



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

PALOMA MANUELLE MARQUES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOCONJUGADOS CONSTITUÍDOS POR
PONTOS QUÂNTICOS E A LECTINA LIGADORA DE MANOSE**

Recife - PE

2020

PALOMA MANUELLE MARQUES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOCONJUGADOS CONSTITUÍDOS POR
PONTOS QUÂNTICOS E A LECTINA LIGADORA DE MANOSE**

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriana Fontes

Coorientadora: Dr^a Carinna Nunes de Lima

Recife - PE

2020

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Silva, Paloma Manuelle Marques da
Desenvolvimento de bioconjugados constituídos por pontos quânticos e a lectina ligadora de manose / Paloma Manuelle Marques da Silva – 2020.

61 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Adriana Fontes

Coorientadora: Carinna Nunes de Lima

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2020.

Inclui referências.

1. Nanopartículas 2. Fluorescência 3. Carboidratos I. Fontes, Adriana (orient.) II. Lima, Carinna Nunes de (coorient.) III. Título.

620.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020-108

PALOMA MANUELLE MARQUES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOCONJUGADOS CONSTITUÍDOS POR
PONTOS QUÂNTICOS E A LECTINA LIGADORA DE MANOSE**

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

Aprovada em: 06 / 01 / 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Adriana Fontes (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o Dr. Paulo Euzébio Cabral Filho (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a Cássia Regina Albuquerque da Cunha (Examinadora Externa)
Laboratório Federal de Defesa Agropecuária em Pernambuco - LFDA

Dedico à minha família, por estarem sempre presente e pelo apoio incondicional em toda minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu Deus, pelas tantas coisas boas que me concedeu, por me guiar e me permitir ir mais além, superando todas as dificuldades.

À toda minha família, em especial, minha mãe Juvanete e minha bisavó Maria, que são minha base, por todo amor, cuidado, sacrifícios e incentivo que me permitiram ir sempre em busca dos meus sonhos e objetivos e me fizeram chegar até aqui. E às minhas irmãs, Cleia e Elaine, que sempre torceram por mim, me apoiando e incentivando e sempre foram as melhores amigas. Amo muito vocês.

À Jonathan, por todo carinho, compreensão, conselhos e suporte, seu apoio foi fundamental para concluir mais essa etapa.

Agradeço a todos os meus amigos, que me acompanham, sonham junto comigo e de alguma forma estiveram sempre presentes nessa trajetória, especialmente, a Ângela, Luquinhas, Rafaela, Lucas Almeida, Larissa, Mayara, Manuela, Suéllen, Midiã, Lorryne, Janaína, Adrian, Elizabeth, Ricardo e todos que sempre torceram pelo meu sucesso.

À minha professora e orientadora Adriana Fontes, por ter aceitado me orientar, por ter me acolhido desde a minha chegada à UFPE e ser sempre tão solícita. Sou imensamente grata pelo seu apoio e todo seu tempo doado, obrigada por todas as críticas que sempre foram construtivas e me fizeram crescer, e por ser essa pessoa tão humana e humilde. Agradeço à Carinna, que esteve sempre presente e me apoiou durante todo o mestrado, pela paciência, suporte, apoio e todo conhecimento compartilhado. Sem vocês nada disso seria possível.

À todo grupo NanoBio, pelo acolhimento, especialmente aqueles que de alguma forma contribuíram diretamente, Paulo Euzébio, Wesley, Mariana, pelo grande exemplo na pesquisa, e a todos que integram esse grupo maravilhoso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

RESUMO

Pontos quânticos (PQs) se tornaram valiosas ferramentas para diversos estudos biológicos devido às suas propriedades únicas, como a alta fotoestabilidade, e por apresentar uma superfície quimicamente ativa que possibilita sua conjugação a biomoléculas, como lectinas. Conjugados de PQ-lectinas têm sido utilizados como sondas versáteis não só para o estudo do papel dessas biomoléculas como também para avaliar o perfil de carboidratos em diferentes sistemas biológicos, fornecendo valiosas informações a respeito da sua glicobiologia. A lectina ligadora de manose (MBL) é uma molécula que atua no sistema imune inato reconhecendo carboidratos como *N*-acetil-D-glicosamina, D-manose e L-fucose expressos nas superfícies de patógenos, e participa de processos biológicos, tais como ativação do complemento, opsonização, modulação da inflamação e depuração de células apoptóticas. Assim, este trabalho objetivou desenvolver um conjugado eficiente e específico constituído por MBL e PQs de CdTe. Para tanto, a adsorção – em vários pHs – e a ligação covalente em pH 6,0 foram avaliadas como estratégias de conjugação, sendo as leveduras de *Candida albicans* utilizadas como prova de conceito. Na conjugação foi utilizada uma MBL recombinante (rhMBL). Os resultados de citometria de fluxo evidenciaram que o conjugado preparado por adsorção em pH 6,0 foi o que marcou mais efetivamente as leveduras, apresentando a maior porcentagem e maior mediana de fluorescência, e, por isso foi escolhido para ser caracterizado quanto à especificidade e às propriedades ópticas. A especificidade foi analisada a partir de ensaios de inibição do conjugado pelo açúcar D-(+)-manose na presença de cálcio (sistema 1), com incubações sem a adição de cálcio (sistema 2), bem como com solução contendo o quelante EDTA (sistema 3). A caracterização óptica indicou que o conjugado escolhido apresentou com intensa fluorescência. Os resultados de citometria de fluxo confirmaram que esta nanossonda (adsorção em pH 6,0) foi capaz de marcar praticamente 100% das leveduras. Essa marcação reduziu para cerca de 15,1% para o sistema 1 e para 13,8% para o sistema 2, enquanto para o sistema 3, a marcação das células não foi praticamente observada, sendo menor que 1%. Esses dados evidenciaram que o conjugado foi específico e que a presença do cálcio foi fundamental para a rhMBL reconhecer as leveduras pelo domínio de reconhecimento de carboidratos. A análise por microscopia de fluorescência confirmou a eficiência do conjugado escolhido, revelando uma marcação homogênea da *C. albicans*. Assim, o conjugado de PQs-rhMBL, por adsorção em pH 6,0, pode ser considerado uma versátil e promissora ferramenta óptica para a compreensão do papel da MBL em diversos sistemas biológicos.

Palavras-chave: Nanopartícula. Fluorescência. Carboidratos. Conjugação.

ABSTRACT

Quantum dots (QDs) can be considered valuable tools for a variety of biological studies due to their unique characteristics. QDs have high photostability and chemically active surface for conjugation with biomolecules, such as lectins. QDs-lectin conjugates have been used as versatile probes not only to understand the role of lectins but also to evaluate the carbohydrate profile in different biological systems, providing valuable information about their glycobiology. Mannose-binding lectin (MBL) is a molecule belonging to the innate immune system, which recognizes carbohydrates as *N*-acetyl-D-glucosamine, D-mannose, and L-fucose expressed on pathogen surfaces. MBL also takes part in biological processes such as complement activation, opsonization, inflammation modulation, and clearance of apoptotic cells. Thus, this work aimed to develop an efficient and specific conjugate consisted of MBL and CdTe QDs. For this, adsorption – at various pHs – and covalent binding at pH 6.0 were evaluated as conjugation strategies, and *Candida albicans* yeasts were used as proof of concept. For conjugation, a recombinant human MBL (rhMBL) was used. Flow cytometry results showed that the conjugate prepared by adsorption at pH 6.0 labeled *C. albicans* yeasts more efficiently, presenting the highest percentage and the highest fluorescence median intensity. Thus, this conjugate was, therefore, chosen to be characterized according to its specificity and optical properties. The specificity of the conjugate was evaluated by inhibition assay, using D-(+)-mannose, in the presence of calcium (system 1), by incubating the conjugates without the addition of calcium (system 2), and also incubating using a solution containing EDTA chelator (system 3). The optical characterization indicated that the chosen conjugate presented intense fluorescence. The flow cytometry results confirmed that this nanoprobe (adsorption at pH 6.0) was capable of labelling almost 100% of yeast cells. The labeling decreased to about 15.1% for system 1 and 13.8% for system 2, while for system 3, cell labeling was practically not observed, being less than 1%. These data show that the conjugate was specific, and the presence of calcium was essential for rhMBL to recognize yeast cells by its CDR domain. Fluorescence microscopy analyses confirmed the efficiency of the chosen conjugate, presenting homogeneous labeling of *C. albicans*. Thus, QDs-rhMBL conjugate by adsorption at pH 6.0 can be considered a versatile and promising optical tool for understanding the role of MBL in many biological systems.

Keywords: Nanoparticle. Fluorescence. Carbohydrates. Conjugation.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 –	Representação de um tetrâmero de MBL formado por suas subunidades estruturais.....	17
Figura 2 –	Estrutura do gene <i>MBL-2</i> e os diferentes éxons que codificam as diferentes regiões do produto proteico.....	18
Figura 3 –	Representação esquemática da via das lectinas do sistema complemento	20
Figura 4 –	A) Imagem de microscopia de campo claro de eritrócito infectado por <i>P. falciparum</i> . B) Microscopia de imunofluorescência de hemácias marcadas com brometo de etídio evidenciando a ligação da MBL a eritrócitos infectados.....	22
Figura 5 –	Esquema de fotoluminescência em semicondutores. Quando o elétron (e^-) é excitado, um éxciton é formado a partir do transporte do e^- para a banda de condução (BC). Após relaxação e recombinação excitônica, é gerada a emissão de fluorescência.....	24
Figura 6 –	Sintonização da emissão dos PQs com o seu tamanho, maior o E_g : emissão para região mais próxima do azul e menor E_g : emissão para a região mais próxima do infravermelho.....	24
Figura 7 –	Registro da emissão fluorescente de PQs (em vermelho) e o corante orgânico Alexa flúor (em verde) ao longo de 3 min. O núcleo, marcado com PQs, continua fluorescente ao longo de todo o teste, ao passo que o citoesqueleto, marcado com o corante orgânico, já não pode ser devidamente observado em torno de 60 s após o início do ensaio.....	25
Figura 8 –	Estrutura do <i>core/shell</i> de um PQ bioconjugado à biomolécula.....	27

Figura 9 –	Representação dos grupos reativos presentes na superfície dos PQs e estratégias de ligação a proteínas.....	29
Figura 10 –	(A) Representação esquemática da conjugação por adsorção de PQs de CdTe à lectina Cramoll. (B) Imagem de microscopia de fluorescência de leveduras de <i>C. albicans</i> marcadas com bioconjugado PQ-Cramoll (pH 7,0).....	31
Figura 11 –	Distribuição e retenção de nanossistemas constituídos por PQs incorporados à nanopartículas poliméricas conjugados com WGA no cérebro de rato após administração intranasal. Imagens ópticas representativas tiradas antes, 2 min e 1, 2, 3, 4 e 8 h após a administração.....	33

MANUSCRITO

Figura 1 –	Espectros de absorção (A) e emissão (B) dos PQs (em preto) e do conjugado preparado por adsorção em pH 6,0 (em vermelho). Os espectros de emissão foram adquiridos com excitação em $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$	45
Figura 2 –	Histogramas de <i>C. albicans</i> incubadas com o conjugado PQs-rhMBL (adsorção pH 6,0) na presença de cálcio (A), após inibição com manose – sistema 1 (B), sem adição de cálcio – sistema 2 (C) e com EDTA – sistema 3 (D).....	46
Figura 3 –	Imagens de microscopia de fluorescência de leveduras de <i>C. albicans</i> incubadas com o conjugado PQs-rhMBL na presença de cálcio (A), após inibição do conjugado – sistema 1 (B) e com EDTA – sistema 3 (C). Barra de escala: 7 μm	47

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Tabela 1 –	Médias das porcentagens de marcação e MIFs para leveduras de <i>C. albicans</i> após incubação com os conjugados preparados por adsorção e ligação covalente.....	43
------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACAMPs	Padrões moleculares associados a células apoptóticas
AMA	Ácido mercaptoacético
AMP	Ácido mercaptopropiônico
AMS	Ácido mercaptosuccínico
BC	Banda de condução
BV	Banda de valência
CDI	Carcinoma ductal infiltrante
ConA	Concanavalina A
DHLA	Ácido dihidrolipóico
DRC	Domínio de reconhecimento de carboidratos
EDC	1-etil-(3-dimetilaminopril) carbodiimida
EFM	Ensaio de fluorescência em microplacas
Eg	<i>Band gap</i>
FB	Fibroadenoma
FCS	Espectroscopia de correlação de fluorescência
HbSS	Eritrócitos falciformes
IgM	Imunoglobulina M
IL-6	Interleucina-6
IL-1 β	Interleucina-1 β
kDa	Kilodalton
MASP	Proteases de serina associadas a MBL
MBL	Lectina ligadora de manose
MIF	Mediana de intensidade de fluorescência
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
NPs	Nanopartículas
PAMPs	Padrões moleculares associados à superfície de patógenos
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
PQs	Pontos quânticos
QDs	<i>Quantum dots</i>
SC	Sistema complemento
SBA	Lectina aglutinina da soja
SNA	Lectina <i>Sambucus nigra</i>
SNC	Sistema nervoso central
Sulfo-NHS	<i>N</i> -hidroxisulfosuccinamida

TNF- α	Fator de necrose tumoral
UEA-I	<i>Ulex europaeus agglutinin-I</i>
WGA	Lectina aglutinina de germe de trigo

Sumário

1 - INTRODUÇÃO	14
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 - Lectina Ligadora de Manose (MBL)	16
2.1.1 - Estrutura e Síntese.....	16
2.1.2 - Funções	19
2.1.3 - Deficiência da MBL	22
2.2 - Pontos Quânticos	23
2.3 - PQs e Bioconjugação	27
2.4 - Aplicação de Bioconjugados de PQs e Lectinas	30
3 - OBJETIVOS	35
3.1 - Objetivo Geral.....	35
3.2 - Objetivos Específicos	35
4 - MANUSCRITO A SER TRADUZIDO E SUBMETIDO PARA A REVISTA <i>JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY - B</i>	36
5 - CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53

1 - INTRODUÇÃO

A lectina ligadora de manose (MBL – do inglês *mannose-binding lectin*) é uma glicoproteína sérica, componente do sistema imune inato humano, com capacidade de se ligar a microrganismos patogênicos e favorecer diversos processos biológicos, tais como ativação do sistema complemento (SC), opsonização, regulação da inflamação, reconhecimento de alterações estruturais celulares e depuração de células apoptóticas (DOMMET; KLEIN; TURNER, 2006). A MBL liga-se seletivamente a terminais ricos em açúcares (tais como *N*-acetil-D-glicosamina, D-manose e L-fucose, especialmente) (WEIS; DRICKAMER; HENDRICKSON, 1992), e na maioria das vezes, através de resíduos de aminoácidos conservados no seu domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC). Esta característica é essencial para a capacidade da MBL distinguir o que é próprio e não próprio do organismo (JACK; KLEIN; TURNER, 2001).

