rCramoll (rCramoll-Lipo). Mesmo com uma redução de mais de 20% na eficiência de encapsulação, quando comparado ao apresentado em 2004 por Andrade e colaboradores, a atividade antitumoral, também contra sarcoma 180 *in vivo*, dos Lipo-rCramoll apresentou resultados similares (75%), revelando a forte ação da lectina recombinante em lipossomas furtivos, Figura 9.

Figura 9 - Efeito de rCramoll e rCramoll encapsulada em lipossomas furtivos (rCramoll-Lipo) no peso dos sarcomas 180 $^{*}(p < 0,05)$.



Fonte: CUNHA et al. (2016).

Sendo assim, Cramoll e sua forma recombinante são ferramentas que atraem o interesse dos pesquisadores ao longo dos anos. Muitos trabalhos ainda têm sido realizados a fim de descobrir novas potencialidades, bem como esclarecer as vias moleculares que são ativadas pela presença dessa lectina. Entretanto, para melhor visualizar e elucidar a sua ação são necessários traçadores. Técnicas baseadas em fluorescência possuem alta intensidade e possibilitam visualizações em tempo real de processos biológicos (LIRA et al., 2011). Análises teciduais e celulares utilizando marcadores fluorescentes como pontos quânticos têm mostrado uma alta sensibilidade, amplo espectro de excitação e maior fotoestabilidade, quando comparadas às técnicas convencionais de imunohistoquímica (BROCKE et al. 2003, CHEN et al., 2009), o que motiva novos estudos que visem aliar as características fluorescentes dos pontos quânticos com a especificidade da lectina Cramoll para analisar diversas células e tecidos.

2.3 PONTOS QUÂNTICOS

A célebre frase de Richard Feynman: -There's Plenty of Room at the Bottom| abriu novas possibilidades para um mundo em escala nano, onde há -novos tipos de forças, possibilidades e efeitos|, constituindo o ponto de partida para o que se chama de

nanotecnologia (FEYNMAN, 1960; DEVREESE, 2007). Este termo foi usado pela primeira vez em 1974 pelo cientista Norio Taniguchi da universidade de Tokyo, ao referir-se a habilidade de produzir materiais em nível nanométrico (SANDHU, 2006).

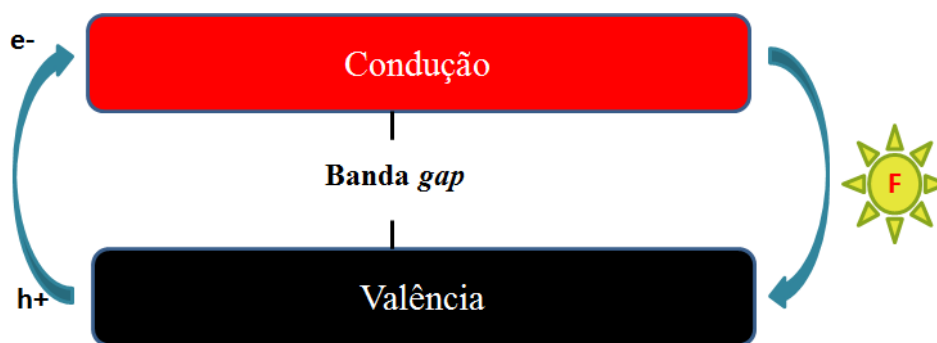
A preparação, caracterização e aplicação de dispositivos em escala nanométrica são funções da nanotecnologia, amplamente conhecida por ter um grande potencial em trazer benefícios para muitas áreas da pesquisa e aplicações (THASSU; PATHAK; DELEERS 2007; VARSHNEY e SHAILENDER, 2012; BEIK et al., 2016). Mais de 2000 nanoprodutos já estão no mercado com particular sucesso em setores como energia, tecnologia da informação e novos materiais para aplicações biomédicas (BOTTERO et al., 2015; KRAJNIK et al., 2016).

Dentro das aplicações biomédicas, os nanomateriais apresentam-se como ferramentas com benefícios potenciais ao combinar múltiplas funções em uma única plataforma, que pode ser direcionada para tecidos e células com uma alta especificidade biológica (DUNCAN e GASPAR, 2011; SCHROEDER et al., 2012; PIKTEL et al., 2016). Essa tecnologia é um campo inovador e altamente especializado, podendo fornecer diagnósticos mais precisos e tratamentos terapêuticos de doenças ao nível molecular (JAIN, 2007), com mais de 40 tipos nanossistemas, incluindo fármacos anticâncer e sondas de imagem (DUNCAN e GARPAS, 2011; SCHROEDER et al., 2012; CLARK et al., 2016).

Um dos diversos tipos de nanomateriais com um significativo impacto na pesquisa em muitos campos como na física, química e ciências biológicas são os pontos quânticos (PQs) ou *quantum dots* (ALGAR; TAVARES; KRULL, 2010). Descritos muitas vezes como átomos artificiais (KLIMOV, 2007; VALIZADEH et al., 2012; CHOU e DENNIS, 2015), eles são partículas coloidais feitas de materiais semicondutores que têm dimensões usualmente na faixa de diâmetro de 2 – 10 nm (FONTES et al., 2012; PROBST et al., 2013; SOENEN et al., 2014; BILAN et al., 2015). O interesse multidisciplinar nos PQs tem sido largamente movido por suas propriedades eletro-ópticas únicas (FONTES et al., 2012; CHOU e DENNIS, 2015).

Em um material semicondutor em escala macro, a banda de valência e a banda de condução estão separadas por um *gap* de energia chamado *band gap* (E_g). Depois da absorção de luz, um elétron pode ser excitado da banda de valência para a banda de condução, deixando um buraco (h^+) na banda de valência. Quando o elétron retorna para a banda de valência a fluorescência é emitida, Figura 10.

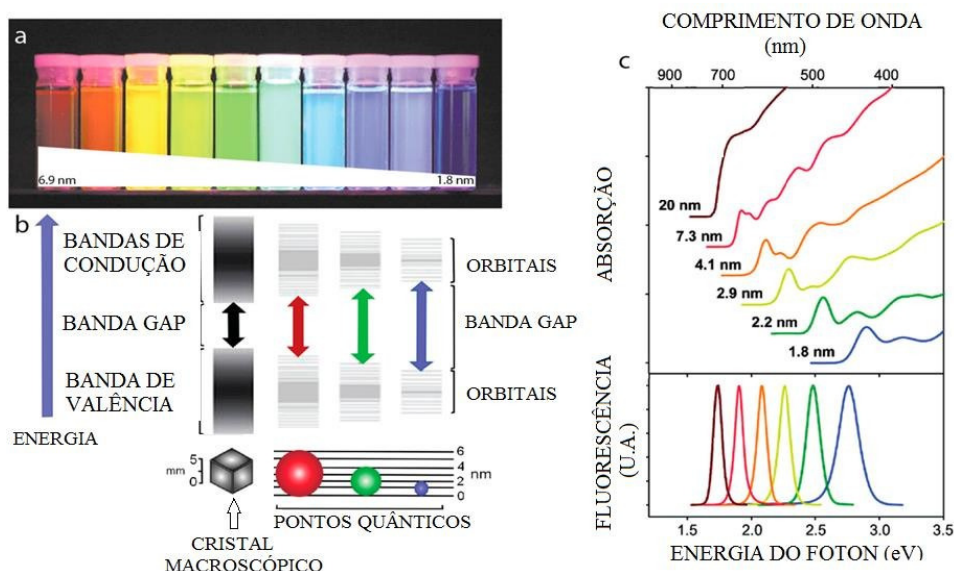
Figura 10 - Banda de valência e condução separadas pela banda gap com formação do par elétron-buraco e emissão de fluorescência pelos pontos quânticos.



Fonte: Próprio autor.

O par (elétron-buraco) é chamado de *éxciton* e a distância entre eles é chamada de raio de Bohr do *éxciton*. Quando as três dimensões do semiconductor são reduzidas para poucos nanômetros e as partículas tornam-se menores que o raio de Bohr (CHAN et al., 2002; CHOU e DENNIS, 2015), pode-se dizer que eles estão em regime de confinamento quântico e nessa situação essas nanopartículas são chamadas de pontos quânticos.

Figura 11 - (a) PQs (CdSe/ZnS), diâmetro aproximado 6.9 nm a 1.8 nm emitindo picos de 655 a 443 nm da esquerda para a direita frente excitação por luz UV (HAN et al., 2001); (b) A energia do *band gap* aumenta com a diminuição do tamanho do nanocrystal. Reimpresso de (COX, 2003); (c) Espectros de absorção e emissão de CdSe. Reimpresso (SMITH e NIE, 2010). Copyright (2010) Sociedade Americana de Química.



Fonte: Adaptado de CHOU e DENNIS (2015).

Em um regime nanométrico, muitas das propriedades físico-químicas dos PQs são diferentes dos mesmos materiais em escala macro, um exemplo dessas mudanças é a sintonização da fluorescência de acordo com o tamanho da partícula. Nesse caso, PQs feitos do mesmo material, mas com tamanhos diferentes, apresentam fluorescência em diferentes regiões espectrais (do ultravioleta ao infravermelho), Figura 11. Isto é uma consequência do confinamento quântico que leva à discretização de níveis eletrônicos e também à variação da energia do *band gap* de acordo com seu tamanho, Figura 11b. Depois da absorção, elétrons retornam para banda de valência e a emissão do PQ é proporcional à energia do *band gap*, quanto menor for o PQ mais alta é a energia do *band gap* e mais direcionada para o azul é sua emissão (FONTES et al., 2012).

Outro fato observado nesse sistema é que a banda de absorção dos PQs é larga e se estende até a região do UV, Figura 11c. O primeiro pico representa a excitação formada pela transição entre os dois primeiros estados eletrônicos discretos. A largura da primeira banda de absorção e seu pico estão relacionados respectivamente à dispersão de tamanho das nanopartículas e ao tamanho médio e concentração dos PQs (SANTOS et al., 2008; FONTES et al., 2012; CHOU e DENNIS, 2015).

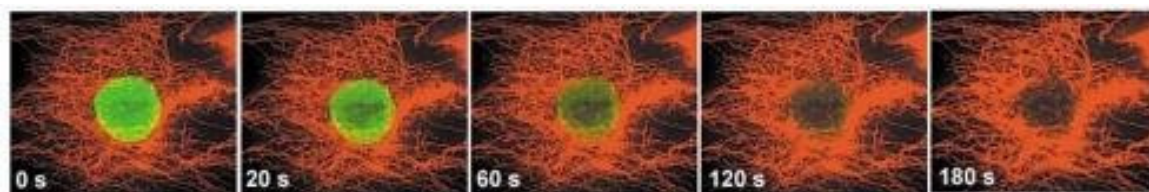
A pesquisa com PQs ganhou atenção pronunciada a partir da década de 90 e, desde então, foram indiscutivelmente adotados como sondas fluorescentes (BRUCHEZ et al., 1998; CHAN e NIE, 1998; ALGAR; TAVARES; KRULL, 2010), para a pesquisa bioanalítica, biofísica e biomédica (PROBST et al., 2013; TANIMOTO et al., 2016; ZHOU et al., 2016; GEIßLER e HILDEBRANDT, 2016). Eles apresentam propriedades que superam as de alguns corantes orgânicos convencionais, entre elas vale destacar as seguintes:

- i. Emissão sintonizável com o tamanho da nanopartícula, largo espectro de excitação e estreito espectro de emissão, Figura 11c. Dessa forma, uma única fonte de luz pode excitá-los gerando emissão em diferentes regiões do espectro, variando-se apenas o tamanho da partícula. Essas características permitem, por exemplo, avaliar as rotas de tráfego de vários carreadores dentro de um mesmo sistema biológico, comparando diretamente seus comportamentos em condições idênticas e gerando picos de emissão distintos com alta resolução (MATTOUSSI; PALUI; NA, 2012; PROBST et al., 2013; BILAN et al., 2015);
- ii. Forte resistência à fotodegradação, fornecendo imagens com maior intensidade de fluorescência por maior tempo. Pontos quânticos mostraram-se mais estáveis quando

comparado com o corante Alexa 488, (Figura 12) (WU et al., 2003; AKCA et al., 2014) e cerca de 100 vezes mais estáveis e 20 vezes mais brilhantes que o corante Rodamina 6G (CHAN e NIE, 1998; WEGNER e HILDEBRANDT, 2015). Essas características facilitam estudos ao longo do tempo e são vantajosas principalmente quando se trata de imagens de marcação *in vivo* (AKCA et al., 2014);

iii. Superfície ativa para conjugação com biomoléculas que permitem o direcionamento ativo e específico dos nanossistemas (KUMAR et al., 2012; FONTES et al., 2012; KUMAR; SHARMA; DEEP, 2014; SURESH, 2014; KARAKOTI et al., 2015).

Figura 12 - Comparação da fotoestabilidade entre PQs e Alexa 488. Microtúbulos marcados com PQ 630–estreptavidina (vermelho) e antígenos nucleares marcados com Alexa 488 (verde) - anti IgG. Os espécimes foram continuamente iluminados por 3 min com luz 100 W de uma lâmpada de mercúrio em uma objetiva de 100x com óleo de imersão. Um filtro de excitação (485 ± 20 nm) foi usado para excitar Alexa 488 e PQ 630. Imagens a 0, 20, 60, 120, e 180 s. Enquanto os sinais de Alexa 488 tornaram-se indetectados dentro de 2 min, os sinais de PQ 630 não mostraram mudanças por um período de 3 min de iluminação.



Fonte: Adaptado de WU et al. (2003).

A fotoestabilidade e alta intensidade de fluorescência também exercem papel especial em muitas análises, como na microscopia de fluorescência de super-resolução, desenvolvida pelos cientistas ganhadores do prêmio Nobel de Química Eric Betzig, Stefan W. Hell, e William E. Moerner em 2014. Essa microscopia auxilia no monitoramento de processos biológicos a nível subcelular, que é importante para o entendimento de relações desencadeadas por cada compartimento celular. Além disso, ela permite a localização de diferentes proteínas na membrana plasmática e no citoplasma, investigando como sinais são transmitidos dentro da célula ou como moléculas são direcionadas para o transporte. Em geral, técnicas de super-resolução requerem altas fontes de excitação e podem necessitar de longos tempos de imagem, até minutos, sendo necessários marcadores brilhantes e estáveis como os PQs (BARROSO, 2011; WEGNER e HILDEBRANDT, 2015).

2.3.1 Síntese de Pontos Quânticos

Existem basicamente duas metodologias para sintetizar PQs: *top-down* e *bottom-up*. Entretanto, a mais usual no campo das aplicações biológicas é a *bottom-up*, que se utiliza da síntese química coloidal, onde se parte de átomos para se chegar a sistemas maiores como as nanopartículas. A síntese *bottom-up* de nanomateriais geralmente compreende diversos estágios consecutivos (FONTES et al., 2012):

- (1) Nucleação em uma solução inicial homogênea;
- (2) Crescimento de um núcleo cristalino pré-formado em partículas isoladas, obtendo o tamanho desejado para as nanopartículas;
- (3) Tratamentos pós-preparativos como purificação coloidal e modificação da superfície por exposição à luz UV (fotoativação).

PQs coloidais podem ser sintetizados em meio orgânico ou aquoso. De modo geral, os métodos de síntese baseados em reagentes organometálicos (em meio orgânico) têm possibilitado a obtenção de semicondutores nanocristalinos coloidais de alta qualidade, isto é, com baixa dispersão de tamanhos das nanopartículas, altos rendimentos quânticos de luminescência e estabilidade química (SILVA et al., 2010). No entanto, este método de síntese, conhecido como rota organometálica utiliza precursores extremamente tóxicos, pirofóricos, de custo elevado e que necessitam de altas temperaturas de reação, além de produzirem PQs hidrofóbicos e, portanto, não são compatíveis com sistemas biológicos (SANTOS; FARIAS; FONTES, 2008; SILVA et al., 2010; FONTES et al., 2012; WEGNER e HILDEBRANDT, 2015).

Como alternativa para que os mesmos se tornem hidrofílicos foram desenvolvidas estratégias de modificações na superfície dos pontos quânticos (SILVA et al., 2010; KARAKOTI et al., 2015). Entretanto, essas modificações geralmente são acompanhadas por um decréscimo do rendimento quântico da fluorescência dos nanocristais (PENG, Z. e PENG, X., 2001; SILVA et al., 2010).

Muitos trabalhos foram realizados com o propósito de se realizar sínteses em meio aquoso (TALAPIN; POZNYAK; GAPONIK, 2002; ZHANG et al., 2003; SILVA et al., 2010). Uma estratégia adotada para elevar a qualidade de fluorescência dos nanocristais sintetizados pelo método aquoso é crescer uma camada externa, constituída também por semicondutores, sobre o núcleo dos nanocristais, dando origem às estruturas do tipo

núcleo/casca (*core/shell*) (TALAPIN; POZNYAK; GAPONIK, 2002; SILVA et al., 2010; WEGNER e HILDEBRANDT, 2015), processo chamado de passivação.

O núcleo dos PQs é responsável pelas propriedades ópticas fundamentais (absorção e emissão). A casca, em geral, é de um material semiconductor com uma *band gap* maior do que o do núcleo e é usado para reduzir os defeitos da superfície, além de tornar as nanopartículas menos sensíveis às mudanças induzidas pelo oxigênio ou pH do ambiente, reduzindo o número de ligações livres que poderiam diminuir a eficiência da fluorescência dos PQs (FONTES et al., 2012; KARAKOTI et al., 2015). Para propósitos biomédicos em que a fluorescência na região do visível e PQs hidrofílicos são usualmente requeridos, tanto núcleo como a casca são geralmente compostos de elementos dos grupos IIB e VIA da tabela periódica, Figura 13, como CdSe/ZnS, CdTe/CdS e ZnSe/ZnS(DABBOUSI et al., 1997; SANTOS; FARIAS; FONTES, 2008; FONTES et al., 2012).

Figura 13 - Tabela periódica simples com realce para os elementos dos grupos IIB e VIA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	1A																	8A
	1 H									Sólido	Líquido	Gasoso						2 He
1		2A																10
	3 Li	4 Be																Ne
3	11 Na	12 Mg																18
																		Ar
19	20 K	21 Ca	22 Sc	23 Ti	24 V	25 Cr	26 Mn	27 Fe	28 Co	29 Ni	30 Cu	31 Zn	32 Ga	33 Ge	34 As	35 Se	36 Br	36 Kr
3	19 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
6	55 Cs	56 Ba	57-71 Lantanídeos	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
7	87 Fr	88 Ra	89-103 Atinídeos	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Ds	111 Rg	112 Cn	113 Nh	114 Fl	115 Uu	116 Lv	117 Ts	118 Og

1A

2A

3A

4A

5A

6A

7A

8A

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

1

2

3

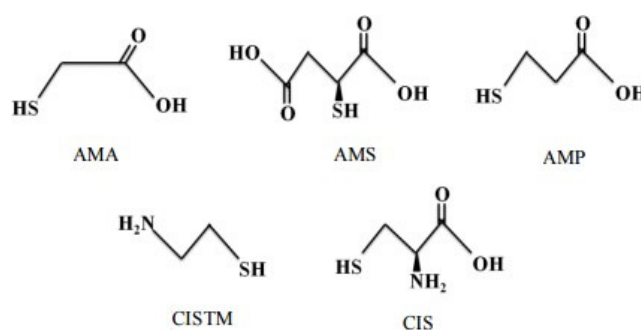
4

Fonte: Adaptado de Tabela periódica simples (<http://www.tabelaperiodicacompleta.com/>).

O crescimento de uma fina camada de sulfeto de cádmio (CdS), derivada geralmente de agentes estabilizantes contendo grupos funcionais tiol (R-SH), em PQs de CdTe é usado como uma forma de melhorar a eficiência da fluorescência e fotoestabilidade, diminuindo os defeitos da superfície (SCHREDER et al., 2000; BORCHERT et al., 2003; PENG et al., 2007; ZENG et al., 2008; YAN et al., 2011; BASLAK et al., 2014; PANKIEWICZ et al., 2015). Os estabilizantes também previnem a aglomeração, a precipitação dos nanocristais (BRUS, 1984; SANTOS; FARIAS; FONTES, 2008; FONTES et al., 2012) e podem servir como ponto de ancoragem para melhor conjugação com biomoléculas (KARAKOTI et al., 2015). A principal

classe de moléculas orgânicas usadas como estabilizantes/funcionalizantes são as moléculas de alquil-tiol como ácido mercaptopropiônico (AMP), ácido mercaptoacético (AMA), ácido mercaptosuccínico (AMS), cisteína (CIS), cisteamina (CISTM) e diferentes mercaptotíols, Figura 14 (FONTES et al., 2012).

Figura 14 - Fórmulas estruturais de alguns agentes estabilizantes: ácido mercaptoacético -AMA, ácido mercaptosuccínico -AMS, ácido 3-mercaptopropiônico -AMP, cisteamina -CISTM, cisteína - CIS.

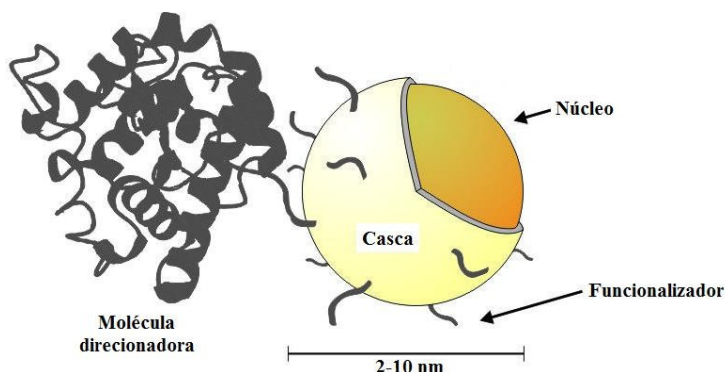


Fonte: Adaptado de CABRAL FILHO et al. (2013).

2.3.2 Bioconjugação

Muitos trabalhos apresentam o potencial dos pontos quânticos para marcação celular inespecífica (YANG et al., 2013), entretanto, o direcionamento específico se torna essencial para o entendimento de muitos fenômenos celulares. A superfície dos PQs oferece a possibilidade para ligação às múltiplas moléculas, Figura 15 (JOHNSON et al., 2014; CLAUSSEN et al., 2015; WEGNER e HILDEBRANDT, 2015), conferindo especificidade para aplicações biológicas em um processo conhecido como bioconjugação (FONTES et al., 2012).

Os estabilizantes, usados na síntese, e precursores na camada de passivação, possuem, por exemplo, terminais carboxílicos ou aminado que podem ser utilizados como pontes químicas (funcionalizadores) baseadas em ligações covalentes e não covalentes para conjugar biomoléculas. Esses terminais também podem conferir cargas (estabilizadores) negativa e positiva às nanopartículas, respectivamente (BIJU et al., 2010; DELEHANTY et al., 2012; FONTES et al., 2012; PROBST et al., 2013).

Figura 15 - Conjugação de uma biomolécula com PQ (núcleo-casca) funcionalizado.

Fonte: Adaptado de FONTES et al. (2012).

