



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CARBOIDRATOS EM TECIDOS MAMÁRIOS
HUMANOS EMPREGANDO LECTINAS CONJUGADAS A PONTOS QUÂNTICOS**

CAMILA GALVÃO DE ANDRADE

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ BEZERRA DE CARVALHO JÚNIOR
CO-ORIENTADORA: Prof. Dra. ADRIANA FONTES

RECIFE-PE
2013

ANDRADE, C. G.

CAMILA GALVÃO DE ANDRADE

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CARBOIDRATOS EM TECIDOS MAMÁRIOS
HUMANOS EMPREGANDO LECTINAS CONJUGADAS A PONTOS QUÂNTICOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial das exigências para obtenção do Título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde pela Universidade Federal de Pernambuco.

RECIFE-PE
2013

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

A553a Andrade, Camila Galvão de

Análise da expressão de carboidratos em tecidos mamários humanos empregando lectinas conjugadas a pontos quânticos / Camila Galvão de Andrade. – Recife: O Autor, 2013.

43 f : il.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Coorientador: Adriana Fontes

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

Inclui bibliografia

1. Mamas – Câncer 2. Lectinas 3. Carboidratos I. Carvalho Júnior, Luiz Bezerra de (orientador) II. Fontes, Adriana (coorientadora) III. Título.

616.99449

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-081

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

CAMILA GALVÃO DE ANDRADE

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CARBOIDRATOS EM TECIDOS MAMÁRIOS
HUMANOS EMPREGANDO LECTINAS CONJUGADAS A PONTOS QUÂNTICOS**

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do último, considera a candidata **CAMILA GALVÃO DE ANDRADE** como:

Recife, 01 de março de 2013

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão
Membro Interno

Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia
Membro Externo

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior
Orientador -Presidente

RECIFE-PE
2013

“A coisa mais perfeita que podemos experimentar é o misterioso. É a fonte de toda arte e de toda ciência verdadeira.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Lucineide e Meliony, pelo exemplo que são para mim e por sempre terem estimulado e dado suporte à minha educação.

À minha irmã Marcela e tia-irmã Tati, pela amizade.

Ao meu orientador, Prof^o. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, por ter aberto as portas do universo científico para mim e ter acreditado no desenvolvimento desse trabalho.

À minha co-orientadora, Prof^a Dra. Adriana Fontes, por todo o apoio, disponibilidade, pelo entusiasmo e pelo exemplo de educadora que é.

Ao Prof^o. Dr. Eduardo Beltrão, pelo suporte e à Prof^a Dra. Beate Saesseger, por ter me recebido em seu grupo e possibilitado a realização desse trabalho.

À minha grande família, meus avós, tios e primos, os quais desejo sempre poder orgulhar.

Às amigas Larissa Matos e Amanda Melo, mais que companheiras de trabalho, pelo apoio, amizade sincera e garantia de muitos momentos de diversão.

A Paulo Euzébio, o colaborador mais prestativo que eu poderia encontrar, agradeço por todo o auxílio, boa vontade e principalmente amizade. Aos demais colegas do Laboratório de Biofísica Química, obrigada pela forma que me receberam.

Ao IC Thiago Fernandes, por me lembrar sempre do prazer de ensinar.

Às amigas biomédicas, Catarina Addobbati, Thaísa Feliciano, Marcela Nassar e Manuela Milet, pela amizade mantida apesar do contato não mais diário.

Aos colegas do grupo IMOBIO, em especial Renata Vieira, Gabriela Ayres, Luiza Lima, Lúcia Silva, Mariana Cabrera e Sinara Almeida.

Aos meus amigos, Camila Fonseca, Rafaela Kelly, Sudarsam Farias e Rodrigo Teti, que mesmo de longe, estavam sempre me dando apoio.

RESUMO

A compreensão dos processos que levam ao desenvolvimento e progressão do câncer continua sendo um desafio para a ciência. Nesse contexto, sondas fluorescentes são consideradas uma ferramenta de grande utilidade na biologia, devido à sua capacidade de fornecer uma visualização específica e mais detalhada de estruturas celulares e conteúdo molecular. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de carboidratos em tecidos mamários humanos normais e compará-los com tecidos transformados benigna (fibroadenoma) e malignamente (carcinoma ductal invasivo). Para isso, foram utilizadas sondas fluorescentes formadas pela conjugação de pontos quânticos (PQs) às lectinas Concanavalina A (Con A) e *Ulex europaeus*-I (UEA-I), reconhecedoras, respectivamente, de resíduos de glicose/manose e fucose. Foram sintetizados PQs de CdTe/CdS, funcionalizados/estabilizados com o ácido mercaptosuccínico (AMS). Os conjugados foram avaliados através de espectroscopia de absorção e emissão, ensaios de fluorescência em microplaca (EFM), determinação da atividade hemaglutinante e ensaios de inibição. Cortes de mama normal, fibroadenoma e carcinoma ductal invasivo foram desparafinizados, hidratados e então incubados com os conjugados PQ-Con A e PQ-UEA. A análise da conjugação por EFM apresentou um aumento de 251% para PQ-Con A e 123% para PQ-UEA na intensidade de fluorescência, quando comparado aos controles, indicando que a bioconjugação foi efetiva. As caracterizações mostraram que o conjugado PQ-lectina permaneceu funcional, mantendo as propriedades fluorescentes e de reconhecimento de carboidratos. Em relação à marcação, o conjugado PQ-Con A marcou intensamente o estroma e as células ductais, enquanto o PQ-UEA marcou preferencialmente as células ductais. Os resultados mostraram que conjugados de PQ-lectinas podem ser utilizados como sondas moleculares e assim ajudar a elucidar processos biológicos.

Palavras-Chave: pontos quânticos, lectinas, carboidratos, câncer de mama.

ABSTRACT

Understanding the processes that lead to the development and progression of cancer still remains a challenge for science. In this context, fluorescent probes are considered a valuable tool in biology because of their ability to provide a particular view, more detailed and more sensitive in terms of cell structures and molecular content. The aim of this study was to evaluate the expression of carbohydrates in normal human breast tissue and compare it with benign (fibroadenoma) and malignantly transformed tissues (invasive ductal carcinoma). For this, we used fluorescent probes composed by quantum dots (QDs) and the lectins Concanavalin A (Con A) and *Ulex europaeus*-I (UEA-I), which recognize, respectively, glucose/mannose and fucose residues. CdTe/CdS QDs were synthesized and functionalized/stabilized with mercaptosuccinic acid (MSA). The conjugates were evaluated by absorption and emission spectroscopy, microplate fluorescence assay (MFA), determination of hemagglutinating activity and inhibition assays. Tissue sections of normal breast, fibroadenoma and invasive ductal carcinoma were deparaffinized, hydrated, and then incubated with QD-Con A and QD-UEA conjugates. The analysis of the conjugation by MFA showed an increased of 251% for QD-Con A and 123% for QD-UEA in fluorescence intensity when compared to controls, indicating that the bioconjugation was effective. The characterizations showed that the QD-lectin conjugated remained functional, keeping its fluorescent properties and carbohydrate recognition ability. In regard to labelling, the conjugated QD-Con A strongly labelled the stroma and ductal cells, while the QD-UEA preferentially labelled ductal cells. The results showed that QD-lectins conjugates can be used as molecular probes and thus help to elucidate biological processes.

Keywords: quantum dots, lectins, carbohydrates, breast cancer.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP – ácido mercaptopropiônico

AMS – ácido mercaptosuccínico

BC – banda de condução

BV – banda de valência

$\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ – Perclorato de Cádmio

CdS – Sulfeto de Cádmio

CdTe/CdS – Telureto de Cádmio passivado com Sulfeto de Cádmio

Con A – Concanavalina A

Cra Iso 1 – *Cratylia mollis* isoforma 1

EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

HE – hematoxilina-eosina

INCA – Instituto Nacional do Câncer

MEC – matriz extracelular

NaBH_4 – Boridreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

PAAF – punção aspirativa com agulha fina

PBS – *Phosphate Buffer Saline*

PQ – ponto quântico

PSA – antígeno prostático específico

SHG – *Second Harmonic Generation*

Sulfo-NHS – N-hidroxi-sulfosuccinimida

TRIS – tris(hidroximetil)aminometano

UEA-I – *Ulex europaeus agglutinin I*

UTDL – unidade terminal ducto-lobular

UV – ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura anatômica da mama normal.	Pág. 03
Figura 2	Estrutura do tecido mamário.	Pág. 04
Figura 3	Dupla camada celular observada nos lóbulos e ductos mamários.	Pág. 04
Figura 4	Aspecto macroscópico e microscópico do fibroadenoma.	Pág. 05
Figura 5	Carcinoma ductal invasivo em diferentes graus de diferenciação: Grau 1 – bem diferenciado, Grau 2 – moderadamente diferenciado e Grau 3 – pouco diferenciado.	Pág. 09
Figura 6	Estrutura monomérica da Con A e UEA-I.	Pág. 11
Figura 7	Variação da cor de emissão dos pontos quânticos, evidenciando as mudanças no seu comportamento ótico de acordo com o tamanho da partícula.	Pág. 13
Figura 8	Resistência do ponto quântico à fotodegradação. Em vermelho, marcação com ponto quântico (PQ 630) e em verde, marcação com corante orgânico (AlexaFluor 488).	Pág. 14
Figura 9	Esquema dos sistemas utilizados no ensaio fluorescente em microplacas.	Pág. 19
Figura 10	Espectros de absorção dos conjugados PQ-Con A, PQ-UEA e controle PQ.	Pág. 22
Figura 11	Espectros de emissão dos conjugados PQ-Con A, PQ-UEA e controle PQ.	Pág. 22
Figura 12	Atividade hemaglutinante dos controles PQ, Con A 28 mg/mL, UEA 28 mg/mL e conjugados PQ-Con A e PQ-UEA.	Pág. 24
Figura 13	Marcação do fibroadenoma com diferentes lectinas.	Pág. 25
Figura 14	Marcação do CDI com diferentes lectinas.	Pág. 26
Figura 15	Marcação de tecido mamário com PQ-Con A.	Pag. 29
Figura 16	Mapas de intensidade referentes à marcação com PQ-Con A.	Pág. 30
Figura 17	Marcação de tecido mamário com PQ-UEA.	Pág. 31
Figura 18	Mapas de intensidade referentes à marcação com PQ-UEA.	Pág. 32
Figura 19	Inibição dos conjugados PQ-Con A e PQ-UEA.	Pág. 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultados do ensaio fluorescente em microplaca de PQ-Con A.	Pág. 23
Tabela 2	Resultados do ensaio fluorescente em microplaca de PQ-UEA.	Pág. 23
Tabela 3	Sumário da marcação de tecido mamário humano por PQ-Con A e PQ-UEA.	Pág. 33

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Anatomia e Histologia da Mama	3
2.2 Alterações Benignas da Mama	5
2.2.1 Fibroadenoma	5
2.2.1.1 Histopatologia	5
2.2.1.2 Manifestações Clínicas	6
2.2.1.3 Diagnóstico	6
2.3 Câncer - Aspectos Gerais	7
2.4 Alterações Malignas da Mama	7
2.4.1 Carcinoma Ductal Invasivo	7
2.4.1.1 Histopatologia	8
2.4.1.2 Manifestações Clínicas	9
2.4.1.3 Diagnóstico	9
2.5 Lectinas	10
2.6 Pontos Quânticos	12
2.6.1 Aplicações	14
3. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo Geral	16
3.2 Objetivos Específicos	16
4. METODOLOGIA	17
4.1 Síntese dos Pontos Quânticos CdTe/CdS MAS	17
4.2 Preparação dos Conjugados	17
4.2.1 Conjugação por Adsorção	17
4.2.2 Conjugação por Ligação Covalente (EDC + Sulfo-NHS)	18
4.3 Caracterização Óptica dos Pontos Quânticos e Conjugados	18
4.4 Confirmação da Bioconjugação	18
4.5 Atividade Hemaglutinante	20
4.6 Marcação dos Tecidos	20

4.7 Inibição da Marcação	20
4.8 Obtenção e Processamento das Imagens	21
5. RESULTADOS & DISCUSSÃO	21
5.1 Caracterização Óptica dos Pontos Quânticos e Conjugados	21
5.2 Confirmação da Bioconjugação	22
5.3 Atividade Hemaglutinante	24
5.4 Marcação dos Tecidos Mamários	24
5.5 Inibição da Marcação	34
6. CONCLUSÃO	36
7. PERSPECTIVAS	36
8. REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

O controle do câncer em nosso país representa, atualmente, um dos grandes desafios que a saúde pública enfrenta. O câncer de tecido mamário é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres. Apesar de ser considerado um câncer de bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados. A elevada incidência e mortalidade por câncer de mama em nosso país justifica o planejamento de estratégias nacionais visando a sua detecção precoce (INCA, 2002; INCA 2009).

Dentre os tumores malignos de mama, os carcinomas ductais invasivos representam o maior grupo, constituindo de 65 a 80% dos carcinomas mamários (DANTAS *et al.*, 2003). A maioria dos cânceres invasivos de mama provavelmente desenvolve-se durante longos períodos de tempo e podem culminar em formas metastáticas (KERLIKOWSKE *et al.*, 2003).

Os fibroadenomas são tumores benignos da mama, que consistem numa lesão no lóbulo mamário, formada pela proliferação de tecido conjuntivo. A faixa etária de maior incidência do fibroadenoma é de 15 a 35 anos de idade (GURAY & SAHIN, 2006). Nos últimos anos, tem se observado um interesse renovado no fibroadenoma, uma vez que, considerando-se todas as faixas etárias e todas as afecções mamárias, benignas e malignas, este ocupa o terceiro lugar, perdendo apenas para o carcinoma de mama e para a involução cística da mama (CALADO & ABREU E LIMA, 2004).

A iniciação e o crescimento tumorais estão associados a modificações da estrutura glicídica de glicoproteínas, glicolipídios e proteoglicanos presentes na superfície celular. Glicosilações aberrantes originadas de disfunções de glicosiltransferases e/ou glicosidases frequentemente resultam em modificações do tipo encurtamento, aumento da expressão ou ausência de expressão de resíduos de carboidratos nestas estruturas (HAKOMORI, 2001). As transformações malignas estão associadas a estas modificações, de forma que, quase todos os tipos de células malignas demonstram alterações em seus padrões de glicosilação quando comparadas às suas células normais (GHAZARIAN *et al.*, 2011).

Devido à sua especificidade em relação aos carboidratos, as lectinas podem ser ferramentas valiosas na identificação e monitoração de alterações na glicosilação de

carboidratos de superfície celular durante a diferenciação celular e transformação neoplásica (FUSTER & ESKO, 2005). A variação na expressão de carboidratos nos vários processos metabólicos de reconhecimento celular possibilita o uso das lectinas como marcadores estruturais, revelando o glicocódigo de superfícies celulares (SHARON & LIZ, 2004).

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas que podem se ligar, de forma reversível, a resíduos de açúcares específicos, através de pontes de hidrogênio e interações de Van Der Waals (LIZ & SHARON, 1998). Um grande número de lectinas tem sido empregado no auxílio do diagnóstico histopatológico para mapeamento dos estágios de diferenciação/desdiferenciação, nível de malignidade e capacidade de metástases em tecidos de cérebro humano (BELTRÃO *et al.*, 2003), mama (BELTRÃO *et al.*, 2001; CAMPOS *et al.*, 2006), colite ulcerativa (MELO-JÚNIOR *et al.*, 2004), entre outros.

Sistemas utilizando lectinas e moléculas luminescentes como sondas moleculares têm se mostrado promissores na investigação de modificações na expressão de glicoproteínas presentes na superfície da membrana celular (CASTRO, 2008). Nesse contexto, surgem os pontos quânticos, que consistem em nanopartículas emissoras de luz. Os pontos quânticos estão emergindo como uma nova classe de marcadores fluorescentes com aplicação na biologia e na medicina. Conjugados a anticorpos, peptídeos e outras pequenas moléculas, estes podem ser utilizados para identificar marcadores tumorais com afinidade e especificidade (SMITH *et al.*, 2008).