A MBL vem sendo associada a diversos processos infecciosos e inflamatórios. Leikina e colaboradores observaram a capacidade da MBL humana de bloquear a fusão viral do vírus da influenza (cepa recombinante X-31) através da imobilização de proteínas de membrana (LEIKINA *et al.*, 2005). Larvie e colaboradores demonstraram que a MBL é capaz de se ligar a peptídeos beta-amiloide, para o qual o acúmulo no parênquima cerebral está relacionado com o desenvolvimento da doença de Alzheimer (LARVIE *et al.*, 2012). Já Garred e colaboradores reportaram que eritrócitos falciformes (HbSS) infectados pelo *Plasmodium falciparum* são reconhecidos pela MBL (GARRED *et al.*, 2003). Além disso, Mendonça e colaboradores sugeriram que a deficiência de MBL contribuiria para o surgimento de episódios vaso-occlusivos em pacientes acometidos dessa alteração genética (MENDONÇA *et al.*, 2010).

O uso de sondas fluorescentes pode ser valioso para se compreender melhor o comportamento e o papel da MBL frente aos diversos sistemas biológicos. As técnicas baseadas em fluorescência propiciam análises sensíveis e com especificidade química. Dentre as sondas fluorescentes destacam-se os PQs, também conhecidos como *quantum dots* (QDs), os quais constituem uma nova classe de marcadores fluorescentes (ALGAR *et al.*, 2011; BAGHER, 2016). Os PQs são nanocristais fluorescentes de materiais semicondutores que possuem propriedades fotofísicas únicas, tornando essas nanoestruturas atraentes para

serem utilizadas na investigação de processos biológicos, tais como: (i) amplo espectro de absorção, que permite a excitação de diferentes “cores” de PQs utilizando uma única fonte de luz; (ii) estreito espectro de emissão, o qual possibilita múltiplas marcações simultâneas; (iii) alta resistência à fotodegradação, o que permite sua aplicação no monitoramento de processos ao longo do tempo; (iv) comprimento de onda de fluorescência sintonizável com o tamanho do PQ e (v) superfície quimicamente ativa, que permite sua conjugação a moléculas de reconhecimento específico, superfícies e até mesmo outras nanopartículas (BREGER; DELEHANTY; MEDINTZ, 2015; TENÓRIO *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2019). Com isso os PQs vêm sendo empregados em diversos estudos *in vitro* com células e tecidos, *in vivo* em pequenos animais e, também, em sensoriamento (FONTES *et al.*, 2012; ANDRADE *et al.*, 2013; WEGNER; HILDEBRANDT, 2015; TRAPIELLA-ALFONSO *et al.*, 2018).

Assim, este estudo objetivou padronizar uma conjugação específica e eficiente entre PQs carboxilados e a MBL, com a finalidade de desenvolver um nanossistema capaz de ser aplicado para desvendar o papel dessa lectina frente a sistemas biológicos por fluorescência. Para tanto, foram usadas leveduras de *Candida albicans* como modelo biológico, uma vez que este possui a parede celular rica em manose, um dos carboidratos reconhecidos pela MBL.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Lectina Ligadora de Manose (MBL)

2.1.1 - Estrutura e Síntese

A palavra lectina, tem sua origem do latim *lectus*, que significa selecionar. O termo lectina é aplicado para todas as proteínas que sejam capazes de se ligar a carboidratos como monossacarídeos, oligossacarídeos e glicoconjugados específicos (LAM; NG, 2011), de forma seletiva e reversível. Essas ligações se dão normalmente através de pontes de hidrogênio e/ou interações de Van der Waals (LIS; SHARON, 1998; FREIRE, 2015).

Quanto à especificidade da ligação das lectinas a carboidratos, são observadas interações principalmente com os seguintes grupos: galactose/*N*-acetilgalactosamina, manose/glicose, fucose, ácido siálico e *N*-acetilglicosamina (OLIVEIRA, 2018). Por exemplo, a lectina Concanavalina A (ConA) é capaz de reconhecer especificamente resíduos de manose e glicose (TENÓRIO *et al.*, 2015). Já a *Cratylia mollis*, ou mais especificamente sua isoforma Cramoll 1,4, se liga a resíduos de glicose/manose e galactose (PAIVA; COELHO, 1992). Enquanto a lectina *Ulex europaeus agglutinin-I* (UEA-I) se liga especificamente a resíduos de fucose (OKAZAKI *et al.*, 2004).

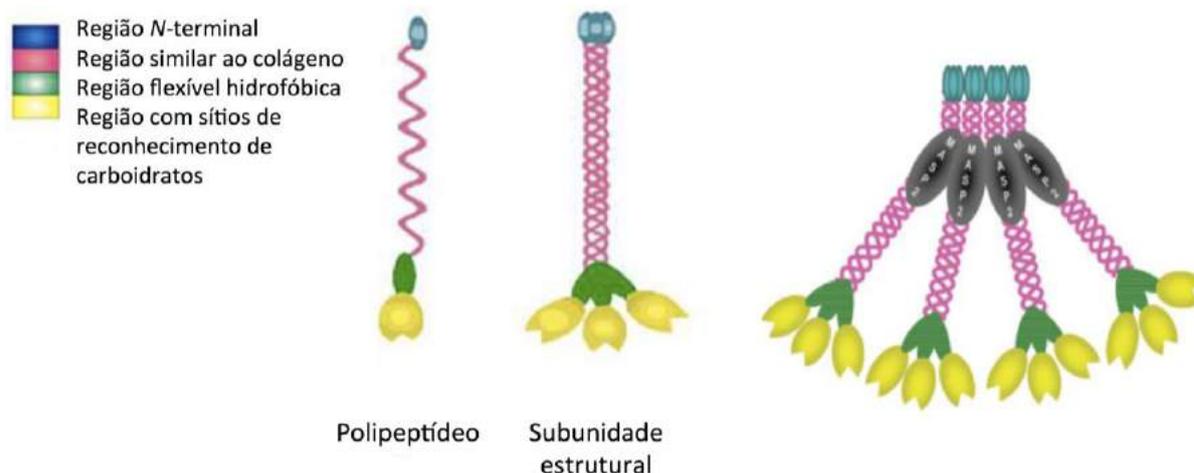
As lectinas estão presentes em animais, plantas e microrganismos e estão envolvidas em diversas funções biológicas, incluindo até mesmo a defesa contra patógenos (VARKI *et al.*, 2009). Assim, as lectinas são potencialmente úteis em aplicações biotecnológicas e biomédicas e podem ser utilizadas para a compreensão de processos biológicos, desenvolvimento de testes de diagnóstico e, também, na terapia de doenças (YAU *et al.*, 2015; ZUBCEVIC *et al.*, 2016; CUNHA *et al.*, 2018).

A lectina ligadora de manose (MBL) é uma glicoproteína sérica pertencente à família de proteínas denominadas de colectinas. É uma proteína sintetizada principalmente no fígado e secretada pelo hepatócito (DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006). No entanto, essa proteína pode ser sintetizada também em outros órgãos, tais como cérebro, baço, rins e coração (DUMESTRE-PERARD *et al.*, 2002).

A unidade estrutural primária da MBL é uma molécula helicoidal de 96 kDa, formada por três subunidades de cadeias polipeptídicas com uma região semelhante ao colágeno de 32 kDa (JACK; KLEIN; TURNER, 2001). Cada uma dessas cadeias é caracterizada por: a) uma região *N*-terminal com ligações cruzadas contendo duas ou três moléculas de cisteína; b) uma região colagenosa de comprimento variável; c) uma região flexível hidrofóbica e d) uma região C-terminal ou domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC) (Figura 1) (TAYLOR *et al.*, 1989; PETERSEN; THIEL; JESENIUS, 2001).

As cadeias polipeptídicas interagem através de suas regiões colagenosas formando uma tripla hélice, sendo que a estabilização da subunidade de três cadeias depende de interações hidrofóbicas na região hidrofóbica flexível, que está covalentemente ligada por pontes dissulfeto. A região hidrofóbica de cada cadeia adota uma forma espiralizada em α -hélice e os DRC apresentam características semelhantes a proteínas globulares (TURNER, 2003).

Figura 1. Representação de um tetrâmero de MBL formado por suas subunidades estruturais.

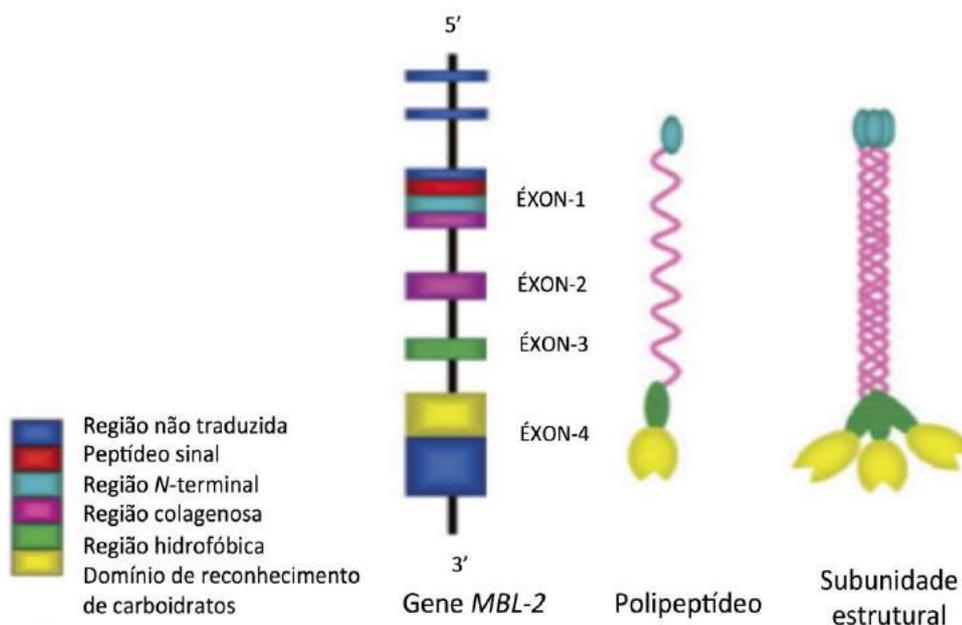


Fonte: Adaptada de DOMMET; KLEIN; TURNER, 2006.

Em humanos, a MBL é codificada pelo gene *MBL-2*, que é constituído por quatro éxons, e o pseudogene *MBL-1*, e estes estão localizados no braço longo do cromossomo 10 (HANSEN; HOLMSLOV, 1998; GARRED *et al.*, 2006). Os éxons do gene *MBL-2* codificam as diferentes estruturas da glicoproteína, onde o éxon-1 codifica a região *N*-terminal rica em cisteína e uma parte da região colagenosa rica

em glicina, enquanto o éxon-2 codifica a porção restante da região de colágeno, o éxon-3 codifica a região hidrofóbica flexível e finalmente, o éxon-4 que codifica o DRC (Figura 2) (TURNER 2003; DOMMET; KLEIN; TURNER, 2006).

Figura 2. Estrutura do gene *MBL-2*, e os diferentes éxons que codificam as diferentes regiões do produto proteico.



Fonte: Adaptada de DOMMET; KLEIN; TURNER, 2006.