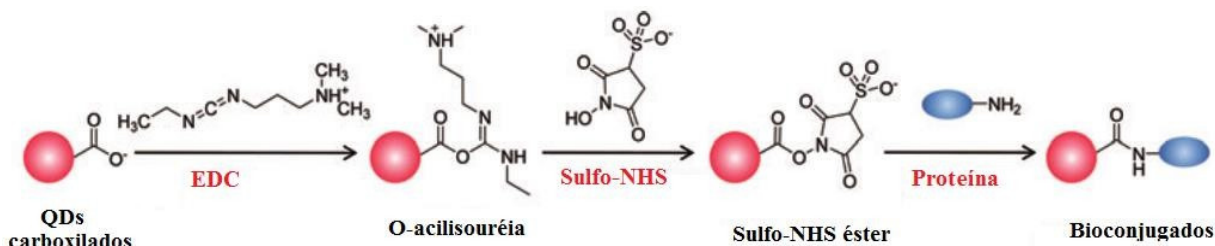
As ligações não covalentes compreendem as interações entre biomoléculas e grupos terminais expostos na superfície dos PQs, sem a necessidade de um agente químico que intermedeie a união (DELEHANTY et al., 2012; KARAKOTI et al., 2015). Exemplos de ligações não covalentes são: a) adsorção da biomolécula na superfície dos PQs, por meio, por exemplo, de interações eletrostáticas, hidrofóbicas ou de Van der Waals; b) afinidade da biotina por PQs funcionalizados com estreptavidina ou avidina; e c) afinidade de resíduos de histidina das proteínas com os PQs (GOLDMAN et al., 2002; DELEHANTY et al., 2012; PROBST et al., 2013; KARAKOTI et al., 2015).

A abordagem não covalente tem sido explorada para ligar uma variedade de proteínas como MBP (proteína que se liga a maltose) e proteína G na superfície dos PQs (SAPSFORD et al., 2006; KARAKOTI et al., 2015). Entretanto, essas estratégias para conjugação podem ser sensíveis ao pH e força iônica do meio biológico (DELEHANTY et al., 2012), como foi visto por Algar e Krull (2010) ao conjugar oligonucleotídeo a PQs (CdSe/ZnS) revestidos com ácido mercaptoacético (AMA) (KARAKOTI et al., 2015).

A bioconjugação também pode ser estabelecida por ligação covalente (BIJU; ITOH; ISHIKAWA, 2010). As principais vias para formação dessa ligação são as que ocorrem entre grupos amina-amina, pontes dissulfeto e carboxila-amina (GOLDMAN et al., 2002; PROBST et al., 2013; KARAKOTI et al., 2015). Um dos agentes de acoplamento para a formação das pontes amida é o EDC [1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)] (DONEGAN e RAKOVICH, 2013; KARAKOTI et al., 2015). Ele forma o intermediário O-acilisouréia e tem sua eficiência aumentada por meio da adição do sulfo-NHS (N-hidroxissulfosuccinamida), que age como agente estabilizante do intermediário, aumentando a eficiência da reação, Figura 16

(ANDERSON; ZIMMERMAN; CALLAHAN, 1964; STAROS, 1982; KARAKOTI et al., 2015).

Figura 16 - Conjugação covalente utilizando EDC e Sulfo-NHS.



Fonte: Adaptado de WANG et al. (2012).

Segundo Bilan e colaboradores (2015), embora exista uma ampla variedade de estratégias para bioconjugação dos PQs com biomoléculas, todas elas devem satisfazer alguns requisitos gerais:

- Minimização da interferência na atividade natural das biomoléculas após o processo de bioconjugação;
- Formação de conjugados estáveis em condições fisiológicas com considerável tempo de meia vida;
- Conjugação orientada. Os sítios de reconhecimento das moléculas na superfície devem estar expostos, permitindo a ligação a antígenos ou moléculas-alvo. A quantidade de moléculas reconhecidas na superfície deve ser controlada (HUO, 2007).

Outro importante requisito é a manutenção da propriedade fluorescente dos PQs após essa união. Embora a bioconjugação ainda permaneça sendo uma tarefa não trivial, um significativo progresso tem sido feito no desenvolvimento de vários métodos de ligação de biomoléculas a PQs (MONTENEGRO et al., 2013; BILAN et al., 2015) e estudos que buscam entender as interações entre moléculas e PQs, bem como propor melhorias nas técnicas de conjugação têm sido cada vez mais realizados.

Ding e colaboradores (2011) realizaram estudos espectroscópicos da interação termodinâmica entre BSA e PQs (CdSe/CdS) revestidos com L-cisteína. Eles verificaram que

o processo de ligação é espontâneo e que pontes de hidrogênio e interações de Van der Waals desempenham um papel importante na adsorção entre PQs e BSA.

Utilizando eletroforese capilar e espectroscopia de correlação de fluorescência, Wang e colaboradores (2012) estudaram os efeitos de certos fatores como ponto isoelétrico das macromoléculas e pH do tampão na bioconjugação. Eles verificaram que a eficiência da bioconjugação, utilizando EDC e sulfo-NHS, foi significativamente dependente dos pontos isoelétricos (pIs) das proteínas, sugerindo que a carga negativa delas significativamente reduz quando o pH do tampão está próximo do pI das proteínas, resultando na diminuição da repulsão eletrostática dos PQs e proteínas. Além disso, a reação de conjugação foi considerada rápida e os conjugados mostraram-se estáveis em tampão pH 7.4.

Em virtude dos fatos mencionados, para um direcionamento específico, além da escolha da biomolécula a ser conjugada, faz-se necessário um planejamento adequado, observando as melhores estratégias e condições para a bioconjugação. Isso visa fornecer nanossistemas estáveis em meio biológico mantendo as características essenciais dos associados para potenciais aplicações nos mais diversos fins.

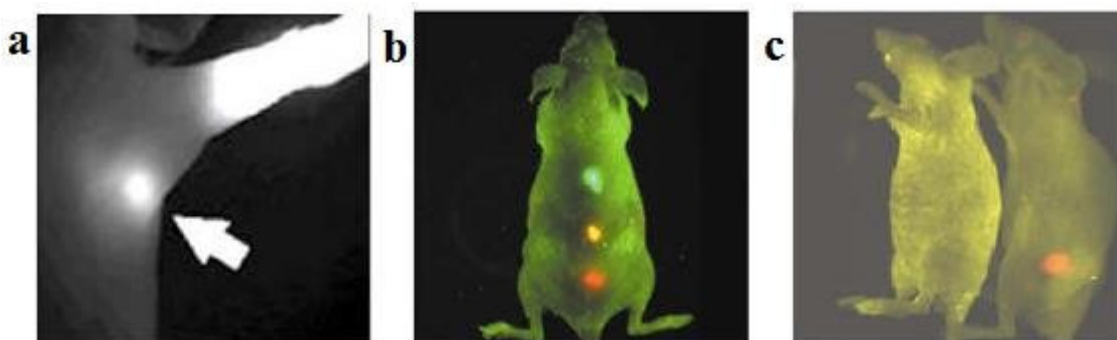
2.3.3 Pontos quânticos - sondas fluorescentes para ciências da vida

Devido às propriedades únicas dos PQs, esses nanocristais têm sido aplicados em diversas áreas, uma das mais promissoras é em estudos que visem compreender os mecanismos que promovem o surgimento, crescimento e resistência do câncer, bem como no desenvolvimento de estratégias complementares para o diagnóstico. Os PQs também têm revelado seu potencial como nanoplataformas para combinação de sua fluorescência com propriedades magnéticas e radioativas de outras nanopartículas ou estruturas químicas, podendo gerar sondas multimodais que, quando adequadamente desenhadas e combinadas com agentes terapêuticos, podem apresentar potencial teragnóstico, ao possuírem aplicações tanto para o diagnóstico como terapia (FANG et al., 2012; NGUYEN e TSIEN, 2013; VISWANATH et al., 2016; SCHROEDER; GOREHAM; NAN, 2016; WO et al., 2016; CABRERA et al., 2017).

Quando conjugados com biomoléculas, os PQs têm sido aplicados em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*. O interesse para aplicações de PQs em análises *in vivo* tem aumentado principalmente pela fotoestabilidade diferenciada dessas nanopartículas e superfície versátil para conjugação de biomoléculas. Sukhanova e colaboradores (2004) mostraram que PQs

conjugados a anticorpos são mais resistentes à fotodegradação, quando comparados com conjugados de isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina e Alexa flúor 488 (BILAN et al., 2015). Em 2013, Kwon e colaboradores também apresentaram o potencial *in vitro* e *in vivo* dos PQs conjugados ao anticorpo que reconhece receptor-2 do fator de crescimento endotelial vascular (anti-VEGFR2). Bioconjugados injetados em camundongos nudes xenotransplantados com células de câncer de próstata (PC3) apresentaram um aumento de fluorescência após 12 horas, sugerindo o potencial do bioconjugado como ferramenta de imagem mais fotoestável em estudos da angiogênese do câncer. Outra importante aplicação *in vivo* têm sido em estudos utilizando microscopia intravital (MIV), para acompanhar, de forma dinâmica, características biológicas diferenciais adquiridas pelo tumor (*hallmarks*), Figura 17 (WEGNER e HILDEBRANDT, 2015; FANG et al., 2012; ELLENBROEK e VAN RHEENEN, 2014; LAPIN et al., 2016).

Figura 17 - Diferentes tipos de marcação utilizando PQs: a) Marcação de linfonodos sentinelas; b) Imagem de PQs multicoloridos encapsulados em microesferas e injetados no rato vivo. c) Imagem do câncer de próstata.



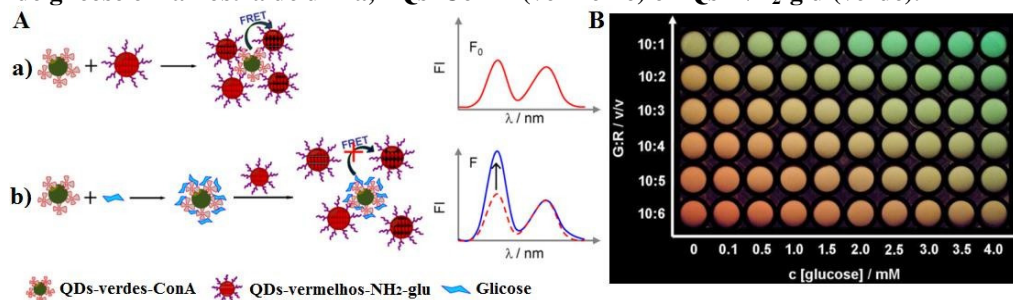
Fonte: Adaptado de GAO et al., 2005.

Diante da potencial aplicação dos PQs, muitos estudos têm avaliado a toxicidade dessas nanopartículas. PQs livres de metais pesados, como baseados em Zn, têm sido sintetizados como alternativas para aplicações *in vivo*, entretanto, eles ainda apresentam limitações das propriedades ópticas, o que realça a necessidade de novos estudos visando sua otimização (FONTES et al. 2012). Em geral, os efeitos tóxicos dos PQs dependem de muitos parâmetros, como sua composição, concentração, revestimento de superfície, o tipo de sistema e interação com o mesmo (WEGNER e HILDEBRANDT, 2015). Além disso, há uma aparente discrepância de sensibilidade entre diferentes células ao meio em que elas são incubadas, tão bem como diferenças na sua capacidade antioxidante (DIAZ et al., 2008, SOENEN et al., 2014).

PQs também têm sido explorados em outras áreas, como na fenotipagem sanguínea. Cabral Filho e colaboradores (2015) mostraram que PQs conjugados com a lectina UEA (*Ulex europaeus* I), anti-A e anti-B podem ser relevantes ferramentas na quantificação e entendimento do padrão de antígenos na superfície dos eritrócitos do grupo ABO e sub-grupo A.

Muitos trabalhos têm voltado a atenção para o desenvolvimento de biossensores utilizando PQs, principalmente para detecção de níveis de glicose no sangue e urina (WANG et al., 2010; HU et al., 2012). Hu e colaboradores desenvolveram uma plataforma baseada na inibição de um fenômeno conhecido como FRET, do inglês *Fluorescence resonance energy transfer*, que ocorre entre o PQ conjugado à lectina e o PQ conjugado ao carboidrato. Através da diferença de fluorescência emitida antes e após a incubação nos diferentes meios contendo a glicose, foi possível quantificar esse carboidrato com um limite de detecção de $0,03 \text{ mmol L}^{-1}$. Dessa forma, eles apresentaram um relevante biossensor para detecção de glicose, inclusive a nível visual, com limite de detecção de aproximadamente $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, Figura 18.

Figura 18 - Biosensor para detecção de glicose em amostras de sangue e urina. A- Mecanismo de transferência de energia ressonante (FRET). a) FRET entre PQs-lectina (QDs-ConA) e PQs-carboidrato (QDs-NH₂-glu); b) Inibição de FRET após incubação em meios contendo glicose. B- Quantificação visual do nível de glicose em amostra de urina, PQs-Con A (vermelho) e PQs-NH₂-glu (verde).

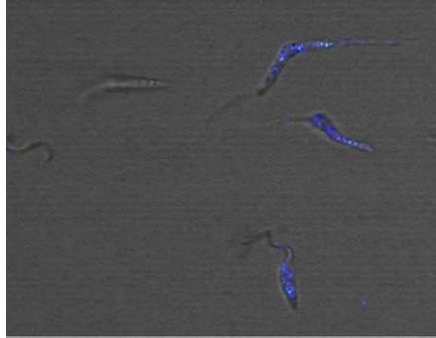


Modificado de Hu et al. (2012).

Outras interessantes aplicações são (i) no desenvolvimento de uma plataforma de captura e imagem do vírus HIV obtidos do sangue total de pacientes soropositivos que pode facilitar o monitoramento de doenças infecciosas (KIM et al., 2009); (ii) na investigação de perfil glicídico em micro-organismos como *Candida albicans* (TENÓRIO et al., 2015); (iii) na detecção de bactérias de interesse na saúde pública como a *Serratia marcescens* (EBRAHIM et al., 2015), *Escherichia coli* (CARRILLO-CARRION et al., 2011) e *Salmonella typhimurium* (WANG et al., 2011) e (iv) em estudos de interação do protozoário *Trypanosoma cruzi* com seu hospedeiro primário, Figura 19 (FEDER et al., 2012). Dessa

forma, PQs apresentam-se como importantes sondas fluorescentes que auxiliam diversas áreas das ciências da vida.

Figura 19 - *Trypanosoma cruzi* marcados com PQs conjugados à lectina SNA.



Modificado de Feder et al. (2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver bioconjugados baseados em pontos quânticos e Cramoll para estudar o perfil de carboidratos em sistemas biológicos.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Investigar as principais estratégias encontradas na literatura para conjugar pontos quânticos às lectinas ou carboidratos e suas aplicações biológicas e compilar e discutir os dados em forma de artigo de revisão;
- ✓ Obter a lectina Cramoll 1,4 da planta de *Cratylia mollis* por metodologia já estabelecida;
- ✓ Sintetizar PQs de CdTe funcionalizados/estabilizados com o ácido mercaptosuccínico (AMS);
- ✓ Estabelecer um protocolo eficiente de conjugação de Cramoll aos PQs avaliando processos de adsorção e ligação covalente;
- ✓ Caracterizar os conjugados quanto a parâmetros físico-químicos e biológicos;
- ✓ Aplicar os conjugados para o estudo da expressão de glicose / manose em células HeLa;
- ✓ Avaliar o potencial leishmanicida de Cramoll e investigar a expressão de glicose / manose em células de *Leishmania braziliensis* utilizando PQ-Cramoll.

4 MANUSCRITO 1

Artigo publicado no **BBA General Subjects**

Pergunta condutora: *Quais as principais aplicações de lectinas e carboidratos conjugados a pontos quânticos?*



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - General Subjects

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

Review

Biomedical applications of glyconanoparticles based on quantum dots

C.R.A. Cunha^{a,b,f}, A.D.P.R. Oliveira^{a,f}, T.V.C. Firmino^{c,g}, D.P.L.A. Tenório^a, G. Pereira^d, L.B. Carvalho Jr.^c, B.S. Santos^e, M.T.S. Correia^b, A. Fontes^{a,*}^a Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil^b Departamento de Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil^c Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil^d Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil^e Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil^f Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil^g Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Quantum dots
Lectin
Carbohydrate
Glycobiology
Fluorescence

ABSTRACT

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

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

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

1. Introduction

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

Carbohydrates are one of the fundamental classes of biomolecules, together with proteins, lipids and nucleic acids. Thus, their study can help to understand the cell biology and to develop new therapeutic and diagnostic approaches. Carbohydrates are present in all cell membranes

and walls. Many biological processes, such as cell adhesion, cancer metastasis, immune response and intracellular trafficking are guided by carbohydrate-protein interactions [2]. These versatile molecules act as important mediators in endocytosis processes [4], intercellular interaction or between cells and extracellular matrix [5,6], adhesion and cell growth [7,8], fertilization [9], and also interactions between pathogen and host [10].

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

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

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

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.11.010>

Received 31 May 2017; Received in revised form 1 November 2017; Accepted 5 November 2017
Available online 07 November 2017

0304-4165/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

5 MANUSCRITO 2

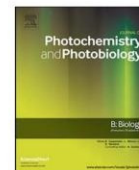
Artigo publicado no **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**.

Pergunta condutora: *Como estabelecer uma conjugação efetiva de Cramoll a pontos quânticos?*



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

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

Quantum dot–Cramoll lectin as novel conjugates to glycobiology



Cássia R.A. Cunha^{a,b}, Camila G. Andrade^{a,c}, Maria I.A. Pereira^a, Paulo E. Cabral Filho^a,
Luiz B. Carvalho Jr.^c, Luana C.B.B. Coelho^b, Beate S. Santos^d, Adriana Fontes^{a,*},
Maria T.S. Correia^{b,**}

^a Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420 Recife, Brazil

^c Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, 50740-120 Recife, Pernambuco, Brazil

^d Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-120 Recife, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Nanoparticles
Bioconjugation
Fluorescence
Glycoconjugate
Proteins

ABSTRACT

The optical properties of quantum dots (QDs) make them useful tools for biology, especially when combined with biomolecules such as lectins. QDs conjugated to lectins can be used as nanoprobes for carbohydrate expression analysis, which can provide valuable information about glycosylation changes related to cancer and pathogenicity of microorganisms, for example. In this study, we evaluated the best strategy to conjugate Cramoll lectin to QDs and used the fluorescent labeling of *Candida albicans* cells as a proof-of-concept. Cramoll is a mannose/glucose-binding lectin with unique biological properties such as immunomodulatory, antiparasitic, and antitumor activities. We probed covalent coupling and adsorption as conjugation strategies at different pH values. QDs conjugated to Cramoll at pH 7.0 showed the best labeling efficiency in the fluorescence microscopy analysis. Moreover, QD-Cramoll conjugates remained brightly fluorescent and preserved identical biological activity according to hemagglutination assays. Flow cytometry revealed that approximately 17% of *C. albicans* cells were labeled after incubation with covalent conjugates, while approximately 92% of cells were labeled by adsorption conjugates (both at pH 7.0). Inhibition assays confirmed QD-Cramoll specificity, which reduced the labeling to at most 3%. Therefore, the conjugates obtained by adsorption (pH 7.0) proved to be promising and versatile fluorescent tools for glycobiology.

1. Introduction

Carbohydrate expression profiles in biological systems have shown to be associated with pathogenic microorganisms and their drug resistance [1,2], as well as with diseases, such as cancer, making studies related to glycobiology quite relevant [3]. The specific recognition of glycidic residues by lectins make these proteins, of non-immune origin [4], important tools to elucidate the role of carbohydrates in the progress and maintenance of a variety of biological processes.

The association of fluorescence-based techniques with nanotechnology has allowed the development of novel nanoprobes, such as quantum dots (QDs), to investigate carbohydrate expression profiles with high sensitivity and specificity. QDs have shown great potential for biological research due to their unique physicochemical properties, especially their exceptional resistance to photobleaching and their active surface, which enables conjugation with a large variety of

biomolecules, such as the lectins, which are proteins that bind specifically and reversibly to carbohydrates [5–8].

QDs conjugated to lectins have already been used to characterize and identify carbohydrate rich structures in blood, tissues, and cells [2,9,10]. Moreover, some authors have also applied QDs in optical and electrochemical biosensors [3,11,12], providing valuable information for glycobiology. For example, Tenório and co-workers reported the conjugation of Concanavalin A (ConA) lectin to cadmium telluride (CdTe) QDs for investigating microbial infections and monitoring their pathogenicity [2].

Cramoll is a mannose/glucose-binding lectin extracted from the plant *Cratylia mollis*, which belongs to the same family as ConA and shares similar structural characteristics and comparable carbohydrate recognition [13]. When compared to ConA, studies have demonstrated that Cramoll has a higher immunomodulatory effect and an improved ability to induce IL-6, IL-17A, IL-22, and IL-23 cytokine production in

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

** Correspondence to: M. T. S. Correia, Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Laboratório de Glicoproteínas, UFPE, 50670-420 Recife, PE, Brazil.

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

<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.10.020>

Received 2 June 2017; Received in revised form 22 October 2017; Accepted 24 October 2017

Available online 25 October 2017

1011-1344/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

6 MANUSCRITO 3

Artigo a ser submetido à revista *Micron*

Pergunta condutora: *O conjugado PQ-Cramoll pode ser uma ferramenta para auxiliar à glicobiologia do câncer?*

ORIGINAL RESEARCH

Quantum Dot-Cramoll Lectin for Carbohydrate Investigation in HeLa Cells

Cássia R. A. Cunha^{1,2}, Maria E. T. Carvalho^{1,2}, Camila A. P. Monteiro¹, Paulo E. Cabral Filho¹, Luana C. B. B. Coelho², Beate S. Santos³, Adriana Fontes^{1,*}, †, Maria T. S. Correia^{2,*}, †

¹ Biophysics and Radiobiology Department, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

² Biochemistry Department, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

³ Pharmaceutical Science Department, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

*Corresponding authors: Adriana Fontes, Av. Prof. Moraes Rego, S/N. Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro de Biociências, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil - Phone: +55 81 21267818, e-mail: adriana.fontes.biofisica@gmail.com; Maria Tereza dos Santos Correia, Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Laboratório de Glicoproteínas, UFPE, 50670-420, Recife, PE, Brazil. Phone: + 55 81 2126854, e-mail: mtscorreia@gmail.com.

†These authors have contributed equally to this work.

E-mail addresses:

cassia.ufpe@hotmail.com (Cássia R. A. Cunha), eduarda_carvalho1@hotmail.com (Maria E. T. Carvalho), camila.apm@hotmail.com (Camila A. P. Monteiro), pauloeuzebio03@hotmail.com (Paulo E. Cabral Filho), lcbcoelho@gmail.com (Luana C. B. B. Coelho), beate_santos@yahoo.com.br (Beate S. Santos), adriana.fontes.biofisica@gmail.com (Adriana Fontes), mtscorreia@gmail.com (Maria T. S. Correia).

ABSTRACT

Changes in glycosylation may play an important role in pathological processes such as cancer. Lectins have been used as tools to bring a deeper understanding of cancer cell glycobiology and, when conjugated to fluorescent labels such as quantum dots allow long-term studies of biological events, with highly sensitive and biochemical specificity, with the aim of understanding the role of biomolecules in different biological processes. In this study, we used the QD-Cramoll conjugates to investigate the carbohydrate profile in HeLa cells. Microscopic analyses showed that QD-Cramoll conjugates were able to label HeLa cells, revealing a surface rich in glucose/mannose residues. The labeling specificity was

corroborated by the specific carbohydrate inhibition assay (methyl α -D-mannopyranoside), which lead to a significant decrease in the labeling of HeLa cells membrane. On the other hand, it was also observed a slightly vesicular labeling in the cytoplasm with a typical pattern of endocytosis. The specificity of the conjugates was also confirmed by the saturation assay using free lectin, for which no labeling was observed. Thus, QD-Cramoll conjugates are versatile and specific tools that can be used to open new perspectives for cancer glycobiology studies as well as to be applied to track the pathway of the therapeutic action of this lectin.

Keywords: semiconductor nanocrystals, protein, glycobiology, cancer.