Levando-se em conta o grande interesse na busca de novas sondas destinadas a avaliar doenças a nível molecular, assim como a relação das transformações malignas com as alterações no perfil dos glicídios presentes na superfície da célula, ganham destaque as metodologias alternativas, utilizando lectinas e pontos quânticos luminescentes, alvos deste trabalho, que proporcionarão uma ferramenta de grande utilidade em estudos histoquímicos e citoquímicos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Anatomia e Histologia da Mama

A mama é formada por um sistema de ductos ramificados a partir do mamilo, os quais se estendem radialmente entre o estroma fibrogorduroso (Figura 1). Ao contrário de outros órgãos, a glândula mamária não está completamente desenvolvida ao nascimento. A ramificação do sistema ductal ocorre apenas no período da puberdade feminina. O aumento da mama durante esta época resulta do acúmulo de tecido adiposo e conjuntivo, além do crescimento e ramificação do sistema ductal. A proliferação do sistema ductal e o acúmulo de gordura se devem ao aumento da quantidade de estrógenos circulantes. Após essa fase, a glândula mamária é formada por estruturas que refletem diferentes fases do desenvolvimento (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; BOGLIOLO, 2006).

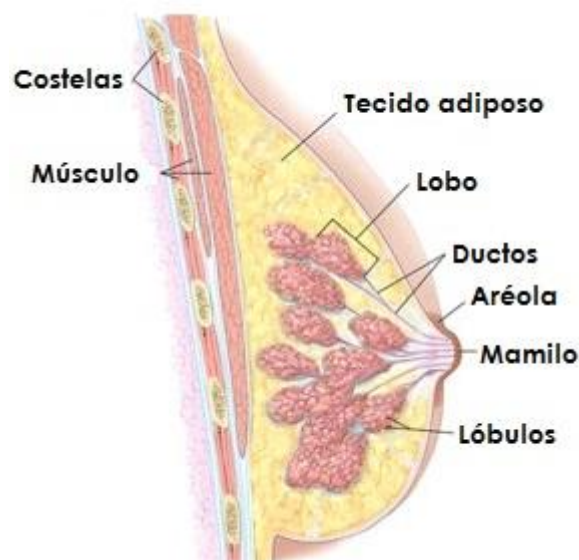


Figura 1. Estrutura anatômica da mama normal.

Fonte: Borchardt *et al.*, 2012. (Adaptado)

O sistema ductal da mama pode ser dividido em dois grupos: a unidade terminal ducto-lobular (UTDL) e os grandes ductos. A UTDL, considerada a unidade anátomo-funcional da mama, consiste em um lóbulo mamário, representando a porção secretória da glândula e pequenos ductos que se reúnem para formar o ducto terminal, o qual drena para o sistema ductal extra-lobular (Figura 2). Quando em intensa atividade secretora, como na gravidez ou na lactação, os pequenos ductos do lóbulo são denominados ácinos. O conjunto de ductos reúne-se em um ducto coletor (ou galactóforo), que emerge no mamilo (BOGLIOLO, 2006).

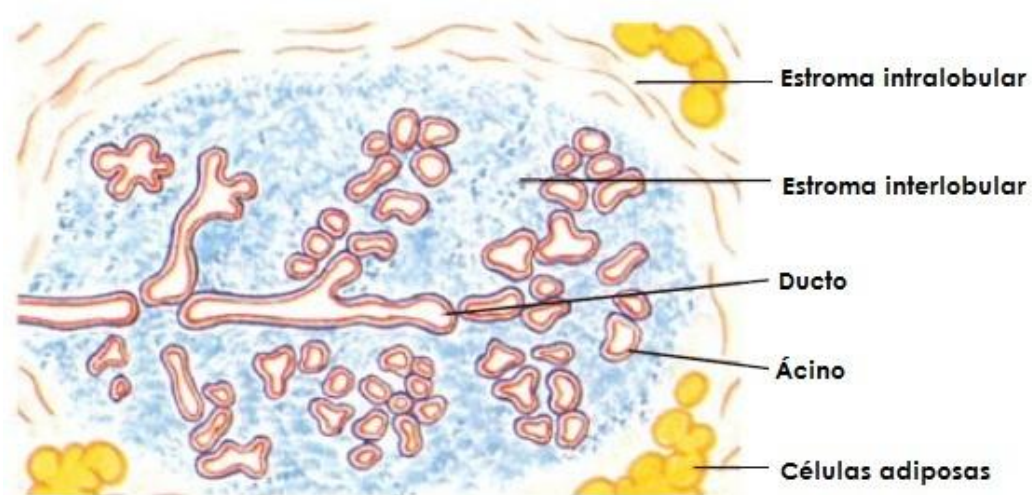


Figura 2. Estrutura do tecido mamário.

Fonte: Rubin & Strayer, 2012 (Adaptado)

O tecido conjuntivo interlobular é especializado e ricamente celular, com abundante rede de fibras reticulares, finas fibras de colágeno e numerosos capilares; tem aspecto frouxo e pode conter número variável de linfócitos, plasmócitos e mastócitos. O estroma interlobular parece responder a estímulos hormonais, variando seu aspecto durante o ciclo menstrual. O tecido conjuntivo intralobular é mais denso e menos celular (HAGE, 2001; BOGLIOLO, 2006).

Na mama normal, os ductos e os lóbulos são revestidos por dois tipos de células (Figura 3). A camada mais externa ou basal é formada por células mioepiteliais, as quais têm morfologia variável, podendo ser arredondadas ou alongadas. Devido a sua capacidade contrátil, essas células ajudam na ejeção do leite durante a lactação. A camada mais interna de células é composta por células luminais, que são células colunares com capacidade de secreção e absorção de fluidos. As duas camadas de células estão apoiadas em uma membrana basal rica em laminina e colágeno tipo IV (KUMAR *et al.*, 2005).

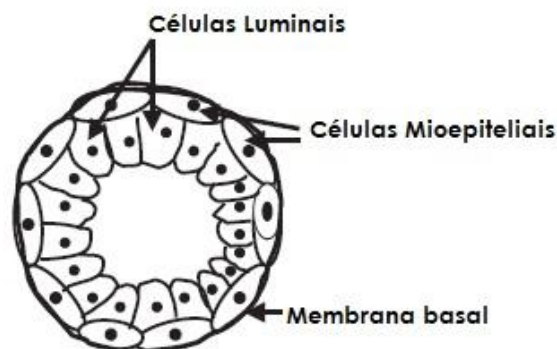


Figura 3. Dupla camada celular observada nos lóbulos e ductos mamários.

Fonte: Dimri *et al.*, 2005. (Adaptado)

2.2 Alterações Benignas da Mama

2.2.1 Fibroadenoma

Um das lesões mais comumente responsáveis pelo surgimento de nódulos mamários é o fibroadenoma (FB), uma proliferação benigna localizada no estroma e ductos mamários (STEVENS & LOWE, 2002). Esta lesão ocorre a partir da puberdade, sendo o tumor mamário mais frequente em mulheres com menos de 30 anos. Costuma estabilizar-se em torno de 3 a 4 cm, no seu maior diâmetro. Um dos aspectos epidemiológicos mais comuns é a idade jovem. A média de idade das portadoras costuma ser entre 25 e 30 anos e sua ocorrência é rara após os 50 anos (MENKE *et al.*, 2007).

2.2.1.1 Histopatologia

O fibroadenoma tem origem lobular, sendo constituído pela proliferação do estroma e do epitélio ducto-lobular. São tumores benignos, sólidos, de consistência firme-elástica, arredondados, bem delimitados e com ampla mobilidade. Considerando-se todas as faixas etárias e todas as afecções mamárias, benignas e malignas, o fibroadenoma ocupa o terceiro lugar, perdendo apenas para o carcinoma de mama e para a involução cística da mama (MENKE, *et al.*, 2007).

A nível macroscópico, os fibroadenomas apresentam-se como lesões esbranquiçadas, firmes, com aspecto de borracha e bem circunscritas, caracteristicamente com 1-4 cm de diâmetro, além de uma superfície de corte brilhante e de textura rígida. Existem dois componentes histológicos: o componente epitelial, com estruturas semelhantes a glândulas, com epitélio do tipo ductal, e o componente estromal, que é um tecido celular fibroso frouxo ao redor das áreas epiteliais (Figura 4) (STEVENS & LOWE, 2002).

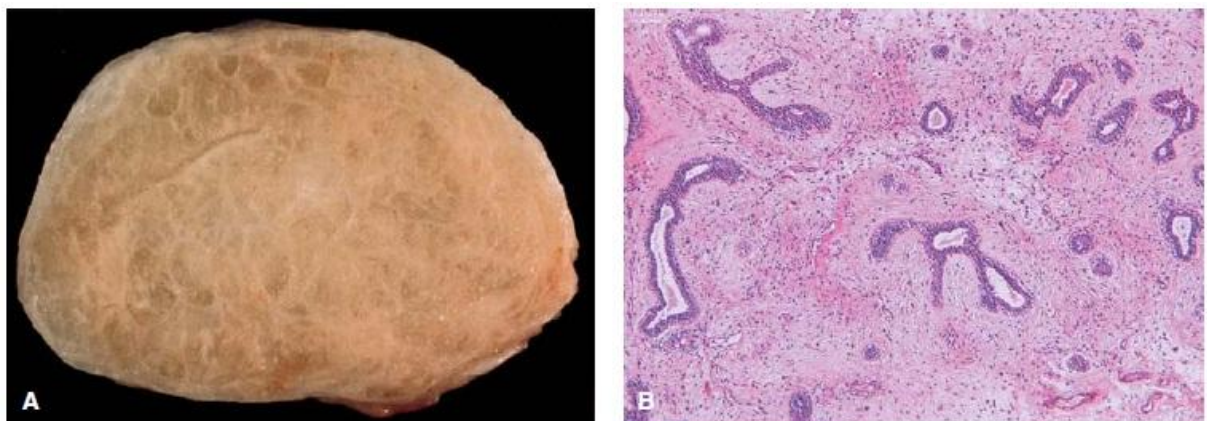


Figura 4. Aspecto macroscópico (A) e microscópico (B) do fibroadenoma.

Fonte: Rubin & Strayer, 2012.

Como regra geral, o fibroadenoma se apresenta em pacientes jovens como nódulo único, bem delimitado; porém, em mulheres de raça negra, tende a formar lesões múltiplas e bilaterais. Durante a gravidez e no final do ciclo menstrual, pode sofrer aumento de volume. Na maioria das vezes a superfície do tumor é lobulada e apresenta pequenas fendas. (BOGLIOLO, 2006).

2.2.1.2 Manifestações clínicas

Clinicamente, o fibroadenoma se apresenta como tumor único ou múltiplo, móvel, não fixo ao tecido adjacente, lobulado, que cresce lentamente, mas pode atingir grandes proporções (CALADO & ABREU E LIMA, 2004). Em geral é indolor, exceto durante a gravidez e lactação, condições que podem estimular seu crescimento rápido. Sua consistência é fibroelástica, mas, nas pacientes de maior faixa etária, pode haver deposição de calcificação distrófica no nódulo e este passa a ter consistência endurecida. A frequência de transformação maligna é muito baixa (0,1 a 0,3% dos casos), desse modo, o fibroadenoma não predispõe ao câncer de mama, mas as duas patologias podem estar associadas em uma mesma paciente. Tal risco é maior a partir dos 35 anos (NAZÁRIO *et al.* 2007).

2.2.1.3 Diagnóstico

O método diagnóstico primário dos fibroadenomas é a mamografia. Porém, apesar de oferecer sensibilidade de 85-95%, a especificidade deste exame é pequena, sendo normalmente necessários procedimentos diagnósticos adicionais. O diagnóstico do fibroadenoma é uma combinação do exame físico detalhado, ultrassom e punção aspirativa com agulha fina (PAAF). Além disso, é necessário a anamnese completa (CALADO & ABREU E LIMA, 2004).

A realização da biópsia por agulha contribui muito para o diagnóstico diferencial das lesões mamárias, mesmo em lesões não-palpáveis, permitindo o acompanhamento dessas lesões ao invés da sua excisão cirúrgica. Caso uma mulher seja diagnosticada, o fibroadenoma não necessita ser removido, a não ser que cresça ou cause desconforto local (MENKE *et al.*, 2007).

2.3 Câncer – Aspectos Gerais

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer pode ser definido como um conjunto de mais de cem doenças. Essas doenças têm em comum a presença de alterações no material genético, o que faz com que as células cresçam e se multipliquem desordenadamente. As células cancerosas passam então a se dividir mais rapidamente que as normais e comumente de maneira incontrolável. O acúmulo destas células pode formar tumores malignos. Estes têm a capacidade de invadir outras regiões do corpo, promovendo a formação de metástases (INCA, 2012).

O câncer é um importante problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento, sendo responsável por mais de 7 milhões de óbitos no mundo anualmente. No Brasil, o número de novos casos cresce a cada ano. Para 2013, a estimativa é de cerca de 518.000 novos casos, sendo o câncer de próstata o mais incidente para homens e o câncer de mama o mais incidente para mulheres (JEMAL *et al.*, 2011; INCA, 2012).

O processo de formação do câncer é denominado carcinogênese. Em síntese, a carcinogênese pode se iniciar de forma espontânea ou ser provocada pela exposição a agentes carcinogênicos (químicos, físicos ou biológicos). Sabe-se que os fatores ambientais possuem um papel importante no desenvolvimento do câncer. Dentre os principais fatores para o surgimento dos tumores malignos estão os carcinógenos químicos e físicos, agentes infecciosos e o estilo de vida do indivíduo (GUEMBAROVSKI & CÓLUS, 2008).

As células malignas em desenvolvimento apresentam certas características em comum, como: autossuficiência em fatores de crescimento, evasão aos inibidores do crescimento, resistência à morte celular programada (apoptose), potencial de replicação ilimitado, indução da angiogênese e capacidade de invadir demais tecidos (metástase) (HANAHAHAN & WEINBERG, 2000).

2.4 Alterações Malignas da Mama

2.4.1 Carcinoma Ductal Invasivo

Os tumores malignos da mama feminina são extremamente comuns, constituindo cerca de 20% de todas as malignidades em mulheres. O carcinoma é uma das principais doenças da mama, e a distinção imediata dos casos de câncer mamário das muitas formas de doença benigna da mama é muito importante (STEVENS & LOWE, 2002).

O carcinoma mamário é a neoplasia maligna mais frequente em mulheres e uma das principais causas de morte por câncer. Numerosos estudos epidemiológicos, clínicos e genéticos têm identificado vários fatores de risco para o câncer mamário. A idade tem nítida influência no aparecimento do carcinoma de mama. O tumor é muito raro antes dos 25 anos; sua incidência aumenta a partir dos 30 anos, com pico entre 50 e 60 anos. Sabe-se que o histórico familiar de câncer de mama é fator de risco bem estabelecido para a doença. Cerca de 1/3 das mulheres com carcinoma mamário tem histórico familiar de um ou mais parentes de primeiro grau com a mesma neoplasia (BOGLIOLO, 2006).

A maioria dos tumores consiste em adenocarcinomas invasivos, originários dos ductos terminais e unidades lobulares, dando origem a carcinomas lobulares invasivos ou carcinomas ductais invasivos. O carcinoma ductal invasivo (CDI), tipo mais frequente de câncer de mama, representa um grupo heterogêneo de lesões. O CDI tem comportamento mais agressivo do que a maioria dos tipos especiais (carcinoma medular, carcinoma mucinoso, doença de Paget, etc). Em contraste com o carcinoma *in situ*, há invasão para outros locais, com a possibilidade de disseminação metastática. Porém, carcinomas *in situ* de ductos ou lóbulos mamários podem ser encontrados em uma fase anterior à invasão, e constituem fator de risco para posterior desenvolvimento de carcinoma mamário invasivo (STEVENS & LOWE, 2002).

2.4.1.1 Histopatologia

Macroscopicamente, o tumor apresenta-se como massa palpável, de consistência firme, forma variável, de coloração acinzentada ou branquicenta, contendo trabéculas irradiando-se a partir do centro da lesão. Esse aspecto macroscópico, semelhante a um caranguejo, foi uma das razões para a origem da palavra câncer. Um carcinoma invasivo de mama pode variar em tamanho, desde menos de 1 cm de diâmetro até massas que ocupam o seio como um todo; entretanto, a maioria das lesões apresenta em média 1 a 3 cm de diâmetro. Histologicamente, o tumor é formado pela proliferação de elementos epiteliais com atipias citológicas relativamente acentuadas, com atividade mitótica variável e com uma tendência diversa a formar estruturas pseudo-glandulares ou semelhantes a ductos. Citologicamente, o aspecto varia desde células com núcleos pequenos, regulares, cromatina homogênea e poucas mitoses, até células grandes com núcleos irregulares e hipercromáticos, nucléolos evidentes e elevado índice mitótico (BOGLIOLO, 2006).