Dessa forma, a MBL possui um arranjo estrutural no qual a associação de duas a seis unidades oligoméricas formam uma estrutura que lembra um “ramo de tulipas” (Figura 1), semelhante ao componente C1q do complemento. O padrão de reconhecimento da MBL é definido através da sua conformação espacial e do sentido de orientação de seu DRC, determinando o tipo de ligante da proteína (TURNER, 2003). Esta lectina pode reconhecer uma grande variedade de açúcares, tais como manose, *N*-acetil-D-glicosamina, L-fucose, glicose e, menos efetivamente, à galactose, expressos em grande quantidade na superfície de sistemas biológicos, como microrganismos e células apoptóticas, mediando assim a fagocitose e a ativação do complemento (TURNER, 1996; ATKINSON; EISEN, 2005).

Assim como as outras colectinas, a MBL mostra ligação seletiva a carboidratos, sendo mais efetiva na presença de cálcio. Essa seletividade ocorre devido a presença de resíduos de aminoácidos altamente conservados nas alças

peptídicas externas dos DRCs que fazem ligações coordenadas com o íon cálcio, que é capaz de orientar e facilitar a ligação da MBL preferencialmente com os grupos 3 e 4-hidroxila de resíduos de carboidratos que são reconhecidos pela lectina (EDDIE IP *et al.*, 2009; TURNER, 2003).

2.1.2 - Funções

A MBL é uma lectina que apresenta importante função, principalmente na imunidade inata em humanos, reconhecendo e se ligando às superfícies de patógenos. Existem evidências de que o papel da MBL se estende além do reconhecimento de patógenos, cooperando com outras moléculas do sistema imune e hoje seu papel é reconhecido em diversos processos biológicos, tais como ativação do complemento, promoção da opsonização independente do complemento, exerce influência também na modulação da resposta inflamatória, estimulando a liberação de citocinas, o que sugere um papel mais amplo para MBL na imunidade e inflamação (TAKAHASHI *et al.*, 2006), além do reconhecimento de alterações de autoestruturas e depuração de células apoptóticas (DOMMET; KLEIN; TURNER, 2006). Como estão descritas mais detalhadamente abaixo:

- MBL e o Sistema Complemento (SC)

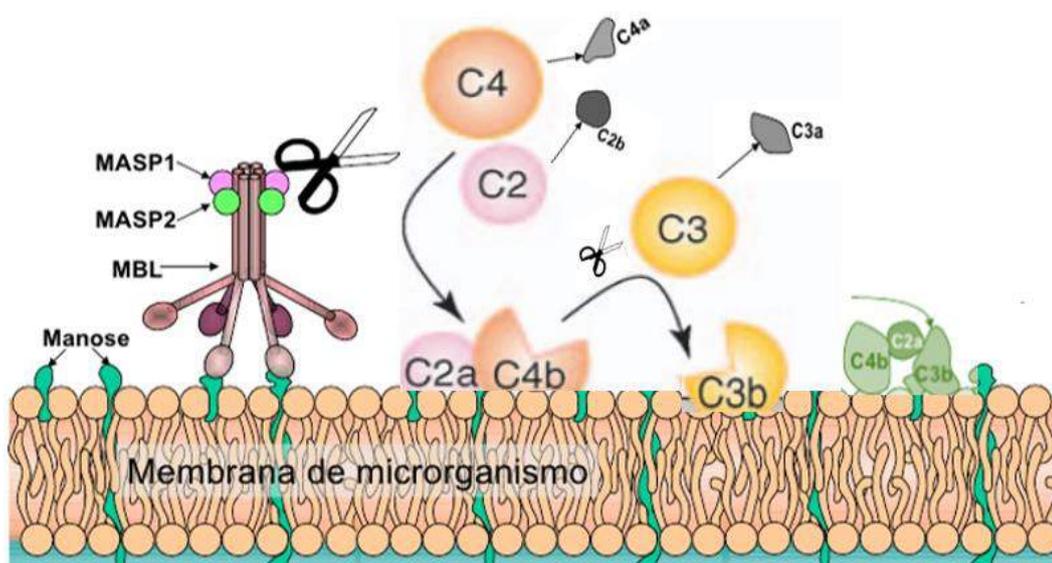
A imunidade inata envolve um conjunto de moléculas capazes de identificar padrões moleculares associados à superfície de patógenos (PAMPs), distinguindo-os de autoantígenos. A MBL é considerada uma molécula de reconhecimento desses padrões, onde participa da cascata do SC e, assim, desempenha um papel importante no sistema imune, ligando-se seletivamente a uma ampla gama de carboidratos expressos na superfície de agentes patogênicos microbianos.

O SC é representado por um grupo de proteínas que desempenham um papel chave no processo de defesa do hospedeiro. É um complexo sistema multiproteico, composto por mais de 30 proteínas presentes no plasma, em outros líquidos biológicos e na membrana celular, sendo um dos mecanismos mais importantes da resposta imune inata e o principal mediador humoral do processo inflamatório junto aos anticorpos (HESS; STEIGER; SCHIFFERLI, 1998).

A ativação do SC mediada pela MBL representa a “terceira via de ativação”, conhecida como “via das lectinas”. A MBL reconhece padrões de açúcares e ativa o complexo de serino proteases associadas à MBL (MASP) 1 e 2. A formação do

complexo e a ativação das MASPs resulta na subsequente clivagem de C4 em C4a e C4b, e de C2 em C2a e C2b. A porção C2a liga à membrana em associação com C4b, resultando na C3 convertase, que cliva C3 em C3a e C3b. O complexo C4bC2aC3b resultante é a C5 convertase, do qual a partir daí segue a via comum, como ilustrado na Figura 3 (FEINBERG *et al.*, 2003; SEYFARTH; GARRED; MADSEN, 2006).

Figura 3. Representação esquemática da via das lectinas do sistema complemento.



Fonte: Adaptada de TAKAHASHI *et al.*, 2006.

- Modulação da inflamação

Existem estudos referentes às doenças associadas à MBL que indicam que a MBL pode ser um potente regulador das vias inflamatórias, mesmo que ainda não se saiba ao certo por qual mecanismo poderia ocorrer essa modulação. Jack e colaboradores (2011) sugerem que a MBL é capaz de liberar citocinas pró-inflamatórias, por meio de observações utilizando *Neisseria meningitidis*, em que foi observado que a MBL presente em altas concentrações diminuía consideravelmente a produção das citocinas IL-6, IL-1 β e TNF- α por monócitos em resposta a esse patógeno, enquanto que em baixas concentrações de MBL a produção dessas citocinas haveriam aumentado, apontando para a MBL como um potente regulador da via inflamatória (JACK; KLEIN; TURNER, 2001).

- Remoção de células apoptóticas

Outras evidências também sugerem a atuação da MBL no reconhecimento de padrões moleculares associados a células apoptóticas (ACAMPs), os quais não são expostos em células saudáveis, e promove a remoção de detritos pelos macrófagos, observando-se que a MBL desencadeia a fagocitose ligando-se diretamente a células apoptóticas que expõem açúcares terminais (OGDEN *et al.*, 2001; VANDIVIER *et al.*, 2002; STUART *et al.*, 2005). Esse processo parece ocorrer na presença de calreticulina na superfície da célula (cC1qR), que se liga ao domínio de colágeno da MBL (TURNER 2003).

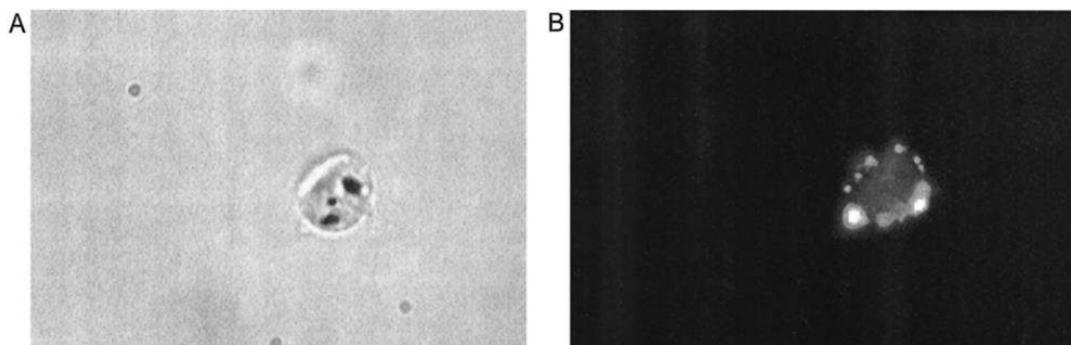
- Promoção da opsonização independente do complemento

A promoção da opsonização pela MBL tem sido associada à ligação a vários receptores putativos ou proteínas de ligação a MBL incluindo cC1qR/calreticulina (MALHOTRA *et al.*, 1990), C1qRp (TENNER; ROBINSON; EZEKOWITZ, 1995) e CR1 (GHIRAN *et al.*, 2000; KLICKSTEIN *et al.*, 1997). No entanto ainda não se sabe ao certo se a MBL atua com papel direto de opsonina ou se pode ser apenas um componente intensificador de outras vias do complemento e/ou da fagocitose mediada por anticorpos (TURNER, 2003).

Devido à sua alta avidéz funcional, a MBL é capaz de se ligar simultaneamente a múltiplos sítios, então realiza, por exemplo, um acoplamento significativo quando se liga a uma superfície microbiana com muitos grupos repetitivos de açúcar. Além disso, a distância entre os locais de ligação maximiza a interação (TURNER, 1996). A MBL tem a capacidade de se ligar com alta afinidade a uma variedade de agentes patogênicos pelo seu domínio DCR que inclui vírus, bactérias, fungos e protozoários, tais como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* do grupo β -hemolítico (NETH *et al.*, 2001).

Além disso, alguns estudos indicam que pode ocorrer a interação da MBL com células não apoptóticas de mamíferos, tais como eritrócitos circulantes. Já foi reportado que eritrócitos falcêmicos infectados pelo *Plasmodium falciparum*, um dos agentes causadores da malária, são reconhecidos pela MBL, assim como ilustra a Figura 4 (GARRED *et al.*, 2003).

Figura 4. A) Imagem de microscopia de campo claro de eritrócito infectado por *P. falciparum*. B) Microscopia de imunofluorescência de hemácias marcadas com brometo de etídio evidenciando a ligação da MBL a eritrócitos infectados.



Fonte: Adaptada de GARRED *et al.*, 2003.

Adicionalmente, a MBL pode também interagir com células que sofreram mudanças em sua superfície durante a transformação oncogênica ou durante infecções patogênicas, por exemplo, quando apresentam estruturas de oligossacarídeos modificadas que promovem o reconhecimento por essa lectina (EZEKOWITZ *et al.*, 1989).

2.1.3 - Deficiência da MBL

Devido à sua capacidade de realizar interações com outras células, a importância biológica da MBL também tem sido atribuída ao seu estado de deficiência. Variantes alélicas tanto da região promotora quanto da região estrutural do gene que codifica a MBL (*MBL-2*), são importantes reguladores da constituição de suas unidades estruturais funcionais e dos seus níveis séricos. A presença de variações pontuais na região estrutural do éxon-1 do gene *MBL-2* resulta na síntese de proteínas instáveis, as quais são facilmente degradadas, levando a um tempo de vida muito curto dessa proteína e, conseqüentemente, a uma diminuição dos seus níveis séricos. Além disso, a presença de polimorfismos na região promotora pode interferir na transcrição do gene *MBL-2*, acarretando a deficiência de expressão da proteína funcional e na diminuição dos níveis séricos da MBL (STEFFENSEN, 2000; TURNER, 2003). Uma vez que, em muitas populações humanas, a deficiência de MBL é relativamente comum (KILPATRICK, 2002), alguns estudos tentam vincular o seu estado de deficiência com apresentações clínicas. Essas alterações já foram associadas, por exemplo ao aumento da susceptibilidade a infecções, especialmente em crianças entre 6 e 18 meses de idade (SUMMERFIELD *et al.*, 1997; KOCH *et al.*,

2001), bem como em pacientes imunossuprimidos (GARRED *et al.*, 1997) e pessoas com doenças autoimunes (TSUTSUMI; TAKAHASHI; SUMIDA, 2005). Mendonça e colaboradores, por exemplo, sugeriram que alterações estruturais encontradas no éxon-1 e baixos níveis séricos da MBL poderiam modificar o fenótipo de crianças portadoras da anemia falciforme. Os autores demonstraram que em pacientes com deficiência de MBL poderia haver um aumento do surgimento de episódios vaso-oclusivos, a partir do acúmulo de eritrócitos nas paredes dos capilares, pela deficiência adicional no sistema fagocítico desses pacientes (MENDONÇA *et al.*, 2010).