INTRODUCTION

Glycans are macromolecules essential for cellular and tissue homeostasis. Thus, changes in glycosylation, caused by glycosyltransferase and/or glycosidase dysfunctions, may play an important role in pathological processes such as cancer, being related to events such as proliferation, invasion, metastasis, and tumor angiogenesis (Fuster and Esko, 2005; Tang et al., 2015; Varki, 2017; Vasconcelos-Dos-Santos et al., 2015). Abnormal carbohydrate profiles are candidates as cancer biomarkers and their biosynthesis has become a target for the development of antitumor therapies (Vasconcelos-Dos-Santos et al., 2015).

As an alternative, lectins have been used as tools to bring a deeper understanding of cancer cell glycobiology. Lectins are proteins of non-immune origin native in plants, animals, and microorganisms, capable of recognizing carbohydrates in a specific and reversible manner (Van Breedam et al., 2014; Van Damme et al., 1998). These proteins have been employed to investigate changes in the glycidic profile that occur on the cell membrane surface during physiological and pathological processes such as cancer (Andrade et al., 2013; Avelino et al., 2014; Fuster and Esko, 2005; Sharon, 2004). In addition, some lectins can induce the death of tumor cells, making the study of lectin-carbohydrate interactions an important step for cancer biology comprehension, development of new diagnostic methodologies and prospection of new therapeutic approaches (Lichtenstein and Rabinovich, 2013).

The isolectins 1 and 4, extracted from the vegetable *Cratylia mollis* Mart. found in semi-arid regions of northeastern Brazil, are widely investigated for their several biological activities. Cramoll 1,4 binds to glucose/mannose and has been shown to be a notorious immunomodulatory agent, antiparasitic, healing, free radical scavenger, in the development of biosensors, and elucidation of glycogen alterations in cancer cells (Da Silva et al., 2015; Fernandes et al., 2010; Pereira et al., 2012; Albuquerque et al., 2016; Silva et al., 2015; Avelino et al., 2014; Lima et al., 2010).

Beltrão et al. (1998) and co-workers verified that Cramoll 1 was efficient to differentiate the labeling of normal and transformed mammary tissues, using the chromogen diaminobenzidine (DAB) with hydrogen peroxide. A similar procedure was applied to prostate tissues, which showed that Cramoll 1,4 also labeled more intensely hyperplastic tissues when compared to normal ones (Lima et al., 2010). The therapeutic potential of

Cramoll 1,4 to inhibit the growth of Sarcoma 180 *in vivo* was also verified (Andrade et al., 2004), as well as with its recombinant form (rCramoll) (Cunha et al., 2016).

Despite the potential of Cramoll, labels are needed not only to apply this lectin to localize and evaluate the glucose/mannose pattern but also to elucidate its action on the biological systems. The combination of fluorescent probes and biomolecules allow real-time studies of biological events, with high sensitivity and biochemical specificity, with the aim of understanding the role of biomolecules in different biological processes. Quantum dots are fluorescent semiconductor nanocrystals that have an active surface for conjugation with biomolecules and high photostability, making them important tools to cell biology comprehension (Fischer and Kissel, 2001; Zhou et al., 2015). In (2018), Cunha and co-workers showed an efficient strategy to conjugate Cramoll 1,4 lectin to CdTe QDs with potential to be applied in several fields of glycobiology. Therefore, the aim of this present study was to use these conjugates to reveal glucose/mannose expression on the surface of human cervical epithelial carcinoma (HeLa) cells. We believe that these conjugates are promising tools to investigate alterations in the expression of glycoproteins present on the cancer cell membrane surface, which can help to improve the understanding of the cell biology of this disease (Andrade et al., 2013).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Synthesis and characterization of quantum dots

CdTe QDs were synthesized in an aqueous medium using MSA (mercaptosuccinic acid) as stabilizing/functionalizing agent, according to a well-established methodology (Cabral Filho et al., 2015). Briefly, metallic tellurium was reduced to Te^{2-} using NaBH_4 under inert atmosphere (N_2). Thereafter, telluride ions were added to a solution of Cd^{2+} /MSA at a high pH (pH >10) and kept in constant stirring and heating (~90 °C) for 8 h. QDs were synthesized in a molar ratio of 5:1:6 (Cd:Te:MSA) and characterized by emission and absorption spectroscopies using a spectrofluorometer LS55 (PerkinElmer) and a spectrophotometer UV-Vis 1800 (Shimadzu), respectively.

Purification and dosage of Cramoll 1,4

The Cramoll 1,4 (from now on named as Cramoll) lectin was extracted from seeds of *Cratylia mollis* and purified using Sephadex G-75 affinity chromatography according to a

well-established protocol (Correia and Coelho, 1995). The Pierce™ Kit, BCA Protein Assay - Thermo Fisher Scientific was used for protein dosage.

Preparation and characterization of QD-Cramoll and confirmation of the bioconjugation

The conjugate was obtained using the protocol established according to Cunha et al., 2018. For this, an aliquot (10 μL , 28 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of Cramoll was incubated with QDs (1 mL, 7 μM) at pH 7.0 under slow stirring for 2 h at 25 °C. The conjugate was also characterized by emission and absorption spectroscopies. The conjugation was confirmed by analyzing the labeling of *Candida albicans* cells. Moreover, the maintenance of the ability of the lectin bind to carbohydrates, even after the conjugation process, was evaluated by hemagglutination assay (HA). Both procedures (conjugation and HA) were performed according to Cunha et al. (2018).

HeLa cell culture

HeLa cells (human cervical epithelial carcinoma) were cultured with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing high glucose concentration (Sigma Aldrich). The culture medium contained 100 units·mL⁻¹ penicillin, 100 mg·mL⁻¹ streptomycin (Sigma Aldrich), and 10% of fetal bovine serum (FBS-Gibco) in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C. When cells reached 80 – 90% confluence, they were trypsinated (0.25% trypsin in dissociation buffer – Gibco). Finally, cells were placed in a 4-well plate (5 x 10⁴ cells/well – Thermo Scientific™ BioLite) for 24 h.

Cells labeling

Cells adhered to the 4-well plate were washed with PBS 1X and incubated for 30 min at 37 °C according to following: (I) control (without conjugates) and (II) cells with QD-Cramoll conjugates (1:25 v/v). After the incubation time, the systems were washed twice with PBS. Then, they were incubated with Hoechst 33258 nuclear dye (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ at final concentration) for 5 min at 37 °C. Finally, the systems were also washed twice with PBS and analyzed by fluorescence microscopy using the excitation band-pass (BP) filter 560/40 and the emission BP filter 645/75 nm (Leica Microscopy DMI 4000B). We assessed the specificity of labeling using the inhibition and saturation assays prior to cell labeling. For the inhibition, the conjugates were previously incubated with the specific carbohydrate (methyl α -D-mannopyranoside) at 0.4 M for 30 min at 25 °C, following by the incubation with the cells.

For the saturation assay, cells were previously incubated with an excess of lectin free ($54\mu\text{g.mL}^{-1}$) for 30 min at 37°C , and then incubated with the conjugates (1:25 v/v).

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis and characterization of quantum dots

Using the molar extinction coefficient provided by Yu and co-workers (2003) and the Lambert-Beer law, the concentration of QDs obtained was estimated as approximately $7\mu\text{M}$. The nanoparticles had a maximum emission at 631 nm, with approximately 54 nm of full width at a half maximum (FWHM). The diameter of the QD of approximately 3.3 nm was estimated using the first maximum of the absorption ($\lambda = 580\text{ nm}$) spectrum (Dagtepe et al., 2007; Rogach et al., 2007).

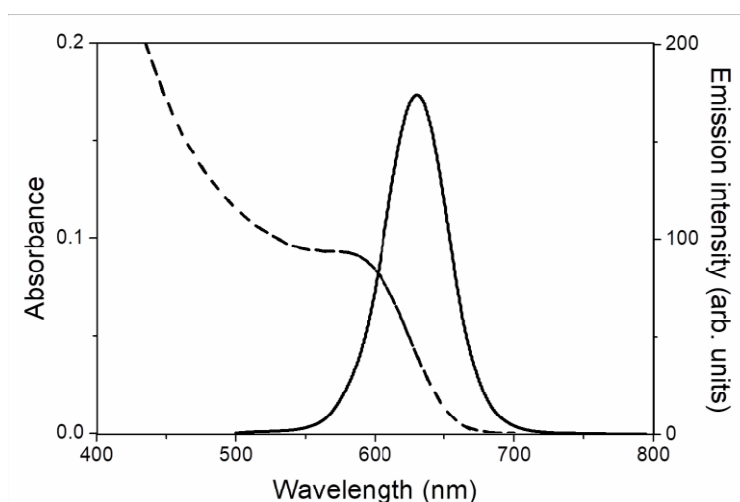


Fig. 1. CdTe QD absorption (dashed line) and emission (filled line) spectra, $\lambda_{\text{exc}} = 488\text{ nm}$.

Purification and dosage of Cramoll 1,4

The purified concentration of vegetable lectin was 9.5 mg.mL^{-1} ($R^2 = 0.9964$) with 53.7 HU.mg^{-1} of specific hemagglutinating activity.

Bioconjugate characterization

The hemagglutinating activity was evaluated before and after the conjugation to verify if the biological activity was maintained. After the conjugation process, the hemagglutination capacity of Cramoll was not altered (512^{-1}). There was no significant change in the absorption

spectrum of the conjugate when compared to the bare Qs (data not shown). Despite the decrease in fluorescence intensity (Figure 2), the conjugate remained highly fluorescent, as can be observed in fluorescence microscopy images (Cunha et al., 2018).

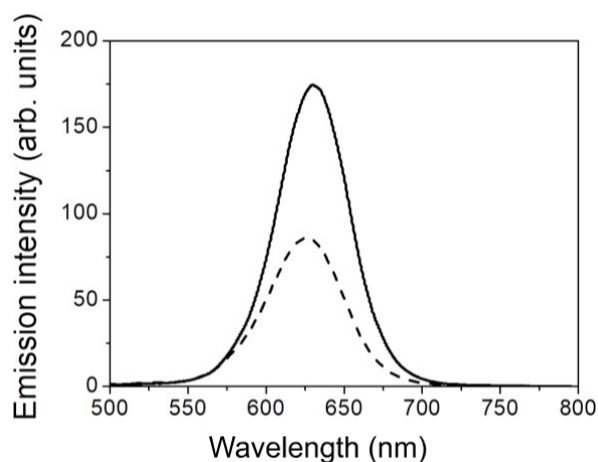


Fig. 2. Emission spectra of QD-Cramoll and QDs bare. QDs bare (filled line) and QD-Cramoll (dashed line). $\lambda_{exc} = 488$ nm.

The labeling of *C. albicans* cells is a simple and rapid method to evaluate the conjugation of Cramoll in QDs, since their cell wall is rich in carbohydrates, especially chitin, β -glycans, and mannoproteins (Ruiz-Herrera et al., 2006; Tenório et al., 2015). Intense labeling on the surface of *C. albicans* cells indicated that the conjugation of Cramoll to CdTe QDs was efficient, Figure 3.

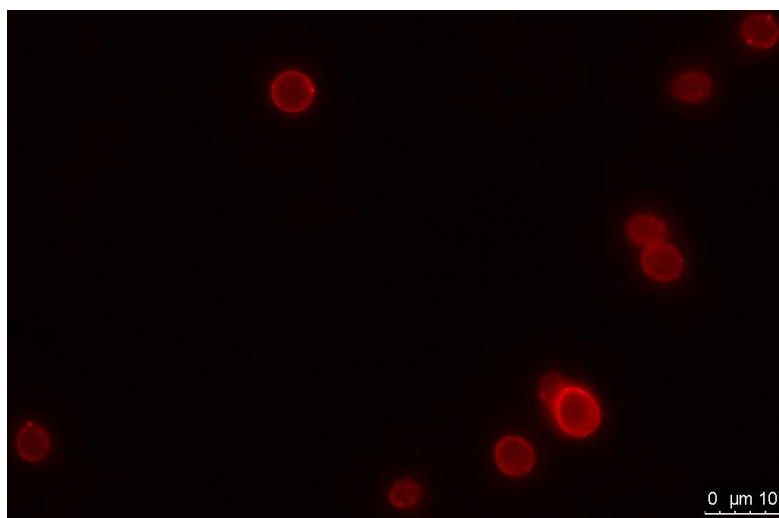


Fig. 3. *Candida albicans* cells labeled with QD-Cramoll. Scale bar: 10 μ m.

HeLa cells labeling

The ability to label differentially normal and transformed breast (Beltrão et al., 1998) and prostate (Lima et al., 2010) tissues motivated further studies using Cramoll to evaluate the expression of these carbohydrates in other tumor lines. Figure 4A shows the typical membrane-labeling pattern promoted by QDs-Cramoll conjugates. Cramoll 1.4 conjugated to QDs was able to label HeLa cells, revealing a surface rich in glucose/mannose residues. Moreover, after 30 min of incubation, there was no signal of cell internalization of the conjugate.

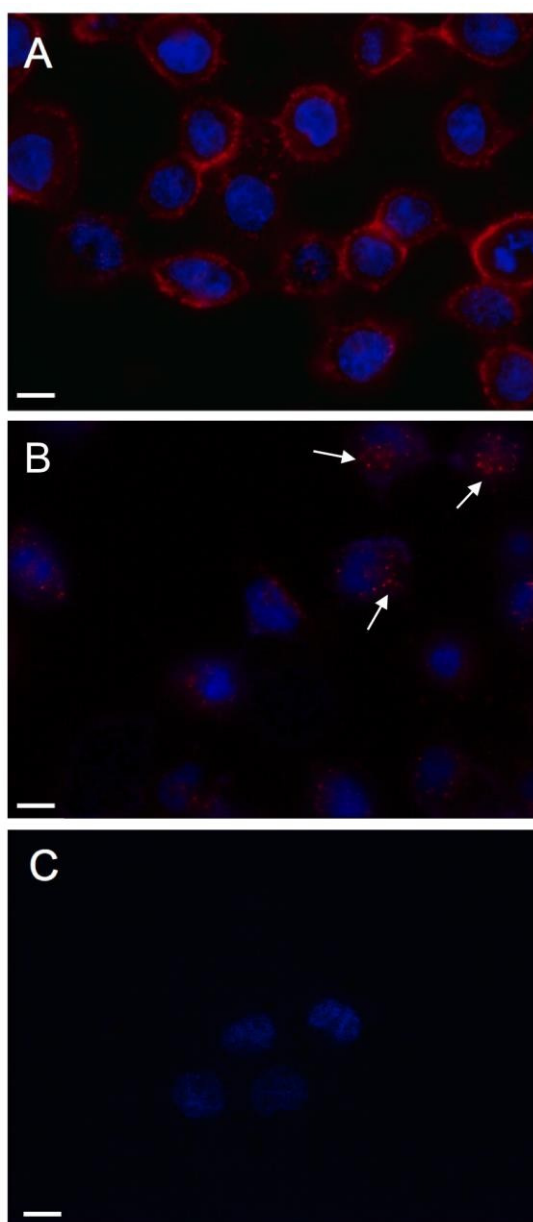


Fig. 4 Labeling HeLa cells: (A) HeLa cells incubated with QD-Cramoll; (B) HeLa cells incubated with QD-Cramoll inhibited; (C) HeLa cells incubated with QD-Cramoll saturated previously with the lectin. Scale bar: 25 μm .

The labeling specificity was corroborated by the specific carbohydrate inhibition assay (methyl α -D-mannopyranoside), which lead to a significant decrease in the labeling of HeLa cells (Fig. 4B). The specificity of the conjugates was also confirmed by the saturation assay, for which no labeling was observed (Fig. 4C).

However, interestingly, when cells were incubated with the inhibited conjugates, a slightly vesicular labeling in the cytoplasm was noted, revealing a typical pattern of endocytosis, quite distinct from Fig. 4A. The internalization of QD-Cramoll-(mannose) conjugates may be mediated by membrane glucose receptors. Due to the high metabolic rate, cancer cells consume a large amount of glucose (Hay, 2016). However, other carbohydrates such as mannose can also be internalized by means of glucose transporters, as is the case of GLUT 1 and 3 transporters (Calvo et al., 2010). These transporters have been found to be highly expressed in many cancer lineages, being one of the routes explored for therapy and diagnosis (Altenberg and Greulich, 2004; Calvaresi and Hergenrother, 2013; Calvo et al., 2010; Kim et al., 2012).

Thus, these results show that QD-Cramoll bioconjugates are a promising tool to map the route of this lectin action and monitor possible changes in the glycidic profile in HeLa cells, which also motivates the use of these conjugates to investigate the glucose expression in other cancer lines.

CONCLUSIONS

In this work, microscopic analyzes showed not only that QD-Cramoll conjugates were able to reveal the rich mannose and glucose structure on HeLa cells membrane, but also the different targeting that these conjugates can have, before and after inhibition, in cell biology. Thus, QD-Cramoll conjugates are promising and specific tools that can be used to open new perspectives for cancer glycobiology studies as well as to be applied to track the pathway of the therapeutic action of this lectin.

REFERENCES

- Afonso-Cardoso, S.R., Rodrigues, F.H., Gomes, M.A.B., Silva, A.G., Rocha, A., Guimaraes, A.H.B., Candeloro, I., Favoreto, S., Ferreira, M.S., de Souza, M.A., 2007. Protective effect of lectin from *Synadenium carinatum* on *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. *The Korean journal of parasitology* 45, 255–266. <https://doi.org/10.3347/kjp.2007.45.4.255>
- Albuquerque, P.B.S., Silva, C.S., Soares, P.A.G., Barros, W., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Teixeira, J.A., Carneiro-da-Cunha, M.G., 2016. Investigating a galactomannan gel obtained from *Cassia grandis* seeds as immobilizing matrix for Cramoll lectin. *International Journal of Biological Macromolecules* 86, 454–461. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.107>
- Altenberg, B., Greulich, K.O., 2004. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics* 84, 1014–1020. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.08.010>
- Andrade, A.F.B., Saraiva, E.M.B., 1999. Lectin-binding properties of different *Leishmania* species. *Parasitology research* 85, 576–81.
- Andrade, C.A.S., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Nascimento, S.C., Santos-Magalhães, N.S., 2004. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 278, 435–445. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.03.028>
- Andrade, C.G., Filho, P.E.C., Tenório, D.P.L., Santos, B.S., Beltrão, E.I.C., Fontes, A., Carvalho, L.B., 2013. Evaluation of glycophenotype in breast cancer by quantum dot-lectin histochemistry. *International Journal of Nanomedicine* 8, 4623–4629. <https://doi.org/10.2147/IJN.S51065>
- Astelbauer, F., Walochnik, J., 2011. Antiprotozoal compounds: state of the art and new developments. *International Journal of Antimicrobial Agents* 38, 118–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.03.004>
- Avelino, K.Y.P.S., Andrade, C.A.S., de Melo, C.P., Nogueira, M.L., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Oliveira, M.D.L., 2014. Biosensor based on hybrid nanocomposite and CramoLL lectin for detection of dengue glycoproteins in real samples. *Synthetic Metals* 194, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2014.05.001>
- Avelino, K.Y.P.S., Andrade, C.A.S., De Melo, C.P., Nogueira, M.L., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Oliveira, M.D.L., 2014. Biosensor based on hybrid nanocomposite and CramoLL lectin for detection of dengue glycoproteins in real samples. *Synthetic Metals* 194, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2014.05.001>
- Ayesta, C., Argüello, C., Hernández, A.G., 1985. *Leishmania braziliensis*: Pathogenic Cell Surface Differences in Promastigotes and Nonpathogenic Strains. *Experimental Parasitology* 59, 185–191.
- Beltrão, E.I., Correia, M.T., Figueredo-Silva, J., Coelho, L.C., 1998a. Binding evaluation of Isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Applied biochemistry and biotechnology* 74, 125–34.
- Beltrão, E.I., Correia, M.T., Figueredo-Silva, J., Coelho, L.C., 1998b. Binding evaluation of Isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Applied biochemistry and biotechnology* 74, 125–34. <https://doi.org/10.1007/BF02825961>

- Cabral Filho, P.E., Cardoso, A.L.C., Pereira, M.I.A., Ramos, A.P.M., Hallwass, F., Castro, M.M.C.A., Gerales, C.F.G.C., Santos, B.S., Pedroso de Lima, M.C., Pereira, G.A.L., Fontes, A., 2015. Cdte quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells. *Biochimica et biophysica acta* 1860, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.09.021>
- Calvaresi, E.C., Hergenrother, P.J., 2013. Glucose conjugation for the specific targeting and treatment of cancer. *Chemical science (Royal Society of Chemistry: 2010)* 4, 2319–2333. <https://doi.org/10.1039/C3SC22205E>
- Calvo, M.B., Figueroa, A., Pulido, E.G., Campelo, R.G., Aparicio, L.A., 2010. Potential role of sugar transporters in cancer and their relationship with anticancer therapy. *International Journal of Endocrinology* 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/205357>
- Camargo, L.B., Langoni, H., 2006. Impact of leishmaniasis on public health. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 12, 527–548. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992006000400002>
- Cassado, A. dos A., de Albuquerque, J.A.T., Sardinha, L.R., de Buzzo, C.L., Faustino, L., Nascimento, R., Ghosn, E.E.B., Lima, M.R., Alvarez, J.M.M., Bortoluci, K.R., 2011. Cellular renewal and improvement of local cell effector activity in peritoneal cavity in response to infectious stimuli. *PLoS ONE* 6, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022141>
- Cavalcante, T.T.A., Firmino, N.S., Tajra, F.S., Andrade, C.R. De, Costa, R.A., 2014. Plant lectins as alternative tools against bacterial biofilms. *African Journal of Microbiology Research* 8, 2555–64. <https://doi.org/10.5897/AJMR2014.6710>
- Chaves, C.R., Fontes, A., Farias, P.M.A., Santos, B.S., de Menezes, F.D., Ferreira, R.C., Cesar, C.L., Galembeck, A., Figueiredo, R.C.B.Q., 2008. Application of core-shell PEGylated CdS/Cd(OH)₂ quantum dots as biolabels of *Trypanosoma cruzi* parasites. *Applied Surface Science* 255, 728–730. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2008.07.035>
- Coelho, L.C.B.B., Silva, P.M.D.S., Lima, V.L.D.M., Pontual, E.V., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H., Correia, M.T.D.S., 2017. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1594074>
- Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., 1995. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* mart. (Camaratu Bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 55, 261–273. <https://doi.org/10.1007/BF02786865>
- Cunha, C.R.A. da, Silva, L.C.N. da, Almeida, F.J.F., Ferraz, M.S., Varejão, N., Cartaxo, M.F. de S., Miranda, R. de C.M. de, Aguiar, F.C.A. de, Santos, N.P. da S., Coelho, L.C.B.B., Santos-Magalhães, N.S., Correia, M.T. dos S., 2016. Encapsulation into Stealth Liposomes Enhances the Antitumor Action of Recombinant *Cratylia mollis* Lectin Expressed in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01355>
- Cunha, C.R.A., Andrade, C.G., Pereira, M.I.A., Cabral Filho, P.E., Carvalho, L.B., Coelho, L.C.B.B., Santos, B.S., Fontes, A., Correia, M.T.S., 2018. Quantum dot–Cramoll lectin as novel conjugates to glycobiology. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 178, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.10.020>
- Cunha, C.R.A., Andrade, C.G., Pereira, M.I.A., Cabral Filho, P.E., Carvalho, L.B., Coelho,