A avaliação histológica de características como formação de túbulos, atipias nucleares e índice mitótico serve para graduar o CDI em: bem diferenciado (G1), médio grau de diferenciação (G2) e pouco diferenciado (G3) (Figura 5). Uma pequena parcela dos tumores constitui lesões de baixo grau, bem diferenciadas, em contraste com os tipos intermediário ou de alto grau, pouco diferenciados, que constituem a maioria dos casos (MENKE *et al.*, 2007).

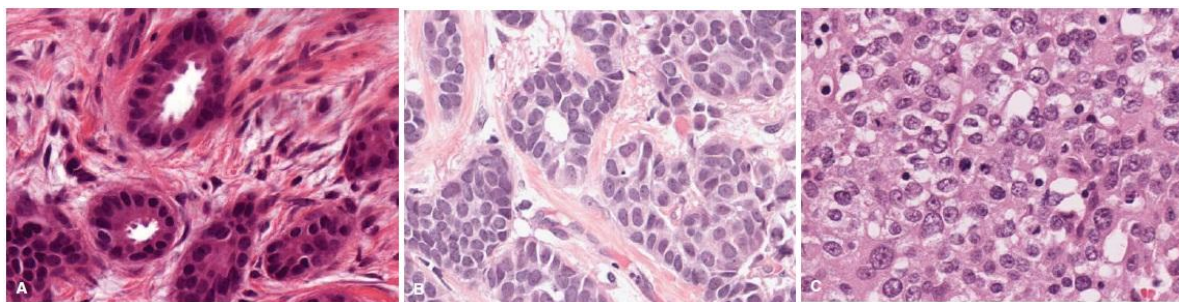


Figura 5. Carcinoma ductal invasivo em diferentes graus de diferenciação: Grau 1 – bem diferenciado (A), Grau 2 – moderadamente diferenciado (B) e Grau 3 – pouco diferenciado (C).

Fonte: Rubin & Strayer, 2012.

O CDI pode ocorrer na forma pura ou como um misto com outro padrão de carcinoma, comumente carcinoma lobular. Quando o carcinoma ductal está associado com tumores de bom prognóstico (carcinoma tubular ou coloidal), o prognóstico é ligeiramente melhor do que aquele para o tumor ductal puro (STEVENS & LOWE, 2002).

2.4.1.2 Manifestações Clínicas

Clinicamente, o carcinoma de mama se manifesta como um nódulo palpável, muitas vezes detectado pela própria paciente. Por essa razão, medidas de educação para a saúde como ensino e treinamento da autopalpação, apesar de pouco eficazes como método de rastreamento, ainda devem ser incentivadas. O carcinoma de mama também pode ser identificado através de achados histológicos em fragmentos de mama retirados por outro motivo (ex.: mastoplastia) ou por anormalidades mamográficas (BOGLIOLO, 2006).

2.4.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico do CDI é feito por exclusão, quando a lesão não preenche os critérios diagnósticos para os tipos especiais de carcinoma mamário, sendo classificado como carcinoma ductal invasivo sem outra especificação (SOE). Os carcinomas ductais de tipo

especial (medular, tubular, etc.) compreendem 10-20% dos carcinomas invasivos e apresentam melhor prognóstico quando comparados ao CDI-SOE. Quando um carcinoma ductal apresenta apenas pequenos focos de um tipo específico, o tumor continua sendo classificado como CDI-SOE (MENKE *et al.*, 2007). O aumento do conhecimento da biologia do tumor e o uso crescente de métodos de rastreamento, como a mamografia, têm permitido a detecção de lesões de pequeno tamanho e até de carcinoma *in situ*, facilitando o diagnóstico e contribuindo para o decréscimo da mortalidade (BOGLIOLO, 2006).

2.5 Lectinas

O termo “lectina” (do latim *legere* – selecionar, escolher), proposto em 1954 por Boyd e Sharpleigh, tem sido utilizado para descrever proteínas ou glicoproteínas, de origem não imunológica, com habilidade de se ligar a carboidratos de forma específica e reversível. Muitas lectinas possuem dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, o que as torna capazes de aglutinar células e precipitar glicoconjugados (MODY *et al.*, 1995; SATO *et al.*, 2000; SHARON & LIS, 2004).

As lectinas provenientes de leguminosas foram as primeiras a serem estudadas, devido à facilidade de isolamento e abundância com que são encontradas na natureza. Porém, nos dias atuais, é possível afirmar que essas moléculas são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em plantas, animais e bactérias (GHAZARIAN *et al.*, 2011).

As lectinas podem ser classificadas, de acordo com sua estrutura quaternária, em quatro categorias: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas. A classe das hololectinas, que consistem em moléculas com, no mínimo, dois domínios idênticos ou bastante homólogos que se ligam ao mesmo carboidrato, abrange a maioria das lectinas estudadas. Além desta classificação, as lectinas em geral também podem ser agrupadas de acordo com o monossacarídeo pelo qual exibem maior afinidade (PEUMANS & VAN DAMME *et al.*, 1995).

A interação entre a lectina e o carboidrato ocorre através de uma porção limitada da molécula proteica, no segmento chamado de Domínio de Reconhecimento de Carboidrato. Os carboidratos interagem com lectinas através de pontes de hidrogênio propiciadas pela disponibilidade de um grande número de hidroxilas nos açúcares, que agem como doadores ou receptores de hidrogênio. Também participam da interação lectina-carboidrato, interações hidrofóbicas e forças de Van Der Waals (MELO-JÚNIOR, 2003).

A Concanavalina A (Con A) é uma lectina vegetal, obtida das sementes de *Canavalia ensiformes* (Figura 6). É constituída de um tetrâmero, com peso molecular igual a 110 kDa, composta por 948 resíduos de aminoácidos. A Con A é o membro mais bem conhecido das lectinas de leguminosas devido as inúmeras aplicações biológicas. Ela é capaz de se ligar, com grande afinidade, à resíduos de α -D-glicose/manose de carboidratos complexos, exibindo alta afinidade por oligossacarídeos de glicoproteínas e glicolipídios de superfície celular. Pode ser definida como uma metaloproteína, uma vez que seus monômeros complexam íons Ca^{2+} e Mn^{2+} . Aparentemente, estes íons são necessários para a manutenção da conformação da lectina, favorecendo a correta exposição dos sítios de reconhecimento de carboidratos (SHARON & LIS, 2004; CHATTERJEE & MANDAL, 2005)

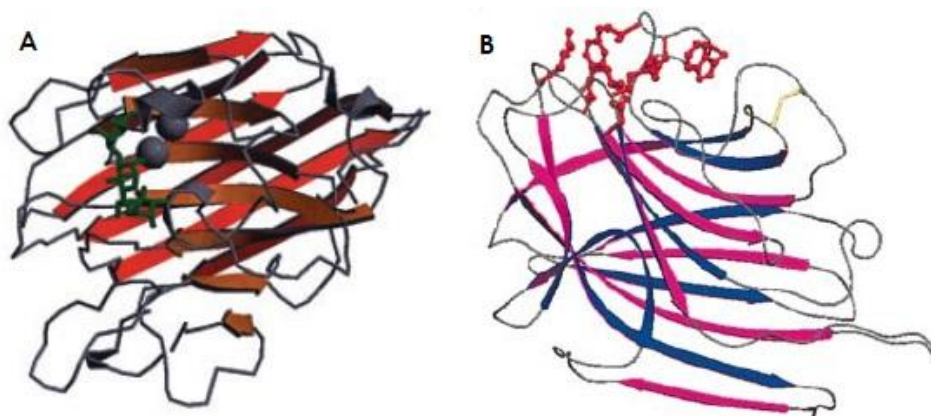


Figura 6. Estrutura monomérica da Con A (A) e UEA-I (B).

Fonte: Audette *et al.*, 2000; Sharon & Lis, 2004.

A lectina *Ulex europaeus agglutinin-I* (UEA-I) se liga especificamente a resíduos de α -L-fucose presentes em glicoproteínas e glicolipídeos. A UEA-I é uma metaloglicoproteína homodimérica. Cada uma de suas sub-unidades (Figura 6) tem peso molecular de aproximadamente 27 kDa (AUDETTE *et al.*, 2000). Em processos nos quais ocorre alteração da glicosilação, resíduos terminais de fucose, aos quais a UEA-I se liga, podem ser expressos em cadeias de carboidratos, seja pela adição de resíduos de fucose ou pela perda de açúcares de outros terminais (OKAZAKI *et al.*, 2004).

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

Devido à sua capacidade de interagir com carboidratos de maneira específica, as lectinas têm sido utilizadas como marcadores histoquímicos no estudo de modificações no

perfil de expressão de carboidratos de superfície das células tumorais, auxiliando na caracterização e diferenciação de tecidos normais e transformados (MODY *et al.*, 1995; HERLING *et al.*, 2000). A técnica oferece vantagens como: sensibilidade, estabilidade e fácil manipulação, contribuindo com informações sobre o desenvolvimento, estágios de diferenciação, grau de malignidade a partir do estabelecimento do perfil de carboidratos expresso no tecido estudado (BELTRÃO *et al.*, 1998; BELTRÃO *et al.*, 2003; MELO-JÚNIOR *et al.*, 2006).

Uma grande variedade de lectinas tem sido utilizada como sondas histoquímicas. Entre as quais se destacam a lectina de *Helix pomatia* - HPA (ARAB *et al.*, 2010), a lectina do amendoim (“Peanut agglutinin”) – PNA (MELO-JÚNIOR *et al.*, 2006), a UEA-1 (THÖM *et al.*, 2007), a de *Triticum vulgaris* – WGA (GUIMARÃES *et al.*, 2008) e a Con A (SOBRAL *et al.*, 2010).

O emprego de lectinas como sondas bioquímicas exige o uso de uma substância reveladora. Diversas substâncias podem ser utilizadas com esse propósito, tais como os reveladores fluorescentes como isotiocionato de fluoresceína (marcação de células endoteliais (FISCHER & KISSEL, 2001)) e reveladores quimioluminescentes como o éster de acridina (marcação de tumores mamários (BRUSTEIN *et al.*, 2012)). Existem ainda, os reveladores cromógenos, como a peroxidase, com a qual a lectina pode ser conjugada. Em 2010, Sobral e colaboradores utilizaram as lectinas Con A e UEA-I conjugadas à peroxidase para avaliar o carcinoma mucoepidermóide (tumor maligno da glândula salivar). Como alternativa de reveladores, há ainda os pontos quânticos, nanopartículas fluorescentes, empregados por Santos e colaboradores (2006) na marcação de fibroadenoma mamário.

2.6 Pontos quânticos

O uso de materiais em dimensões próximas ao nível atômico foi citado pela primeira vez por Richard Feynman em 1959. No entanto, o termo nanotecnologia foi utilizado apenas em 1974, pelo pesquisador japonês Norio Taniguchi. Desde então, os estudos nesta área têm avançado consideravelmente. A nanotecnologia consiste no estudo e na aplicação de materiais que se encontram na escala nanométrica (10^{-9} m) (UNESCO, 2010).

Dentre os materiais nanométricos, têm-se os nanocristais semicondutores coloidais, também chamados de pontos quânticos, os quais, por se encontrarem em regime de confinamento quântico em três dimensões, exibem propriedades ópticas diferentes quando comparadas às propriedades dos mesmos cristais em escala macroscópica (SILVA *et al.*, 2010).

Os pontos quânticos (PQs) são formados por elementos dos grupos II-VI e III-V da tabela periódica e têm cerca de 2-10 nm. Estes fluoróforos inorgânicos possuem características como: alta resistência à fotodegradação, baixa citotoxicidade e emissão dependente do tamanho da partícula (MEDINTZ *et al.*, 2005; AZZAZY *et al.*, 2007).

Em um PQ, a energia do *bandgap* (mínimo de energia que deve ser fornecida para que o elétron passe da banda de valência para a banda de condução) varia de acordo com o tamanho do nanocristal. Com a redução do tamanho do cristal, ocorre um distanciamento entre as bandas, o que reflete em um aumento no valor da energia do *bandgap*. Dessa forma, quanto menor o tamanho da partícula, maior será a diferença de energia entre a banda de valência e a banda de condução, e maior será a energia do *bandgap*. Assim, partículas menores tendem a emitir em regiões de comprimento de onda próximas ao azul. Já as partículas maiores têm energia do *bandgap* menor, conseqüentemente, emitem em regiões do comprimento de onda próximas do vermelho. Portanto, modificando-se não apenas a composição química, como também o tamanho destas nanopartículas, pode-se obter pontos quânticos de diversas cores (Figura 7) (SMITH *et al.*, 2004).

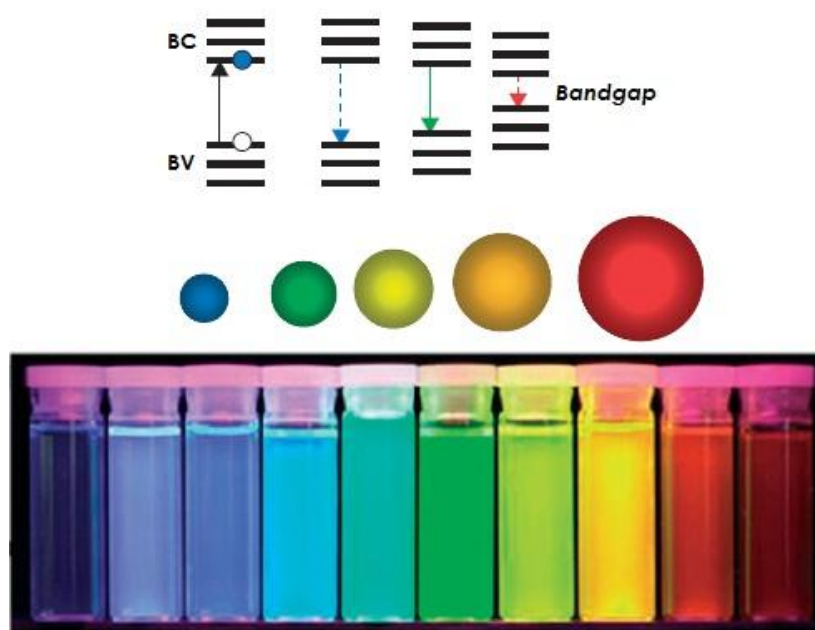


Figura 7. Variação da cor de emissão dos pontos quânticos, evidenciando as mudanças no seu comportamento óptico de acordo com o tamanho da partícula.

Fonte: Mansur, 2010 (modificado).

Comparados aos corantes orgânicos, os pontos quânticos apresentam propriedades fluorescentes que os tornam vantajosos para uso em aplicações biológicas. Estes possuem largo espectro de absorção, o que permite que vários tipos de pontos quânticos possam ser

excitados empregando-se um único comprimento de onda de excitação. Ao mesmo tempo, essas nanopartículas apresentam um estreito espectro de emissão, possibilitando a utilização de vários tipos de pontos quânticos numa marcação múltipla, de forma com que cada um deles seja identificado facilmente, sem que haja sobreposição espectral. Por serem capazes de absorver 10-50 vezes mais fótons que os corantes orgânicos, os pontos quânticos exibem uma melhoria significativa na fluorescência da sonda. Estudos demonstraram que os PQs se mostraram 10-20 vezes mais brilhantes que corantes orgânicos (GAO *et al.*, 2004). A estabilidade dos PQs, no que se refere à fotodegradação, é superior a dos fluoróforos orgânicos convencionais, o que permite que estes sejam aplicados na microscopia de fluorescência para detecção sensível durante longos períodos de observação (Figura 8) (WANG & CHEN, 2011).

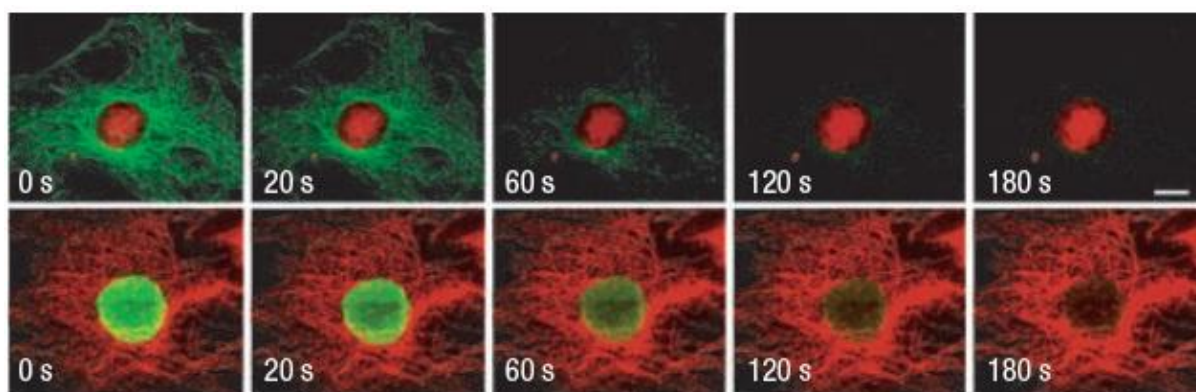


Figura 8. Resistência do ponto quântico à fotodegradação. Em vermelho, marcação com ponto quântico (PQ 630) e em verde, marcação com corante orgânico (AlexaFluor 488).