2.2 - Pontos Quânticos

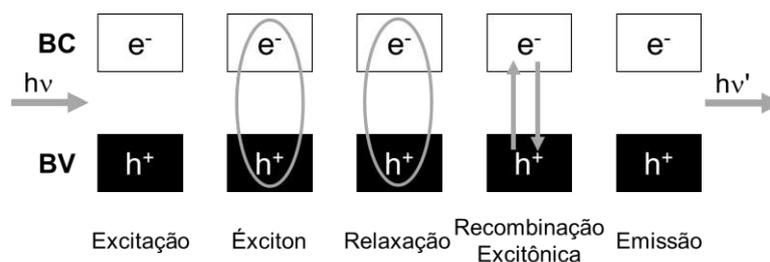
A nanotecnologia é o campo da ciência que desenvolve e aplica estruturas nanométricas e está em rápida expansão nos últimos anos. Está associada ao “entendimento, controle e reestruturação da matéria”, cujos tamanhos devem estar compreendidos aproximadamente entre 1 e 100 nm, em pelo menos uma de suas dimensões (BHUSHAN, 2017). Ferramentas projetadas na nanoescala têm sido extensivamente estudadas nos últimos anos e vêm permitindo o desenvolvimento de estratégias vantajosas no campo das biociências (KRISHNA *et al.*, 2018).

Pontos Quânticos (PQs), também conhecidos como *quantum dots* (QDs), são nanocristais coloidais fluorescentes de materiais semicondutores, que apresentam tipicamente diâmetros entre 1,5 a 10 nm ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). O tamanho reduzido faz com que essas nanoestruturas apresentem propriedades fotofísicas únicas, que estão ausentes quando organizados em estruturas macroscópicas (BHUSHAN, 2017).

Os materiais semicondutores possuem uma banda de valência (BV) e uma banda de condução (BC). Ao absorver energia suficiente, os elétrons e^- são capazes de transpor o intervalo existente entre essas duas bandas, chamado *band gap* (E_g), saindo da BV para a BC (SMITH; GAO; NIE, 2004). Ao realizar essa migração para a BC, o elétron deixa um buraco/*hole* (h^+) na BV onde se encontrava anteriormente, formando um par elétron-buraco, ao qual dá-se o nome de éxciton (SMITH; GAO; NIE, 2004; MICHALET; BENTOLILA; WEISS, 2008). A distância existente entre e^- e h^+ foi denominada como raio de Bohr do éxciton (a_{exc}) e é específica de cada semicondutor. A emissão de fótons (fluorescência) acontece quando e^- e h^+ sofrem

recombinação excitônica, em que o e^- relaxa ao seu estado energético fundamental e retorna à BV (Figura 5) (MICHALET; BENTOLILA; WEISS, 2008).

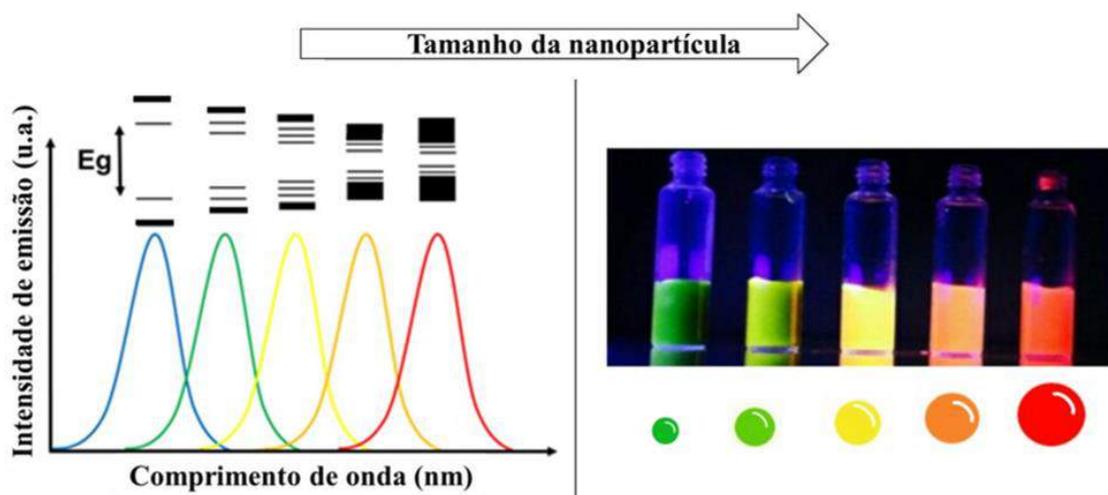
Figura 5. Esquema de fotoluminescência em semicondutores. Quando o elétron (e^-) é excitado, um éxciton é formado a partir do transporte do e^- para a banda de condução (BC). Após relaxação e recombinação excitônica, é gerada a emissão de fluorescência.



Fonte: Adaptada de PEREIRA, 2014.

A distribuição dos estados energéticos nas bandas é contínua em um semicondutor macroscópico, porém, ao diminuir as dimensões de um cristal para além do raio de Bohr do éxciton, e^- e h^+ são forçados a estar mais próximos, e os estados energéticos ajustados. O efeito de confinamento quântico se intensifica à medida que cada dimensão do cristal se torna menor que a_{exc} , dessa forma, quando as três dimensões são menores que a_{exc} , têm-se um ponto quântico (GAO; NIE, 2004; CHOU; DENNIS, 2015).

Figura 6. Sintonização da emissão dos PQs com o seu tamanho, maior o E_g : emissão para região mais próxima do azul e menor E_g : emissão para a região mais próxima do infravermelho.

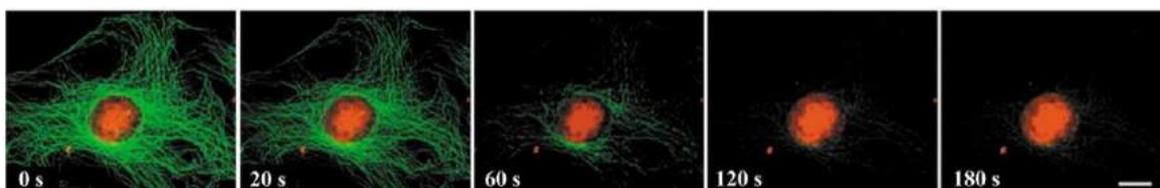


Fonte: Adaptada de CESAR, 2014.

Esse confinamento espacial em nanoescala dos PQs produz modificação da estrutura eletrônica e, como consequência, o E_g aumenta com a diminuição do tamanho da partícula. Dessa forma, para PQs de um mesmo material semiconductor, nanopartículas menores emitem radiação eletromagnética com maior energia e vice-versa para PQs de tamanhos maiores. Uma vez que o comprimento de onda da luz é inversamente proporcional a sua energia, PQs menores terão fluorescência indo para região azul e os maiores para o vermelho (Figura 6) (SANTOS; FARIAS; FONTES, 2008).

Os PQs apresentam propriedades ópticas vantajosas quando comparados às sondas convencionais, os marcadores fluorescentes orgânicos (corantes orgânicos), que são comumente utilizados como marcadores biológicos. Suas propriedades se destacam devido ao seu estreito espectro de emissão e amplo espectro de absorção (SANTOS; FARIAS; FONTES, 2008). Ao contrário dos corantes orgânicos, que exigem mais de uma fonte de luz de excitação, a fluorescência dos nanocristais é capaz de ser excitada por uma única fonte luminosa, que pode emitir em diferentes regiões do espectro e que, portanto, confere ao tamanho dessas nanopartículas mais uma vantagem, uma vez que, a emissão de luz pelos PQs pode ser sintonizada conforme o seu tamanho (WU *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2010). Além disso, os PQs se destacam, principalmente, pelo seu alto brilho e sua fotoestabilidade, em que são cerca de 100 vezes mais fotoestáveis que os corantes orgânicos, possibilitando ensaios praticamente em tempo real e permitindo o monitoramento de processos dinâmicos ao longo do tempo (Figura 7). Os PQs também possuem superfície altamente ativa, que possibilita sua conjugação a biomoléculas e até mesmo outras nanopartículas (SMITH *et al.*, 2008; MUKHERJEE; SHIM; SONG, 2016).

Figura 7. Registro da emissão fluorescente de PQs (em vermelho) e o corante orgânico Alexa flúor (em verde) ao longo de 3 min. O núcleo, marcado com PQs, continua fluorescente ao longo de todo o teste, ao passo que o citoesqueleto, marcado com o corante orgânico, já não pode ser devidamente observado em torno de 60 s após o início do ensaio.



Fonte: Adaptada de WU *et al.*, 2003.

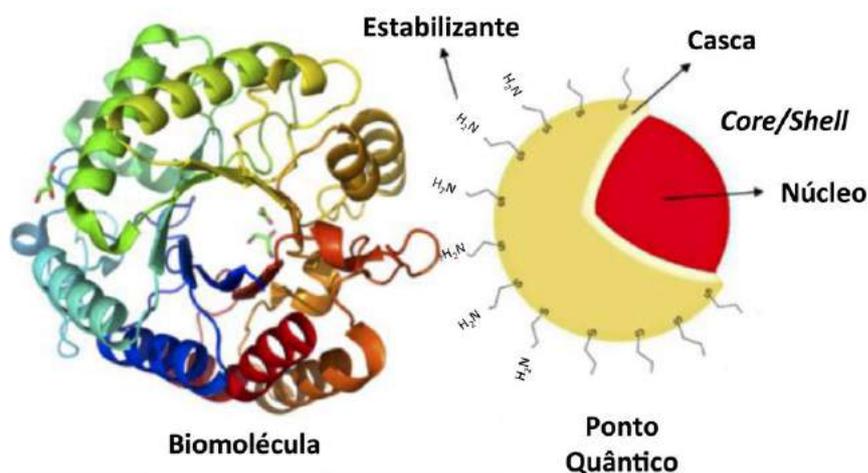
Devido a essas propriedades únicas, como emissão regulável por tamanho, alta fotoestabilidade e superfície quimicamente ativa, PQs se tornaram uma ótima alternativa para diversas aplicações em muitos campos de pesquisa, como física, química e biologia (ALGAR *et al.*, 2011; BAGHER, 2016). Como por exemplo, aplicações tecnológicas relacionadas a dispositivos fotovoltaicos, eletrônicos, e biomédicos, vêm cada vez mais sendo utilizadas e empregadas como uma ferramenta versátil e eficiente, propiciando muitos avanços (SILVA *et al.*, 2010; DONG *et al.*, 2012; KRISHNA *et al.*, 2018).

Os PQs utilizados para aplicações biológicas podem ser preparados a partir de uma síntese aquosa, obtidos pela estratégia *bottom-up*, a qual se realiza partindo-se de átomos para se chegar a sistemas maiores como as nanopartículas e, que podem ser obtidos a partir do controle de parâmetros, tais como tempo de reação e quantidade de precursores, onde utiliza-se em geral soluções contendo calcogenetos, cations metálicos e agentes estabilizantes (MURRAY; NORRIS; BAWENDI *et al.*, 1993; FONTES *et al.*, 2012). A síntese aquosa dos nanocristais é de grande interesse, pois, é reprodutível, de baixo custo e hidrofílica (LI *et al.*, 2004; PILLA *et al.*, 2012). São, frequentemente, utilizados em sua síntese compostos que contém elementos como o cádmio (Cd), selênio (Se), enxofre (S), zinco (Zn) e telúrio (Te), em conjunto com ligantes orgânicos (estabilizantes/funcionalizantes) que geralmente possuem um grupamento tiol e carboxílico ou tiol e amina em sua extremidade (CESAR, 2014; SILVA *et al.*, 2010; CUNHA *et al.*, 2018).

Após a síntese os PQs apresentam uma nanoestrutura complexa composta de algumas camadas (Figura 8), onde: o núcleo da nanopartícula determina sua emissão. Devido à grande área superficial que essas nanopartículas possuem por causa do seu tamanho reduzido, os defeitos de superfície gerados têm um papel mais significativo, contribuindo para a diminuição da intensidade, ou até mesmo supressão, da fluorescência. Esses defeitos surgem de átomos com ligações não compartilhadas devido à interrupção do crescimento do nanocristal (SILVA *et al.*, 2010). Para diminuir esses defeitos pode ser usado o revestimento com uma segunda camada semicondutora para passivar a superfície, refazendo ligações não compartilhadas, e assim favorecer uma recombinação excitônica mais eficiente, aperfeiçoando a sua emissão, o que origina PQs com uma estrutura de núcleo/casca (*core/shell*) (Figura 8), como CdSe/ZnS por exemplo (TALAPIN *et al.*, 2002;

WEGNER; HILDEBRANDT, 2015). Por fim, a camada orgânica mais externa determina o grau de funcionalidade em relação à marcação do sistema biológico de interesse (MICHALET *et al.*, 2005).

Figura 8. Estrutura do *core/shell* de um PQ bioconjugado à biomolécula.



Fonte: Adaptado de PEREIRA *et al.*, 2019.