- L.C.B.B., Santos, B.S., Fontes, A., Correia, M.T.S., 2018a. Quantum dot–Cramoll lectin as novel conjugates to glycobiology. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 178, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.10.020>
- Cunha, C.R.A., Oliveira, A.D.P.R., Firmino, T.V.C., Tenório, D.P.L.A., Pereira, G., Carvalho, L.B., Santos, B.S., Correia, M.T.S., Fontes, A., 2018b. Biomedical applications of glyconanoparticles based on quantum dots. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1862, 427–439. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.11.010>
- Da Silva, L.C.N., Alves, N.M.P., De Castro, M.C.A.B., Higino, T.M.M., Da Cunha, C.R.A., Pereira, V.R.A., Da Paz, N.V.N., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.D.S., De Figueiredo, R.C.B.Q., 2015. PCramoll and rCramoll as New Preventive Agents against the Oxidative Dysfunction Induced by Hydrogen Peroxide. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/520872>
- Dagtepe, P., Chikan, V., Jasinski, J., Leppert, V.J., 2007. Quantized growth of CdTe quantum dots; observation of magic-sized CdTe quantum dots. *Journal of Physical Chemistry C* 111, 14977–14983. <https://doi.org/10.1021/jp072516b>
- De Melo, C.M.L., Paim, B.A., Zecchin, K.G., Morari, J., Chiaratti, M.R., Correia, M.T.S., Barroso Coelho, L.C.B., Paiva, P.M.G., 2010. Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels, and cytokine expression in treated spleen cells of rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 342, 163–169. <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0480-z>
- Diaz, J.R., Ramírez, C.A.R., Nocua, P.A., Guzman, F., Requena, J.M., Puerta, C.J., 2018. Dipeptidyl peptidase 3, a novel protease from *Leishmania braziliensis*. *PLoS ONE* 13, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190618>
- Fernandes, M.P., Inada, N.M., Chiaratti, M.R., Araújo, F.F.B., Meirelles, F. V., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Alves, M.J.M., Gadelha, F.R., Vercesi, A.E., 2010a. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 42, 69–78. <https://doi.org/10.1007/s10863-010-9268-9>
- Fernandes, M.P., Inada, N.M., Chiaratti, M.R., Araújo, F.F.B., Meirelles, F. V., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Alves, M.J.M., Gadelha, F.R., Vercesi, A.E., 2010b. Mechanism of *trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 42, 69–78. <https://doi.org/10.1007/s10863-010-9268-9>
- Fischer, D., Kissel, T., 2001. Histochemical characterization of primary capillary endothelial cells from porcine brains using monoclonal antibodies and fluorescein isothiocyanate-labelled lectins: Implications for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 52, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(01\)00159-X](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(01)00159-X)
- Förstermann, U., Sessa, W.C., 2012. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *European Heart Journal* 33, 829–837. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
- Frézard, F., Martins, P.S., Barbosa, M.C.M., Pimenta, A.M.C., Ferreira, W.A., Melo, J.E. de, Mangrum, J.B., Demicheli, C., 2008. New insights into the chemical structure and composition of the pentavalent antimonial drugs, meglumine antimonate and sodium stibogluconate. *Journal of Inorganic Biochemistry* 102, 656–665. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.10.010>

- Fuster, M.M., Esko, J.D., 2005. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nature reviews. Cancer* 5, 526–42. <https://doi.org/10.1038/nrc1649>
- Garami, A., Mehlert, A., 2001. Glycosylation Defects and Virulence Phenotypes of *Leishmania mexicana* Phosphomannomutase and Dolicholphosphate- Mannose Synthase Gene Deletion Mutants. *Society* 21, 8168–8183. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.23.8168>
- Ghorbani, M., Farhoudi, R., 2018. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Design, Development and Therapy* 12, 25–40. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S146521>
- Gorakshakar, A.C., Ghosh, K., 2016. Use of lectins in immunohematology. *Asian J Transfus Sci.* 10, 12–21. <https://doi.org/10.4103/0973-6247.172180>
- Hay, N., 2016. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nature Reviews Cancer* 16, 1–15. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.77>
- Hibbs, J.B., Taintor, R.R., Vavrin, Z., Rachlin, E.M., 1988. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 157, 87–94. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(88\)80015-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(88)80015-9)
- Iqbal, H., Ishfaq, M., Wahab, A., Abbas, M.N., Ahmad, I., Rehman, A., Zakir, M., 2016. Therapeutic modalities to combat leishmaniasis, a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 6, 1–5. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60975-6](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60975-6)
- Jandú, J.J., Costa, M.C., Santos, J.R.A., Andrade, F.M., Magalhães, T.F., Silva, M. V., Castro, M.C.A.B., Coelho, L.C.B.B., Gomes, A.G., Paixão, T.A., Santos, D.A., Correia, M.T.S., 2017a. Treatment with pCramoll Alone and in Combination with Fluconazole Provides Therapeutic Benefits in *C. gattii* Infected Mice. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00211>
- Jandú, J.J., Moraes Neto, R.N., Zagnignan, A., de Sousa, E.M., Brelaz-de-Castro, M.C.A., dos Santos Correia, M.T., da Silva, L.C.N., 2017b. Targeting the immune system with plant lectins to combat microbial infections. *Frontiers in Pharmacology* 8, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00671>
- Kim, W.H., Lee, J., Jung, D.W., Williams, D.R., 2012. Visualizing sweetness: Increasingly diverse applications for fluorescent-tagged glucose bioprobes and their recent structural modifications. *Sensors* 12, 5005–5027. <https://doi.org/10.3390/s120405005>
- Lichtenstein, R.G., Rabinovich, G.A., 2013. Glycobiology of cell death: when glycans and lectins govern cell fate. *Cell Death. Differ* 20, 976–986. <https://doi.org/cdd201350> [pii];10.1038/cdd.2013.50 [doi]
- Lima, A.L.R., Cavalcanti, C.C.B., Silva, M.C.C., Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., Beltrão, E.I.C., dos S Correia, M.T., 2010. Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010, 179817. <https://doi.org/10.1155/2010/179817>
- Maciel, E.V.M., Araújo-Filho, V.S., Nakazawa, M., Gomes, Y.M., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.S., 2004. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals* 32, 57–60. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2003.12.001>
- Martins, T.V.F., De Carvalho, T.V., De Oliveira, C.V.M., De Paula, S.O., Cardoso, S.A., De Oliveira, L.L., Marques-Da-Silva, E.D.A., 2015. *Leishmania chagasi* heparin-binding protein: Cell localization and participation in *L. chagasi* infection. *Molecular and*

- Biochemical Parasitology 204, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.12.005>
- Nagakura, K., Tachibana, H., Kaneda, Y., Nakae, T., 1986. Leishmania braziliensis: Localization in Promastigotes of Glycoproteins in Promastigotes. Experimental Parasitology 61, 335–342.
- Oliveira, P.S.S. De, R??go, M.J.B.D.M., Da Silva, R.R., Cavalcanti, M.B., Galdino, S.L., Correia, M.T.D.S., Coelho, L.C.B.B., Pitta, M.G.D.R., 2013. 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 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/263968>
- Pang, X., Xiao, X., Liu, Y., Zhang, R., Liu, J., Liu, Q., Wang, P., Cheng, G., 2016. Mosquito C-type lectins maintain gut microbiome homeostasis. Nat Microbiol. 1, 1–24. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.23.Mosquito>
- Panunto-Castelo, A., Souza, M.A., Roque-Barreira, M.C., Silva, J.S., 2001. KM+, a lectin from Artocarpus integrifolia, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against Leishmania major antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. Glycobiology 11, 1035–1042. <https://doi.org/10.1093/glycob/11.12.1035>
- Pelissari, D.M., Cechinel, M.P., Sousa-Gomes, M.L. De, Lima Júnior, F.E.F. De, 2011. Tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil. Epidemiologia e Serviços de Saúde 20, 107–110. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742011000100012>
- Perdomo, D., Bonhivers, M., Robinson, D., 2016. The Trypanosome Flagellar Pocket Collar and Its Ring Forming Protein—TbBILBO1. Cells 5, 9. <https://doi.org/10.3390/cells5010009>
- Pereira, D.D.S.T., Lima-Ribeiro, M.H.M., Santos-Oliveira, R., Cavalcanti, C.D.L.B., de Pontes-Filho, N.T., Coelho, L.C.B.B., Carneiro-Leão, A.M.D.A., Correia, M.T.D.S., 2012. Topical application effect of the isolectin hydrogel (Cramoll 1,4) on second-degree burns: experimental model. Journal of biomedicine & biotechnology 2012, 184538. <https://doi.org/10.1155/2012/184538>
- Pinho, B.R., Sousa, C., Valentão, P., Andrade, P.B., 2011. Is nitric oxide decrease observed with naphthoquinones in LPS stimulated RAW 264.7 macrophages a beneficial property? PLoS ONE 6, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024098>
- Rogach, A.L., Franzl, T., Klar, T.A., Feldmann, J., Gaponik, N., Lesnyak, V., Shavel, A., Eychmüller, A., Rakovich, Y.P., Donegan, J.F., 2007a. Aqueous synthesis of thiol-capped CdTe nanocrystals: State-of-the-art. Journal of Physical Chemistry C 111, 14628–14637. <https://doi.org/10.1021/jp072463y>
- Rogach, A.L., Franzl, T., Klar, T.A., Feldmann, J., Gaponik, N., Lesnyak, V., Shavel, A., Eychmüller, A., Rakovich, Y.P., Donegan, J.F., 2007b. Aqueous synthesis of thiol-capped CdTe nanocrystals: state-of-the-art. Journal of Physical Chemistry C 111, 14628–14637. <https://doi.org/10.1021/jp072463y>
- Ruiz-Herrera, J., Victoria Elorza, M., Valentín, E., Sentandreu, R., 2006. Molecular organization of the cell wall of Candida albicans and its relation to pathogenicity. FEMS Yeast Research 6, 14–29. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2005.00017.x>
- Santos, B.S., Farias, P.M.A., Menezes, F.D. de, Mariano, E.L., Ferreira, R. de C., Giorgio, S.,

- Bosetto, M.C., Ayres, D.C., Lima, P.M., Fontes, A., Thomas, A.A., Cesar, C.L., 2006. Molecular Differentiation of *Leishmania* Protozoarium using CdS Quantum Dots as Biolabels, in: Achilefu, S., Bornhop, D.J., Raghavachari, R. (Eds.), SPIE. pp. 609706–1–609706–9. <https://doi.org/10.1117/12.646912>
- Sharon, N., 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14, 53R–62R. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh122>
- Shi, Z., Sun, R., Yu, T., Liu, R., Cheng, L.J., Bao, J.K., Zou, L., Tang, Y., 2016. Identification of novel pathways in plant lectin-induced cancer cell apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences* 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17020228>
- Shokri, A., Saeedi, M., Fakhar, M., Morteza-Semnani, K Keighobadi, M., Hosseini Teshnizi, S., Kelidari, H., Sadjadi, S., 2017. Antileishmanial Activity of *Lavandula angustifolia* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and nano-emulsions on *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER). *Iran J Parasitol* 12, 622–631.
- Silva, L.C.N. da, Filho, C.M.B., Paula, R.A. de, Coelho, L.C.B.B., Silva, M.V. da, Correia, M.T. dos S., 2014. *Cratylia mollis* Lectin: A Versatile Tool for Biomedical Studies. *Current Bioactive Compounds* 10, 44–54. <https://doi.org/10.2174/157340721001140725000701>
- Silva, L.C.N., Alves, N.M.P., de Castro, M.C.A.B., Pereira, V.R.A., da Paz, N.V.N., Coelho, L.C.B.B., de Figueiredo, R.C.B.Q., Correia, M.T. dos S., 2015. Immunomodulatory effects of pCramoll and rCramoll on peritoneal exudate cells (PECs) infected and non-infected with *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Biological Macromolecules* 72, 848–854. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.09.045>
- Silva, L.C.N., Filho, C.M.B., Paula, R.A. De, Coelho, L.C.B.B., Silva, M. V, Maria, T., Correia, S., 2014. *Cratylia mollis* Lectin: A Versatile Tool for Biomedical Studies 44–54.
- Souza, S.R., Dutra, R.F., Correia, M.T.S., Pessoa, M.M. a, Lima-Filho, J.L., Coelho, L.C.B.B., 2003. Electrochemical potential of free and immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. *Bioresource Technology* 88, 255–258. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00011-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00011-7)
- Tang, H., Hsueh, P., Kletter, D., Bern, M., Haab, B., Rapids, G., Carlos, S., 2015. The detection and discovery of glycan motifs in biological samples using lectins and antibodies: new methods and opportunities. *Adv Cancer Res* 126:, 167–202. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2014.11.003>
- Teixeira, C.R., Cavassani, K.A., Gomes, R.B., Teixeira, M.J., Roque-Barreira, M.C., Cavada, B.S., Silva, J.S. Da, Barral, A., Barral-Netto, M., 2006. Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. *Vaccine* 24, 3001–3008. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.11.067>
- Tenório, D.P.L. a., Andrade, C.G., Cabral Filho, P.E., Sabino, C.P., Kato, I.T., Carvalho, L.B., Alves, S., Ribeiro, M.S., Fontes, A., Santos, B.S., 2015. 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* 142, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.11.010>
- Tripathi, P., Tripathi, P., Kashyap, L., Singh, V., 2007. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 51, 443–452.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00329.x>

- Van Breedam, W., Pöhlmann, S., Favoreel, H.W., de Groot, R.J., Nauwynck, H.J., 2014. Bitter-sweet symphony: Glycan-lectin interactions in virus biology. *FEMS Microbiology Reviews* 38, 598–632. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12052>
- Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Barre, A., Rougé, P., 1998. Critical Reviews in Plant Sciences Plant Lectins : A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles Plant Lectins : A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolut. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17, 575–692.
- Varki, A., 2017. Biological roles of glycans. *Glycobiology* 27, 3–49. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww086>
- Vasconcelos-Dos-Santos, A., Oliveira, I.A., Lucena, M.C., Mantuano, N.R., Whelan, S.A., Dias, W.B., Todeschini, A.R., 2015. Biosynthetic Machinery Involved in Aberrant Glycosylation: Promising Targets for Developing of Drugs Against Cancer. *Front Oncol* 5, 138. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00138>
- Woodrum, B.W., Maxwell, J., Allen, D.M., Wilson, J., Krumpe, L.R.H., Bobkov, A.A., Hill, R.B., Kibler, K. V., O’Keefe, B.R., Ghirlanda, G., 2016. A designed -Nestedl dimer of Cyanovirin-N increases antiviral activity. *Viruses* 8, 1–15. <https://doi.org/10.3390/v8060158>
- Yu, W.W., Qu, L., Guo, W., Peng, X., 2003a. Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe and CdS Nanocrystals. *Chemistry of Materials* 15, 2854–2860. <https://doi.org/10.1021/cm033007z>
- Yu, W.W., Qu, L., Guo, W., Peng, X., 2003b. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chemistry of Materials* 15, 2854–2860. <https://doi.org/10.1021/cm034081k>
- Zhou, J., Yang, Y., Zhang, C., 2015. Toward Biocompatible Semiconductor Quantum Dots : From Biosynthesis and Bioconjugation to Biomedical Application. *Chemical Reviews*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00049>

7 MANUSCRITO 4

Artigo em construção a ser submetido à revista *Experimental Parasitology*

Pergunta condutora: *O conjugado PQ-Cramoll possui potencial terapêutico em Leishmania braziliensis?*

ORIGINAL RESEARCH

***In vitro* effect of Cramoll lectin in *Leishmania braziliensis* and application in cell labeling**

Camila G. Andrade^{1,3†}, Cássia R. A. Cunha^{1,2†}, Maria E. T. Carvalho^{1,2}, Karla R. C. Ribeiro⁴, Paulo E. Cabral Filho¹, Luana C. B. B. Coelho², Beate S. Santos⁵, Regina C. B. Q. Figueiredo⁶, Maria T. S. Correia^{2,*}, Adriana Fontes^{1,*}, Luiz B. Carvalho Jr^{2,3}

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

² Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

³ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

⁴ Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brazil.

⁵ Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

⁶ Departamento de Microbiologia, Instituto Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brazil.

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

†These authors have contributed equally to this work.

ABSTRACT: Leishmaniasis is a disease caused by protozoan parasites from more than 20 *Leishmania* species. Although the drugs recommended for Leishmaniasis treatment have been used for decades,

they can often induce side effects that may lead to treatment discontinuation. Therefore, the need for alternative treatment has led to the search for molecules, especially of natural origin, with antileishmanial potential. Cramoll is a lectin extracted from the seeds of *Cratylia mollis*, which has several biological activities. Herein, it was evaluated the *in vitro* effect of Cramoll in *Leishmania braziliensis* promastigotes. In addition, this lectin was conjugated to quantum dots (QDs) to investigate the carbohydrate profile and/or the interaction of this lectin with the parasites. The results revealed that the lectin was able to inhibit the growth of promastigote forms of the parasite ($IC_{50} = 112.0 \mu\text{g/mL}$), with lower toxicity to mammalian cells ($CC_{50} = 173.5 \mu\text{g/mL}$). The lectin selectivity index revealed higher toxicity to the parasite ($SI = 1.5$) than to peritoneal exudate cells. Cramoll conjugated to QD proved bound efficiently to parasite surface, also inducing agglutination, whereas bare QDs preferentially labeled the anterior portion of promastigotes. The results revealed the potential of Cramoll in anti-*L. braziliensis* therapy and, when conjugated to QDs to correlate the lectin therapeutic potential with the glycode profile in *Leishmania* species as well as study host cell invasion.

Keywords: protein, *Leishmania braziliensis*, quantum dots, glycobiology, leishmanicidal activity.

1. INTRODUCTION

Leishmaniasis is a neglected infectious disease widely distributed around the world, caused by protozoa of the genus *Leishmania*. Several species, such as *Leishmania donovani*, *L. chagasi*, *L. amazonensis*, and *L. braziliensis* (Steverding, 2017) are responsible for the infection in humans, which may occur in three major clinical forms, that are: Cutaneous Leishmaniasis (limited and painless), Mucocutaneous or Cutaneous Mucosal Leishmaniasis (destructive ulcerous lesions on the mucosa of the nose, mouth and pharynx), and Visceral Leishmaniasis or Kalazar (parasites affect the mononuclear phagocytic system of the spleen, bone marrow, and lymphoid tissues) (Diaz et al., 2018).

Current therapy represents a major challenge due to the diversity of *Leishmania* species and the broad spectrum of clinical manifestations of the disease. The treatment dose and time depend on the clinical form and, in some cases, there is only an evolution to cure after the attempt of several therapeutic schemes (Pelissari et al., 2011; Iqbal et al., 2016). The therapy used has been considering efficient. However, it often requires high doses, prolonged treatment time, and present high toxicity and side effects, which can lead to the abandonment of the treatment as well as parasite resistance development. Besides, some of these drugs cannot be administered in pregnancy and for patients with kidney, liver, and heart diseases (Camargo and Langoni, 2006; Frézard et al., 2008; Ghorbani and Farhoudi, 2018; Shokri et al., 2017). Due to problems with current therapy for Leishmaniasis, the search for new drugs, especially those of a natural origin, are increasingly necessary (Shokri et al., 2017).

Cramoll 1,4 (Cramoll) is a lectin extracted from the leguminous *Cratylia mollis*. This lectin recognizes glucose/mannose residues (Correia and Coelho, 1995) and was able to decrease the viability and inhibit proliferation and reduce viability of *Trypanosoma cruzi* parasites, the causative agent of Chagas disease (Fernandes et al., 2010). In addition, as this lectin can target effectively carbohydrate residues of cellular membranes, it has been used in different studies related to the glycode of biological systems (Beltrão et al., 1998; Cunha et al., 2018). Recently, Cunha et al. (2018) showed a successful conjugation procedure of Cramoll to quantum dots (QDs) and this conjugate was able to reveal the carbohydrate expression profile in *Candida albicans* cells.

Thus, the use of Cramoll and their QD-conjugates may be interesting, respectively, to be applied not only as a therapeutic agent but also to study the parasite glycobiology, since

membrane glycans can play an important role for the success of host cells invasion. Moreover, it may be possible to explore the potential of these fluorescent conjugates to probe, distinguish and understand the interaction of this lectin with different *Leishmania* species, or even the interaction of labeled promastigotes with macrophages. In this context, the aim of this study was to investigate the *in vitro* activity of Cramoll lectin on *L. braziliensis* and its ability, when conjugated to QDs, to be used as a tool to investigate the carbohydrate profile and/or the interaction of this lectin with these parasites.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Purification and protein dosage

Cramoll 1,4 (Cramoll) lectin was purified from a 10% (m/v) *Cratylia mollis* seed extract in 0.15 M NaCl according to the protocol reported by Correia and Coelho (1995). Then, the protein dosage was performed using the BCA kit for protein determination (*Pierce BCA protein assay kit*, Thermo Scientific).

2.2 Hemagglutinating assay (HA)

The hemagglutinating activity was measured in terms of hemagglutination units (HU), indicated as the inverse of the highest dilution able to exhibit visible hemagglutination. The protocol followed was that described by Beltrão et al. (1998).

2.3 *Leishmania* culture

Promastigote forms of *L. braziliensis* (MHOM / BR / 1975 / M2903) were maintained in Schneider's medium containing 20% of fetal bovine serum (FBS) at 26 °C and used during the exponential growth phase.

2.4 IC₅₀ determination

Cells (1×10^6 cells·mL⁻¹) were incubated in 24-well plates at 26 °C in Schneider's medium supplemented with 10% of FBS in the absence or presence of different concentrations of Cramoll (from 15.6 to 250 µg·mL⁻¹). Cell growth was determined daily by counting in a Neubauer chamber. The lectin IC₅₀ (concentration that inhibits 50% of parasite growth) was determined after 48 h of culture by linear regression analysis through SPSS 18.0 software. The tests were performed in triplicate.

2.5 Cytotoxicity assay

Balb/c mice were used to obtain peritoneal exudate cells (PECs). Cells collectively known as PECs include populations of immune cells such as macrophages (the major fraction), B1 cells, B2 cells, T cells, natural killer cells, dendritic cells, and granulocytes (Cassado et al., 2011; Silva et al., 2015). The experiments involving animals were carried out according to the ethical standards and approved by the animal experiment ethics committee (CEUA - FIOCRUZ nº 39/2012). PECs were collected by lavage of the peritoneal cavity with RPMI-1640 medium, supplemented with 10% of FBS. Cells (1×10^6 cells·mL⁻¹) were distributed in 96-well plates and incubated in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. After 24 h, the medium was removed, and adherent PECs were then incubated in the absence or presence of different lectin concentrations (15.6 - 250 µg·mL⁻¹) for 48 h.

Cell viability was assessed by the MTT assay. This test is based on the reduction of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide tetrazolium) (Sigma-Aldrich) by mitochondrial enzymes from viable cells, which produce a purple crystal called formazan crystal. Thus, 48 h after the treatment, RPMI medium containing the lectin was replaced with RPMI without phenol red supplemented plus 10% FBS, then 10 µL of MTT was added and incubated for 3 h in at 37 °C and 5% CO₂. Thus, the supernatant was removed, and the pellet solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) (100 µL/well). The absorbance reading was performed spectrophotometrically, at 490 nm, in a Benchmark plus microplate reader (Bio-Rad®). CC₅₀, the concentration capable of causing a cytotoxic effect in 50% of cells, was estimated by linear regression and the tests were performed in quadruplicate. The selectivity index (SI), which indicates how much a compound is toxic to the parasite in relation to host cells, was determined as the ratio of CC₅₀ / IC₅₀.

2.6 NO production

Nitric oxide (NO) is a molecule that has significant importance in the human immune system because it can act as a toxic agent for infectious organisms. It has been shown that macrophages - which possess the enzyme capable of synthesizing NO - have the ability to kill parasites of the genus *Leishmania*, and that this antileishmanial activity is mediated by NO. In cell cultures, NO released by cells is rapidly converted to nitrogen derivatives, among which nitrite is the most stable compound and can be measured (Pinho et al., 2011; Tripathi et al., 2007).