Fonte: Medintz *et al.*, 2005.

2.6.1 Aplicações

Para investigar as células e os processos celulares é muito importante a visualização de estruturas e compartimentos contidos no interior das células e moléculas que estão envolvidas na bioquímica celular. Uma vez que as células são quase transparentes à luz visível e as moléculas individualmente são muito pequenas, normalmente a observação direta desses elementos utilizando-se apenas a microscopia óptica convencional não é possível. Sendo assim, as estruturas ou moléculas de interesse têm que ser marcadas com uma sonda que pode ser diretamente visualizada. Uma das técnicas mais comuns utilizadas em biologia celular é a marcação utilizando a fluorescência (PARAK *et al.*, 2005).

A fluorescência é um método sensível e de rotina para o monitoramento de eventos biológicos utilizando corantes e proteínas fluorescentes. Durante os últimos 5 anos,

PQs também têm sido utilizados como marcadores em uma variedade de ensaios biológicos. Pesquisas recentes têm mostrado que os PQs podem ser ligados a diversas moléculas, tais como peptídeos, anticorpos e ácidos nucleicos, para serem utilizados como sondas fluorescentes (SMITH *et al.*, 2004). Ao ligar essas moléculas aos pontos quânticos, formando bioconjugados, cria-se um método de detecção mais sensível e específico (FARIAS *et al.*, 2007).

Entre as diversas aplicações dos pontos quânticos, pode-se citar a imunomarcação, ensaios de motilidade celular, monitoramento de tráfico intracelular, entrega de drogas e marcação de células *in vivo* (DELEHANTY *et al.*, 2009). PQs bioconjugados já foram empregados com sucesso na detecção do marcador de câncer de mama Her2 em células fixadas (WU *et al.*, 2003); detecção de PSA utilizando PQs recobertos com estreptavidina (WANG *et al.*, 2008); marcação de linhagens celulares de carcinoma hepatocelular (YU *et al.*, 2007); estudo da interação entre o *Trypanossoma cruzi* e o inseto vetor da doença de Chagas (FEDER *et al.*, 2009); marcação de leveduras (FARIAS *et al.*, 2007); investigação do microambiente tumoral (PENG *et al.*, 2011), entre outros.

Na busca de informações sensíveis e métodos quantitativos para detectar e diagnosticar o câncer, a nanotecnologia tem sido reconhecida como um campo de grande promessa. Aplicações de pontos quânticos na investigação de processos patológicos, como as neoplasias, constituem um tema de interesse crescente, no qual muitas perguntas ainda permanecem sem resposta (FARIAS *et al.*, 2007).

Desta forma, despertou-se o interesse em aplicar pontos quânticos conjugados a lectinas na histoquímica de tecidos mamários transformados benigna e malignamente, contribuindo para a aplicação no diagnóstico quanto à caracterização destes tumores.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Utilizar pontos quânticos conjugados a lectinas para avaliar a expressão de carboidratos em tecidos mamários humanos transformados benigna e malignamente.

3.2 Específicos

- Sintetizar e caracterizar os PQs;
- Conjugar os PQs às lectinas Con A e UEA-I;
- Avaliar o perfil de expressão de glicose/manose e L-fucose em tecidos mamários humanos, diagnosticados com fibroadenoma e carcinoma ductal invasivo, empregando histoquímica com lectinas;
- Determinar o padrão de marcação e correlacionar com o nível de transformação histológico.

4. METODOLOGIA

4.1 Síntese dos Pontos Quânticos CdTe/CdS – AMS

Os pontos quânticos foram sintetizados em meio aquoso, utilizando como precursores soluções de perclorato de cádmio ($\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$) e de telúrio reduzido (Te^{-2}). Em um balão, foi adicionado 20 mL de $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$, 80 mL de tampão PBS 0,01 M pH 7,4 e 5 mL de ácido mercaptosuccínico (6,8 mg/mL). Este último atua como agente estabilizante e funcionalizante. O ácido mercaptosuccínico (AMS) possui em sua estrutura duas carboxilas livres que podem se ligar a porção amina presente nas proteínas. O pH da solução foi ajustado para 10,5 utilizando NaOH 2M. Para redução do telúrio metálico, foi adicionado, em outro balão, 0,013 g de Te^0 e 100 μL de NaOH 2M. Em atmosfera de nitrogênio, foi acrescentado, com auxílio de uma seringa, 0,114 g de NaBH_4 (diluídos em 5 mL de água Milli-Q). Após atingir 80 °C, o Te^0 é reduzido a Te^{-2} , tornando-se incolor, sendo então retirado deste segundo balão e injetado no balão contendo a solução de cádmio. Esse sistema foi mantido sobre atmosfera de nitrogênio, a 80 °C, durante 7 horas. A proporção molar da síntese foi Cd:Te:AMS 2:1:2,4.

4.2 Preparação dos Conjugados

Com o intuito de aprimorar o processo de conjugação, diversas metodologias foram utilizadas até que se estabelecesse o protocolo empregado neste trabalho. Foram realizados testes variando o pH dos PQs (anteriormente à conjugação), a concentração da lectina e as proporções de lectina e de PQ utilizada na preparação do conjugado, sendo as metodologias mais efetivas aqui descritas.

4.2.1 Conjugação por Adsorção

Ao final da síntese, os PQs apresentam pH alto (em torno de 10,5), porém, em trabalhos anteriores, foi verificado que, em pH 8,0, a Con A apresentou aumento da adsorção (RIBEIRO, 2005). Por essa razão, é feito o ajuste do pH do PQ de CdTe/CdS-AMS (Telureto de Cádmio passivado com Sulfeto de Cádmio e funcionalizados/estabilizados com ácido mercaptosuccínico) para 8,0, utilizando o próprio agente estabilizante (AMS). Foi, então, adicionada a lectina Con A (Sigma-Aldrich Chemical Co., USA) a 2 mL do PQ. O conjugado foi mantido sob agitação por 2h, a 25°C.

4.2.2 Conjugação por Ligação Covalente (EDC + Sulfo-NHS)

Utilizando também o próprio agente estabilizante (AMS), o pH do PQ foi ajustado para 5,5 (pH necessário para que ocorra a reação do EDC e sulfo-NHS). Acrescentou-se 1 mL de hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (0,4 mg/mL) e aguardou-se 5 min. Após esse período, adicionou-se 1 mL de N-hidroxi-sulfosuccinimida (sulfo-NHS) (1,1 mg/mL) e esperou-se 15 min antes de acrescentar 20 µL de UEA-I (Sigma-Aldrich Chemical Co., USA). Foi feita incubação por 24 horas, a 4°C. Noventa minutos antes da marcação, foi adicionado 50 µL de TRIS para cada 1 mL, para promover o bloqueio dos grupos carboxílicos do estabilizante/funcionalizante ativados pelo EDC/sulfo-NHS.

O EDC (agente de acoplamento) reage com a carboxila presente no PQ formando um intermediário instável (*o*-acilisouréia), que pode ser hidrolisado rapidamente, antes que ocorra a interação com a proteína. A adição do sulfo-NHS promove a formação de um intermediário (éster) que apresenta maior estabilidade frente ao formado pelo EDC, aumentando assim o rendimento da formação da ligação amida através da conjugação (HERMANSON, 2008).

4.3 Caracterização Óptica dos Pontos Quânticos e Conjugados

Após a preparação dos conjugados, realizou-se a caracterização espectroscópica, para obtenção dos espectros de absorção e emissão das amostras. A fim de se obter o espectro de absorção, foi realizada uma varredura na faixa de 400-700 nm. Esta análise foi realizada no Espectrofotômetro *Evolution 600 UV-Vis* (Thermo Scientific, CA, USA). Para obtenção do espectro de emissão, foi fixado o comprimento de onda de excitação em 365 nm e realizada a espectroscopia de emissão, utilizando o Espectrofluorímetro LS55 (Perkin Elmer, Freemont, USA). Para tal, foi feita uma varredura na faixa de 400-700 nm. Além dos conjugados (PQ-Con A (Adsorção) e PQ-UEA (Covalente)), foi analisada, como controle, a suspensão contendo apenas os pontos quânticos. Para controle do conjugado covalente, a suspensão de PQs foi diluída 1:1 em salina, uma vez que os mesmos sofrem diluição após a adição do EDC e sulfo-NHS durante a conjugação.

4.4 Confirmação da Bioconjugação

Esse ensaio foi realizado em microplacas de poliestireno *Optiplat F HB* (Perkin Elmer, Freemont, USA) com 96 poços. Para o conjugado PQ-Con A, as amostras foram separadas nos seguintes sistemas: (1) Con A 280 µg/mL diluída em PBS

0,01M pH 7,2 sendo, portanto, o 1º controle; (2) PQ com o pH 8,0 (2º controle) e (3) o conjugado PQ-Con A, como amostra teste. Para o conjugado PQ-UEA os sistemas foram: (1) UEA 280 µg/mL diluída em PBS 0,01M pH 7,2 (1º controle); (2) PQ com adição de EDC/sulfo-NHS (2º controle) e (3) o conjugado PQ-UEA, como amostra teste. Foram adicionados aos poços da placa, em triplicata, 200 µL de cada sistema a ser testado. Em seguida a placa permaneceu em banho-maria, a 37°C, durante 2 h, e os poços foram lavados com tampão PBS 0,01 M e pH 7,2. Após a secagem, foi realizada leitura da placa no Fluorímetro Wallace Victor² Multilabel Counter (Perkin Elmer, Freemont, USA). A Figura 9 ilustra o protocolo descrito.

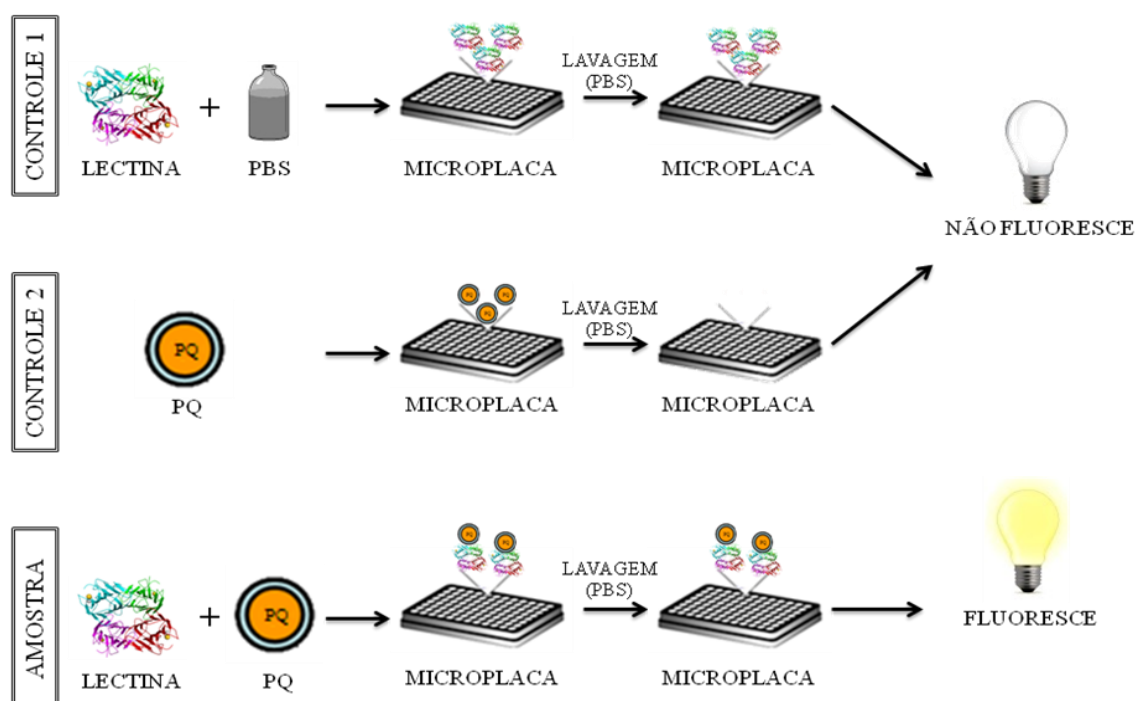


Figura 9. Esquema dos sistemas utilizados no ensaio fluorescente em microplacas.

O método de ensaio fluorescente em microplacas, desenvolvido pelo Grupo Nanotecnologia Biomédica (Laboratório de Biofísica Química - UFPE), permite confirmar a conjugação da seguinte forma: o controle formado pela lectina fica aderido à microplaca após a lavagem (devido à afinidade da proteína com o poliestireno), porém, não possui propriedades fluorescentes. Os PQs, por não terem afinidade com a placa, são removidos durante as lavagens, não apresentando fluorescência considerável. Os conjugados, por sua vez, são retidos na placa por conterem proteínas em sua composição e pelo fato de serem formados por PQs, exibem sinal de fluorescência considerável.

Estabeleceu-se que, para a confirmação da conjugação, os conjugados deveriam apresentar pelo menos 100% de aumento da intensidade de fluorescência quando comparados aos valores médios dos controles. Para o cálculo do aumento da intensidade de fluorescência, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Fluorescência relativa (\%)} = \frac{(\text{Fluorescência do Bioconjugado} - \text{Fluorescência do controle})}{\text{Fluorescência do controle}} \times 100\%$$

na qual *fluorescência do bioconjugado* corresponde a intensidade de fluorescência emitida pelo conjugado PQ-lectina e *fluorescência do controle* corresponde a média da fluorescência emitida pelos controles (PQ e lectina).

4.5 Atividade Hemaglutinante

Uma vez que os conjugados foram preparados, foram feitos testes para avaliar a capacidade destes de aglutinar hemácias. O protocolo seguido foi o descrito em Beltrão *et al.* (1998). Esses testes têm como função demonstrar que o sítio de ligação ao carboidrato da lectina permanece ativo mesmo após o processo da conjugação com o ponto quântico.

4.6 Marcação dos Tecidos

Amostras parafinizadas de mama normal, fibroadenoma (FB) e carcinoma ductal invasivo (CDI) foram obtidas no Banco de Tecidos do Setor de Patologia do LIKA – UFPE. Foram feitos cortes de 4 µm, fixados em lâminas albuminizadas. As lâminas foram então desparafinizadas e reidratadas através do uso de soluções de xilol e soluções de álcool em diferentes concentrações (100% e 70%). Após a desparafinização, os cortes foram tratados com uma solução de tripsina 0,1% (m/v), durante 2 minutos a 37°C. Em seguida, os tecidos foram incubados com 100 µL do conjugado PQ-lectina por 2 h, a 4 °C. Nas lâminas controle, incubou-se os tecidos com 100 µL de PBS. Em testes iniciais, foi feito também o controle utilizando para marcação apenas o PQ, com o propósito de verificar se haveria alguma marcação inespecífica. As lâminas foram então lavadas com PBS 0,01M, pH 7,2. Posteriormente, foram adicionados 20 µL de PBS sobre a lâmina e esta foi coberta com lamínula para realização da leitura em microscópio.

4.7 Inibição da Marcação

Testes de inibição da marcação foram realizados incubando, previamente, os conjugados com uma solução 0,3 M do seu carboidrato específico (metil α-D-manopiranosídeo para PQ-

Con A e L-fucose para PQ-UEA, ambos obtidos através da Sigma-Aldrich Chemical Co., USA) durante 1 hora, sendo então seguido o protocolo de marcação descrito anteriormente.

4.8 Obtenção e Processamento das Imagens

As lâminas foram analisadas no microscópio de fluorescência (Leica DMI4000B, Leica, Alemanha) utilizando o filtro A com excitação *bandpass* (340-380 nm) e coleta de emissão *longpass*, acima de 425 nm, para que fosse detectada a autofluorescência emitida pelo tecido (visualizada na faixa do azul-verde), assim como a fluorescência emitida pelos pontos quânticos (visualizada na faixa do laranja-avermelhado). Os tecidos foram observados usando a objetiva de 20 e 40x. As imagens foram adquiridas utilizando a câmera PCO Pixelfly (PCO-TECH Inc., Michigan, USA). Todas as imagens foram coletadas utilizando os mesmos parâmetros de aquisição. Os mapas de intensidade foram obtidos utilizando o *software* Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, USA).