Nos PQs hidrofílicos essa camada orgânica mais externa tem funções de: (i) ajudar na estabilidade coloidal, prevenindo a aglomeração e a precipitação dos nanocristais (SANTOS; FARIAS; FONTES, 2008; FONTES *et al.*, 2012), (ii) conferir carga para a superfície, (iii) contribuir para a formação do *shell* e conferir grupos funcionais e (iv) servir como ponto de ancoragem para melhor conjugação com biomoléculas ou até mesmo com outras nanopartículas (MARTINS; TRINDADE, 2012; KARAKOTI *et al.*, 2015), propiciando aplicações *in vitro* e *in vivo* com essas nanopartículas (FONTES *et al.*, 2012; ANDRADE *et al.*, 2013; HAN *et al.*, 2015; WEGNER; HILDEBRANDT, 2015; CABRAL FILHO *et al.*, 2016; TRAPIELLA-ALFONSO *et al.*, 2018). Dentre os agentes estabilizantes mais utilizados, destacam-se os compostos catiônicos em pH próximo ao fisiológico que possuem grupos amina (cisteamina), aniônicos que possuem grupos carboxila (ácido mercaptopropiônico, AMP; ácido mercaptoacético, AMA; e ácido mercaptosuccínico, AMS) e neutros que possuem grupos amina e carboxila (cisteína) (MAMEDOVA *et al.*, 2001; ÅKERMAN *et al.*, 2002).

2.3 - PQs e Bioconjugação

A superfície dos PQs oferece a possibilidade de ligação a diferentes moléculas, tais como anticorpos, enzimas e lectinas que vão dar um direcionamento

biológico mais específico ou agregar novas funções e propriedades para a aplicação biológica (MARTINS; TRINDADE, 2012; ANDRADE *et al.*, 2013; WEGNER; HILDEBRANDT, 2015).

Assim, os PQs vêm sendo aplicados desde ensaios bioanalíticos; imageamento *in vitro* de células a tecidos; imageamento *in vivo* de pequenos animais; diagnóstico de câncer e outras doenças, e, até mesmo em biossensores (SMITH *et al.*, 2004; MEDINTZ *et al.*, 2005; FONTES *et al.*, 2012; ANDRADE *et al.*, 2013; WEGNER; HILDEBRANDT, 2015).

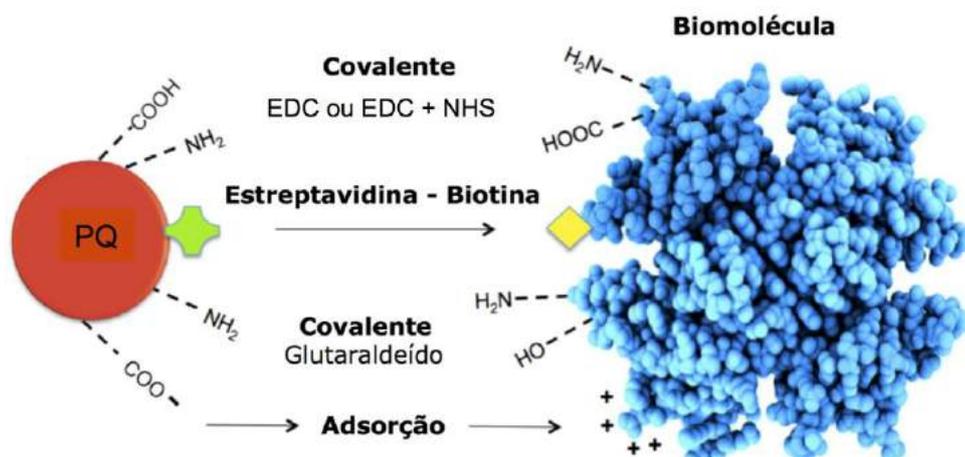
Segundo Bilan e colaboradores (2015), as várias estratégias existentes para a conjugação dos PQs com biomoléculas, por exemplo, devem satisfazer alguns importantes requisitos como a manutenção da propriedade fluorescente dos PQs após essa união e uma mínima interferência na atividade da biomolécula após o processo de bioconjugação. Os conjugados formados devem também ser estáveis nas condições de aplicação (BILAN *et al.*, 2015).

A conjugação depende dos grupos reativos presentes na superfície dos PQs e biomoléculas. Dentre as diferentes estratégias desenvolvidas, há dois tipos de abordagens principais: ligação não covalente e ligação covalente. Na ligação covalente, os grupos funcionais da superfície dos PQs estão covalentemente ligados à biomolécula formando, por exemplo, uma ligação entre grupos amina-amina, carboxil-amina ou pontes dissulfeto (SARAN *et al.*, 2011; HERMANSON, 2013; CABRAL FILHO *et al.*, 2015; FOUBERT *et al.*, 2016). A ligação amina-amina pode ser realizada utilizando o glutaraldeído como agente intermediário e, na conjugação covalente carboxil-amina os agentes de acoplamento 1-etil-3-(3-dimetilaminopril) carbodiimida (EDC) e *N*-hidroxisulfosuccinamida (Sulfo-NHS) ou *N*-hidroxisuccinimida (NHS) são amplamente utilizados como agentes de acoplamento (HERMANSON, 2013; KARAKOTI *et al.*, 2015).

Já as ligações não covalentes compreendem as interações entre grupos terminais expostos na superfície do PQ e das biomoléculas, sem a necessidade de um agente químico que intermedie a união, essas interações envolvem ligação direta na superfície dos PQs ou adsorção (DELEHANTY *et al.*, 2012; KARAKOTI *et al.*, 2015). Interações diretas podem envolver a associação de moléculas tioladas com os metais da superfície, por exemplo. Já a adsorção pode em geral envolver interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e/ou interações eletrostáticas. A

ligação não covalente pode se dar também por meio da afinidade da biotina por PQs funcionalizados com estreptavidina ou avidina. A Figura 9 faz um sumário dessas estratégias de conjugação (HERMANSON, 2013; FOUBERT *et al.*, 2016; KARAKOTI *et al.*, 2015).

Figura 9. Representação dos grupos reativos presentes na superfície dos PQs e estratégias de ligação a proteínas.



Fonte: Adaptada de CUNHA *et al.*, 2018.

Apesar das diversas estratégias para se realizar bioconjugações, esse ainda pode ser um processo desafiador. Para se ter sucesso nas diversas aplicações é fundamental o preparo de bioconjugados eficientes e estáveis. Para tanto, é importante a utilização de alguns métodos para otimizar o desempenho, caracterizar e avaliar a eficiência do processo de conjugação. Dentre os métodos utilizados, pode-se citar:

- (i) a espectroscopia de correlação de fluorescência (FCS), que fornece informações relacionadas a modificações no tamanho hidrodinâmico e tempo de difusão de nanoestruturas fluorescentes antes e após a conjugação (CABRAL FILHO *et al.*, 2015);
- (ii) o ensaio de fluorescência em microplacas (EFM), que tem a vantagem de oferecer uma análise prática, quantitativa e rápida de várias amostras ao mesmo tempo (CARVALHO *et al.*, 2014) por meio da comparação dos sinais dos conjugados com os controles (PQs sozinhos e biomoléculas). Esse método indica uma boa conjugação quando o sinal fluorescente dos conjugados se destaca em relação ao sinal dos controles. Ele é baseado na afinidade das moléculas pela

microplaca fluorescente, na falta de afinidade pelos PQs e no baixo sinal fluorescente emitido pelas biomoléculas nas condições do experimento;

(iii) a eletroforese avalia a interação entre PQs e biomoléculas comparando a mobilidade eletroforética dos componentes sozinhos (biomoléculas e PQs) em relação aos conjugados (KIM *et al.*, 2018);

(iv) a avaliação do potencial zeta relacionado a modificações na carga da superfície das nanoestruturas antes e após a conjugação (CABRERA *et al.*, 2017);

(v) o DLS (do inglês *Dynamic Light Scattering*), também usado para determinar variações no diâmetro hidrodinâmico de nanopartículas antes e após a conjugação (IPE *et al.*, 2006).

Vale também ressaltar que, apesar do uso dessas técnicas de avaliação da conjugação, ainda é necessário realizar testes adicionais para evitar resultados falso-positivos ou falso-negativos, utilizando amostras de células e tecidos como controle ou ensaios de inibição e até de saturação, a fim de ter um entendimento mais confiável sobre o processo biológico estudado.

Além disso, dependendo do tipo de conjugação utilizada, também é necessário, antes da aplicação, bloquear os grupos funcionais ativados durante o processo de bioconjugação antes da aplicação biológica para evitar falsos-positivos (PEREIRA *et al.*, 2019).

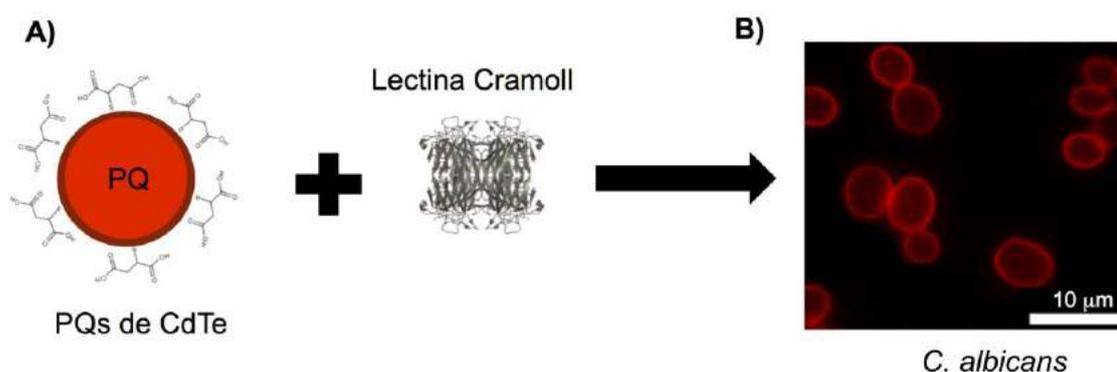
2.4 - Aplicação de Bioconjugados de PQs e Lectinas

A pesquisa relacionada às interações lectina-carboidrato é uma área promissora no ramo da biologia e da biomedicina (NILSSON, 2007; DAN; LIU; NG, 2016). O papel dessas biomoléculas, assim como suas interações nos sistemas biológicos, pode ser revelado e elucidado pelo uso de sondas fluorescentes. Bioconjugados contendo lectinas e PQs têm sido aplicados como ferramentas desde estudos relacionados a microorganismos, até aos associados ao câncer, promovendo a elucidação de muitos processos celulares patológicos (CUNHA *et al.*, 2018).

Tenório e colaboradores, por exemplo, padronizaram a conjugação de PQs de CdTe à ConA, que reconhece manose/glicose, utilizando *Candida albicans* como modelo. Os autores puderam estudar o perfil glicídico de manose e glicose nas leveduras e biofilme com esses conjugados (TENÓRIO *et al.*, 2015).

Cunha *et al.* 2018 avaliaram a melhor estratégia para conjugar a lectina Cramoll aos PQs de CdTe, estudando o método de adsorção e ligação covalente da biomolécula à nanopartícula em diferentes pHs. A partir de análises por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo, padronizaram como eficaz o conjugado obtido por adsorção a pH 7,0, pela melhor eficiência na marcação de leveduras de *C. albicans*, como ilustra a Figura 10 e, também, por confirmação da especificidade pelos resultados de ensaios de inibição. O estudo concluiu que bioconjugados efetivos e específicos foram obtidos com potencial para serem aplicados no estudo do perfil de glicose e manose em variados sistemas biológicos (CUNHA *et al.*, 2018).

Figura 10. (A) Representação esquemática da conjugação por adsorção de PQs de CdTe à lectina Cramoll. (B) Imagem de microscopia de fluorescência de leveduras de *C. albicans* marcadas com bioconjugado PQ-Cramoll (pH 7,0).



Fonte: Adaptada de CUNHA *et al.*, 2018.

Jeong e colaboradores (2012) desenvolveram bioconjugados de PQs e lectinas (ConA, SBA – aglutinina da soja (específica para *N*-acetilgalactosamina), SNA – lectina *Sambucus nigra* (reconhece ácido siálico) e WGA – aglutinina de gérmen de trigo (reconhece *N*-acetilglicosamina), por uma ligação biotina-estreptavidina, como nanossondas para avaliar o perfil de glicanos expressos na superfície de células e tecidos de câncer. Os conjugados apresentaram-se altamente fluorescentes e estáveis, exibindo alta sensibilidade na análise da expressão de carboidratos. Nas linhagens de células e tecidos da mama (MCF-7) e do cólon colorretal (HCT116), por exemplo, uma alta expressão de *N*-acetilglicosamina e ácido siálico foi encontrada em relação às amostras normais. O reconhecimento específico foi confirmado a partir dos testes de inibição utilizando os açúcares reconhecidos pelas lectinas. Portanto, o método se mostrou útil, com

possível potencial para o diagnóstico e compreensão de processos biológicos associados ao câncer (JEONG *et al.*, 2012).

Carvalho e co-autores (2019) utilizaram os conjugados PQs de CdTe e Cramoll para estudar a glicobiologia de tecidos mamários humanos normais, de fibroadenoma (FB) e carcinoma ductal infiltrante (CDI). Os autores demonstraram, a partir das análises de microscopia, uma intensa marcação em todo o tecido de CDI (células ductais e estroma), observando que este apresenta um alto nível de resíduos de glicose/manose expostos em sua superfície, enquanto as amostras normais e FB tinham marcação considerável apenas nas células ductais. Esses resultados foram confirmados de forma quantitativa por uma adaptação do ensaio de fluorescência em microplaca para tecidos, proposta pelos autores. Uma vez que a lectina teve sua atividade preservada, os autores concluíram que os conjugados PQs-Cramoll podem ser considerados sondas específicas e eficazes, que podem ser aplicadas para investigar e diferenciar a glicobiologia de tecidos normais e transformados (CARVALHO *et al.*, 2019).