In order to evaluate the effect of different concentrations of Cramoll on the NO production by PECs, a nitrite quantification test was performed using Griess reagent. Therefore, 100 μL of PECs culture supernatant treated with the different lectin concentrations ($15.6 - 250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 48 h were incubated with 100 μL of Griess reagent [1% sulfanilamide / N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (0.1% dihydrochloride / 2.5% H_3PO_4] at 25 °C for 10 min. The absorbance was measured at 540 nm in the Benchmark plus microplate reader (Bio-Rad®). The nitrite concentration was determined using a standard calibration curve constructed from known concentrations of sodium nitrite. The tests were performed in quadruplicate.

2.7 QD synthesis and optical characterization

CdTe QDs were synthesized in an aqueous medium using MSA (mercaptosuccinic acid) as stabilizing/functionalizing agent, according to a well-established methodology (Cabral Filho et al., 2015). In summary, metallic tellurium was completely reduced to Te^{2-} by using NaBH_4 under inert atmosphere (N_2). Thereafter, a solution of Cd^{2+} / MSA (pH >10) was prepared and the Te^{2-} was added to this solution. The system was kept in constant agitation and heating ($\sim 90^\circ\text{C}$) for 8 h. QDs were synthesized in a molar ratio of 5:1:6 (Cd:Te:MSA) and characterized by emission and absorption spectroscopies using a spectrofluorimeter LS 55 (PerkinElmer) and the spectrophotometer UV-Vis 1800 (Shimadzu), respectively.

2.8 QD-Cramoll conjugates

The conjugate was obtained using the protocol established according to Cunha et al. (2018). For this, an aliquot (10 μL , $28 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) of Cramoll was incubated with QDs (1 mL, 7 μM) at pH 7.0 under slow stirring for 2 h at 25 °C. The conjugate was also characterized by emission and absorption spectroscopy and compared to the bare QDs (control) characterization.

To evaluate the maintenance of the lectin ability to bind to carbohydrates after the conjugation process, the HA was performed. To evaluated the efficiency of the conjugation, the labeling of *Candida albicans* cells was investigated according to Cunha et al. (2018).

2.9 *L. braziliensis* labeling

Cells ($1 \times 10^7 \text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$) were incubated with 200 μL of the QD-Cramoll conjugate in a ratio of 1:1 v/v for 1 h at 25 °C. To remove the bare QDs, the suspensions were centrifuged

at $210 \times g$ for 10 min, and then resuspended in PBS. To verify the specificity of the labeling, the inhibition assay was performed. QD-Cramoll was incubated with the specific carbohydrate (methyl α -D-mannopyranoside) at 0.4 M for 30 min at 25 °C, before incubation with the cells. The labeling was verified by fluorescence microscopy (Leica DMI4000B), by using the excitation band-pass (BP) filter at 560/40 and the emission BP filter at 645/75 nm.

3. RESULTS

3.1 Protein dosage and hemagglutinating assay

The purification of the lectin resulted in a Cramoll solution having a concentration of $9.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The control containing only the lectin Cramoll was able to agglutinate cells even after being diluted 512 times (Hemagglutinating activity = 512^{-1}).

3.2 Antileishmanial activity

The inhibitory effect of the lectin Cramoll on the growth of the promastigote forms of *L. braziliensis* was dose-dependent (Figure 1). After 48 h of treatment, the highest concentrations of the lectin tested (125 and $250 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) induced the most considerable inhibitory effect on cell growth, reaching about 70% of growth inhibition. On the other hand, the lower concentrations slightly altered the growth of the promastigote forms, presenting a total number of cells similar to the control group and less than 5% of growth inhibition. The IC_{50} (concentration inhibiting 50% of parasite growth) of the lectin was $112.0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

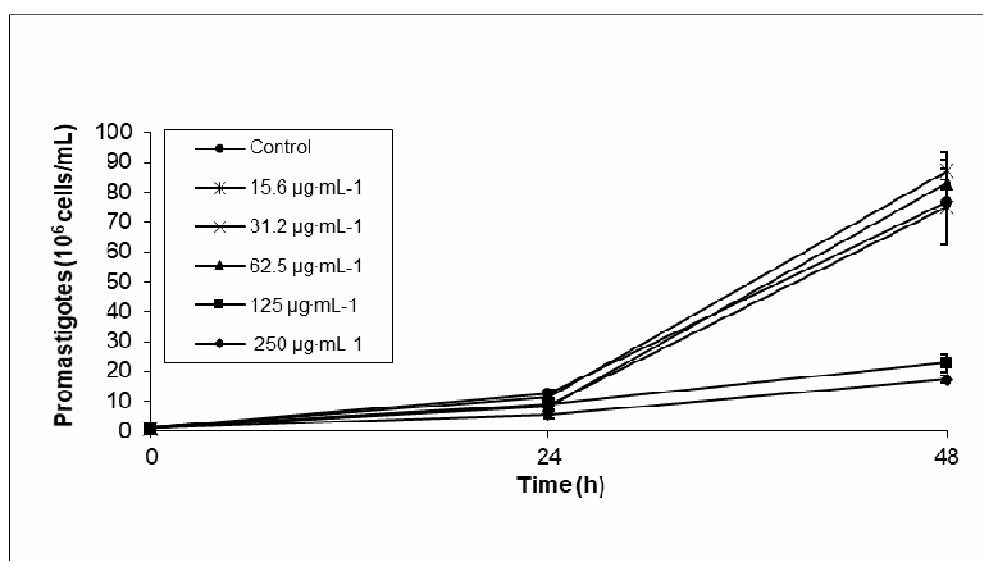


Fig. 1 – Growth curve of promastigotes of *L. braziliensis* treated with Cramoll.

3.3 Cytotoxicity

Cramoll incubation with PECs demonstrated that the lectin probably stimulated cell mitogenesis, which was observed by the considerable increase in the number of cells treated with 31.2 and 62.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figure 2). None of the concentrations tested were able to completely inhibit cell viability. At the highest concentration used, approximately 30% of the cells were still viable. The CC_{50} of Cramoll (concentration capable of inhibiting 50% cell viability) was estimated at 173.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

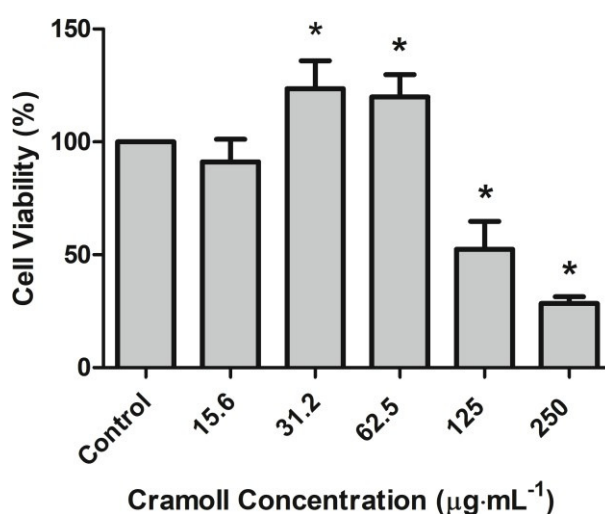


Fig. 2 – Cytotoxic effect of Cramoll on mammalian cells.

*Statistically significant values in relation to control. ANOVA test ($p < 0.05$), followed by Tukey post-test.

SI was calculated using $\text{CC}_{50}/\text{IC}_{50}$ and indicates how much the lectin is toxic to promastigote forms compared to mammalian cells. Cramoll showed to be more selective against promastigotes with SI equals to 1.5.

3.4 NO dosage

The NO dosage demonstrated that Cramoll was able to induce an increase in NO production (for Cramoll concentrations up to 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) by PECs (Figure 3), compared to the control group.

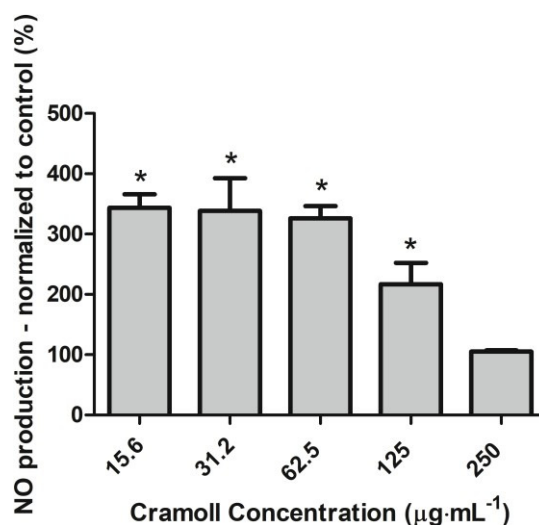


Fig. 3 – Effect of Cramoll on the production of nitric oxide.

*Statistically significant values in relation to control. ANOVA test ($p < 0.05$), followed by Tukey post-test.

3.5 QDs and conjugates characterization

Using the molar extinction coefficient provided by Yu et al (2003) and based on the Lambert-Beer law, the concentration of QDs obtained was *ca.* 7 μM . The nanoparticles had a maximum emission at 631 nm, with approximately 54 nm full width at half height (FWHM) and a characteristic absorption spectrum (Figure 4A). The diameter of the QD of approximately 3.3 nm was estimated using the first maximum of the absorption spectrum, which was at 580 nm (Dagtepe et al., 2007; Rogach et al., 2007b).

The ability to hemagglutinate cells, exhibited by Cramoll conjugated to QDs, demonstrated the preservation of the carbohydrate binding sites present in the lectin even after the conjugation process (512^{-1}). There was no significant change in the absorption spectrum of the conjugate when compared to the bare QDs (data not shown). Despite the decrease in fluorescence intensity (Figure 4B), the conjugate remained highly fluorescent, as can be observed in fluorescence microscopy images (Cunha et al., 2018a).

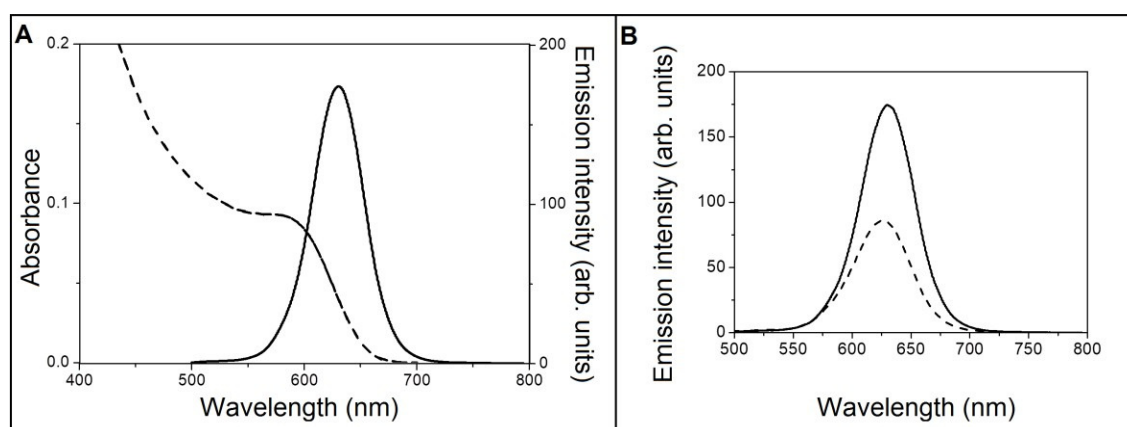


Fig. 4 – A) CdTe QD absorption (dashed line) and emission (filled line) spectra. B) Emission spectra of QD-Cramoll conjugates (dashed line) and bare QDs (filled line) – $\lambda_{exc} = 488$ nm.

Due to the specificity of the Cramoll lectin to bind α -D-mannose and α -D-glucose, *C. albicans* yeasts were used as a model to confirm the conjugation. Figure 5 shows that this procedure was efficient to combine the biological specificity of the lectin and fluorescent properties of QDs, as also showed by Cunha et al. (2018a).

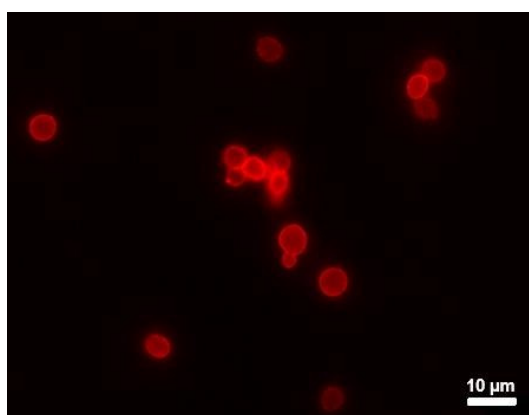


Fig. 5 – Labeling of *C. albicans* yeast cells with the QD-Cramoll conjugate.

3.7 *L. braziliensis* labeling

Fluorescence microscopy images of promastigote forms incubated with bare QDs and QD-Cramoll conjugates showed different labeling patterns (Figure 6). The bare QDs labeled in a dotted profile (Figure 6A) while QD-Cramoll conjugate revealed an intense labeling of

the parasite cell membrane (Figure 6B). The specificity of the labeling was confirmed by the inhibition assay with the specific carbohydrate, verified by the absence of labeling on the cell membrane (Figure 6C).

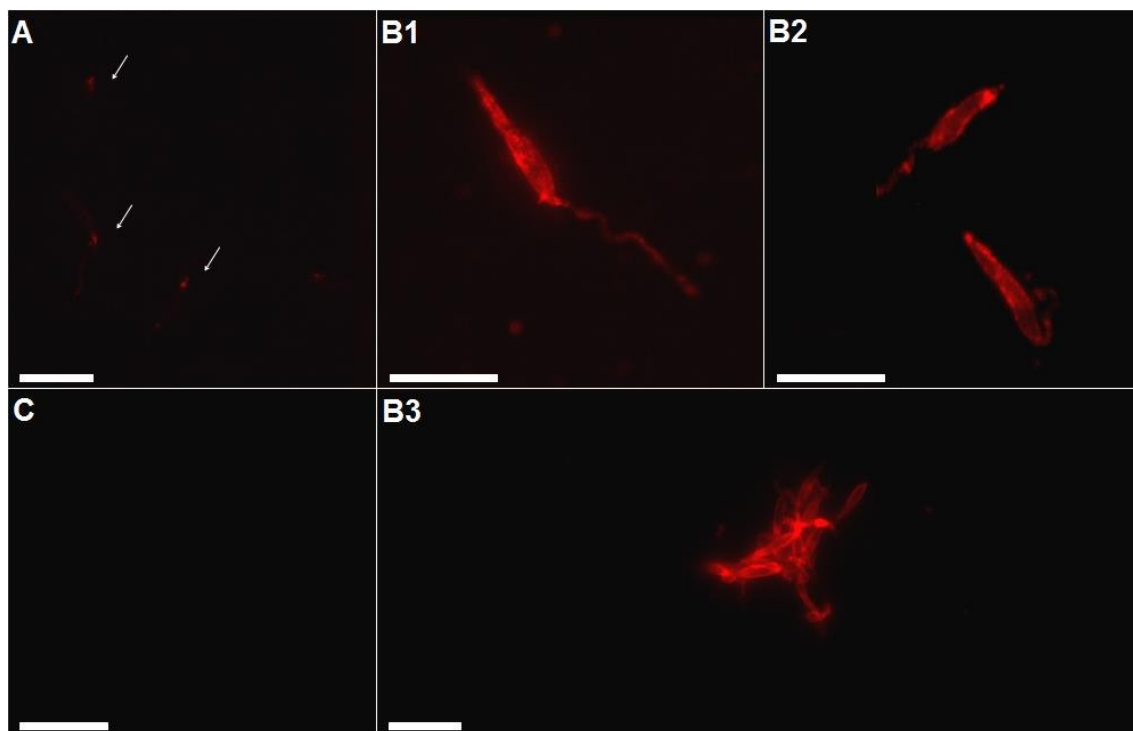


Fig. 6 – Labeling of *L. braziliensis* with bare QDs (A); QD-Cramoll (B) and, inhibited QD-Cramoll (C). Scale bar: 10 μm (in A and B), 25 μm (in C).

4. DISCUSSION

Since the current treatment offered to Leishmaniasis patients faces challenges due to the high toxicity presented, the investment in the development and improvement of compounds that have low cytotoxicity is very important (Astelbauer and Walochnik, 2011). Due to their ability to specifically and reversibly recognize carbohydrates, the lectins have revealed potential as adjuvants for the development of vaccines (Panunto-Castelo et al., 2001; Teixeira et al., 2006) and prophylactic function (Afonso-Cardoso et al., 2007) in the fight against Leishmaniasis.

Cramoll is a lectin that has been applied against known microorganisms with medical importance such as *T. cruzi* (Fernandes et al., 2010) and in mice infected with *Cryptococcus gattii* (Jandú et al., 2017a). When used in another important parasite, the epimastigote forms

of *T. cruzi*, Cramoll lectin inhibited the cell growth by 60% when concentrations above 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ were applied (Fernandes et al., 2010). In this study, Cramoll induced the death of *L. braziliensis* promastigotes. Until the present moment, as far as we know there is no report in the literature about the antileishmanial activity of this lectin.

The SI revealed the Cramoll presented higher toxicity to parasite cells than to PECs (SI = 1.5). Moreover, it was observed that Cramoll induced a mitogenic effect on PECs. This effect was also noticed by Silva et al. (2015) in these same cells, and on lymphocytes by Maciel et al. (2004).

The application of lectins in studies against microorganisms based on the modulation of the immune system has gained wide interest (Jandú et al., 2017b). These biomolecules can induce the production of important factors for the immune response, such as cytokines and reactive oxygen species (Coelho et al., 2017; Jandú et al., 2017b). When incubated with PECs for 48 h in a concentration closer to the IC_{50} , Cramoll stimulated a NO production of about 2-fold than control, corroborating its role as an important immunomodulatory agent (Melo et al., 2010; Silva et al., 2015). Silva et al. (2015) showed that, after 24 h of incubation, Cramoll lectin also stimulated the production of NO in PECs. The production of NO is related to a cytotoxic effect important in the fight against tumors and microorganisms (Förstermann and Sessa, 2012; Hibbs et al., 1988; Silva et al., 2015).

Leishmania produces mannose-containing glycoconjugates considered to be essential for virulence to the mammalian host and for viability (Garami and Mehlert, 2001). Therefore, the conjugation of lectins to fluorophores as QDs can produce glyconanoparticles that allow more sensitive and specific analyses which aim to provide information of considerable relevance for the study of the pathogenicity and resistance of microorganisms (Cunha et al., 2018b).

QD-Cramoll conjugates bound to cell surface leading to a typical membrane labeling profile. This labeling pattern was specific and occurred due to the recognition of carbohydrate residues present on the parasite cell surface by the lectin. This fluorescent probe was also able to show the cell agglutination induced by Cramoll (Figure 6B3), an effect which was also noticed for other lectins by Andrade and Saraiva (1999). These proteins have been used in the study of the composition of the plasma membrane of this parasite (Ayesta et al., 1985; Martins et al., 2015; Nagakura et al., 1986). Andrade and Saraiva (1999) analyzed *Leishmania*

cell surface carbohydrates by radioiodinated lectin-binding assays, while Nagakura et al. (1986) employed lectin-conjugated fluorescein isothiocyanate (FITC) to identify the location of glycoproteins in *L. braziliensis* promastigotes. However, no studies were found that indicate the concomitant use of QDs and lectins in the labeling of *Leishmania* with the purpose of better understanding the distribution pattern of membrane carbohydrates. It is also noteworthy that although presenting similarities with ConA lectin, Cramoll presents differences regarding affinity for glycoproteins and has a considerable immunomodulatory effect (Oliveira et al., 2013; Silva et al., 2014). Furthermore, conjugation to QDs allows acquiring images with an intense fluorescent signal and substantial photostability when compared to organic dyes such as FITC. These properties may make it possible to trace the path of biomolecules and associate the effectiveness of the Cramoll binding with its leishmanicidal performance in different *Leishmania* species.

The dot pattern observed after cell incubation with the bare QDs indicated labeling in the anterior portion of parasites, may near the flagellar pocket. In species of the genus *Leishmania*, the flagellar pocket is the only site of endocytosis and exocytosis (Perdomo et al., 2016), which indicates that probably the bare QDs were endocytosed by the parasite, justifying this labeling pattern. Santos et al. (2006) reported the labeling of *L. amazonensis* using CdS /Cd(OH)₂ nanoparticles stabilized with polyphosphate anions and/or glutaraldehyde molecules, which were capable of evidencing distinct parts of the parasite body, such as the flagellar pocket. Bare QDs were also used in the labeling of *T. cruzi* (Chaves et al., 2008) and it was observed the labeling only of the cytostome/cytopharynx and reservosomes.

5. CONCLUSIONS

Cramoll lectin was able to inhibit the growth of promastigote forms of *L. braziliensis*. The results also indicate that Cramoll presents low toxicity to mammalian cells, being more selective to the parasite. The *in vitro* inhibitory activity against *L. braziliensis* promastigotes demonstrated that this lectin has potential to be used as a coadjuvant agent in the treatment of Leishmaniasis.

Moreover, when applied in the labeling of *L. braziliensis*, bare QDs and conjugates showed different labeling distribution. QD-Cramoll conjugates strongly bound to the cell membrane, due to the specific interaction of the lectin with glycoconjugates present in cell

surface, while bare QDs labeled the anterior region of the parasite probably in a process involving endocytosis. The results show the potential of the application of QD-Cramoll conjugates as molecular probes, capable of generating information about cellular structures, and thus helping to elucidate biological processes.