5. RESULTADOS & DISCUSSÃO

5.1 Caracterização Óptica dos Pontos Quânticos e Conjugados

A Figura 10 mostra o espectro de absorção das suspensões analisadas. Como se pode observar na imagem, os conjugados PQ-Con A (Adsorção) e PQ-UEA (Covalente) apresentam máximo de absorção na mesma região dos seus respectivos controles, contendo apenas o PQ, (589 nm; 594 nm). Esse fato demonstra que a conjugação não interferiu nas características espectroscópicas dos PQs, uma vez que os mesmos continuam exibindo um longo espectro de absorção, que vai desde a região UV até cerca de 600 nm, propriedade característica destas nanopartículas.

Utilizando dados já descritos na literatura, é possível calcular o diâmetro dos PQs utilizando para tal o espectro de absorção (DAGTEPE *et al*, 2007). A partir desta informação, verificou-se que os PQs utilizados neste trabalho têm cerca de 3,5 nm de diâmetro. Utilizando as informações descritas no espectro de absorção é possível ainda, através da Lei de Lambert-Beer, a obtenção da concentração de nanopartículas presentes na amostra (YU, 2003). A concentração original dos PQs de CdTe/CdS (MSA) foi cerca de 10^{15} partículas/mL.

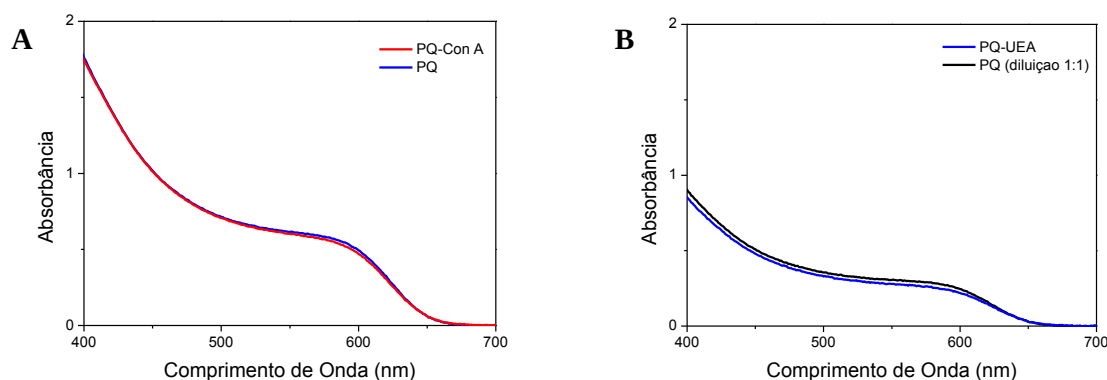


Figura 10. Espectros de absorção. Em A observa-se o espectro de absorção do conjugado por adsorção (PQ-Con A), vermelho, e o controle (PQ) em azul. Em B, o conjugado covalente PQ-UEA, em azul, e o controle (PQ diluído 1:1) em preto.

Na Figura 11 observa-se o espectro de emissão dos conjugados e suspensão de PQs. Assim como foi visto no espectro de absorção, no espectro de emissão os conjugados apresentaram o mesmo padrão de comportamento do controle PQ, exceto por um discreto aumento da intensidade de luz emitida nos conjugados preparados através do método covalente, o que pode ter ocorrido devido ao ajuste de pH sofrido pelo PQ durante o processo da conjugação. Uma vez que o ajuste é feito com o próprio estabilizante, pode haver um melhoramento da camada de passivação do PQ, melhorando assim sua intensidade.

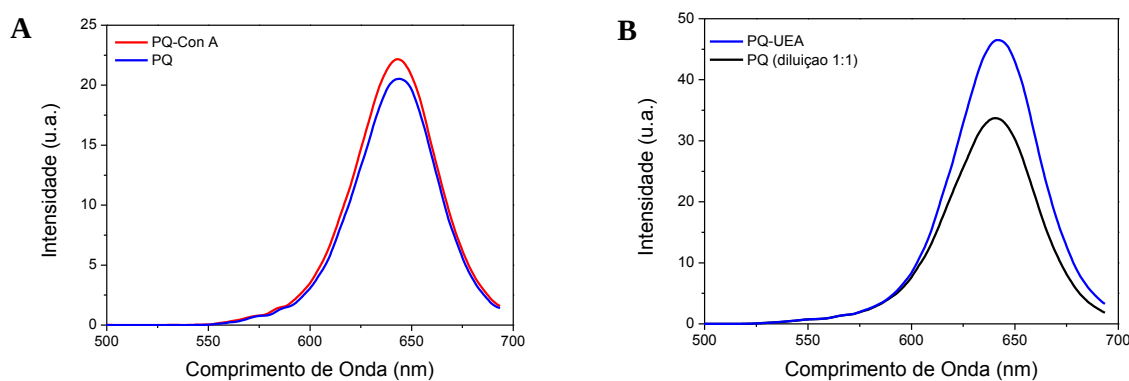


Figura 11. Espectros de emissão. Em A, observa-se o espectro de emissão do conjugado por adsorção (PQ-Con A), vermelho, e o controle (PQ) em azul. Em B, o conjugado covalente PQ-UEA, em azul, e o controle (PQ diluído 1:1) em preto.

5.2 Confirmação da Bioconjugação

As tabelas 1 e 2 mostram os resultados da confirmação da bioconjugação através do ensaio fluorescente em microplaca. Os resultados estão apresentados pela média da leitura

consecutiva de três poços. A conjugação foi capaz de aumentar em 251% a intensidade de fluorescência do conjugado PQ-Con A e em 123% a intensidade do conjugado PQ-UEA em relação aos seus controles. Como citado anteriormente, foi estabelecido que, para a confirmação da conjugação, os conjugados deveriam apresentar pelo menos 100% de aumento da intensidade de fluorescência quando comparados aos valores médios dos controles. Sendo assim, o alto sinal de fluorescência emitido por esses sistemas (acima de 100%), quando comparados aos seus controles, confirma a ocorrência da conjugação.

Tabela 1. Resultados do ensaio fluorescente em microplaca de PQ-Con A. Os controles incluem solução de Con A 280 µg/mL e o PQ em pH 8,0.

PQ-Con A		
Amostras	Intensidade de Fluorescência (u.a.)	Fluorescência relativa
Controles	213,5	-
PQ-Con A	750,0	<u>251%</u>

Tabela 2. Resultados do ensaio fluorescente em microplaca de PQ-UEA. Os controles incluem solução de UEA 280 µg/mL e PQ/EDC/sulfo-NHS.

PQ-UEA		
Amostras	Intensidade de Fluorescência (u.a.)	Fluorescência relativa
Controles	261	-
PQ-UEA	583	<u>123%</u>

A interação por adsorção é baseada em atrações hidrofóbicas ou por interação eletrostática, sendo, dessa forma, um método simples, flexível, amplamente utilizado. Por outro lado, na ligação covalente há o compartilhamento de um ou mais pares de elétrons entre os átomos, o que esse tipo de ligação tenda a ser mais forte e, portanto, mais estável. Por essa razão, diversas tentativas foram realizadas com o propósito de obter ambos os conjugados (PQ-Con A e PQ-UEA) ligados covalentemente. Porém, o conjugado PQ-Con A covalente não pode ser utilizado na marcação dos tecidos uma vez que o mesmo precipitava instantes após a conjugação. Acredita-se que o ajuste do pH do PQ, necessário para conjugação covalente (pH = 5,5), altera o estado tridimensional da proteína, favorecendo a formação de dímeros. Esse estado pode não ser o ideal para conjugação com o PQ, desestabilizando o sistema e levando à formação do precipitado.

5.3 Atividade Hemaglutinante

Lectinas ligam-se especificamente a resíduos de açúcar terminais presentes na superfície dos eritrócitos, levando-os a aglutinarem-se, o que é denominado atividade hemaglutinante (KHAN *et al.*, 2002).

Os resultados obtidos através dos testes de atividade hemaglutinante podem ser visualizados na Figura 12. Caso haja hemaglutinação e o teste seja positivo, forma-se uma malha de células na superfície do poço. Se o resultado for negativo, ou seja, não haja aglutinação, as células precipitam, formando um botão no fundo do poço. Observando-se a Figura 12, verifica-se que, como esperado, o controle dos pontos quânticos não formou malha na superfície do poço, já que estas nanopartículas não possuem capacidade de aglutinar hemácias. O controle contendo apenas a lectina Con A foi capaz de aglutinar células mesmo após ser diluído 32 vezes. O mesmo comportamento foi mostrado pelo conjugado PQ-Con A. O controle contendo apenas a lectina UEA aglutinou células até ser diluído 16 vezes, padrão também exibido pelo conjugado PQ-UEA. A capacidade de hemaglutinar células exibida pelos conjugados PQ-Con A e PQ-UEA demonstra a preservação dos sítios de ligação a carboidratos presentes na lectina mesmo após o processo de conjugação.

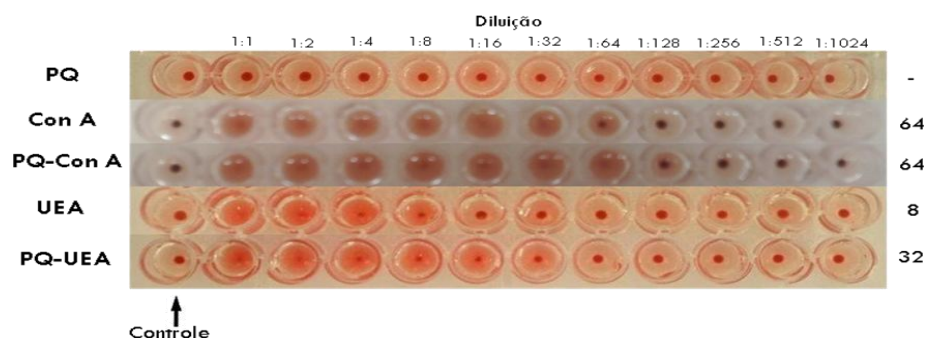


Figura 12. Atividade hemaglutinante dos controles PQ, Con A 280 µg/mL, UEA 280 µg/mL e conjugados PQ-Con A e PQ-UEA.

5.4 Marcação dos Tecidos Mamários

Imagens coradas com hematoxilina-eosina (HE) são, hoje, o padrão ouro para o exame clínico de biópsias. Tipicamente, um exame das imagens HE por um patologista permite uma visualização e identificação dos principais tipos de células. Enquanto as imagens coradas por HE fornecem uma visão da estrutura do tecido, imagens obtidas com auxílio de sondas fluorescentes fornecem uma visualização específica e mais detalhada em termos de conteúdo molecular (AMBEKAR *et al.*, 2012).

O desenvolvimento do tumor está associado a alterações na estrutura de resíduos de glicanos presentes na superfície celular. A glicosilação aberrante muitas vezes resulta em um encurtamento das cadeias do glicano ou em um aumento da expressão dessas estruturas em células nas quais estes são normalmente ausentes ou escassos (HAKOMORI, 2001; KOROURIAN *et al.*, 2008). A caracterização do perfil sacarídico é indispensável para a compreensão dos diversos processos biológicos, entre eles, o desenvolvimento do câncer (SHIMMA & JIGAMI, 2004). As Figuras 13 e 14 demonstram a expressão de manose/glicose e L-fucose no fibroadenoma e no carcinoma ductal invasivo. Para tal, foram utilizadas as sondas formadas pelos PQs e as lectinas Con A e UEA-I, respectivamente.

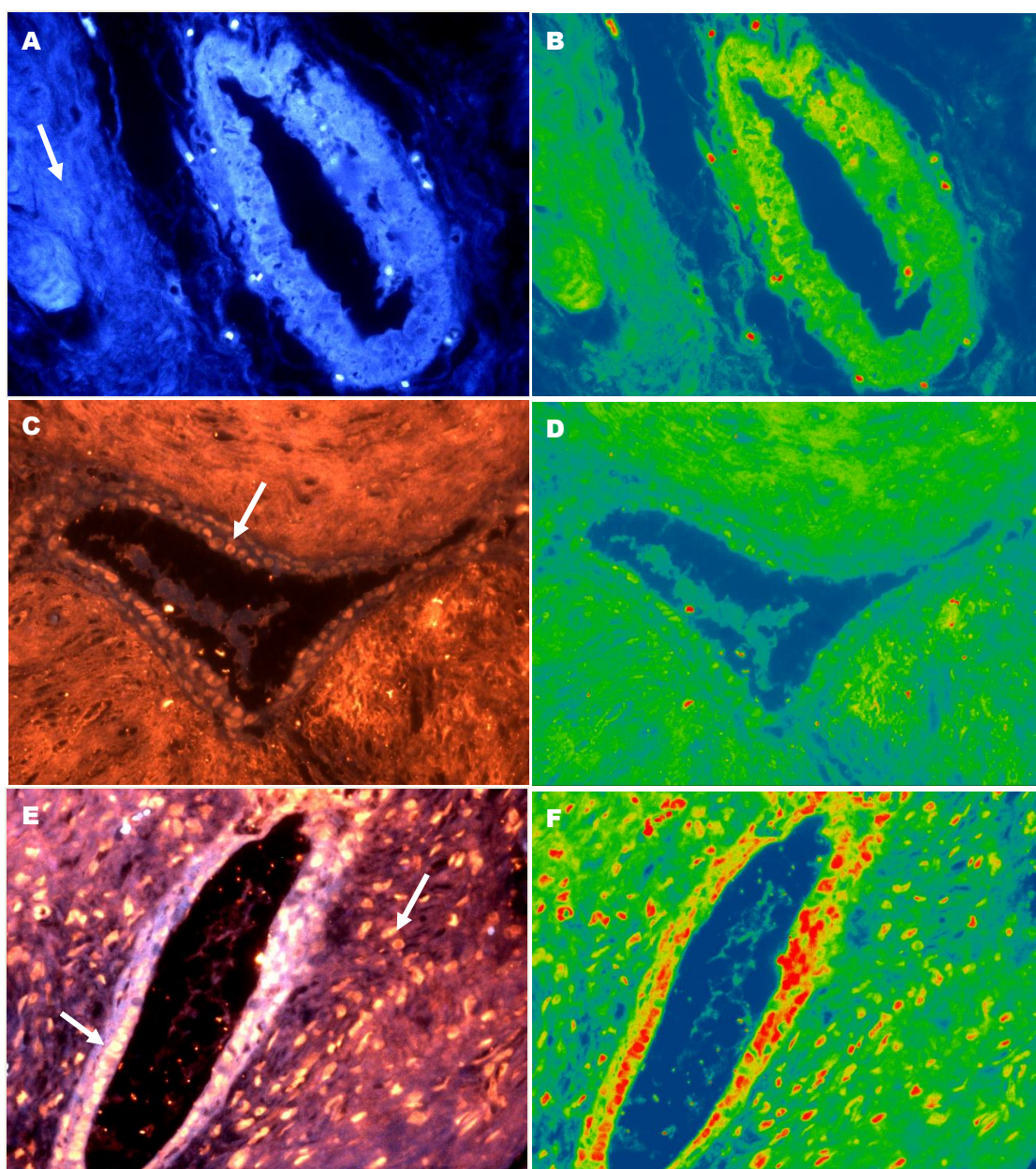


Figura 13. Marcação do FB com diferentes lectinas. Em A, tecido controle, em C, marcação com PQ-Con A e em E, marcação com PQ-UEA (400x). Em B, D e F, os respectivos mapas de intensidade (Azul = 0 u.a.; Verde = 112 u.a.; Amarelo = 176 u.a. e Vermelho = 255 u.a.).