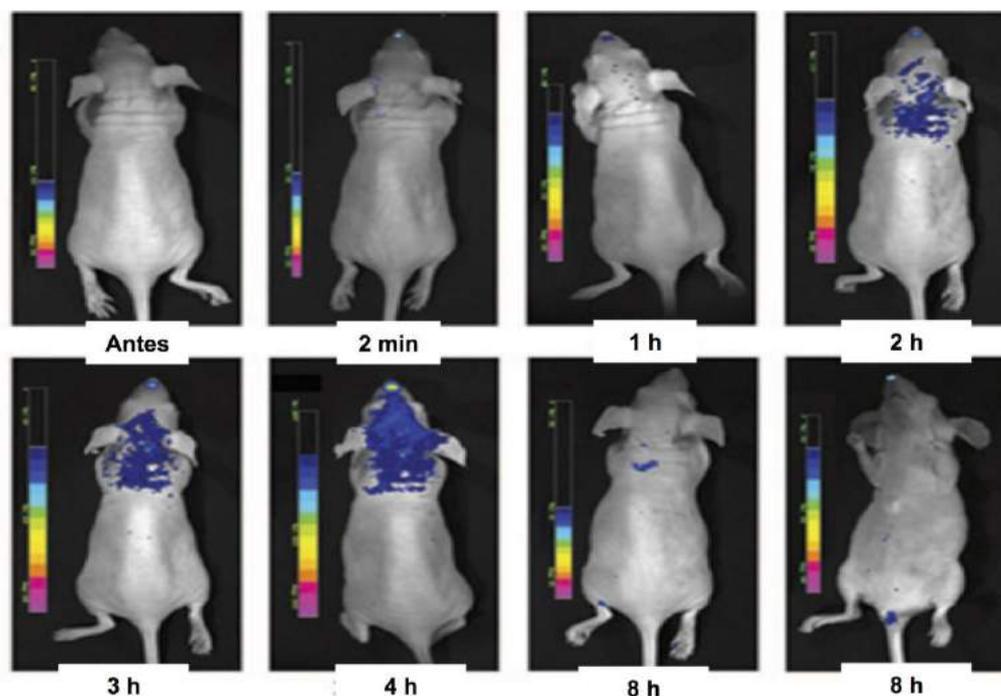
Além disso, Oliveira e colaboradores (2020) também utilizaram os conjugados de PQs de CdTe e lectina Cramoll para avaliação de perfis de glicose/manose em três diferentes espécies de *Candida*: *C. glabrata*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Os autores observaram que *C. parapsilosis* apresentou maior quantidade de glicose/manose exposta em sua superfície. Dessa forma, os autores concluíram que os conjugados PQs-Cramoll demonstraram ser eficazes para avaliação da constituição e comparação dos glicídios presentes nas paredes celulares de espécies de fungos frequentemente envolvidas na candidíase (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

PQs também têm sido também explorados na área de fenotipagem sanguínea. Cabral Filho e colaboradores (2015) aplicaram PQs de CdTe associados covalentemente à lectina UEA-I (também chamada de anti-H e que reconhece fucose) e a anticorpos monoclonais anti-A ou anti-B para quantificar a expressão dos antígenos A, B e H em eritrócitos, através da citometria de fluxo. A partir dos perfis de marcação, os autores puderam verificar que os bioconjugados foram capazes de distinguir e correlacionar as diferentes expressões dos antígenos eritrocitários em eritrócitos ABO e do sub-grupos A (A_1 , A_2 , A_3 , A_x e A_{el}). Além disso, os autores reportaram que os conjugados permaneceram fluorescentes e estáveis por pelo

menos 6 meses, concluindo que os mesmos podem ser aplicados na quantificação e entendimento do padrão de antígenos na superfície dos eritrócitos (CABRAL FILHO *et al.*, 2015).

Foram também desenvolvidos, no estudo de Gao e colaboradores, nanossistemas contendo PQs de CdSe/ZnS incorporados em nanopartículas poliméricas funcionalizadas com a lectina WGA como plataformas para obtenção de imagens cerebrais *in vivo*. Os conjugados foram inseridos no cérebro de ratos através da aplicação nasal para investigação de doenças do sistema nervoso central (SNC). As nanopartículas obtidas demonstraram ter excelente direcionamento cerebral com distribuição rápida e extensiva no SNC. Uma outra vantagem apresentada foi o tempo que o nanossistema permaneceu no cérebro, sendo suficiente para proporcionar um bom reconhecimento dos seus alvos e, após 8 horas da administração, a presença do nanossistema nos tecidos já era praticamente inexistente, como ilustrado na Figura 11. Sendo assim, os autores concluíram que a nanossonda apresenta potencial considerável para estudo de várias doenças do SNC (GAO *et al.*, 2008).

Figura 11. Distribuição e retenção de nanossistemas constituídos por PQs incorporados à nanopartículas poliméricas conjugados com WGA no cérebro de rato após administração intranasal. Imagens ópticas representativas tiradas antes, 2 min e 1, 2, 3, 4 e 8 h após a administração.



Fonte: GAO *et al.*, 2008.

Vemos assim, que conjugados de PQs e lectinas podem ser considerados ferramentas fluorescentes práticas e versáteis para estudar a glicobiologia não só em microorganismos, no câncer e em hematologia, mas em diversas áreas de pesquisa. A combinação das características fluorescentes dos PQs com a especificidade das lectinas, possibilita estudos cada vez mais sensíveis e específicos, abrindo novas possibilidades para várias aplicações biomédicas.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Desenvolver bioconjugados constituídos por pontos quânticos e Lectina Ligadora de Manose (MBL).

3.2 - Objetivos Específicos

- Sintetizar PQs de CdTe funcionalizados/estabilizados com ácido mercaptosuccínico (MSA);
- Avaliar procedimentos baseados em adsorção e conjugação covalente para estabelecer um protocolo eficiente de conjugação da MBL aos PQs;
- Realizar caracterização óptica dos PQs e do bioconjugado;
- Verificar a efetividade e especificidade do bioconjugado por meio de ensaios com leveduras de *Candida albicans* como modelo biológico.

**4 - MANUSCRITO A SER TRADUZIDO E SUBMETIDO PARA A REVISTA
*JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY - B***

**Lectina Ligadora de Manose Conjugada com Pontos Quânticos - Uma Nova
Plataforma Fluorescente para Glicobiologia**

Paloma M. M. Silva^{1,#}, Carinna N. Lima^{1,#}, Wesley Félix de Oliveira², Paulo E. Cabral Filho¹, Beate S. Santos³, Patrícia Moura⁴, Thomas Vorup-Jensen⁵, Adriana Fontes^{1,*}

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

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

³Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

⁴Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

⁵Biochemistry Department, Aarhus University, Aarhus, Denmark.

Contribuíram igualmente para esse trabalho.

*Corresponding Author: Adriana Fontes, Av. Prof. Moraes Rego, S/N. Departamento de Biofísica e Radiobiologia, CCB, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil - Phone: +55 81 21267818, e-mail: adriana.fontes@ufpe.br.

Resumo: Os pontos quânticos (PQs) têm se destacado na glicobiologia por sua fotoestabilidade e capacidade de se combinar a lectinas, originando conjugados versáteis para investigar perfis de expressão de carboidratos com alta sensibilidade/especificidade. A lectina ligadora de manose (MBL) é uma proteína do sistema imune inato que está envolvida em processos como ativação do sistema complemento, opsonização e eliminação de células apoptóticas e patógenos. No presente estudo, estratégias de adsorção (em diferentes pHs) e interação covalente (carboxil-amina) foram avaliadas para conjugar os PQs à uma MBL recombinante (rhMBL). O conjugado mais eficiente foi escolhido através da marcação de leveduras de *Candida albicans* avaliada por citometria de fluxo. Os resultados indicaram que o nanossistema obtido por adsorção em pH 6,0 foi o mais promissor, marcando praticamente 100% das células com a maior mediana de intensidade de fluorescência. Adicionalmente, o conjugado selecionado foi específico, revelando marcações de ca. 15,1, 13,8 e abaixo de 1% quando as leveduras foram incubadas, respectivamente: (i) após a inibição do sítio de reconhecimento de carboidrato (DRC) da MBL conjugada aos PQ com manose, (ii) sem a adição de cálcio e, (iii) na presença de EDTA. Pode-se concluir que foi desenvolvida uma ferramenta óptica promissora para elucidar os papéis da MBL em diversos processos biológicos.

Palavras-chaves: fluorescência, conjugação, nanossistema, carboidratos.

1 - INTRODUÇÃO

As lectinas são macromoléculas que reconhecem e se ligam a carboidratos associados a lipídios e proteínas [1]. A interação altamente específica entre carboidratos e lectinas permite controlar e mediar uma infinidade de processos biológicos, incluindo sinalização celular, reconhecimento molecular, imunidade e inflamação [2]. A integração das lectinas com nanoestruturas vem permitindo o desenvolvimento de nanoplataformas capazes de elucidar o complexo papel biológico dessas proteínas e dos carboidratos. Dentre essas nanoestruturas, destacam-se os pontos quânticos (PQs), especialmente por sua intensa fluorescência, alta fotoestabilidade e superfície quimicamente reativa para conjugação com biomoléculas [3].

Nanoferramentas constituídas por PQs associados a lectinas como a Concanavalina A (ConA), a Cramoll, a *Ulex europeaus I* (UEA-I), dentre outras, vêm sendo aplicadas com sucesso na investigação da glicobiologia relacionada processos normais e patológicos. Dentre muitas aplicações, esses nanoconjugados já foram aplicados, por exemplo, no estudo da distribuição de antígenos eritrocitários, do perfil de manose/glicose em tecidos de câncer e microorganismos e para a identificação de células de leucemia entre outros [4,5,6]. A adsorção e a interação covalente entre os grupos carboxil-amina estão entre as estratégias mais aplicadas para conjugar os PQs às lectinas [7,8]. Essa associação é desafiadora, pois é necessário manter as propriedades fluorescentes dos PQs e a função biológica das moléculas. A conjugação entre PQs e lectinas depende dos grupos funcionais mais reativos presentes nos compostos utilizados. Há lectinas que conjugam mais efetivamente por adsorção, como a ConA e a Cramoll, e há aquelas que se associam mais eficientemente por interação covalente, como a UEA-I [4].

A lectina ligadora de manose (*mannose-binding lectin* - MBL) é uma glicoproteína sérica, componente do sistema imune inato humano, capaz de se ligar a superfícies de microorganismos patogênicos através do seu domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC) [9]. A MBL pode reconhecer padrões de açúcares como manose, *N*-acetil-D-glicosamina, L-fucose, glicose e, menos efetivamente, galactose [10,11]. A MBL também apresenta características funcionais análogas à da C1q e atua na ativação do sistema complemento, opsonização,

regulação da inflamação e depuração de células apoptóticas [12], e vem sendo associada a processos infecciosos e inflamatórios.

Leikina e colaboradores, por exemplo, observaram a capacidade da MBL de bloquear a fusão viral do vírus da influenza através da imobilização de proteínas de membrana [13]. Larvie e colaboradores demonstraram que a MBL é capaz de se ligar a peptídeos beta-amiloide, cujo acúmulo no parênquima cerebral está relacionado com o desenvolvimento da doença de Alzheimer [14]. Já Garred e colaboradores reportaram que eritrócitos falciformes (HbSS) infectados pelo *Plasmodium falciparum* são reconhecidos pela MBL [15]. Além disso, Mendonça e colaboradores sugeriram que deficiência de MBL contribuiria para o surgimento de episódios vaso-oclusivos em pacientes acometidos dessa alteração genética [16]. Mais recentemente, Lima e colaboradores observaram que a MBL é capaz de interagir com eritrócitos saudáveis, sugerindo também que essa proteína pode estar desempenhando uma função moduladora de membrana nessas células [17].

Assim, o grande impacto que a MBL possui em diversos mecanismos biológicos, estimulou o desenvolvimento de uma nanossonda específica e eficiente composta por PQs carboxilados e MBL. Para tanto, foram avaliadas duas abordagens de conjugação, por adsorção, sob diferentes pHs, e por interação covalente. Na escolha do conjugado mais efetivo foram utilizadas leveduras de *Candida albicans* por ter parede celular rica em manose, um dos carboidratos reconhecidos pela MBL. Além disso, uma completa combinação de ensaios foi utilizada para certificar a especificidade do conjugado. Até onde vai nosso conhecimento, esse é o primeiro conjugado constituído por PQs e MBL proposto. Acreditamos que a nanoplataforma desenvolvida apresenta potencial para desvendar e agregar novas informações sobre o papel dessa lectina frente aos sistemas biológicos.