REFERENCES

- Afonso-Cardoso, S.R., Rodrigues, F.H., Gomes, M.A.B., Silva, A.G., Rocha, A., Guimaraes, A.H.B., Candeloro, I., Favoreto, S., Ferreira, M.S., de Souza, M.A., 2007. Protective effect of lectin from *Synadenium carinatum* on *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. *The Korean journal of parasitology* 45, 255–266. <https://doi.org/10.3347/kjp.2007.45.4.255>
- Andrade, A.F.B., Saraiva, E.M.B., 1999. Lectin-binding properties of different *Leishmania* species. *Parasitology research* 85, 576–81.
- Beltrão, E.I., Correia, M.T., Figueredo-Silva, J., Coelho, L.C., 1998a. Binding evaluation of Isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Applied biochemistry and biotechnology* 74, 125–34.
- Cabral Filho, P.E., Cardoso, A.L.C., Pereira, M.I.A., Ramos, A.P.M., Hallwass, F., Castro, M.M.C.A., Geraldies, C.F.G.C., Santos, B.S., Pedroso de Lima, M.C., Pereira, G.A.L., Fontes, A., 2015. Cdte quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells. *Biochimica et biophysica acta* 1860, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.09.021>
- Cassado, A. dos A., de Albuquerque, J.A.T., Sardinha, L.R., de Buzzo, C.L., Faustino, L., Nascimento, R., Ghosn, E.E.B., Lima, M.R., Alvarez, J.M.M., Bortoluci, K.R., 2011. Cellular renewal and improvement of local cell effector activity in peritoneal cavity in response to infectious stimuli. *PLoS ONE* 6, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022141>
- Chaves, C.R., Fontes, A., Farias, P.M.A., Santos, B.S., de Menezes, F.D., Ferreira, R.C., Cesar, C.L., Galembeck, A., Figueiredo, R.C.B.Q., 2008. Application of core-shell PEGylated CdS/Cd(OH)₂ quantum dots as biolabels of *Trypanosoma cruzi* parasites. *Applied Surface Science* 255, 728–730. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2008.07.035>
- Coelho, L.C.B.B., Silva, P.M.D.S., Lima, V.L.D.M., Pontual, E.V., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H., Correia, M.T.D.S., 2017. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1594074>
- Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., 1995. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* mart. (Camaratu Bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 55, 261–273. <https://doi.org/10.1007/BF02786865>
- Cunha, C.R.A. da, Silva, L.C.N. da, Almeida, F.J.F., Ferraz, M.S., Varejão, N., Cartaxo, M.F. de S., Miranda, R. de C.M. de, Aguiar, F.C.A. de, Santos, N.P. da S., Coelho, L.C.B.B., Santos-Magalhães, N.S., Correia, M.T. dos S., 2016. Encapsulation into Stealth Liposomes Enhances the Antitumor Action of Recombinant *Cratylia mollis* Lectin

- Expressed in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01355>
- Cunha, C.R.A., Andrade, C.G., Pereira, M.I.A., Cabral Filho, P.E., Carvalho, L.B., Coelho, L.C.B.B., Santos, B.S., Fontes, A., Correia, M.T.S., 2018. Quantum dot–Cramoll lectin as novel conjugates to glycobiology. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 178, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.10.020>
- Cunha, C.R.A., Oliveira, A.D.P.R., Firmino, T.V.C., Tenório, D.P.L.A., Pereira, G., Carvalho, L.B., Santos, B.S., Correia, M.T.S., Fontes, A., 2018b. Biomedical applications of glyconanoparticles based on quantum dots. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1862, 427–439. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.11.010>
- Da Silva, L.C.N., Alves, N.M.P., De Castro, M.C.A.B., Higino, T.M.M., Da Cunha, C.R.A., Pereira, V.R.A., Da Paz, N.V.N., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.D.S., De Figueiredo, R.C.B.Q., 2015. PCramoll and rCramoll as New Preventive Agents against the Oxidative Dysfunction Induced by Hydrogen Peroxide. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/520872>
- Dagtepe, P., Chikan, V., Jasinski, J., Leppert, V.J., 2007. Quantized growth of CdTe quantum dots; observation of magic-sized CdTe quantum dots. *Journal of Physical Chemistry C* 111, 14977–14983. <https://doi.org/10.1021/jp072516b>
- De Melo, C.M.L., Paim, B.A., Zecchin, K.G., Morari, J., Chiaratti, M.R., Correia, M.T.S., Barroso Coelho, L.C.B., Paiva, P.M.G., 2010. Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels, and cytokine expression in treated spleen cells of rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 342, 163–169. <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0480-z>
- Diaz, J.R., Ramírez, C.A.R., Nocua, P.A., Guzman, F., Requena, J.M., Puerta, C.J., 2018. Dipeptidyl peptidase 3, a novel protease from *Leishmania braziliensis*. *PLoS ONE* 13, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190618>
- Fernandes, M.P., Inada, N.M., Chiaratti, M.R., Araújo, F.F.B., Meirelles, F. V., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Alves, M.J.M., Gadelha, F.R., Vercesi, A.E., 2010a. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 42, 69–78. <https://doi.org/10.1007/s10863-010-9268-9>
- Förstermann, U., Sessa, W.C., 2012. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *European Heart Journal* 33, 829–837. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
- Frézard, F., Martins, P.S., Barbosa, M.C.M., Pimenta, A.M.C., Ferreira, W.A., Melo, J.E. de, Mangrum, J.B., Demicheli, C., 2008. New insights into the chemical structure and composition of the pentavalent antimonial drugs, meglumine antimonate and sodium stibogluconate. *Journal of Inorganic Biochemistry* 102, 656–665. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.10.010>
- Garami, A., Mehlert, A., 2001. Glycosylation Defects and Virulence Phenotypes of *Leishmania mexicana* Phosphomannomutase and Dolicholphosphate- Mannose Synthase Gene Deletion Mutants. *Society* 21, 8168–8183. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.23.8168>
- Ghorbani, M., Farhoudi, R., 2018. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug*

- Design, Development and Therapy 12, 25–40. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S146521>
- Hibbs, J.B., Taintor, R.R., Vavrin, Z., Rachlin, E.M., 1988. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 157, 87–94. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(88\)80015-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(88)80015-9)
- Iqbal, H., Ishfaq, M., Wahab, A., Abbas, M.N., Ahmad, I., Rehman, A., Zakir, M., 2016. Therapeutic modalities to combat leishmaniasis, a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 6, 1–5. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60975-6](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60975-6)
- Jandú, J.J., Costa, M.C., Santos, J.R.A., Andrade, F.M., Magalhães, T.F., Silva, M. V., Castro, M.C.A.B., Coelho, L.C.B.B., Gomes, A.G., Paixão, T.A., Santos, D.A., Correia, M.T.S., 2017a. Treatment with pCramoll Alone and in Combination with Fluconazole Provides Therapeutic Benefits in *C. gattii* Infected Mice. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00211>
- Jandú, J.J., Moraes Neto, R.N., Zagnignan, A., de Sousa, E.M., Brelaz-de-Castro, M.C.A., dos Santos Correia, M.T., da Silva, L.C.N., 2017b. Targeting the immune system with plant lectins to combat microbial infections. *Frontiers in Pharmacology* 8, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00671>
- Maciel, E.V.M., Araújo-Filho, V.S., Nakazawa, M., Gomes, Y.M., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.S., 2004. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals* 32, 57–60. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2003.12.001>
- Martins, T.V.F., De Carvalho, T.V., De Oliveira, C.V.M., De Paula, S.O., Cardoso, S.A., De Oliveira, L.L., Marques-Da-Silva, E.D.A., 2015. *Leishmania chagasi* heparin-binding protein: Cell localization and participation in *L. chagasi* infection. *Molecular and Biochemical Parasitology* 204, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.12.005>
- Nagakura, K., Tachibana, H., Kaneda, Y., Nakae, T., 1986. *Leishmania braziliensis*: Localization in Promastigotes of Glycoproteins in Promastigotes. *Experimental Parasitology* 61, 335–342.
- Oliveira, P.S.S. De, R??go, M.J.B.D.M., Da Silva, R.R., Cavalcanti, M.B., Galdino, S.L., Correia, M.T.D.S., Coelho, L.C.B.B., Pitta, M.G.D.R., 2013. *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* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/263968>
- Panunto-Castelo, A., Souza, M.A., Roque-Barreira, M.C., Silva, J.S., 2001. KM+, a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. *Glycobiology* 11, 1035–1042. <https://doi.org/10.1093/glycob/11.12.1035>
- Pelissari, D.M., Cechinel, M.P., Sousa-Gomes, M.L. De, Lima Júnior, F.E.F. De, 2011. Tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 20, 107–110. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742011000100012>
- Perdomo, D., Bonhivers, M., Robinson, D., 2016. The Trypanosome Flagellar Pocket Collar and Its Ring Forming Protein—TbBILBO1. *Cells* 5, 9. <https://doi.org/10.3390/cells5010009>
- Pinho, B.R., Sousa, C., Valentão, P., Andrade, P.B., 2011. Is nitric oxide decrease observed

- with naphthoquinones in LPS stimulated RAW 264.7 macrophages a beneficial property? PLoS ONE 6, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024098>
- Rogach, A.L., Franzl, T., Klar, T.A., Feldmann, J., Gaponik, N., Lesnyak, V., Shavel, A., Eychmüller, A., Rakovich, Y.P., Donegan, J.F., 2007a. Aqueous synthesis of thiol-capped CdTe nanocrystals: State-of-the-art. *Journal of Physical Chemistry C* 111, 14628–14637. <https://doi.org/10.1021/jp072463y>
- Santos, B.S., Farias, P.M.A., Menezes, F.D. de, Mariano, E.L., Ferreira, R. de C., Giorgio, S., Bosetto, M.C., Ayres, D.C., Lima, P.M., Fontes, A., Thomas, A.A., Cesar, C.L., 2006. Molecular Differentiation of *Leishmania* Protozoarium using CdS Quantum Dots as Biolabels, in: Achilefu, S., Bornhop, D.J., Raghavachari, R. (Eds.), SPIE. pp. 609706–1–609706–9. <https://doi.org/10.1117/12.646912>
- Shokri, A., Saeedi, M., Fakhar, M., Morteza-Semnani, K Keighobadi, M., Hosseini Teshnizi, S., Kelidari, H., Sadjadi, S., 2017. Antileishmanial Activity of *Lavandula angustifolia* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and nano-emulsions on *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER). *Iran J Parasitol* 12, 622–631.
- Silva, L.C.N. da, Filho, C.M.B., Paula, R.A. de, Coelho, L.C.B.B., Silva, M.V. da, Correia, M.T. dos S., 2014. *Cratylia mollis* Lectin : A Versatile Tool for Biomedical Studies. *Current Bioactive Compounds* 10, 44–54. <https://doi.org/10.2174/157340721001140725000701>
- Silva, L.C.N., Alves, N.M.P., de Castro, M.C.A.B., Pereira, V.R.A., da Paz, N.V.N., Coelho, L.C.B.B., de Figueiredo, R.C.B.Q., Correia, M.T. dos S., 2015. Immunomodulatory effects of pCramoll and rCramoll on peritoneal exudate cells (PECs) infected and non-infected with *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Biological Macromolecules* 72, 848–854. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.09.045>
- Silva, L.C.N., Filho, C.M.B., Paula, R.A. De, Coelho, L.C.B.B., Silva, M. V, Maria, T., Correia, S., 2014. *Cratylia mollis* Lectin: A Versatile Tool for Biomedical Studies 44–54.
- Teixeira, C.R., Cavassani, K.A., Gomes, R.B., Teixeira, M.J., Roque-Barreira, M.C., Cavada, B.S., Silva, J.S. Da, Barral, A., Barral-Netto, M., 2006. Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. *Vaccine* 24, 3001–3008. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.11.067>
- Tripathi, P., Tripathi, P., Kashyap, L., Singh, V., 2007. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 51, 443–452. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00329.x>
- Yu, W.W., Qu, L., Guo, W., Peng, X., 2003b. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chemistry of Materials* 15, 2854–2860. <https://doi.org/10.1021/cm034081k>
- Zhou, J., Yang, Y., Zhang, C., 2015. Toward Biocompatible Semiconductor Quantum Dots : From Biosynthesis and Bioconjugation to Biomedical Application. *Chemical Reviews*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00049>

8 CONCLUSÕES

Pontos quânticos conjugados às biomoléculas são conhecidos por aliarem as características fluorescentes das nanopartículas à atividade biológica da biomolécula, sendo direcionados para diversos usos em ciências da vida. Nesse trabalho, nós apresentamos uma revisão com as diferentes vias para conjugar lectinas e carboidratos a pontos quânticos e as suas principais aplicações. Um protocolo de conjugação eficiente foi estabelecido para conjugar CdTe PQs à lectina Cramoll, fornecendo uma ferramenta versátil para monitoramento de mudanças no perfil glicídico celular. PQ-Cramoll foi capaz de marcar de forma intensa células HeLa e indicou que estas células exibem uma superfície rica em resíduos de glicose/manose, sendo a especificidade da marcação comprovada através do ensaio de inibição com carboidrato específico e saturação com a lectina livre. Em células de *Leishmania*, Cramoll foi capaz de inibir o crescimento de formas promastigota de *L. braziliensis* com maior toxicidade para o parasito, quando comparado com células de mamífero. Além disso, a lectina conjugada ao ponto quântico foi capaz de marcar a membrana de células de *L. braziliensis*, enquanto que os PQs sozinhos preferencialmente marcaram a região anterior do parasita. Dessa forma, os bioconjugados PQ-Cramoll apresentaram-se como uma versátil ferramenta para auxiliar em estudos da glicobiologia. Devido ao potencial terapêutico dessa lectina, o bioconjugado também apresenta perspectivas de uso como agente terapêutico rastreável.

9 PERSPECTIVAS

As próximas etapas consistem em utilizar o conjugado para aprofundar o estudo do perfil de expressão de glicose/manose em HeLa e aplicar esse conjugado em outras linhagens do câncer, correlacionando, se possível, com o grau de malignidade tumoral. Também planeja-se avaliar a citotoxicidade da Cramol frente a essas linhagens. Experimentos complementares como utilização de sondas e outras técnicas microscópicas para aprofundar a compreensão dos processos biológicos no estudo da *Leishmania* também estão entre nossos objetivos.

REFERÊNCIAS

- ADAMCZYK, B.; THARMALINGAM, T.; RUDD, P. M. Glycans as cancer biomarkers. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1820, n. 9, p. 1347–1353.
- ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 26, n. 9, p. 1324–1337, 2007.
- AKCA, O. et al. Radioiodine labeled CdSe/CdS quantumdots: Lectin targeted dual probes. **Radiochim. Acta**. v. 102, n. 9, p. 849–859, 2014.
- ALBUQUERQUE, P. B. et al. Investigating a galactomannan gel obtained from *Cassia grandis* seeds as immobilizing matrix for Cramoll lectin. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 86, p. 454–461, 2016.
- ALFAROUEK, K. O. et al. Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question. **Oncoscience**. v. 1, n. 12, p. 777–802, 2014.
- ALGAR, W. R.; KRULL, U. J. Developing mixed films of immobilized oligonucleotides and quantum dots for the multiplexed detection of nucleic acid hybridization using a combination of fluorescence resonance energy transfer and direct excitation of fluorescence. **Langmuir**. v. 26, n. 8, p. 6041–7, 2010.
- ALGAR, W. R.; TAVARES, A. J.; KRULL, U. J. Beyond labels: A review of the application of quantum dots as integrated components of assays, bioprobes, and biosensors utilizing optical transduction. **Analytica Chimica Acta**. v. 673, n. 1, p. 1–25, 2010.
- ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Drug delivery systems: entering the mainstream. **Science**, v. 303, n. 5665, p. 1818–22, 2004.
- ANDERSON, G. W.; ZIMMERMAN, J. E.; CALLAHAN, F. M. The use of esters of N hydroxysuccinimide in peptide synthesis. **J. Am. Chem. Soc.** v. 86, p. 1839–42, 1964.
- 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 - **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo**, .18 p., ISSN 1679-0154; 36, 2011.
- ARNOLD, J. N. et al. Evaluation of the serum N-linked glycome for the diagnosis of cancer and chronic inflammation. **Proteomics**. v. 8, p. 3284–3293, 2008.

AVELINO, K. Y. P. S. et al. Biosensor based on hybrid nanocomposite and CramoLL lectin for detection of dengue glycoproteins in real samples. **Synthetic Metals**. v. 194, p. 102–108, 2014.

BARCELLOS-HOFF, M. H.; LYDEN, D.; WANG, T. C. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. **Nat. Rev. Cancer**. v. 13, p. 511–518, 2013.

BARROSO, M. M. Quantum dots in cell biology. **J Histochem Cytochem.**, v. 59, n. 3, p. 237-251, 2011.

BASLAK, C. et al. A comparative study on fluorescence quenching of CdTe nanocrystals with a serial of polycyclic aromatic hydrocarbons. **J. Lumin.** v. 153, p. 177–181, 2014.

BEDESSEM, B.; RUPHY, S. SMT or TOFT? How the two main theories of carcinogenesis are made (artificially) incompatible. **Acta Biotheor.** v. 63, n. 3, p. 257-267, 2015.

BEIK, J. et al. Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced applications. **J. Control Release**. v. 235, p. 205-221, 2016.

BELTRÃO, E. I. C.; et al. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 74, p. 125–134, 1998.

BERX, G.; VAN ROY, F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.** v. 1, p. 003129, 2009.

BEZERRA, W. M. et al. Establishment of a heterologous system for the expression of *Canavalia brasiliensis* lectin: a model for the study of protein splicing. **Genet. Mol. Res.** v. 5, p. 216–223, 2006.

BIJU, V. Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy. **Chem. Soc. Rev.** v. 43, p. 744–64, 2014.

BIJU, V.; ITOH, T.; ISHIKAWA, M. Delivering quantum dots to cells: bioconjugated quantum dots for targeted and nonspecific extracellular and intracellular imaging. **Chem. Soc. Rev.** v. 39, p. 3031–3056, 2010.

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

BISHAYEE, A. The role of inflammation and liver cancer. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 816, p. 401-435, 2014.

BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** v. 15, n. 12, p. 786–801, 2014.

BORCHERT, H. et al. Relations between the photoluminescence efficiency of CdTe nanocrystals and their surface properties revealed by synchrotron XPS. **J. Phys. Chem. B**. v. 107, n. 36, p. 9662–9668, 2003.

BOSQUES, C. J.; RAGURAM, S.; SASISEKHARAN, R. The sweet side of biomarker discovery. **Nat. Biotechnol.** v. 24, p. 1100–1101, 2006.

BOTTERO, J-Y. et al. Nanotechnology, global development in the frame of environmental risk forecasting. A necessity of interdisciplinary researches. **Geoscience.** v. 347, p. 35–42, 2015.

BOTEZATU, A. et al. Mechanisms of Oncogene Activation. In: Bulgin, D. (Ed.). **New Aspects in Molecular and Cellular Mechanisms of Human Carcinogenesis.** ISBN 978-953-51-2253-1, 2016.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science.** v. 119, p. 419, 1954.

BRETTTHAUER, R. K.; CASTELLINO, F. J. Glycosylation of *Pichia pastoris* - derived proteins. **Biotechnology and Applied Biochemistry.** v. 30, p. 193–200, 1999.

BROCKE, T. et al. Spectroscopy of few electron collective excitations in charge-tunable artificial atoms. **Phys. Rev. Lett.** v. 91, p. 257401–257404, 2003.

BROWN, G. D. et al. Hidden killers: Human fungal infections. **Sci. Transl. Med.** v. 4, p. 165rv13, 2012.

BRUCHEZ, M. et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. **Science.** v. 281, p. 2013–2016, 1998.

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

BRUSTEIN, V. P. et al. Chemiluminescent detection of carbohydrates in the tumoral breast diseases. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 166, n. 2, p. 268–275, 2012.

CABRAL FILHO, P. E. Investigação de antígenos eritrocitários do sistema abo utilizando quantum dots conjugados a anticorpos monoclonais e à lectina *Ulex europaeus*. 2013. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco. 2013.

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.

CABRERA M. P. et al. Highly fluorescent and superparamagnetic nanosystem for biomedical applications. **Nanotechnology.** v. 28, 2017.

CALDERONE, R.A.; FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol.** v. 9, p. 327–335, 2001.

CAO, Y. et al. Cancer research: past, present and future. **Nat. Rev. Cancer.** v. 11, n. 10, p. 749-754, 2011.

CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature.** v. 438, n. 7070, p. 932-936, 2005.

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

CAVALCANTE, T. T. A. et al. Plant lectins as alternative tools against bacterial biofilms. **African Journal of Microbiology Research.** v. 8, n. 27, p. 2555-2564, 2014.

CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. **Nat. Rev. Cancer.** v. 4, p. 118-132, 2004.

CHAN, W. C. W.; NIE, S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. **Science.** v. 281, p. 2016-2018, 1998.

CHANDRASEKARAN, G. et al. Antibacterial and Antifungal Activities of Lectin Extracted from Fruiting Bodies of the Korean Cauliflower Medicinal Mushroom, *Sparassis latifolia* (Agaricomycetes). **Int. J. Med. Mushrooms,** v. 18, n. 4, p. 291-299, 2016.

CHATTERJEE, S. et al. Tumor VEGF:VEGFR2 autocrine feed-forward loop triggers angiogenesis in lung cancer. **J. Clin. Invest.** v. 123, n. 4, p. 1732-1740, 2013.

CHEN, C. J. et al. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. **Nat. Med.** v. 13, n. 7, p. 851-856. 2007.

CHEN, F. et al. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. **BMC Medicine.** v. 13, n. 45, 2015.

CHENG, F-F. et al. N-Acetylglucosamine biofunctionalized CdSeTe quantum dots as fluorescence probe for specific protein recognition. **Analyst.** v. 138, p. 666-670, 2013.

CHEN, H. et al. Comparison of quantum dots immunofluorescence histochemistry and conventional immunohistochemistry for the detection of caveolin-1 and PCNA in the lung cancer tissue microarray. **J. Mol. Histol.** v. 40, n. 4, p. 261-268, 2009.

CHEN, J. et al. A novel sialic acid-specific lectin from *Phaseolus coccineus* seeds with potent antineoplastic and antifungal activities. **Phytomedicine.** v. 16, p. 352-360, 2009.

CHHOUR, P. et al. Multimodal imaging: Nanocrystal loaded PLA-shelled contrast agents. **Biomedical Engineering Conference (NEBEC), 2015 41st Annual Northeast.** IEEE, doi: 10.1109/NEBEC.2015.7117202, 2015.

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. 2403-2411, 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.

CLARK, A. J. et al. CRLX101 nanoparticles localize in human tumors and not in adjacent, nonneoplastic tissue after intravenous dosing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 113, n. 14, p. 3850-3854, 2016.

CLAUSSEN, J. C. et al. Probing the Enzymatic Activity of Alkaline Phosphatase within Quantum Dot Bioconjugates. **J. Phys. Chem. C**. v. 9, n. 8, p. 7791-7803, 2015.

COFFELT, S. B. et al. Elusive identities and overlapping phenotypes of proangiogenic myeloid cells in tumors. **Am. J. Pathol.** v. 176, p. 1564–1576, 2010.

COLE, A. J. et al. Assessing mutant p53 in primary high-grade serous ovarian cancer using immunohistochemistry and massively parallel sequencing. **Scientific Reports**. v. 6, 2016.

CONDEELIS, J.; POLLARD, J. W. Macrophages: obligate 6. partners for tumour cell migration, invasion and metastasis. **Cell**. v. 124, p. 263-266, 2006.

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.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**. v. 420, p. 860-867, 2002.

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

CUNHA, C. R. A. Avaliação da atividade antitumoral da lectina recombinante de *Cratylia mollis* (rCramoll) livre e encapsulada em lipossomas furtivos. 2014. 123 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – Centro de ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco. 2014.

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.

CURTO, M. et al. Contact dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. **J. Cell Biol.** v. 177, p. 893–903, 2007.

CUZICK, J. et al. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epi- dermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the genomic health recurrence score in early breast cancer. **J. Clin. Oncol.** v. 29, p. 4273–4278, 2011.

DABBOUSI, B. O. et al. (CdSe) ZnS core-shell quantum dots: synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. **Journal of Physical Chemistry B**. v. 101, p. 9463–9475, 1997.

DATTA, D. et al. Human Prostate Cancer Hallmarks Map. **Scientific Reports**. v. 6, 2016.

DeBERARDINIS; R. J. CHANDEL, N. S. Fundamentals of cancer metabolismo. **Sci. Adv.** v. 2, n. 5, 2016.

DELEHANTY, J. B. et al. Active cellular sensing with quantum dots: Transitioning from research tool to reality; a review. **Analytica Chimica Acta.** v. 750, p. 63– 81, 2012.

DENARDO, D.G.; ANDREU, P.; COUSSENS, L.M. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. **Cancer Metastasis Rev.** v. 29, p. 309–316, 2010.

DESOIZE, B.; JARDILLIER, J. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? **Crit. Rev. Oncol. Hematol.** v. 36, p. 193–207, 2000.

DEVREESE, J. T. Importance of Nanosensors: Feynman's Vision and the Birth of Nanotechnology. **Mater. Res. Soc. Symp. Proc.** v. 952, 2007.

DIAZ, B. et al. Assessing methods for blood cell cytotoxic responses to inorganic nanoparticles and nanoparticle aggregates. **Small.** v. 4, p. 2025-2034, 2008.

DING, L. et al. Spectroscopic studies on the thermodynamics of L-cysteine capped CdSe/CdS quantum dots--BSA interactions. **J. Fluoresc.** v. 21, n. 1, p. 17-24, 2011.