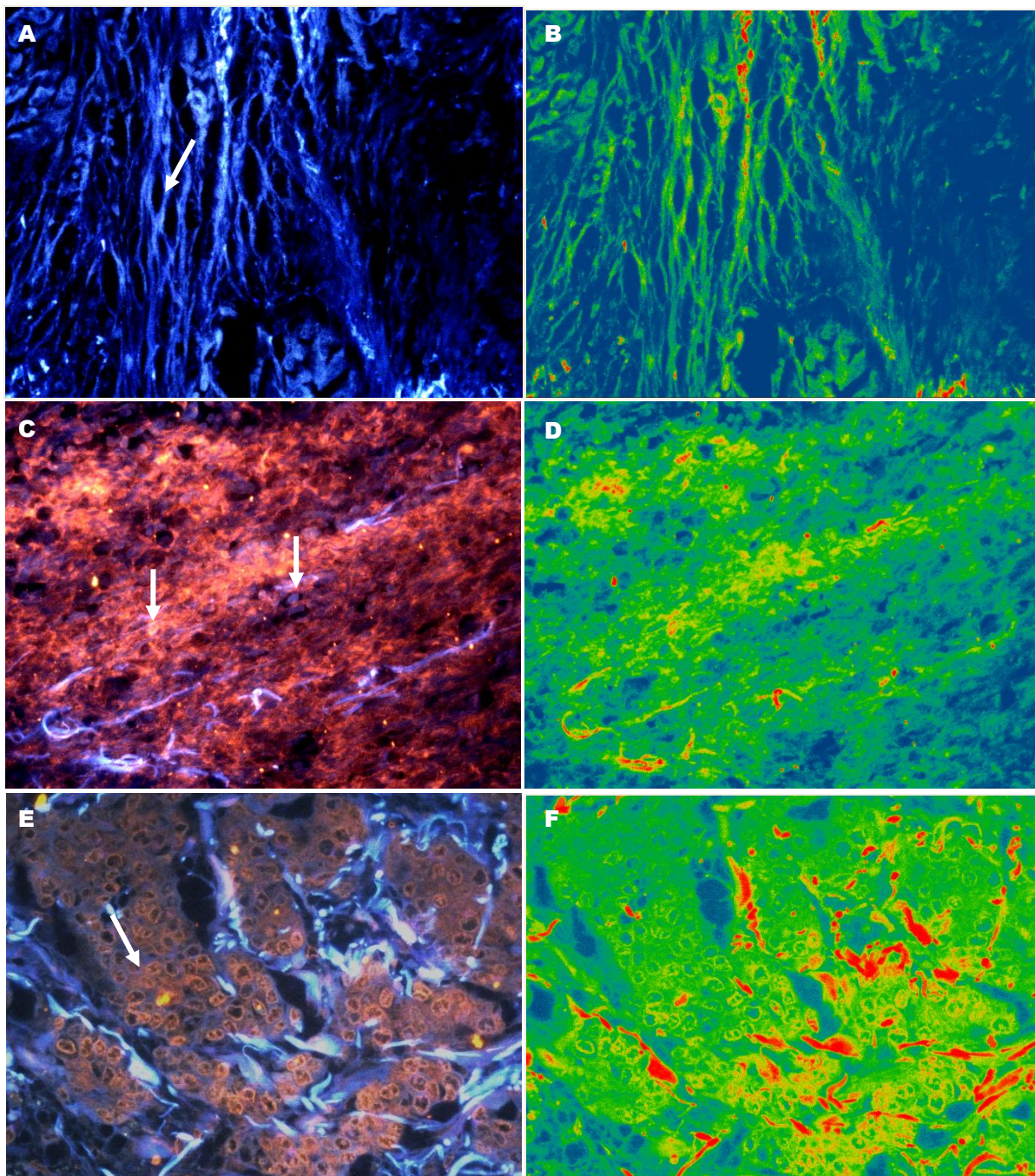


Figura 14. Marcação do CDI com diferentes lectinas. Em A, tecido controle, em C, marcação com PQ-Con A e em E, marcação com PQ-UEA (400x). Em B, D e F, os respectivos mapas de intensidade (Azul = 0 u.a.; Verde = 112 u.a.; Amarelo = 176 u.a. e Vermelho = 255 u.a.).

Todas as amostras de tecidos humanos apresentam autofluorescência intrínseca, que é em grande parte devido ao colágeno fibras de fluorescência (BROKNER *et al.*, 2000). O colágeno está presente em grande quantidade nas membranas basais dos tecidos e possui forte emissão na região do azul-violeta, como mostrado na Figura 13A e 14A (HAGE, 2001).

Em testes iniciais foi feita a incubação dos tecidos apenas com o PQ, sem lectina, para verificar se haveria algum tipo de interação inespecífica. Como esperado, não houve marcação, sendo visualizado no microscópio apenas a autofluorescência do tecido (imagens não exibidas). Acredita-se que, na ausência da lectina, o PQ sozinho não é capaz de interagir com o tecido, e assim, é removido durante a lavagem com PBS.

Como evidenciado nas Figuras 13C e 14C, o conjugado PQ-Con A foi capaz de marcar o estroma tecidual assim como as células ductais, tanto nas amostras de fibroadenoma como no carcinoma ductal invasivo. O padrão de marcação do PQ-UEA foi diferente do padrão de PQ-Con A em ambos os tipos de tecido, tendo esse conjugado marcado principalmente as células ductais e mais fracamente o estroma. No fibroadenoma, PQ-UEA marcou tanto as células ductais como os fibroblastos presentes no estroma (Figura 13E), enquanto no CDI, foram marcadas principalmente as células transformadas (Figura 14E). Esse resultado reflete a distribuição de manose/glicose e fucose nos tecidos e está diretamente relacionado à atividade de glicosiltransferases e glicosidases.

Apesar de a adsorção ser uma interação fraca, devido à ausência de formação de ligação química, os resultados obtidos com o conjugado PQ-Con A foram reproduzidos com sucesso, assim como os do conjugado PQ-UEA, observando-se sempre o mesmo padrão de marcação nas lâminas.

Em Beltrão *et al.* (1998), observou-se marcação moderada do epitélio ductal no fibroadenoma. Esse estudo foi realizado utilizando como sonda a lectina Con A conjugada a peroxidase. No mesmo trabalho foi visto que o tecido mamário maligno, assim como o benigno, demonstrou marcação de intensidade variável do estroma quando utilizada esta sonda, o que pode ser explicado pelo reconhecimento, a partir da lectina, de resíduos de glicose da porção glicídica do colágeno. Rêgo (2009) verificou que Con A e UEA conjugadas à peroxidase marcaram células neoplásicas com maior intensidade em casos de CDI pouco diferenciados.

A maioria dos estudos sobre o diagnóstico do câncer de mama se concentram em células epiteliais, dessa forma, pouco tem sido relatado sobre o papel do estroma circundante e da sua matriz extracelular (MEC). O envolvimento do estroma e a sua utilização como uma ferramenta de diagnóstico, no entanto, é um conceito emergente. A MEC contém predominantemente colágeno tipo I, que tem sido reconhecido como sendo importante para a iniciação e progressão do câncer da mama (AMBEKAR *et al.*, 2012).

Recentemente, tem se desenvolvido metodologias para quantificar a organização das fibras de colágeno utilizando a microscopia SHG. A quantificação facilita a detecção de

mudanças na organização destas fibras devido a dano ou doença, e, portanto, pode contribuir para o diagnóstico precoce. Han e colaboradores (2008) utilizaram a microscopia SHG para identificar a relação estrutural do colágeno presente no estroma saudável e no estroma tumoral. Diferenças no conteúdo de colágeno, em sua estrutura e distribuição em tecidos tumorais mostram o potencial de sua aplicação como marcador no diagnóstico de câncer (HOMPLAND *et al.*, 2008).

O conjugado PQ-Con A mostrou-se uma ferramenta aplicável para marcação de estroma, como pode ser visualizado nas Figuras 13C e 14C. Tanto no tumor maligno como no tumor benigno houve marcação intensa do estroma. A matriz extracelular é um produto celular complexo, formado por glicoproteínas, colágeno, glicosaminoglicanas e proteoglicanas como principais componentes, dessa forma, a lectina Con A é capaz de interagir com os resíduos de carboidratos presentes na MEC (GOISSIS, 2007).

As células do estroma, em conjunto com os componentes da MEC, proporcionam o microambiente que é fundamental para o crescimento das células cancerígenas, a invasão e progressão metastática. Alterações do estroma podem acompanhar ou até mesmo preceder a transformação maligna de células epiteliais (MICKE & ÖSTMAN, 2004).

Devido à importância do estroma tumoral para o desenvolvimento, promoção e invasão do câncer, tem se discutido, nos últimos anos, o papel do estroma como fonte de novos biomarcadores de câncer. Da mesma forma que, a célula maligna em si pode ser a fonte de substâncias que podem ser utilizadas como biomarcadores do câncer, o estroma tumoral contém fatores que podem ser utilizados como biomarcadores potenciais (SUND & KALLURI, 2009). Em contraste com os fibroblastos normais, fibroblastos associados ao câncer, por exemplo, aumentam o crescimento de tumores e metástases através da produção de fatores de crescimento e proteínas da MEC, alterando os padrões de sinalização e interação célula-célula e a adesão/migração celular (KHAMIS, 2012).

Além da comparação do padrão de marcação entre as duas lectinas no fibroadenoma e CDI, também foi feito um estudo comparando a intensidade da marcação de PQ-Con A e PQ-UEA no tecido mamário normal, fibroadenoma e CDI, com o objetivo de correlacionar a expressão de carboidratos com o nível de transformação histológica. A Figura 15 mostra o padrão de marcação de PQ-Con A no tecido mamário normal, no tumor benigno (FB) e no tumor maligno (CDI). Na Figura 17 foi feita avaliação da marcação destes mesmos tecidos, porém, utilizando o conjugado PQ-UEA. As Figuras 16 e 18 ilustram, respectivamente, os mapas de intensidade referentes a estas marcações.

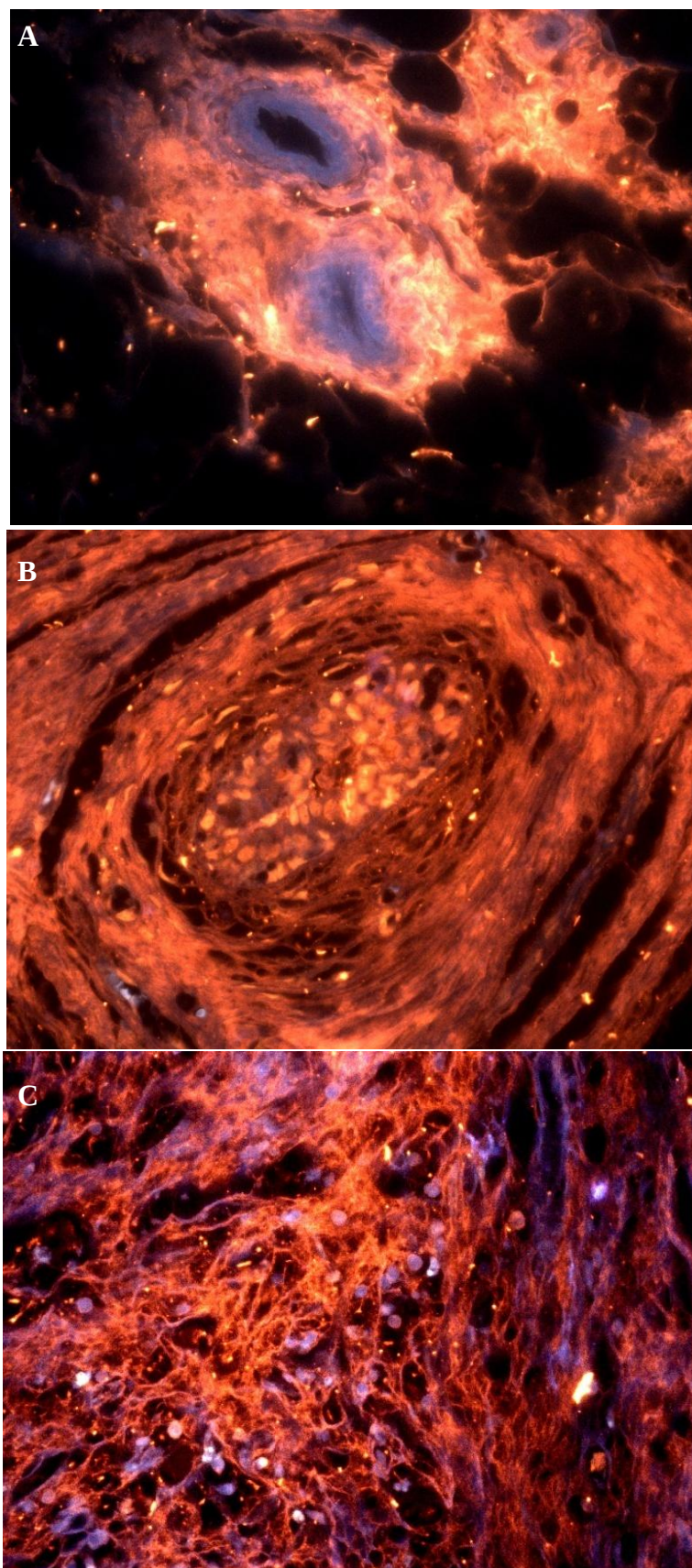


Figura 15. Marcação de tecido mamário com PQ-Con A (400x). Em A, tecido mamário normal, em B, fibroadenoma e em C, CDI.

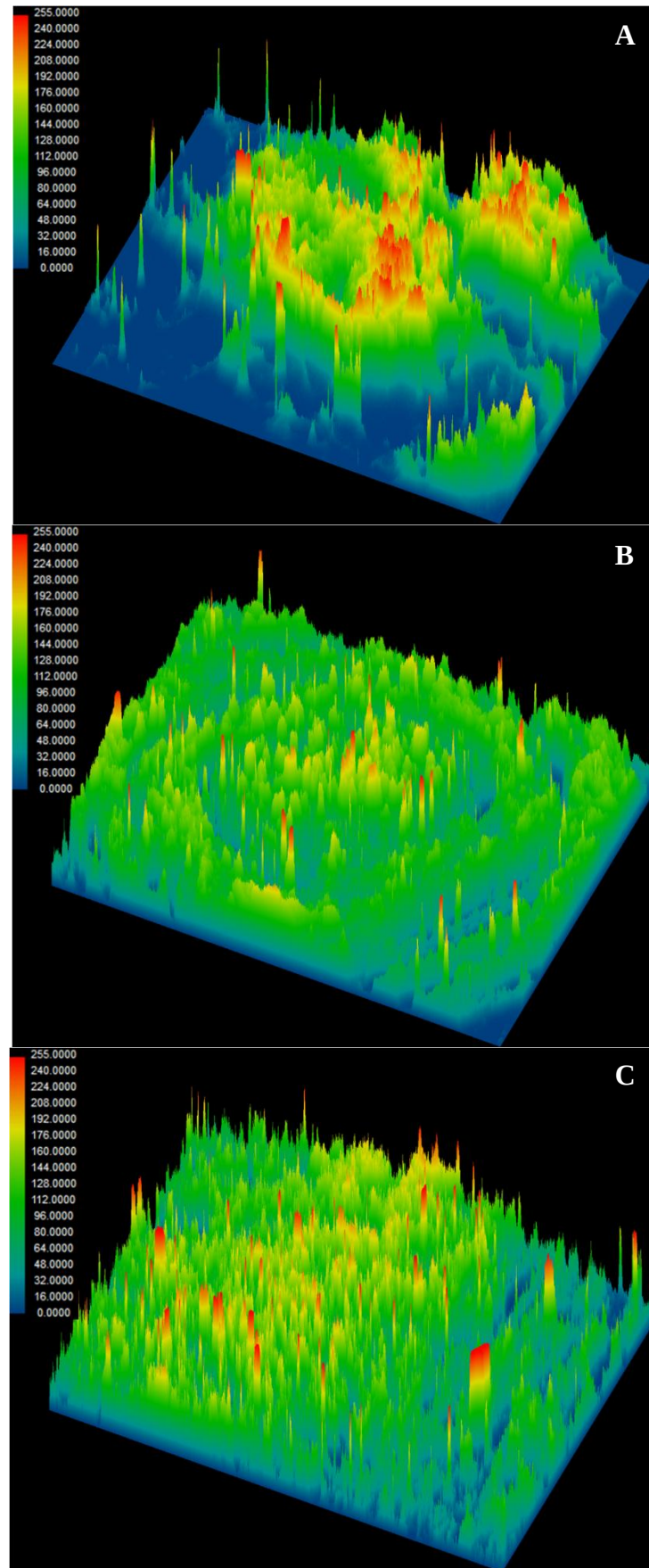


Figura 16. Mapas de intensidade referentes à marcação com PQ-Con A. Em A, tecido mamário normal, em B, fibroadenoma e em C, CDI (Azul = 0 u.a.; Verde = 112 u.a.; Amarelo = 176 u.a. e Vermelho = 255 u.a.).