2 - METODOLOGIA

2.1 - Síntese e Caracterização Óptica dos PQs de CdTe

A síntese dos nanocristais de telureto de cádmio (CdTe) foi realizada de acordo com metodologia já bem estabelecida, proposta por Cabral Filho *et al.*, 2016 [18]. De forma resumida, inicialmente foi preparada uma solução de perclorato de

cádmio [$\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$] contendo MSA (ácido mercaptosuccínico) como agente estabilizante/funcionalizante, em água ultrapura a $\text{pH} > 10$, sob atmosfera inerte com nitrogênio (N_2). Simultaneamente, o telúrio metálico (Te^0) foi reduzido para Te^{2-} usando borohidreto de sódio (NaBH_4), sob atmosfera inerte (N_2) a $100\text{ }^\circ\text{C}$ e em $\text{pH} > 10$, utilizando NaOH (2 M). Posteriormente, a solução contendo íons Te^{2-} foi adicionada a de Cd^{2+} /MSA para a formação das nanopartículas. Em seguida, para o crescimento dos nanocristais, estes permaneceram sob agitação por 6 horas e aquecimento a $105\text{ }^\circ\text{C}$ para obter PQs com emissão no vermelho. A proporção molar usada nesta síntese foi de 5:1:6 (Cd:Te:MSA).

Após sintetizados, a caracterização óptica dos PQs foi realizada por espectroscopias de absorção, usando espectrofotômetro UV-Vis 1800 (Shimadzu), e emissão, realizadas em espectrofluorímetro (LS 55 – PerkinElmer). O espectro de fluorescência foi adquirido sob excitação (λ_{exc}) em 488 nm. O tamanho e a concentração dos PQs foram determinados usando o primeiro máximo de absorção, a lei de Lambert-Beer e o coeficiente de extinção para PQs de CdTe [19,20]. Todos os reagentes utilizados para a síntese foram adquiridos pela Sigma-Aldrich.

2.2 - Conjugação dos PQs à rhMBL e Caracterização Óptica

Para a conjugação foi utilizada uma MBL recombinante (rhMBL) adquirida da *Enzon Pharmaceuticals*. Os PQs de CdTe foram conjugados à rhMBL por meio de duas diferentes abordagens: (i) interação por adsorção entre os PQs e a rhMBL e (ii) ligação covalente, baseadas em metodologias previamente desenvolvidas, com algumas modificações [18,21,22].

Na conjugação por adsorção, foram testadas suspensões de PQs (1 mL) em diferentes pHs (4,5; 6,0 e 7,0), ajustados com MSA ($6,8\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Após o ajuste do pH de cada suspensão, a lectina rhMBL ($1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi adicionada às suspensões para uma concentração final de $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e, em seguida, os sistemas foram mantidos sob agitação por 30 min, à temperatura ambiente (ca. $25\text{ }^\circ\text{C}$). Após 30 min, os conjugados foram mantidos refrigerados (ca. $4\text{ }^\circ\text{C}$) por 7 dias.

Para a ligação covalente entre os PQs e a rhMBL, foram usados os agentes de acoplamento 1-etil-3-(3-dimetilaminopril) carbodiimida (EDC) e *N*-hidroxisuccinimida (NHS) para propiciar ligações químicas entre terminais carboxílicos presentes na superfície dos PQs e os grupos amina da rhMBL.

Primeiramente, o pH dos PQs foi ajustado para pH 6,0 também utilizando uma solução MSA ($6,8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), uma vez que os agentes de acoplamento funcionam de maneira mais eficaz em pH mais ácido, próximo ao escolhido (HERMANSON, 2013). Em seguida, 500 μL de EDC ($0,4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e 500 μL de NHS ($1,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram adicionados a 1 mL de suspensão de PQs. Após 15 min, a rhMBL ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi adicionada, atingindo uma concentração final de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os conjugados também foram incubados por 7 dias a ca. $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Após os 7 dias de incubação, os conjugados PQs-rhMBL foram lavados utilizando filtros de ultracentrifugação (Vivaspin 6, 10 kDa, GE Healthcare), em quatro ciclos de centrifugação, a $908 \times g$, por 6 min. Após a lavagem, os conjugados foram ressuspensos para o mesmo volume e armazenados por 5 dias, a ca. $4 \text{ }^\circ\text{C}$, antes do uso. O conjugado mais efetivo também foi caracterizado por espectroscopia de absorção e emissão, nas mesmas condições que os PQs.

2.3 - Avaliação dos Conjugados por Marcação de Leveduras de *Candida albicans*

Para escolher a abordagem mais promissora para a conjugação, os nanossistemas foram avaliados por meio de marcações de levedura de *Candida albicans*, uma vez que suas paredes são ricas em manose [23], tornando esses sistemas biológicos adequados para avaliar a interação com os conjugados.

Para tanto, as leveduras *C. albicans* (ATCC 10231) foram cultivadas em caldo Sabouraud dextrose por 24 h, a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, para posterior incubação com os conjugados. Em seguida, as células foram centrifugadas ($775 \times g$ por 2 min), por 2 ciclos, e ressuspensas em solução salina isotônica (0,9% p/v) contendo íons cálcio (1 mM), pois a MBL é uma lectina que se liga mais efetivamente aos sistemas biológicos, pela porção de reconhecimento de carboidratos (DRC), na presença de cálcio [15].

As suspensões celulares de *C. albicans* ($1 \times 10^6 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram então incubadas com conjugados (PQs-rhMBL) na proporção de 1:1 (50:50 μL), em triplicatas, por 30 min, à temperatura ambiente. Após a incubação, os sistemas foram centrifugados ($775 \times g$, por 30 s) e, em seguida, ressuspensos em solução salina isotônica (0,9% p/v). Para este estudo, a marcação celular foi avaliada quantitativamente por citometria de fluxo (NovoCyte ACEA Biosciences). A análise citométrica foi realizada com excitação em 488 nm e a emissão foi coletada

utilizando o filtro 675/30 nm. Foram adquiridos 20.000 eventos, avaliando-se a mediana de fluorescência (MIF) e a porcentagem de marcação. Os dados foram expressos por média \pm erro padrão. Vale ressaltar que os conjugados preparados por ligação covalente foram bloqueados, antes da incubação com as leveduras, usando a base TRIS (concentração final de 5 mM) por 2 h para evitar interações não específicas.

Dentre os conjugados testados nos diferentes pHs e abordagens, o que se destacou como mais promissor, foi aquele visualmente mais estável e mais efetivo na marcação das leveduras, foi escolhido como o mais eficiente, e, a partir daí, prosseguiu-se com avaliações adicionais da especificidade do conjugado, conforme detalhado abaixo.

2.4 - Avaliação da Especificidade do Conjugado

Para verificar a especificidade dos conjugados, foram realizados os seguintes ensaios (em triplicatas):

(i) Sistema 1: o conjugado foi incubado previamente com o açúcar D-(+)-manose ($0,4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ - Sigma-Aldrich) por 30 min, para que estes pudessem ocupar os sítios de reconhecimento de carboidratos presentes na lectina impedindo a sua ligação à superfície das leveduras e, assim, confirmar sua especificidade. Em seguida, incubou-se as leveduras com o conjugado de PQs-rhMBL já inibido na presença de cálcio;

(ii) Sistema 2: leveduras de *C. albicans* foram ressuspendidas em uma solução salina isotônica (0,9% p/v) sem cálcio antes da incubação com o conjugado, para que fosse possível avaliar a influência desses íons na interação do conjugado com a superfície das células;

(iii) Sistema 3: o conjugado foi incubado com as células de *C. albicans* em meio contendo tampão com adição de EDTA (0,2 mM), um composto orgânico com capacidade de agir como quelante de íons cálcio presentes no meio, os quais seriam necessários para a interação da rhMBL com os açúcares da superfície da célula pelo DRC, antes do conjugado ser adicionado ao sistema.

Após incubação, realizada da mesma forma que na seção 2.3, os sistemas foram, então, centrifugados ($775 \times g$ por 30 s), e após essa etapa, foram ressuspendidos em solução salina isotônica (0,9% p/v) para avaliação por citometria

de fluxo segundo seção 2.3. Nesses ensaios foi utilizado o citômetro Accuri™ C6 – Becton Dickinson com excitação em 488 nm e detecção pelo filtro FL3 – 670 nm/LP. Foram também coletados 20.000 eventos. Foi analisada a porcentagem de marcação expressa por média \pm erro padrão. Adicionalmente, as leveduras incubadas com o conjugado escolhido e com os sistemas 1 e 3 foram analisadas por microscopia de fluorescência (DMI 4000B, Leica). Para tanto, foram utilizados o filtro de excitação 560/40 nm e o filtro de emissão 645/75 nm.

3 - RESULTADOS

3.1 - Avaliação das Estratégias de Bioconjugação

Nessa etapa foram avaliados os conjugados preparados em pHs 4,5; 6,0 e 7,0 a partir do método de adsorção, e o conjugado em pH 6,0, utilizando a estratégia de ligação covalente. As porcentagens de marcação, bem como as MIFs, estão apresentadas na Tabela 1. Vale ressaltar que todos esses ensaios foram realizados na presença de cálcio. Dentre os conjugados testados, foi escolhido como o mais promissor o conjugado preparado por adsorção em pH 6,0, por ter apresentado a maior porcentagem e maior MIF de marcação. No entanto, os conjugados preparados por ligação covalente e adsorção em pH 7,0 também apresentaram potencial.

Tabela 1. Médias das porcentagens de marcação e MIFs para leveduras de *C. albicans* após incubação com os conjugados preparados por adsorção e ligação covalente.

Estratégia	pH	Porcentagem (%)	MIF (u. a.)
Adsorção	4,5	69,0 \pm 9,2	(2,6 \pm 0,3) $\times 10^4$
Adsorção	6,0	99,0 \pm 0,2	(84 \pm 10) $\times 10^4$
Adsorção	7,0	99,0 \pm 0,1	(34 \pm 0,1) $\times 10^4$
Covalente	6,0	98,0 \pm 0,1	(17 \pm 0,2) $\times 10^4$

Nossos resultados de conjugação por adsorção indicaram que o pH está influenciando a interação entre a MBL e os PQs. A adsorção entre nanopartículas e biomoléculas pode ser mediada, por exemplo, por forças eletrostáticas, interações

hidrofóbicas, forças de Van der Waals e pontes de hidrogênio [24]. Quais dessas interações vão exercer um papel mais significativo na conjugação, depende, dentre outros fatores, da carga dos PQs e do ponto isoelétrico (pI) da biomolécula [25,26].

Tenório *et al.* e Cunha *et al.* prepararam conjugados efetivos por meio da adsorção entre PQs e as lectinas ConA e Cramoll, respectivamente, as quais, assim como a MBL, também têm afinidade por manose. Embora a ConA e a Cramoll possuam também semelhanças estruturais, essas lectinas possuem diferentes pls. O pI da ConA é ca. 5,7 e da Cramoll é ca. 8,5. Tenório *et al.* reportaram uma conjugação efetiva em pH 8,0, enquanto Cunha *et al.* conjugaram efetivamente a Cramoll aos PQs em pH 7,0. Ambos autores utilizaram PQs carboxilados, negativamente carregados. Como uma biomolécula apresenta carga elétrica resultante positiva quando está em um meio com pH menor que o pI, Cunha *et al.* sugeriram que as forças eletrostáticas, diferentemente do que ocorre para a ConA, seriam as interações predominantes na ligação entre os PQs e a Cramoll [21,22].

Os PQs aqui utilizados são também carboxilados e, portanto, negativamente carregados nos pHs estudados. O pI da MBL humana encontra-se entre 5,4 e 5,8. Assim, os resultados reportados por Tenório *et al.* [21] e Cunha *et al.* [22] em conjunto com os nossos dados – que indicaram conjugações mais efetivas em meio com $\text{pH} \geq \text{pI}$ – pode-se sugerir que as forças eletrostáticas provavelmente não são as interações predominantes na ligação dessa lectina aos PQs.

3.2 - Caracterização Óptica dos PQs e do Bioconjugado

A suspensão de PQs de CdTe apresentou um espectro de absorção característico, com um primeiro máximo em 600 nm (Figura 1A). Além disso, os nanocristais apresentaram um intenso máximo de emissão em 649 nm e uma largura máxima a meia altura (do inglês *full width at half maximum* – FWHM) de cerca de 72 nm, como representado na Figura 1B. Os PQs apresentaram um tamanho médio de aproximadamente 3,5 nm [20]. Com base na Lei de Lambert - Beer e usando o coeficiente de extinção molar para os PQs CdTe [19], a concentração estimada foi de aproximadamente 3,4 μM .

Um parâmetro importante a ser analisado após a conjugação é a manutenção das propriedades ópticas do conjugado. A caracterização óptica realizada para o conjugado escolhido indicou que não houve mudanças consideráveis no FWHM e

nem no perfil de absorção desse nanossistema (Figuras 1A e 1B). Também não foram observados *redshift* ou *blueshift* na fluorescência da nanossonda desenvolvida. A diminuição da intensidade de emissão do conjugado foi muito pequena em relação aos PQs. Um perfil espectroscópico semelhante foi também observado, por exemplo, por Tenório e co-autores na conjugação da ConA aos PQs [21].