DONEGAN, J.; RAKOVICH, Y. Cadmium telluride quantum dots: advances and applications. Donegan, J. F. (Ed.). Pan Stanfor Publishing, 2013.

DONEHOWER, L. A. et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. **Nature.** v. 356, n. 6366, p. 215-221, 1992.

DREHER, M. R. et al. Tumorvascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 98, p. 335–344, 2006.

DUBERTRET, B. et al. In Vivo Imaging of Quantum Dots Encapsulated in Phospholipid Micelles. **Science.** v. 298, p. 1759-1762, 2002.

DUNCAN, R.; GASPAR, R. Nanomedicine(s) under the microscope. **Mol. Pharm.** v. 8, n. 6, p. 2101-2141, 2011.

DUNN, G.P.; OLD, L.J.; SCHREIBER, R.D. The three Es of cancer immunoediting. **Annu. Rev. Immunol.** v. 22, p. 329-360, 2004.

DVORAK, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. **N. Engl. J. Med.** v. 315, n. 26, p. 1650-1659, 1986.

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.

EGEBLAD, M.; NAKASONE, E. S.; WERB, Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organs. **Dev. Cell.** v. 18, p. 884–901, 2010.

ELLENBROEK, S. I.; VAN RHEENEN, J. Imaging hallmarks of cancer in living mice. **Nat. Rev. Cancer**. v. 14, n. 6, p. 406-418, 2014.

FANG, M. et al. Quantum dots for cancer research: current status, remaining issues, and future perspectives. **Cancer Biol. Med.** v. 9, p. 151-163, 2012.

FEDER, D. et al. *In vitro* and *in vivo* documentation of quantum dots labeled *Trypanosoma cruzi*-Rhodnius prolixus interaction using confocal microscopy, **Parasitol. Res.** v. 106, p. 85-93, 2009.

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.

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. 381-8, 2014.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v. 29, p. 789-791, 2009.

FEYNMAN, R. P. There's Plenty of Room at the Bottom. **Engineering and Science**. v. 23, n. 5, 1960.

FISCHER, D.; KISSEL, T. Histochemical characterization of primary capillary endothelial cells from porcine brains using monoclonal antibodies and fluorescein isothiocyanate-labelled lectins: implications for drug delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v. 52, n. 1, p. 1-11, 2001.

FONTES, A. et al. Quantum Dots in Biomedical Research. In: Hudak, R.; Penhaker, M.; Majernik, J. (Ed.). **Biomedical Engineering - Technical Applications in Medicine**, INTECH, ISBN 978-953-51-0733-0, 432, 2012.

FONZI, W. A. Phr1 and phr2 of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of β -1,3- and β -1,6-glucans. **J. Bacteriol.** v. 181, p. 7070-7079, 1999.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v.16, p. 329-344, 2015.

FUSTER, M. M.; ESKO, J. D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. **Nat. Rev. Cancer**. v. 5, n. 7, p. 526-42, 2005.

GANDHALI, A. D. Cancer nanotechnology: the recent developments in the cancer therapy. **Glob. J. Nano.** v. 1, n. 1, 2016.

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

GAO, Z.; ZHANG, L.; SUN, Y. Nanotechnology applied to overcome tumor drug resistance. **Journal of Controlled Release**. v. 162, p. 45-55, 2012.

GEIBLER, D.; HILDEBRANDT, N. Recent developments in Förster resonance energy transfer (FRET) diagnostics using quantum dots. **Anal Bioanal. Chem.** v. 408, n. 17, p. 4475–83, 2016.

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.

GHRERA, A. S. et al. Quantum dot-based microfluidic biosensor for cancer detection. **Appl. Phys. Lett.** v. 106, n.19, p.193703– 193703.5, 2015.

GILGUNN, S. et al. Aberrant PSA glycosylation — a sweet predictor of prostate cancer. **Nat. Rev. Urol.** v. 10, p. 99–107, 2013.

GOCHEVA, V. et al. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. **Genes Dev.** v. 24, p. 241–255, 2010.

GOLDMAN, E. R. et al. Avidin: a natural bridge for quantum dot-antibody conjugates, **J. Am. Chem. Soc.** v.124, n. 22, p. 6378–6382, 2002.

GOLDMAN, E. R. et al. Self-assembled luminescent CdSe–ZnS quantum dot bioconjugates prepared using engineered poly-histidine terminated proteins. **Anal. Chim. Acta.** v. 534, p. 63–67, 2005a.

GOLDMAN, E. R. et al. A hybrid quantum dot-antibody fragment fluorescence resonance energy transfer-based TNT sensor. **J. Am. Chem. Soc.** v. 127, p. 6744–6751, 2005b.

GOLDSTEIN, M. J.; MITCHELL, E. P. Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. **Cancer Invest.** v. 23, p. 338–351, 2005.

GORAKSHAKAR, A. C.; GHOSH, K. Use of lectins in immunohematology. **Asian J. Transfus. Sci.** v. 10, n. 1, p. 12–21, 2016.

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

GOW, N. A. R. e YADAV, B. Microbe Profile: *Candida albicans*: a shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans. **Microbiology**, v. 163, p.1145–1147, 2017.

GREISH, K. et al. Macromolecular therapeutics: advantages and prospects with special emphasis on solid tumour targeting. **Clin. Pharmacokinetics.** v. 42, p. 1089–1105, 2003.

HAN, E. et al. Electrochemiluminescent biosensing of carbohydrate-functionalized CdS nanocomposites for in situ label-free analysis of cell surface carbohydrate. **Biosensors and Bioelectronics.** v. 26, p. 2500–2505, 2011.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell.** v. 86, p. 353–364, 1996.

HANAHAN, D; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**. v. 100, n. 1, p. 57-70, 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARVEY, M.; et al. A mutant p53 transgene accelerates tumour development in heterozygous but not nullizygous p53-deficient mice. **Nat. Genet.** v. 9, n. 3, p. 305-311, 1995.

HATTORI, N.; USHIJIMA, T. Epigenetic impact of infection on carcinogenesis: mechanisms and applications. **Genome Medicine**. v. 8, n. 10, 2016.

HAUCK, T. S. et al. *In vivo* quantum-dot toxicity assessment. **Small**. v. 6, n 1, p. 138-44, 2010.

HIDA, K. et al. Tumor angiogenesis – characteristics of tumor endothelial cells. **Int. J. Clin. Oncol.** v. 21, n. 206, 2016.

HNISZ, D. et al. Activation of proto-oncogenes by disruption of chromosome neighborhoods. **Science**. v. 351, n. 6280, p. 1454-1458, 2016.

HONG, E. J.; CHOI, D. G.; SHIM, M. S. Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. v. 6, n. 4, p. 297-307, 2016.

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

HAKOMORI, S. Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. **Cancer Res**. v. 45, p. 2405–2414, 1985.

HAKOMORI, S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**. v. 99, p. 10231–10233, 2002.

HÄUSELMANN, I.; BORSIG, L. Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis. **Front Oncol**. v. 4, n. 28, 2014.

HOTEZ, P. J. Neglected Parasitic Infections and Poverty in the United States. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, 2014.

IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. GLOCOCAN. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2012. < <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>>. ACESSO: 13/06/2016.

INCA (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA), COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**– Rio de Janeiro: INCA, 2015. 122 p.

INCA (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA)/ MINISTÉRIO DA SAÚDE, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de

Educação; organização Luiz Claudio Santos Thuler . **ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer** – 2. ed. rev. e atual.– Rio de Janeiro: INCA, 2012. 129p.

INMAN, K. S.; FRANCIS, A. A.; MURRAY, N. R. Complex role for the immune system in initiation and progression of pancreatic cancer. **World J. Gastroenterol.** v. 20, n. 32, p. 11160-11181, 2014.

IWAKUMA, T.; LOZANO, G. Crippling p53 activities via knock-in mutations in mouse models. **Oncogene.** v. 26, n. 15, p. 2177-2184, 2007.

IYER, A. K.; KHALED. G.; FANG, J.; MAEDA, H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. **Drug Discov.** p. 812–818, 2006.

IYER, A.K. et al. Role of integrated cancer nanomedicine in overcoming drug resistance, **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 65, n 13-14, p. 1784–1802, 2013.

JABR-MILANE, L. et al. Multi-functional nanocarriers for targeted delivery of drugs and genes. **J. Control. Release.** v. 130, p. 121–128, 2008.

JAFRI, M. A. et al. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. **Genome Medicine.** v. 8, n. 69, 2016.

JAIN, N. K. Pharmaceutical Nanotechnology. **Pharmaceutical Technology.** p. 1-17, 2007.

JANEWAY, C. A. J; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol.** v. 20, p.197–216, 2002.

JOHANSSON, M.; DENARDO, D.G.; COUSSENS, L.M. Polarized immune responses differentially regulate cancer development. **Immunol. Rev.** v. 222, p. 145–154, 2008.

JOHNSON, B. J. et al. Understanding enzymatic acceleration at nanoparticle interfaces: Approaches and challenges. **Nano Today.** v. 9, p. 102-131, 2014.

JOYCE, J. A.; POLLARD, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nat. Rev. Cancer.** v. 9, p. 239–252, 2009.

JONG, M. Imaging preclinical tumour models: improving translational Power. **Nature Reviews | Cancer.** v.14, p. 481-493, 2014.

KANNAGI, R. Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. **Glycoconj J.** v. 14, p. 577–584, 1997.

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. 562–575, 2009.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matriz metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell.** v. 141, n; 1, p. 52-67, 200.

- KIBERSTIS, P. A. Metastasis: Na evolving story. **Science**. v. 352, n. 6282, p. 162-163, 2016.
- KIM, Y. J.; VARKI, A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. **Glycoconj. J.** v. 14, p. 569–576, 1997.
- KIM, Y-G. et al. Quantum dot-based HIV capture and imaging in a microfluidic channel. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 25, p. 253–258, 2009.
- KLIMOV, V. I. Spectral and dynamical properties of multiexcitons in semiconductor nanocrystals. **Annu. Rev. Phys. Chem.** v. 58, p. 635–673, 2007.
- KONG, B. et al. ER stress compromises VEGFA secretion of pancreatic cancer cells under hypoxic conditions, thereby contributing to tumor hypoxia. **Pancreas Cancer**. v. 18, n. 2, 2016.
- KRAJNIK, P. et al. Transitioning to sustainable production e part III: developments and possibilities for integration of nanotechnology into material processing technologies. **Journal of Cleaner Production**. v. 112, 2016.
- KRESO, A.; DICK, J. E. Evolution of the cancer stem cell model. **Cell Stem Cell**. v. 14, n. 3, p. 275-291, 2014.
- KUMAR, K. K. et al. Biological role of lectins: A review. **Journal of Orofacial Sciences**. v. 4, n. 1, 2012.
- KUMAR, P.; SHARMA, S.C.; DEEP, A. Bioconjugation of anti estrogen alpha antibody with CdSSe/ZnS quantum dots for molecular sensing of a breast cancer antigen. **Sensors and Actuators B**. v. 202, p. 404–409, 2014.
- KWON, H. et al. *In Vitro* and *In Vivo* Imaging of Prostate Cancer Angiogenesis Using Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Antibody-Conjugated Quantum Dot. **Korean Journal of Radiology**. v. 14, p. 30-37, 2013.
- LANDSTEINER, K. The Specificity of Serological Reactions. **3rd ed. Springfield**: Charles C Thomas, 1936.
- LANDHUIS, E. Glycobiology: Sweet success. **Nature**. v. 547, p. 127–129, 2017.
- LANNOO, N.; VAN DAMME, E. J. M. Lectin Domains at the Frontiers of Plant Defense. **Frontiers in Plant Science**. v. 5, n. 397, 2014.
- LAO, U. L.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Simple conjugation and purification of quantum dot - antibody complexes using a thermally responsive elastin-protein L scaffold as immuno- fluorescent agents. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 128, p. 14756–14757, 2006.
- LAPIN, N. A. et al. Intravital microscopy for evaluating tumor perfusion of nanoparticles exposed to non-invasive radiofrequency electric fields. **Cancer Nanotechnol**. v. 7, p. 5, 2016.

LATGE, J. P. The cell wall: A carbohydrate armour for the fungal cell. **Mol. Microbiol.** v. 66, p. 279–290, 2007.

LAVIGUEUR, A. et al. High incidence of lung, bone, and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 oncogene. **Mol. Cell. Biol.** v. 9, n. 9, p. 3982–3991, 1989.

LI, S. et al. Peptide-Conjugated Quantum Dots Act as the Target Marker for Human Pancreatic Carcinoma Cells. **Cell Physiol. Biochem.** v. 38, p. 1121–1128, 2016.

LICHTENSTEIN, R. G.; RABINOVICH, G. A. Glycobiology of cell death: when glycans and lectins govern cell fate. **Cell Death and Differentiation.** v. 20, p. 976–986, 2013.

LIM, S. et al. Immunoregulatory Protein B7-H3 Reprograms Glucose Metabolism in Cancer Cells by ROS-Mediated Stabilization of HIF1 α . **Cancer Res.** v. 76, n. 8, p. 2231–2242, 2016.

LIMA, A. L. R. et al. Histochemical Evaluation of Human Prostatic Tissues with *Cratylia mollis* Seed Lectin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology.** p. 1–7, 2010.

LIMA, V. L. M. et al. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. **Carbohydrate Polymers.** v. 31, p. 27–32, 1997.

LIRA, R. B. Estudo da Interação de Quantum dots com células e direcionamento intracelular mediado por lipossomas. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Ciências Biológicas, Recife-PE, 96f, 2011.

LOCKER, G. Y. et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. **J. Clin. Oncol.** v. 24, p. 5313–5327, 2006.

LOPES, S. C. A. et al. Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs, Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches, Prof. Letícia Rangel (Ed.), ISBN: 978-953-51-1098-9, InTech, DOI: 10.5772/55290, 2013.

LOPES, A.; CHAMMAS, R.; IYEYASU, H. Oncologia para a graduação. São Paulo, **Lemar**, v. 3, p. 219–228, 2013.

LOWE, S.W.; CEPERO, E.; EVAN, G. Intrinsic tumour suppression. **Nature.** v. 432, p. 307–315, 2004.

LUDOLPH, B. et al. Novel single molecule precursor routes for the direct synthesis of highly monodispersed quantum dots of cadmium or zinc sulfide or selenide. **Chem Commun.** p. 1849–1850, 1998.

LUNT, S. Y.; VANDER HEIDEN, M. G. Aerobic glycolysis: Meeting the metabolic requirements of cell proliferation. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** v. 27, p. 441–464, 2011.

MAC GABHANN, F.; POPEL, A. S. Systems biology of vascular endothelial growth factors. **Microcirculation.** v. 15, p. 715–738, 2008.

MACIEL, E. V. M. et al. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**. v. 32, n. 1, p. 57-60, 2004.

MAEDA, H. et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. **J. Control Release**. v. 65, n.1-2, p. 271-84, 2000.

MAEDA, H.; SAWA, T.; KONNO, T. Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS, **J. Control Release**. v. 74, p. 47-61, 2001.

MA-HOCK, L. et al. Short term inhalation toxicity of a liquid aerosol of CdS/Cd(OH)₂ core shell quantum dots in male Wistar rats. **Toxicology letters**. v. 208, n. 2, p. 115-24, 2012.

MARTYNENKO, I. V. et al. Chlorin e6-ZnSe/ZnS quantum dots based system as reagent for photodynamic therapy. **Nanotechnology**. v. 26, n. 5, p. 055102, 2015.

MATTOUSSI, H.; PALUI, G.; NA, H.B. Luminescent quantum dots as platforms for probing in vitro and in vivo biological processes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 138-166, 2012.

MAZMANIAN, S. K. et al. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. **Cell**. v. 122, p.107-118, 2005.

MEDINTZ, I. L. et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. **Nat. Mater**. v. 4, p. 435-446, 2005.

MEDINTZ, I. L. et al. A reactive peptidic linker for self-assembling hybrid quantum dot-DNA bioconjugates. **Nano Lett**. v. 7, p. 1741-1748, 2007.

MEEK, D.W. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? **Nature Reviews Cancer**. v. 9, p. 714-723, 2009.

MELO, C. M. L. et al. Mitogenic response and cytokine production induced by Cramoll 1,4 lectin in splenocytes of inoculated mice. **Scandinavian Journal of Immunology**. v. 73, p. 112-121, 2011a.

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

MELO, C. M. L. et al. Healing activity induced by Cramoll1,4 lectinin healthy and immune compromised mice. **Int. J. Pharm**. v. 408, n. 1-2, p. 113-119, 2011c.

MENÉNDEZ, C. et al. Identification and recombinant expression of a bacterial exolevanase useful for the production of high fructose syrups. **Biotecnologia Aplicada**. v. 22, p. 68-72, 2005.

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

- MEYER, N.; PENN, L. Z. Reflecting on 25 years with MYC. **Nature Reviews Cancer**. v. 8, p. 976-990, 2008.
- MIN, W.; JONES, D. H. Stability and detection of recombinant pre-pro-concanavalin A after cytoplasmic expression in *Escherichia coli*. **FEBS Lett**. v. 301, p. 315–318, 1992.
- MINKO, T. Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. **Adv Drug Deliv Rev**. v. 56, p. 491–509, 2004.
- MINTZ, P. J. et al. Discovery and horizontal follow-up of an autoantibody signature in human prostate cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci**. v. 112, n. 8, p. 2515–2120, 2015.
- MODY, R.; JOSHIB, S. H. A.; CHANEY, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. v. 33, n. 1, p. 1-10, 1995.
- MOHAMED, M. M.; SLOANE, B. F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. **Nat. Rev. Cancer**. v. 6, n.10, p. 764-75, 2006.
- MONTENEGRO, J. M. et al. Controlled antibody/bioconjugation of inorganic nanoparticles for targeted delivery. **Adv. Drug Delivery Rev**. v. 65, p. 677–688, 2013.
- MUENST, S. et al. The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. **Journal of Internal Medicine**. v. 279, n. 6, 2016.
- MUMM, J. B.; OFT, M. Cytokine-based transformation of 21. immune surveillance into tumor-promoting inflammation. **Oncogene**. v. 27, p. 5913-5919, 2008.
- MURDOCH, C. et al. Theroleofmyeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. **Nat. Rev. Cancer**. v. 8, p. 618–631, 2008.
- NARANG, A.S.; VARIA, S. Role of tumor vascular architecture in drug delivery. **Adv Drug Deliv. Rev**. v. 63, n. 8, p. 640-658, 2011.
- NESS, J. M. et al. Combined tyramide signal amplification and quantum dots for sensitive and photostable immunofluorescence detection. **J. Histochem. Cytochem**. v. 51, p. 981-98, 2003.
- NGUYEN, D. X.; BOS, P.D.; MASSAGUÉ, J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. **Nature Reviews | Cancer**. v. 9, n. 4, p. 274–84, 2009.
- NGUYEN, Q. T.; TSIEN, R. Y. Fluorescence-guided surgery with live molecular navigation — a new cutting edge. **Nature Reviews | Cancer**. v. 13, p. 653-662, 2013.
- NIMRICHTER, L. et al. Intact cell adhesion to glycan microarrays. **Glycobiology**. v. 14, p. 197–203, 2004.
- OBENAU, A. C.; MASSAGUÉ, J. Surviving at a distance: organ specific metastasis. **Trends Cancer**. v. 1, n. 1, p. 76–91, 2015.

OKADA, T.; LOPEZ-LAGO, M.; GIANCOTTI, F.G. Merlin/NF-2 mediates contact inhibition of growth by suppressing recruitment of Rac to the plasma membrane. **J. Cell Biol.** v. 171, p. 361–371, 2005.

OLIVEIRA, C. et al. A comparative study of recombinant and native frutalin binding to human prostate tissues. **BMC Biotechnol.** v. 9, p. 78, 2009.

OLIVEIRA, C.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Recombinant production of plant lectins in microbial systems for biomedical application – the frutalin case study. **Frontiers in plant Science.** v. 5, 2014.

OLIVEIRA, M. D. L. et al. Electrochemical evaluation of lectin-sugar interaction on gold electrode modified with colloidal gold and polyvinyl butyral. **Colloids Surf B Biointerfaces.** v. 66, n. 1, p. 13-9, 2008.

OLIVEIRA, M. D. L. et al. Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition. **Journal of Colloid and Interface Science.** v. 362, p. 194–201, 2011a.

OLIVEIRA, M. D. L. et al. Detection of dengue virus serotypes on the surface of gold electrode based on *Cratylia mollis* lectin affinity. **Sensors and Actuators.** v. 155, p. 789–795, 2011b.

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.

ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Rev Med (São Paulo)**, v. 89, n. 1, p. 21-31, 2010.

OZAWA, M. The N-cadherin cytoplasmic domain confers anchorage independent growth and the loss of contact inhibition. **Sci. Rep.** v. 5, p.15368, 2015.

PAIVA, P. M. G. et al. Isolation of a trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. **Bioresource Technology.** v. 88, p. 75–79, 2003.

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.

PALERMO, C.; JOYCE, J.A. Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. **Trends Pharmacol. Sci.** v. 29, p. 22–28, 2008.

PALUMBO Jr, A. et al. Genetic instability in the tumor microenvironment: a new look at an old neighbor. **Mol. Cancer.** v. 14, n. 145, 2015.

PAN, S. et al. Mass spectrometry based glycoproteomics from a proteomics perspective. **Mol. Cell Proteomics.** v. 10, n. 1, 2011.

PANG, X. et al. Mosquito C-type lectins maintain gut microbiome homeostasis. **Nat. Microbiol.** 2016.

PANKIEWICZ, C. G. et al. Characterization of the Dynamics of Photoluminescence Degradation in Aqueous CdTe/CdS Core-Shell Quantum Dots. **J. Fluoresc.** v. 25, p. 1389–1395, 2015.

PAYNE, G. S.; BISHOP, J. M.; VARMUS, H. E. Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene in bursal lymphomas. **Nature.** v. 295, p. 209–214, 1982.

PAYNE, S. J. L. et al. Predictive markers in breast cancer – the present. **Histopathology.** v. 52, p. 82–90, 2008.

PENG, H. et al. Preparation of water-soluble CdTe/CdS core/shell quantum dots with enhanced photostability. **J. Lumin.** v. 127, n. 2, p. 721–726, 2007.

PENG, Z.A.; PENG, X. Formation of high-quality CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals using CdO as precursor. **J. Am. Chem. Soc.** v. 123, n. 1, p.183-4, 2001.

PEREIRA, D. S. T. et al. Topical Application Effect of the Isolectin Hydrogel (Cramoll 1,4) on Second-Degree Burns: Experimental Model. **Journal of Biomedicine and Biotechnology.** v. 2012, 2012.

PIERORAZIO, P. M. et al. Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. **BJU INT.** v. 111, n. 5, p. 753–760, 2013.

PIKTEL, E. et al. Recent insights in nanotechnology-based drugs and formulations designed for effective anti-cancer therapy. **J. Nanobiotechnol.** v. 14, p. 39, 2016.

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

POLLI, C. D. et al. Jacalin-Activated Macrophages Exhibit an Antitumor Phenotype. **BioMed. Research International.** v. 2016, 2016.

POPOLO, L. *PHR* Family: The Role of Extracellular Transglycosylases in Shaping *Candida albicans* Cells. **Fungi.** v. 3, p. 59, 2017.

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.

QIAN, B. Z.; POLLARD, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell.** v. 141, p. 39–51, 2010.

QIAN, C-N. et al. Revisiting tumor angiogenesis: vessel co-option, vessel remodeling, and cancer cell-derived vasculature formation. **Chin. J. Cancer.** v. 35, p. 10, 2016.

RABINOVICH, G. A. et al. Functions of cell surface galectin–glycoprotein lattices. **Curr Opin Struct. Biol.** v. 17, p. 513–520, 2007.