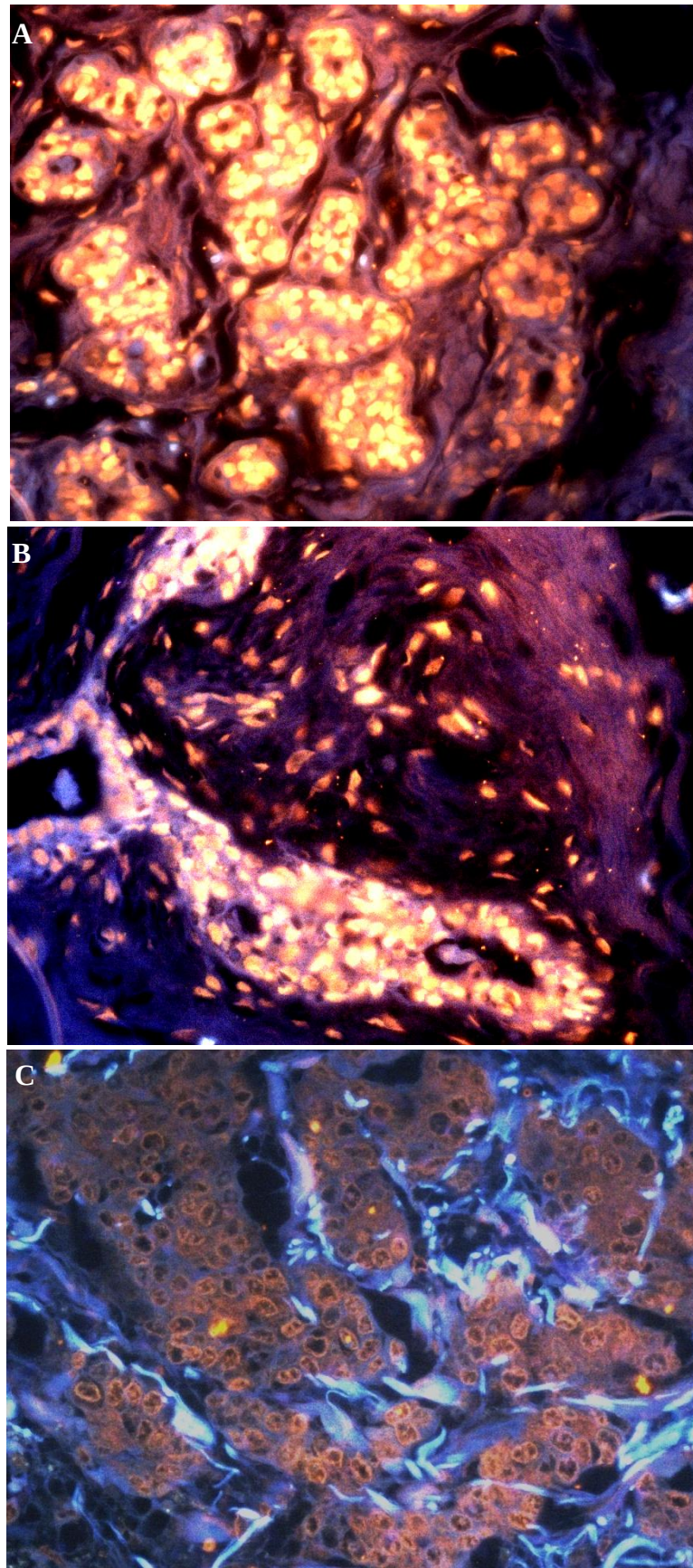


Figura 17. Marcação de tecido mamário com PQ-UEA (400x). Em A, tecido mamário normal, em B, fibroadenoma e em C, CDI.

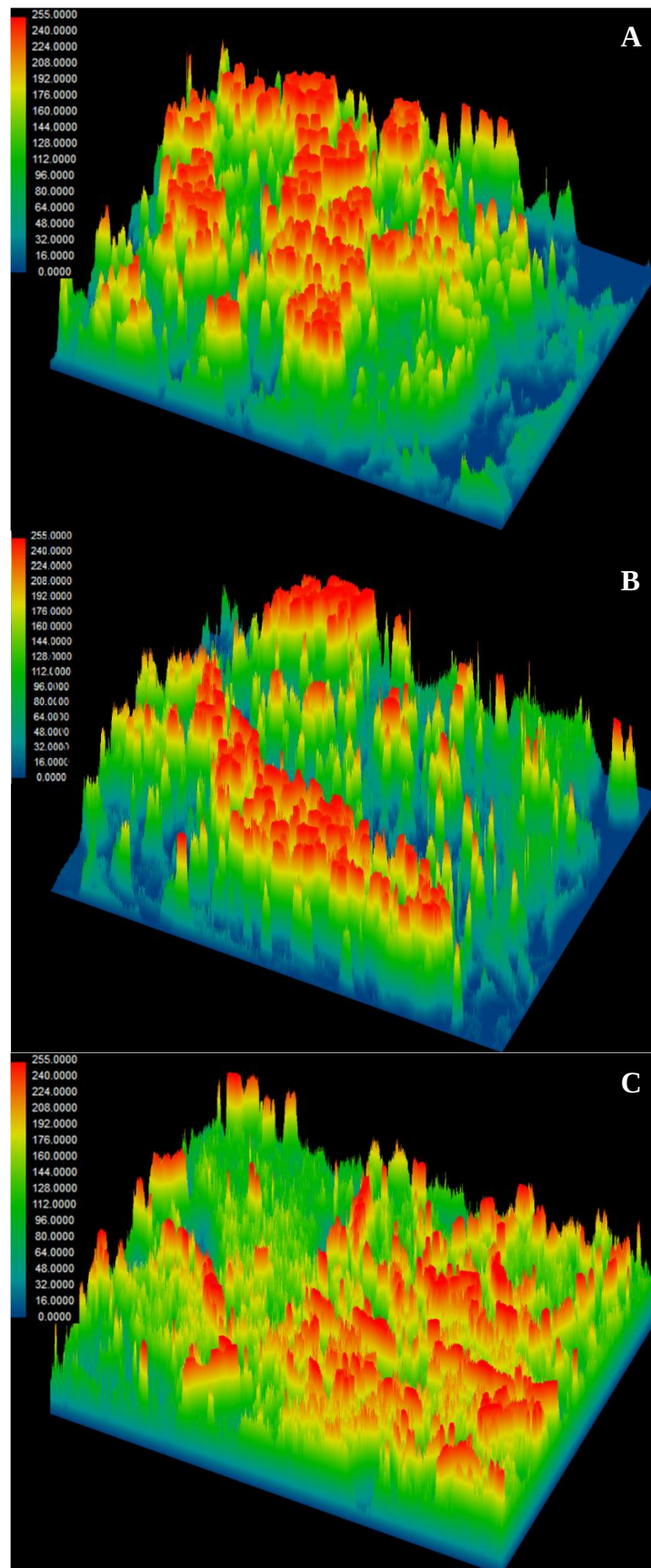


Figura 18. Mapas de intensidade referentes à marcação com UEA. Em A, tecido mamário normal, em B, fibroadenoma e em C, CDI (Azul = 0 u.a.; Verde = 112 u.a.; Amarelo = 176 u.a. e Vermelho = 255 u.a.).

O tecido normal demonstrou marcação intensa do estroma pelo conjugado PQ-Con A e ausência de marcação das células ductais por este mesmo conjugado (Figura 15A e 16A), sendo estas visualizadas em azul devido à autofluorescência emitida pelo tecido. Já utilizando o conjugado PQ-UEA, destaca-se a marcação intensa das células e moderada do estroma (Figuras 17A e 18A). Em Rêgo (2009), também foi observada marcação das células epiteliais na mama normal utilizando a UEA, porém, neste trabalho, a lectina foi utilizada conjugada à peroxidase. A Tabela 3 sumariza os resultados obtidos através da marcação de tecidos mamários com o conjugado lectina e ponto quântico.

Observando os mapas de marcação do conjugado PQ-Con A (Figura 16) verifica-se uma ligeira diferença na intensidade da marcação do tecido normal quando comparado ao fibroadenoma e carcinoma ductal invasivo, sendo o primeiro levemente mais intenso. No entanto, houve pouca diferença na intensidade de marcação entre o tumor benigno e o tumor maligno.

Em relação aos mapas de marcação do conjugado PQ-UEA, apesar de exibirem marcação mais intensa quando comparados ao conjugado PQ-Con A, também não apresentam diferenças significativas entre os tecidos, apenas uma marcação ligeiramente menos intensa no CDI quando comparado ao FB e tecido normal.

Tabela 3. Sumário da marcação de tecido mamário humano por PQ-Con A e PQ-UEA.

	Mama Normal	Fibroadenoma	Carcinoma Ductal Invasivo
PQ-Con A	Estroma intensamente marcado.	Estroma e células ductais intensamente marcados.	Estroma intensamente marcado. Células transformadas marcadas moderadamente.
PQ-UEA	Células ductais intensamente marcadas. Estroma moderadamente marcado.	Células ductais e fibroblastos intensamente marcados. Estroma moderadamente marcado.	Células transformadas intensamente marcadas. Estroma fracamente marcado.

Diversos trabalhos fizeram uso das lectinas para avaliar tecidos mamários. Em estudo publicado por Beltrão e colaboradores (1998), investigou-se o padrão de expressão de carboidratos no tecido normal e transformado (doença fibrocística, FB e CDI) utilizando Con

A e Cra Iso 1 conjugadas à peroxidase. Verificou-se marcação fraca de Con A no tecido normal, moderada no fibroadenoma e intensa no carcinoma ductal invasivo. Em 2006, Santos *et al.* conjugaram pontos quânticos de CdS/Cd(OH)₂ à lectina Con A com o intuito de marcar fibroadenoma e comparar ao tecido normal. Como no trabalho anterior, foi vista marcação mais intensa do fibroadenoma em relação ao tecido normal.

Campos *et al.* (2006) utilizaram a lectina Con A conjugada ao éster de acridina na marcação de tecido mamário normal e CDI. Observou-se maior emissão de luz pelo CDI quando comparado ao normal. Em Brustein *et al.* (2012) também foi utilizado a quimiluminescência para diferenciar o tecido mamário normal do fibroadenoma e CDI. Empregando as lectinas Con A e PNA conjugadas ao éster de acridina foi visto que a intensidade de luz emitida foi maior no fibroadenoma seguido do CDI e do tecido normal. Vale salientar que o emprego de metodologias distintas pode justificar a diferença entre os resultados obtidos nestes trabalhos.

5.5 Inibição da Marcação

A fim de demonstrar a especificidade da marcação obtida, foram realizados ensaios de inibição da marcação. Para tal, antes de serem aplicados nos tecidos, os conjugados PQ-Con A e PQ-UEA foram incubados com seus açúcares específicos (metil α -D-manopiranosídeo e L-fucose, respectivamente). A incubação prévia com o carboidrato faz com que este ocupe os sítios de ligação a carboidratos presentes nas lectinas e assim, ao ser aplicado no tecido, o conjugado não é capaz de reconhecer os glicoconjugados localizados na superfície celular.

O resultado dos testes de inibição da marcação é mostrado na Figura 19. Como esperado, após o conjugado PQ-Con A ser inibido com seu carboidrato específico, ocorreu redução quase total da marcação das amostras de fibroadenoma e carcinoma ductal invasivo. O mesmo comportamento foi verificado ao inibir o conjugado PQ-UEA com seu carboidrato específico.

Uma vez que os sítios de reconhecimento a carboidratos da lectina estejam ocupados, não ocorre interação dos conjugados com os açúcares presentes na superfície das células ductais e estroma, sendo eles removidos após a lavagem com o tampão. Este resultado indica que a marcação obtida pelos conjugados PQ-Con A e PQ-UEA nas amostras de fibroadenoma e CDI foi, de fato, específica.

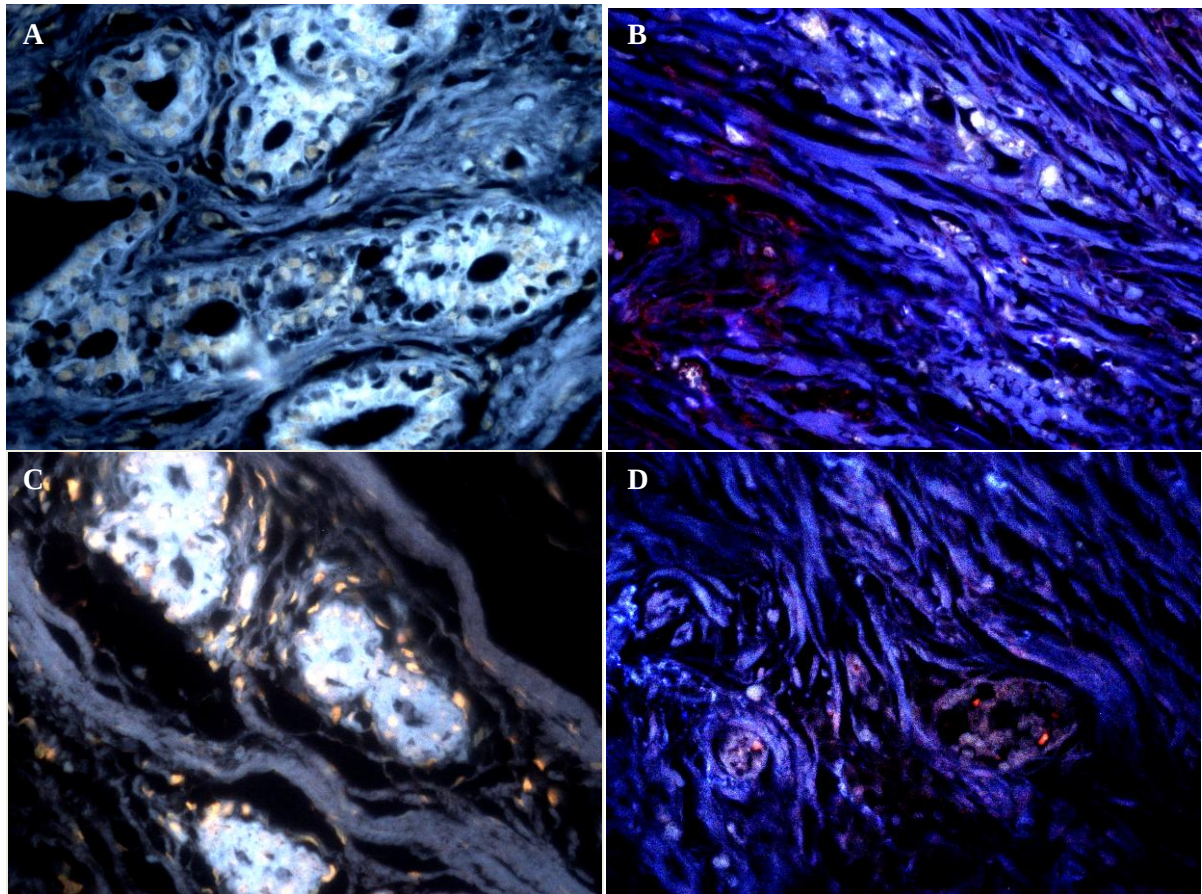


Figura 19. Inibição dos conjugados PQ-Con A e PQ-UEA. Em A e B, fibroadenoma e CDI, respectivamente, incubados com PQ-Con A inibido. Em C e D, fibroadenoma e CDI, respectivamente, incubados com PQ-UEA inibido (400x).

6. CONCLUSÃO

Através da metodologia utilizada neste trabalho, foi possível obter com sucesso pontos quânticos de CdTe/CdS funcionalizados e passivados com AMS. Apesar da conjugação de PQs a diferentes biomoléculas ainda ser um desafio, o ensaio fluorescente em microplaca mostrou que o método empregado permitiu a obtenção eficaz de conjugados PQ-lectinas. Ainda, a análise espectroscópica demonstrou que o processo de conjugação utilizado não altera as propriedades dos PQs e não afeta a viabilidade das lectinas, como comprovado no teste da atividade hemaglutinante.

Os conjugados PQ-Con A e PQ-UEA mostraram distribuição da marcação diferente, havendo preferência por certas áreas do tecido mamário. O primeiro marca fortemente o estroma e moderadamente as células ductais, enquanto que o segundo marca preferencialmente as células ductais e mais fracamente o estroma. É possível ainda afirmar que a marcação obtida foi de fato específica, pois uma vez inibidos os conjugados, com carboidratos específicos, a marcação foi drasticamente reduzida.

Os resultados obtidos mostram o potencial de conjugados de PQ-lectinas como sondas moleculares, capazes de gerar informações a cerca de estruturas celulares, conteúdo molecular e ambiente tumoral e assim ajudar a elucidar processos biológicos, gerando novas possibilidades, particularmente na medicina diagnóstica.