RAMOS, R.S. Ciência e paradigma na pesquisa em câncer: a necessidade do estabelecimento de um debate. **Cad. Saúde Colet.** v. 21, n. 4, Rio de Janeiro, 2013.

RAY, P. C.; YU, H.; FU, P. P. Toxicity and Environmental Risks of Nanomaterials: Challenges and Future Needs. **J. Environ. Sci. Health C. Environ. Carcinog Ecotoxicol.** v. 27, n.1, p. 1–35, 2009.

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

RODRÍGUEZ, E. et al. Glycans from *Fasciola hepatica* Modulate the Host Immune Response and TLR-Induced Maturation of Dendritic Cells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 12, 2015.

RUAN, Y. et al. Detection of Prostate Stem Cell Antigen Expression in Human Prostate Cancer Using Quantum-Dot-Based Technology. **Sensors.** v. 12, n. 5, p. 5461-5470, 2012.

RUSEVA, M. et al. Mannan-binding lectin deficiency modulates the humoral immune response dependent on the genetic environment. **Immunology.** v. 127, p. 279–288, 2009.

RZIGALINSKI, B. A.; STROBL, J. S. Cadmium-containing nanoparticles: perspectives on pharmacology and toxicology of quantum dots. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 238, p. 280-288, 2009.

SAFI, F. et al. Diagnostic value of CA 19–19 in patients with pancreatic cancer and nonspecific gastrointestinal symptoms. **J. Gastrointest. Surg.** v. 1, p. 106–112, 1997.

SANDHU, A. Who invented nano? **Nature Nanotechnology.** v. 87, 2006.

SANTOS, A. C. O.; PEIXOTO, C. A.; COELHO, L. C. B. B. Ultrastructural analysis and immunocytochemical localization of isolectins in *Cratylia mollis* seeds. **Micron.** v.35, n. 7, p. 613-618, 2004.

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.

SAPSFORD, K.E. et al. Biosensing with luminescent semiconductor quantum dots. **Sensors.** v. 6, p. 925–53, 2006.

SARAVANAN, C. et al. Detection of differentially expressed wound healing-related glycogens in galectin-3-deficient mice. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** v. 50, p. 5690–5696, 2009.

SEBESTYÉN, E. et al. Large-scale analysis of genome and transcriptome alterations in multiple tumors unveils novel cancer-relevant splicing networks. **Genome Res.** 2016, v. 26, n. 6, p. 732-744, 2016.

SCHÄFER, M.; WERNER, S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** v. 9, p. 628–638, 2008.

SCHREDER, B. et al. CdTe/CdS clusters with core-shell structure in colloids and films: the path of formation and thermal breakup. **J. Phys. Chem. B.** v. 104, n. 8, p. 1677–1685, 2000.

SCHROEDER, A. et al. Treating metastatic cancer with nanotechnology. **Nature reviews cancer.** v. 12, p. 39-50, 2012.

SCHUMACKER, P. T. Reactive Oxygen Species in Cancer: A Dance with the Devil. **Cancer Cell.** v. 27, n. 2, p. 156-157, 2015.

SEVENICH, L.; JOYCE, J.A. Pericellular proteolysis in cancer. **Genes Dev.** v. 28, n. 21, p. 2331–2347, 2014.

SHANG, Y.; ZENG, YUN.; ZENG, YONG. Integrated Microfluidic Lectin Barcode Platform for High-Performance Focused Glycomic Profiling. **Scientific Reports.** v. 6, p. 20297, 2016.

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

SHELDON, P. S.; KEEN, J. N.; BOWLES, D. J. Post-translational peptide bond formation during concanavalin A processing in vitro. **Biochemical Journal.** v. 320, p.865-870, 1996.

SHI, Z. et al. Identification of Novel Pathways in Plant Lectin-Induced Cancer Cell Apoptosis. **Int. J. Mol. Sci.** v.17, n. 2, p. 228, 2016.

SHIBU, E. S. et al. Photoluminescence of CdSe and CdSe/ZnS Quantum Dots: Modifications for Making the Invisible Visible at Ensemble and Single-molecule Levels. **Coordination Chemistry Reviews.** v. 263–264, p. 2–12, 2014.

SHIBU, E. S. et al. Nanomaterials formulations for photothermal and photodynamic therapy of cancer. **J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.** v. 15, p. 53-72, 2013.

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, M. C. C. et al. Immobilized *Cratylia mollis* lectin: An affinity matrix to purify a soybean (Glycine max) seed protein with in vitro platelet antiaggregation and anticoagulant activities. **Process Biochemistry.** v. 46, p. 74–80, 2011.

SILVA, L. C. N. et al. *Cratylia mollis* Lectin: A Versatile Tool for Biomedical Studies. **Current Bioactive Compounds.** v. 10, 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, 2015a.

SILVA, L. C. N. et al. Immunomodulatory effects of pCramoll and rCramoll on peritoneal exudate cells (PECs) infected and non-infected with *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 72, p. 848–854, 2015b.

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.

SILVA, P. M. S.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S. Electrochemical Biosensing Strategies to Detect Serum Glycobiomarkers. **Advances in Research**. v. 6, n. 6, p. 1-17, 2016.

SOENEN, S. J. et al. The performance of gradient alloy quantum dots in cell labeling. **Biomaterials**. v. 35, p. 7249-7258, 2014.

SOLÍS-MARTÍNEZ, R. et al. Tumor-associated macrophages contribute to the progression of prostate cancer. **Gaceta Mexicana de Oncología**. v. 14, n. 2, p. 97–102, 2015.

SONNENSCHN, C.; SOTO, A. M. The aging of the 2000 and 2011 Hallmarks of Cancer reviews: A Critique. **J. Biosci.** v. 38, n. 3, p. 651–663, 2013.

SOUSSI, T.; WIMAN, K. G. TP53: an oncogene in disguise. **Cell Death and Differentiation**. v. 22, p. 1239–1249, 2015.

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

SFIHI-LOUALIA, G. et al. *Candida albicans* β -1,2-mannosyltransferase Bmt3 prompts the elongation of the cell-wall phosphopeptidomannan. **Glycobiology**. v. 26, n.2, p.203-14, 2016.

SPATH, G. F. et al. Persistence without pathology in phosphoglycan-deficient *Leishmania major*. **Science**. v. 301, p.1241–1243, 2003.

SPERLING, R. A.; PARAK, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. **Philosophical Transactions of The Royal Society A Mathematical Physical and Engineering**. v. 368, n. 1915, p. 1333–83, 2010.

STAROS, J. V. N-hydroxysulfosuccinimide active esters: bis(N-hydroxysulfosuccinimide) esters of two dicarboxylic acids are hydrophilic, membrane-impermeant, protein cross-linkers. **Biochemistry**. v. 21, n. 17, p. 3950–3955, 1982.

STEEG, P. S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. **Nat. Med.** v. 12, n. 8, p. 895–904, 2006.

STREICHER, H.; SHARON N. Recombinant plant lectins and their mutants. **Methods Enzymol**. v. 363, p. 47–77, 2003.

SUKHANOVA, A. et al. Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells. **Anal. Biochem**. v. 324, p. 60–67, 2004.

SUN, Y. et al. Energy metabolic dysfunction as a carcinogenic factor in cancer cells. **Clin. Trans. Med.** v. 5, n. 14, 2016.

SYED, P. et al. Role of lectin microarrays in cancer diagnosis. **Proteomics**. v. 16, n. 8, p. 1257-1265, 2016.

STILLMARK. H. Ueber Ricin. ein giftiges Fragment aus den Samen von Ricinus comm. L und einigen anderen Euphorbiaceen. Kaiserliche Universität zu Dorpat; Tartu. Estonia. 1888.

SURESH, A. K. Extracellular bio-production and characterization of small monodispersed CdSe quantum dot nanocrystallites. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 130, p. 344–349, 2014.

TABASSUM, D. P.; POLYAK, K. Tumorigenesis: ito takes a village. **Nature Reviews Cancer**, v.15, p. 473–483, 2015.

TALAPIN, D. V.; POZNYAK, S. K.; GAPONIK, N. P. Synthesis of surface-modified colloidal semiconductor nanocrystals and study of photoinduced charge separation and transport in nanocrystal-polymer composite. **Physica E**. v. 14, p. 237, 2002.

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

TANG, H. et al. The detection and discovery of glycan motifs in biological samples using lectins and antibodies: new methods and opportunities. **Adv Cancer Res**. v. 126, p. 167–202, 2015.

TANSEY, W. P. Mammalian MYC Proteins and Cancer. **New Journal of Science**. v. 2014, 2014.

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.

THASSU, D.; PATHAK, Y.; DELEERS, M. Nanoparticulate drug-delivery sstems: an overview, in. thassu d., pathak y., deleers M. **Nanoparticulate Drug Delivery Systems, Informa Healthcare**. USA, Inc. p. 1-31, 2007.

THURBER, G. M.; FIGUEIREDO, J. L.; WEISSLEDER, R. Multicolor fluorescent intravital live microscopy (FILM) for surgical tumor resection in a mouse xenograft model. **Plos One**, v. 4, 2009.

TRIPATHI, N. K. Production and Purification of Recombinant Proteins from *Escherichia coli*. **Chem. Bio. Eng. Rer**. v. 3, n. 3, p. 116–133, 2016.

THURBER, G. M.; FIGUEIREDO, J. L.; WEISSLEDER, R. Multicolor fluorescent intravital live microscopy (FILM) for surgical tumor resection in a mouse xenograft model. **Plos One**. v. 4, 2009.

VALASTYAN, S.; WEINBERG, R. A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell**. v. 147, n. 2, p. 275–292, 2011.

VALIZADEH, A. et al. Quantum dots: synthesis, bioapplications, and toxicity. **Nanoscale Research Letters**. v. 7, p. 480, 2012.

VAN DIE, I.; CUMMINGS, R. D. Glycan gimmickry by parasitic helminths: a strategy for modulating the host immune response? **Glycobiology**. v. 20, n. 1, p. 2–12, 2010.

VAN DAMME, E. J. M. et al. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Crit. Rev. Plant Sci**. v. 17, p. 575–692, 1998.

VAN DAMME, E. J. M.; LANNOO, N.; PEUMANS, W. J. Plant lectins. **Adv. Bot. Res.** v. 48, p. 107–209, 2008.

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

VAREJÃO, N. et al. Heterologous expression and purification of a biologically active legume lectin from *Cratylia mollis* seeds (CRAMOLL 1). **Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics**. v. 1804, p. 1917–1924, 2010.

VAREJÃO, N.; CORREIA, M. T. S; FOGUEL, D. Characterization of the unfolding process of the tetrameric and dimeric forms of *Cratylia mollis* seed lectin (CRAMOLL 1): effects of natural fragmentation on protein stability. **Biochemistry (Easton)**. v. 50, p. 7330–7340, 2011.

VARKI, A. Evolutionary forces shaping the Golgi glycosylation machinery: Why cell surface glycans are universal to living cells. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. v. 3, 2011.

VARKI, A. et al. Essentials of Glycobiology. 2nd ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, NY**, 2009.

VARKI, A. et al., editors. Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015–2017. General Principles. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453075/>.

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

VARSHNEY, H. M.; SHAILENDER, M. Nanotechnology. Current Status in Pharmaceutical Science: A Review. **Int. J. Therap. Appl**. v. 6, p. 14–24, 2012.

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. 138, 2015.

VAZ, A. F. M. et al. Gamma irradiation as an alternative treatment to abolish allergenicity of lectins in food. **Food Chemistry**. v. 124, p. 1289–1295, 2011.

VAZ, A. F. M. et al. Molecular fragmentation of wheat-germ agglutinin induced by food irradiation reduces its allergenicity in sensitised mice. **Food Chemistry**. v. 132, p. 1033-1039, 2012.

VAZ, A. F. M. et al. Low-dose gamma irradiation of food protein increases its allergenicity in a chronic oral challenge. **Food and Chemical Toxicology**. v. 51, p. 46-52, 2013.

VIANA, C. T. R. et al. Differential Contribution of Acute and Chronic Inflammation to the Development of Murine Mammary 4T1 Tumors. **Plos One**. v. 10, n. 9, 2015.

VIANA, O.S. et al. Comparative Study on the Efficiency of the Photodynamic Inactivation of *Candida albicans* Using CdTe Quantum Dots, Zn(II) Porphyrin and Their Conjugates as Photosensitizers. **Molecules**. v. 20, p. 8893-8912, 2015.

VIEIRA, N. C. et al. Trypanocidal activity of a new pterocarpan and other secondary metabolites of plants from Northeastern Brazil flora. **Bioorg Med. Chem.** v. 16, p. 1676–1682, 2008.

VISWANATH, B.; KIM, S.; LEE, K. Recent insights into nanotechnology development for detection and treatment of colorectal câncer. **International Journal of Nanomedicine**. v. 11, p. 2491–2504, 2016.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A.J. Surfing the p53 network. **Nature**. v. 408, n. 6810, p. 307-310, 2000.

VOUSDEN, K. H.; LANE, D. P. p53 in health and disease. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** v. 8, n. 4, p. 275-283, 2007.

WANG, J.-H. et al. Bioconjugation of Concanavalin A and CdTe quantum dots and the detection of glucose. **Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.** v. 364, p. 82–86, 2010.

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

WANG, L-W. et al. Quantum dots-based double imaging combined with organic dye imaging to establish an automatic computerized method for cancer Ki67 measurement. **Sci. Rep.** v. 6, p. 20564, 2016.

WANG, Y. B. et al. Rapid, sensitive, and simultaneous detection of three foodborne pathogens using magnetic nanobead-based immunoseparation and quantum dot-based multiplex immunoassay. **J. Food Prot.** v.74, p. 2039–2047, 2011.

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.

WEINBERG, R. A. A biologia do câncer. Porto Alegre: **Artmed**. 844 p., 2008.

WHITESIDE, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**. v. 27, n. 45, p. 5904-5912, 2008.

WILLIAMS, C. B. et al. Tumor-associated macrophages: unwitting accomplices in breast cancer malignancy. **NPJ Breast Cancer**. v. 2, 2016.

WILLIS, S. N.; ADAMS, J. M. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. **Curr. Opin. Cell Biol.** v. 17, p. 617–625, 2005.

WO, F. et al. A Multimodal System with Synergistic Effects of Magneto-Mechanical, Photothermal, Photodynamic and Chemo Therapies of Cancer in Graphene-Quantum Dot-Coated Hollow Magnetic Nanospheres. **Theranostics**. v. 6, n. 4, p. 485-500, 2016.

WOODRUM, B. W. A Designed -Nested Dimer of Cyanovirin-N Increases Antiviral Activity. **Viruses**. v. 8, n. 6, p. 158, 2016.

WORMALD, M. R.; SHARON, N. Carbohydrates and glycoconjugates. Progress in non-mammalian glycosylation, glycosyltransferases, invertebrate lectins and carbohydrate-carbohydrate interactions. **Current Opin. Struct. Biol.** v. 14, n. 591, 2004.

WYCKOFF, J. B. et al. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. **Cancer Res.** v. 67, n. 6, p. 2649-2656, 2007.

WU, X. et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. **Nature Biotechnology**. v. 21, p. 41–46, 2003.

XIE, M. et al. Lectin-modified trifunctional nanobiosensors for mapping cell surface glycoconjugates. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 24, p. 1311–1317, 2009.

YAMANAKA, M. et al. Deletion polymorphism in *siglec14* and its functional implications. **Glycobiology**. v. 19, p. 841–846, 2009.

YAN, Y. et al. Spectroscopic investigation of oxygen sensitivity in CdTe and CdTe/CdS nanocrystals. **J. Phys. Chem. C**. v. 115, n. 50, p. 24521–24527, 2011.

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, G. et al. miR-100 antagonism triggers apoptosis by inhibiting ubiquitination-mediated p53 degradation. **Oncogene**. doi:10.1038/onc.2016.270, 2016.

YAU, T. et al. Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy. **Molecules**. v. 20, p. 3791-3810, 2015.

YE, L. et al. A pilot study in non-human primates shows no adverse response to intravenous injection of quantum dots. **Nat. Nanotechnol.** v. 7, p. 453-8, 2012.

YUAN, F. et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft:molecular size dependence and cutoff size. **Cancer Res.** p. 553752–553756, 1995.

ZENG, Q. et al. Synthesis and optical properties of type II CdTe/CdS core/shell quantum dots in aqueous solution via successive ion layer adsorption and reaction. **J. Phys. Chem. C.** v. 112, n. 23, p. 8587–8593, 2008.

ZHANG, L. W.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A. Mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake. **Toxicol. Sci.** v. 110, n. 1, 2009.

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.

ZHU, Z.; DESAIRE, H. Carbohydrates on Proteins: Site-Specific Glycosylation Analysis by Mass Spectrometry. **Annu. Ver. Anal. Chem.** v. 8, p. 463–483, 2015.

ZURAWSKI, V. R. Jr. et al. Elevated serum CA 125 levels prior to diagnosis of ovarian neoplasia: relevance for early detection of ovarian cancer. **Int. J. Cancer.** v. 42, p. 677–680, 1988.

APÊNDICE A – TRABALHOS COMPLEMENTARES



Encapsulation into Stealth Liposomes Enhances the Antitumor Action of Recombinant *Cratylia mollis* Lectin Expressed in *Escherichia coli*

OPEN ACCESS

Edited by:

Manuela Caniça,
National Institute of Health Doutor
Ricardo Jorge, Portugal

Reviewed by:

Nejat Duzgunes,
University of the Pacific, USA
Juliane Viana,
Universidade Católica de Brasília,
Brazil

*Correspondence:

Maria T. dos Santos Correia
mtscorreia@gmail.com

[†]These authors have contributed
equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance and
Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 18 January 2016

Accepted: 16 August 2016

Published: 16 September 2016

Citation:

Cunha CRA, Silva LCN, Almeida FJF,
Ferraz MS, Varejão N, Cartaxo MFS,
Miranda RCM, Aguiar Jr. FCA, Santos
NPS, Coelho LCBB,
Santos-Magalhães NS and Correia
MTS (2016) Encapsulation into Stealth
Liposomes Enhances the Antitumor
Action of Recombinant *Cratylia mollis*
Lectin Expressed in *Escherichia coli*.
Front. Microbiol. 7:1355.
doi: 10.3389/fmicb.2016.01355

Cássia R. A. da Cunha^{1†}, Luís C. N. da Silva^{1,2†}, Fábio J. F. Almeida³, Milena S. Ferraz³,
Nathalia Varejão⁴, Marina F. de Souza Cartaxo³, Rita de Cássia M. de Miranda⁵,
Francisco C. A. de Aguiar Jr.⁶, Noemia P. da Silva Santos⁶, Luana C. B. B. Coelho¹,
Nereide S. Santos-Magalhães³ and Maria T. dos Santos Correia^{1*}

¹ Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil, ² Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Universidade Ceuma, São Luís, Brazil, ³ Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil, ⁴ Laboratório de Agregação de Proteínas e Amiloidoses, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, ⁵ Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente, Universidade Ceuma, São Luís, Brazil, ⁶ Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil

This study evaluated the *in vivo* antitumor potential of the recombinant lectin from seeds of *Cratylia mollis* (rCramoll) expressed in *Escherichia coli*, free or encapsulated in stealth liposomes, using mice transplanted with sarcoma 180. rCramoll-loaded stealth liposomes (rCramoll-lipo) were formulated by hydration of the lipid film followed by cycles of freezing and thawing, and about 60% of rCramoll was encapsulated. This novel preparation showed particle size, polydispersity index, and pH suitable for the evaluation of antitumor activity *in vivo*. Tumor growth inhibition rates were 59% for rCramoll and 75% for rCramoll-lipo. Histopathological analysis of the experimental groups showed that both free and encapsulated lectin caused no changes in the kidneys of animals. Hematological analysis revealed that treatment with rCramoll-lipo significantly increased leukocyte concentration when compared with the untreated and rCramoll group. In conclusion, the encapsulation of rCramoll in stealth liposomes improves its antitumor activity without substantial toxicity; this approach was more successful than the previous results reported for pCramoll loaded into conventional liposomes. At this point, a crucial difference between the antitumor action of free and encapsulated rCramoll was found along with their effects on immune cells. Further investigations are required to elucidate the mechanism(s) of the antitumor effect induced by rCramoll.

Keywords: lectins, heterologous expression, cancer, immunomodulation, pharmaceutical preparations

REVIEW ARTICLE

Lectin-Carbohydrate Interactions: Implications for the Development of New Anticancer Agents

Evellyne de Oliveira Figueirôa^a, Cassia Regina Albuquerque da Cunha^a, Priscilla B.S. Albuquerque^a, Raiana Apolinário de Paula^a, Mary Ângela Aranda-Souza^a, Matheus Alves da Silva^b, Adrielle Zagmignan^b, Maria G. Carneiro-da-Cunha^a, Luís Cláudio Nascimento da Silva^{b,§} and Maria Tereza dos Santos Correia^{a,§*}

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, CEP 50670-420, Recife, PE, Brazil; ^bPós-graduação em Biologia Parasitária, Universidade Ceuma, CEP 65075-120, São Luís, MA, Brazil

Abstract: Lectins are a large group of proteins found in animals, plants, fungi, and bacteria that recognize specific carbohydrate targets and play an important role in cell recognition and communication, host-pathogen interactions, embryogenesis, and tissue development. Recently, lectins have emerged as important biomedical tools that have been used in the development of immunomodulatory, antipathogenic, and anticancer agents. Several lectins have been shown to have the ability to discriminate between normal cells and tumor cells as a result of their different glycosylation patterns. Furthermore, the specific binding of lectins to cancer cells has been shown to trigger mechanisms that can promote the death of these abnormal cells. Here, we review the importance of lectins-carbohydrates interactions in cancer therapy and diagnosis. We examine the use of lectins in the modification of nanoparticles (liposomes, solid lipid nanoparticles and other polymers) for anticancer drug delivery. The development of drug delivery systems (liposomes, alginate/chitosan microcapsules, alginate beads) carrying some antitumor lectins is also discussed. In these cases, the processes of cell death induced by these antitumor lectins were also showed (if available). In both cases (lectin-conjugated polymers or encapsulated lectins), these new pharmaceutical preparations showed improved intracellular delivery, bioavailability and targetability leading to enhanced therapeutic index and significantly less side effects.

ARTICLE HISTORY

Received: February 13, 2017

Revised: April 12, 2017

Accepted: May 13, 2017

DOI:

10.2174/0929867324666170523110400

Keywords: Lectins, Glycosylation, Cancer diagnosis and therapy, Tumor cells, Cell death, Liposomes.

1. INTRODUCTION

Our current definition of lectins was proposed in the mid-1990s, when Peumans and Van Damme characterized them as non-immune proteins that contain a non-catalytic site for the specific and reversible recognition of saccharides that does not change the covalent bonding structure of their glycosidic linkages [1]. These proteins can be classified based on their molecular structure and number of sugar binding domains in

merolectins, hololectins, chimerlectins, and superlectins (Fig. 1). The aspects of lectin discovery and the development of the field "lectinology" have been recently revised by Manning *et al.* [2].

These proteins are ubiquitous in nature, and can be found in animals, plants, bacteria, and fungi [2-5]. In these organisms, lectins are essential for mechanisms related to survival, sugar storage and immune system regulation [6-11]. Lectins also have multiple biotechnological potentials (as shown in Table 1) [3, 5, 12, 13]. In fact, the lectin-carbohydrates interactions make lectins important tools in cell biology, immunology, biochemistry, and genetics and in the development of therapeutic agents [2, 13-15].

*Address correspondence to this author at the Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, CEP 50670-420, Recife, PE, Brazil; Tel: +55 81 21268540; Fax: +55 81 21268576; E-mail: mtscorreia@gmail.com

[§]Equal contributors