7. PERSPECTIVAS

Uma vez que os resultados envolvendo o tema são contraditórios, mais estudos devem ser desenvolvidos na tentativa de esclarecer o assunto. Como perspectivas para este trabalho têm-se: o aprimoramento do protocolo de conjugação, a utilização de PQs com cores diferentes (uma cor para cada lectina), melhoramento do processo de marcação (variação do tempo e temperatura de incubação) e uma investigação mais aprofundada do papel da tripsinização. Pretende-se ainda empregar o ensaio fluorescente em microplaca para avaliar não só o processo de conjugação, como a própria marcação em si. Para isso, pensou-se em incubar os tecidos com os conjugados nas microplacas, para obter resultados quantitativos após a leitura no fluorímetro. É fundamental também aumentar o número de amostras para obtenção de resultados mais conclusivos.

8. REFERÊNCIAS

AMBEKAR, R.; LAU, T. Y.; WALSH, M.; BHARGAVA, R.; TOUSSAINT JR, K. C. Quantifying collagen structure in biopsies using second-harmonic generation imaging. *Biomedical Optics Express*, v. 3, n. 9, p. 2021-2035, 2012.

ARAB, M.R., SALARI, S., KARIMI, M. e MOFIDPOUR, H. Lectin Histochemical Study of Cell Surface Glycoconjugate in Gastric Carcinoma Using Helix Pomatia Agglutinin. *Acta Medica Iranica*, v. 48, n. 4, p. 209-213, 2010.

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

AZZAZZY H. M. E.; MANSOUR M. M. H.; KAZMIERCZAK, S. C. From diagnostics to therapy: prospects of quantum dots. *Clinical Biochemistry*, v. 40, p. 917-927, 2007.

BELTRÃO, E. I. C.; CORREIA, M. T. S.; FIGUEREDO-SILVA, J.; COELHO, L. C. B. B. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 74, p. 125-134, 1998.

BELTRÃO, E. I. C.; CABRAL, T.; FIGUEREDO-SILVA, J.; COELHO, L.; CARVALHO JR, L. B. Infiltrating ductal mammary carcinoma: a lectin histochemistry study. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco*, v. 46, n. 1, p. 32-35, 2001.

BELTRÃO, E. I. C.; MEDEIROS, P. L.; RODRIGUES, O. G.; FIGUEREDO-SILVA, J.; VALENÇA, M. M.; COELHO, L. C. B. B.; CARVALHO JR, L. B. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumour. *European Journal of Histochemistry*, v. 47, p. 139-142, 2003.

BOGLIOLO, L. Bogliolo Patologia. 7ª edição Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.

BORCHARTT, T. B.; CONCI, A.; LIMA, R. C. F.; RESMINI, R.; SANCHEZ, A. Breast thermography from na imaging processing viewpoint: a survey. *Signal Processing*, 2012. ARTICLE IN PRESS.

BROOKNER, C. K.; FOLLEN, M.; BOIKO, I.; GALVAN, J.; THOMSEN, S.; MALPICA, A.; SUZUKI, S. LOTAN, R.; RICHARDS-KORTUM, R. Autofluorescence patterns in short-term cultures of normal cervix tissue. *Photochemistry and Photobiology*, v. 71, n. 6, p. 730-736, 2000.

BRUSTEIN, V. P.; CAVALCANTI, C. L.; MELO-JÚNIOR, M. R.; CORREIA, M. T.; BELTRÃO, E. I.; CARVALHO JR, L. B. Chemiluminescent detection of carbohydrates in the tumoral breast diseases. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 166, p. 268-275, 2012.

CALADO, S. S.. ABREU E LIMA, M. C. C. Estudo morfológico dos fibroadenomas da mama: uma análise comparativa entre os grupos etários. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 40, n. 6, p. 411-419, 2004.

CAMPOS, L. M.; CAVALCANTI, C. L. B.; LIMA-FILHO, J. L.; CARVALHO, JR, L. B.; BELTRÃO, E. I. C. Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. *Biomarkers*, v. 11, n. 5, p. 480-484, 2006.

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

CHATTERJEE, A.; MANDAL, D. K. Quaternary association and reactivation of dimeric concanavalin A. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 35, p. 103-109, 2005.

DAGTEPE, P.; CHIKAN, V.; JASINSKI, J.; LEPPERT, V. J. Quantized growth of CdTe quantum dots; observation of magic sized CdTe quantum dots. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 111, p. 14977-14983, 2007.

DANTAS, K.A.; SANTOS, G.C.; FILHO, O.G. Sistemas de graduação para carcinoma: estudo comparativo da concordância cito-histológica. *Revista Brasileira de Ginecologia. e Obstetrícia*. v. 25, n. 2, p. 121-130, 2003.

FARIAS, P. M. A.; SANTOS, B. S.; FONTES, A.; CESAR, C. L. Semiconductor nanocrystals and fluorescence microscopy in biological labeling. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*, p. 840-847, 2007.

FARIAS, P. M. A.; SANTOS, B. S.; MENEZES, F.; BRASIL JR, A. G.; FERREIRA, R.; MOTTA, M. A.; CASTRO-NETO, A. G.; VIEIRA, A. A. S.; SILVA, D. C. N.; FONTES, A.; CESAR, C. L. Highly fluorescent semiconductor core-shell CdTe-CdS nanocrystals for monitoring living yeast cells activity. *Applied Physics A*, v. 89, p. 857-861, 2007.

FEDER, D.; GOMES, S. A. O.; THOMAZ, A. A.; ALMEIDA, D. B.; FAUSTINO, W. M.; FONTES, A.; STAHL, C. V.; SANTOS-MALLET, J. R.; CESAR, C. L. *In vitro* and *in vivo* documentation of quantum dots labeled *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interaction using confocal microscopy. *Parasitology Research*, v. 106, p. 85-93, 2009.

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. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 52, n. 1, p. 1-11, 2001.

FUSTER, M.M.; ESKO, J.C. The sweet and sour of cancer: glycans as new therapeutic targets. *Nature*, v. 5, p. 526-542, 2005.

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.

GOISSIS, A. P. A. Análise estrutural do colágeno tipo I. Correlação estrutura:atividade biológica. São Carlos. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia). USP. 2002. 112f.

GUEMBAROVSKI, R. L.; CÓLUS, I. M. S. Câncer: uma doença genética. *Genética na Escola*, v. 1, p. 4-7, 2008.

GUIMARÃES, M. T., MELO-JUNIOR, M.R., COSTA SILVA, R.B., CAVALCANTE, C.B.L. e BELTRÃO, E.I.C. Estudo comparativo da expressão de carboidratos no sistema ovo-granuloma hepático na esquistossomose humana e experimental. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 67, n. 1, p. 59-63, 2008.

GURAY, M. e SAHIN, A. Benign breast disease: classification, diagnosis and management. *The Oncologist*, v. 11, n. 5, p. 435-449, 2006.

HAGE, R. Aplicação da técnica de espectroscopia de fluorescência induzida por laser na diferenciação entre tecido normal e neoplásico da mama feminina humana. São José dos Campos. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica). Univap. 2001. 94f.

HAKOMORI, S. Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: basis for development of anti-cancer vaccines. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 491, p. 369-402, 2001.

HAN, X.; BURKE, R. M.; ZETTEL, M. L.; TANG, P.; BROWN, E.B. Second harmonic properties of tumor collagen: determining the structural relationship between reactive stroma and healthy stroma. *Optics Express*, v. 16, n. 3, p. 1846-1859, 2008.

HERLING, M., KNOLLE, J., BAHN, H., GABIUS, H.J. e HINZE, R. Glychohistochemical monitoring of chemically induced sarcomas at different stages of tumorigenesis. *In Vivo*, v. 14, n. 4, p. 499-506, 2000.

HERMANSON, G. T. Bioconjugate techniques. 2ª edição. Elsevier. 2008. 1202 páginas.

HOMPLAND, T.; ERIKSON, A.; LINDGREN, M.; LINDMO, T.; DAVIES, C. L. Second harmonic generation in collagen as a potencial cancer diagnostic parameter. *Journal of Biomedical Optics*, v. 13, n. 5, p. 50-54, 2008.

INCA. Falando sobre câncer de mama. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância – (Conprev). Rio de Janeiro: MS/INCA, 2002. 66 págs.

INCA. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro. 2009.

INCA. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 2ª edição. Rio de Janeiro. 2012. 129 páginas.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.. FORMAN, D. *Global Cancer Statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 10ª edição. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan. 2004. 488 páginas.

KERLIKOWSKE, K.; MOLINARO, A.; CHA, I.; LJUNG, B. M.; ERNSTER, B. L.; STEWART, K.; CHEW, K.; MOORE D. H. 2nd; WALDMAN, F. Characteristics associated with recurrence among women with ductal carcinoma in situ treated by lumpectomy. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 95, p. 1692-1702, 2003.

KHAMIS, Z. I.; SAHAB, Z. J.; SANG, Q.X.A. Active roles of tumor stroma in breast cancer metastasis. *International Journal of Breast Cancer*, v. 12, p. 1-10, 2012.

KHAN, F.; KHAN, R. W.; SHERWANI, A.; MOHMOOD, S.; AZFER, M. A. Lectins as markers for blood grouping. *Medical Science Monitor*, v. 8, n. 12, p. 293-300, 2008.

KOROURIAN, S.; SIEGEL, E.; KIEBER-EMMONS, T.; MONZAVI-KARBASSI, B. Expression analysis of carbohydrates antigens in ductal carcinoma in situ of breast by lectin histochemistry. *BMC Cancer*, v. 8, n. 136, 2008.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K; FAUSTO, N. Robbins & Cotran: Patologia - Bases Patológicas das Doenças. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2005. 1504f.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*, v. 98, n. 2, p. 637-674, 1998.

MANSUR, H. S. Quantum dots and nanocomposites. *WIREs Nanomedicine and Nanotechnology*, v. 2, p. 113-129, 2010.

MEDINTZ, I. L.; UYEDA, H. T.; GOLDMAN, E. R.; MATTOUSSI, H. Quantum dots bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nature Materials*, v. 4, p. 435-446, 2005.

MELO-JÚNIOR, M. R. Histoquímica e análise digital de imagem em neoplasias cutâneas. 2003. 57 f. Dissertação (Mestrado em Patologia). Universidade Federal de Pernambuco. 2003.

MELO-JÚNIOR, M. R., ARAÚJO-FILHO, J. L. S., PATU, V. J. R. M., MACHADO, M. C. F. P., BELTRÃO, E. I. C. e CARVALHO JR., L. B. Digital image analysis of skin neoplasms evaluated by lectin histochemistry: potential marker to biochemical alterations and tumour differential diagnosis. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 42, n. 6, p. 455-460, 2006.

MENKE, C. H.; BIAZÚS, J. V.; XAVIER, N. L.; CAVALHEIRO, J. A.; RABIN, E. G.; BITTÇEBRUNN, A.; CERICATTO, R. Rotinas em Mastologia. 2ª edição. Porto Alegre. Artmed, 2007. 272 páginas.

MICKE, P.; ÖSTMAN, A. Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer*, v. 45, n. 2, p. 163-175, 2004.

MODY, R., JOSHI, S. e 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.

NAZÁRIO, A. C. P.; REGO, M. F.; OLIVEIRA, V. M. Nódulos benignos da mama: uma revisão dos diagnósticos diferenciais e conduta. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 29, n. 4, p. 211-219, 2007.

OKAZAKI, H.; MIZUNO, M.; NASU, J.; MAKIDONO, C.; HIRAOKA, S.; YAMAMOTO, K.; OKADA, H.; FUJITA, T.; TSUJI, T.; SHIRATORI, Y. Difference in *Ulex europaeus* agglutinin I binding activity of decay-accelerating factor detected in stools of patients with colorectal cancer and ulcerative colitis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 143, n. 3, p. 169-174, 2004.

PARAK, W. J.; PELLEGRINO, T.; PLANK, C. Labelling cells with quantum dots. *Nanotechnology*, n. 16, p. 9-25, 2005.

PENG, C. W.; LIU, X. L.; CHEN, C.; LIU, X.; YANG, X. Q.; PANG, D. W.; ZHU, X. B.; LI, Y. Patterns of cancer invasion revealed by PQs-based quantitative multiplexed imaging of tumor microenvironment. *Biomaterials*, v. 32, p. 2907-2917, 2011.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, v. 109, p. 347-352, 1995.

RÊGO, M. J. B. M. Carcinoma ductal invasivo mamário esporádico: uma abordagem histoquímica e imunohistoquímica. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) - Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2009.

RIBEIRO, R. T. Caracterização impedimétrica da absorção de concanavalina A sobre eletrodos sólidos. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2005. 68 f.

RUBIN, R.; STRAYER, D. S. Rubin's pathology. 6º edição. China. Editora Lippincott Williams & Wilkins. 2012. 1466 páginas.

SAMES, K. H.; SCHUMACHER, U.; HALATA, Z.; VAN DAMME, E. J .M.; PEUMANS, W. J.; ASMUS, B.; MOLL, R.; MOLL, I. Lectin and proteoglycan histochemistry of Merkel cells carcinoma. *Experimental Dermatology*, v. 10, p. 100-109, 2001.

SANTOS, B. S. *et al.* CdS-Cd(OH)₂ core shell quantum dots functionalized with concanavalin A lectin for recognition of mammary tumor. *Physica Status Solidi, (c)*, v. 3, n. 11, p. 4017-4022, 2006.

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

SHIMMA, Y.; JIGAMI, Y. Expression of human glycosyltransferase genes in yeast as a tool for enzymatic synthesis of sugar chain. *Glycoconjugate Journal*, v. 21, n.1-2, p. 75-78, 2004.

SILVA, F. O.; VIOL, L. C. S.; FERREIRA, D. L.; ALVES, J. L. A.; SCHIAVON, M. A. O estado da arte de semicondutores nanocristalinos coloidais. *Química Nova*, v. 33, n. 9, p. 1933-1939, 2010.

SMITH, A. M.; GAO, X.; NIE, S. Quantum dot nanocrystals for *in vivo* molecular and cellular imaging. *Photochemistry and photobiology*, v. 80, n. 3, p. 377-385, 2004.

SMITH, A. M.; DUAN, H.; MOHS, A. M.; NIE, S. Bioconjugated quantum dots for *in vivo* molecular and cellular imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, n. 11, 2008.

SOBRAL, A. P. V.; REGO, M. J. B. M.; CAVALCANTI, C. L. B.; CARVALHO JR, L. B.; BELTRÃO, E. I. C. Con A and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepidermoid carcinoma. *Journal of Oral Science*, v. 52, n. 1, p. 49-54, 2010.

STEVENS, A; LOWE, J. Patologia. 2ª edição. São Paulo. Editora Manole. 2002. 670 páginas.

SUND, M.; KALLURI, R. Tumor stroma derived biomarkers in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 28, n. 1-2, p. 177-183, 2009.

THÖM, I.; SCHULT-KRONEFELD, O.; BURKHOLDER, I.; GOERN, M.; ANDRITZKY, B.; BLONSKI, K.; KUGLER, C.; EDLER, L.; BOKEMEYER, C.; SCHUMACHER, U.; LAACK, E. Lectin histochemistry of metastatic adenocarcinomas of the lung. *Lung Cancer*, n. 56, p. 391-397, 2007.

UNESCO. Nanotecnologia para o MERCOSUL: edição 2010 do Prêmio Mercosul de Ciência e Tecnologia. – Brasília: UNESCO, MBC, RECyT/ MERCOSUL, CNPq, 2010. 180 p.

YU, W. W.; QU, L.; GUO, W.; PENG, X. Experimental determination of the extinction coefficient of the CdTe, CdSe and CdS nanocrystals. *Chemical Materials*, v. 15, p. 2854-2860, 2003.

YU, X.; CHEN, L.; LI, K.; LI, Y.; XIAO, S.; LUO, X.; LIU, J.; ZHOU, L.; DENG, Y.; PANG, D.; WANG, O. Immunofluorescence detection with quantum dot bioconjugates for hepatoma *in vivo*. *Journal of Biomedical Optics*, v. 12, n. 1, 2007.

WANG, Y.; DOSSEY, A. M.; FROUDE, J. W.; LUBITZ, D. T.; TZUR, D.; SEMENCHENKO, V.; WISHART, D. S. PSA fluoroimmunoassays using anti-PSA and quantum-dot conjugates. *Nanomedicine*, v. 3, n. 4, p. 475-483, 2008.

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

WU, X.; LIU, H.; LIU, J.; HALEY, K. N.; TREADWAY, J.A.; LARSON, J.P.; GE, N.; PEALE, F.; BRUCHEZ, M. P. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nature Biotechnology*, v. 21, p. 41-46, 2003.