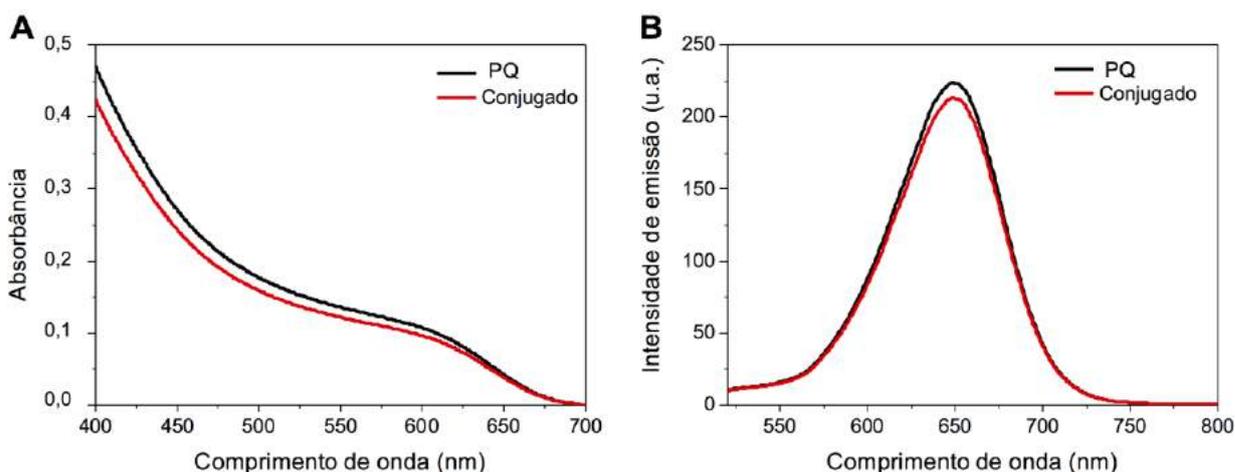


Figura 1. Espectros de absorção (A) e emissão (B) dos PQs (em preto) e do conjugado preparado por adsorção em pH 6,0 (em vermelho). Os espectros de emissão foram adquiridos com excitação em $\lambda_{exc} = 488$ nm.

3.3 - Avaliação da Especificidade do Conjugado

Após a escolha do conjugado mais efetivo, foram realizados ensaios de especificidade comparando as incubações após inibição com monômeros de manose na presença de cálcio (sistema 1), sem a adição de cálcio (sistema 2) e com EDTA (sistema 3) – seção 2.4 – com a marcação realizada com os conjugados PQs-rhMBL com cálcio. Os resultados dessa avaliação encontram-se na Figura 2 abaixo. Foi confirmado que o conjugado preparado por adsorção em pH 6,0 foi capaz de marcar aproximadamente 99% das leveduras na presença do íon (Figura 2A). Em contraponto, após incubações com os sistemas 1, 2 e 3, os percentuais de marcação reduziram consideravelmente para cerca de $15,1 \pm 1,4\%$, $13,8 \pm 0,3\%$ e abaixo de 1%, respectivamente (Figuras 2B, 2C e 2D). Vale ressaltar que o sistema com EDTA se apresentou fluorescente sob observação visual em luz UV (365 nm).

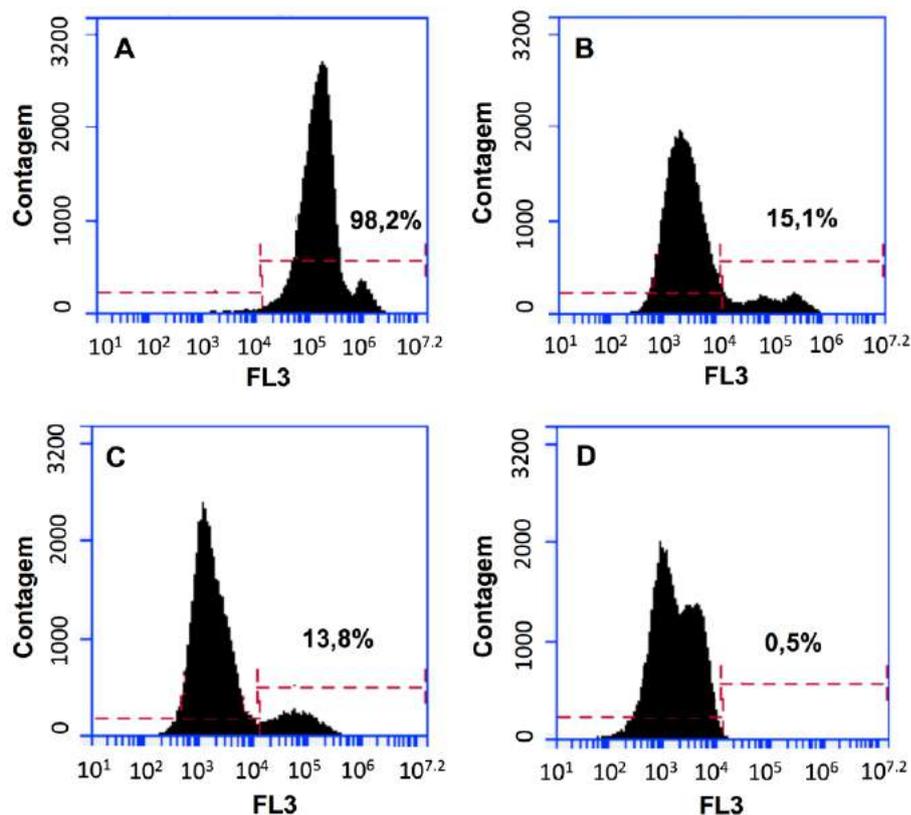


Figura 2. Histogramas de *C. albicans* incubadas com o conjugado PQs-rhMBL (adsorção pH 6,0) na presença de cálcio (A), após inibição com manose – sistema 1 (B), sem adição de cálcio – sistema 2 (C) e com EDTA – sistema 3 (D).

Resultados semelhantes também foram encontrados nos estudos de Oliveira *et al.* [27], para os quais leveduras de *C. albicans* foram eficientemente marcadas após incubação com conjugados de PQs-Cramoll e uma redução de marcação semelhante foi observada após incubação com nanossistemas inibidos por methyl- α -D-manopiranosídeo.

Portanto, nossos resultados indicam que o conjugado de PQs-rhMBL escolhido além de ser eficiente, apresenta especificidade. É relatado na literatura que a MBL reconhece patógenos, como a *C. albicans*, pela sua porção DRC [9]. Além disso, a MBL se liga com maior avidéz pelo DRC na presença de cálcio, pois esses íons permitem que essa porção da lectina forme pontes coordenadas com os grupos 3- e 4- hidroxila dos açúcares (D-manose, *N*-acetil-D-glicosamina e L-fucose, por exemplo) expostos nas superfícies de microorganismos e outras células que possuam carboidratos deste tipo para reconhecimento [9, 28]. Assim, ao incubar o conjugado com monômeros de manose, os DRCs da lectina são preenchidos

diminuindo a interação dos nanossistemas com as leveduras (Figura 2B). Corroborando essa observação, ao utilizar EDTA, a MBL não foi capaz de formar pontes coordenadas com os carboidratos, não sendo assim capaz de se ligar à *C. albicans* (Figura 2D). As lectinas ConA e Cramoll também são conhecidas por apresentar maior avidéz ao se ligar pelo DRC na presença de cálcio. No entanto, os estudos de Tenório *et al.*, [21] Cunha *et al.* [22] e Oliveira *et al.* [27] indicaram que conjugados formados por PQs e lectinas nativas dessas espécies foram capazes de marcar mais de 90% de leveduras de *C. albicans* sem a adição de cálcio. Os resultados da Figura 2C indicam então que a MBL recombinante utilizada nesse estudo é mais dependente desse íon para reconhecer os açúcares pelo DRC, do que as lectinas ConA e Cramoll nativas que também têm especificidade por manose, por exemplo.

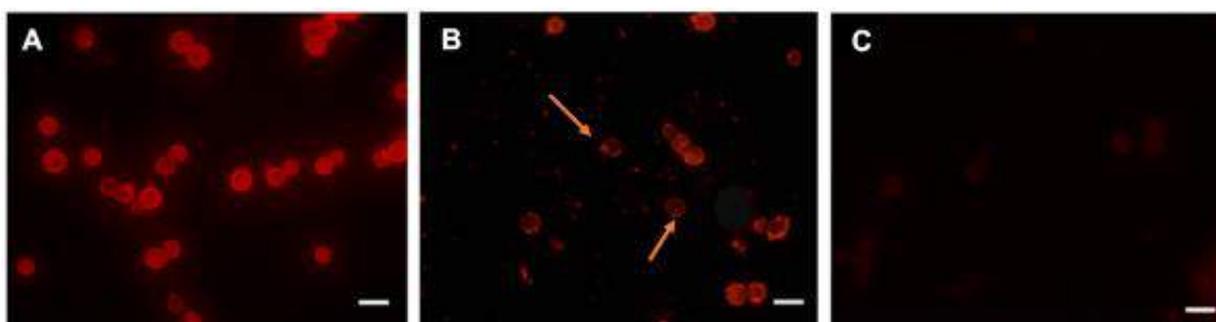


Figura 3. Imagens de microscopia de fluorescência de leveduras de *C. albicans* incubadas com o conjugado PQs-rhMBL na presença de cálcio (A); após inibição do conjugado – sistema 1 (B) e com EDTA – sistema 3 (C). Barra de escala: 7 μ m.

A efetividade e especificidade da interação dos conjugados com as leveduras de *C. albicans* foram também analisadas por microscopia de fluorescência. A Figura 3 mostra uma marcação intensa e homogênea das paredes das células pelos conjugados em pH 6,0, indicando mais uma vez a eficiência da conjugação da MBL com os PQs CdTe, obtida por adsorção em pH 6,0 (Figura 3A). Após incubação com o sistema 1 (inibido), foi possível visualizar uma marcação menos efetiva e heterogênea, com agregados de conjugados aderidos às paredes das células (indicado pelas setas) (Figura 3B). Já para o sistema 3, não foi praticamente observado sinal fluorescente após incubação com EDTA, sendo visualizada apenas a autofluorescência das células (Figura 3C). Assim, esses resultados por

microscopia corroboram os obtidos por citometria de fluxo. Dessa forma, podemos também concluir que a conjugação por adsorção em pH 6,0 resultou em um conjugado de PQs-rhMBL eficiente e específico que apresentou-se como uma ferramenta versátil e promissora para estudos biológicos.

4 - CONCLUSÃO

Os PQs de CdTe foram conjugados com sucesso à lectina rhMBL por adsorção em pH 6,0. Os conjugados apresentaram intensa fluorescência, eficiência e especificidade na marcação fluorescente – por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência – de leveduras de *C. albicans* na presença de cálcio. Esses resultados indicaram que essa lectina recombinante é altamente dependente desse íon para uma efetiva ligação com esse sistema biológico pela porção DRC. Assim, o conjugado desenvolvido apresenta versatilidade e potencial para ser utilizado na compreensão do papel da MBL em diversos processos biológicos.

AGRADECIMENTOS: Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE). O Instituto Nacional de Fotônica (INCT-INFo) também é reconhecido.

REFERÊNCIAS

- [1] H. Ghazarian, B. Itoni, S.B. Oppenheimer, A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics, *Acta Histochemica*, 113 (2011): 236-247.
- [2] N.C. Reichardt, M. Martín-Lomas, S. Penadés, Glyconanotechnology, *Chemical Society Reviews*, 42 (2013): 4358-4376.
- [3] A. Sukhanova, I. Nabiev, Fluorescent nanocrystal quantum dots as medical diagnostic tools, *Expert Opinion on Medical Diagnostics*, 2 (2008): 429-447.
- [4] P.E. Cabral Filho, A. Fontes, M.I. Pereira, H.P. Fernandes H.P., A.A. de Thomaz, C.L. Cesar, B.S. Santos, M.L. Barjas-Castro, Blood group antigen studies using

CdTe quantum dots and flow cytometry, *International Journal of Nanomedicine*, 10 (2015): 43-93.

[5] Z. Zhelev, H. Ohba, R. Bakalova, R. Jose, S. Fukuoka, T. Nagase, M. Ishikawa, Y. Baba, Fabrication of quantum dot–lectin conjugates as novel fluorescent probes for microscopic and flow cytometric identification of leukemia cells from normal lymphocytes, *Chemical Communications*, 15 (2005): 1980-1982.

[6] C.C. Lucena, Potencial antileucêmico da lectina de *Cratylia floribunda* e sua conjugação com nanotubos de carbono, (2016).

[7] A.S. Karakoti, R. Shukla, R. Shanker, S. Singh, Surface functionalization of quantum dots for biological applications, *Advances in Colloid and Interface Science*, 215 (2015): 28-45.

[8] A. Foubert, N.V. Beloglazova, A. Rajkovic, B. Sas, A. Madder, I. Yu. Goryacheva, S. De Saeye, Bioconjugation of quantum dots: Review & impact on future application, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 83 (2016): 31-48.

[9] J. Atkinson, H. Eisen, Complement System, In: *Kelley's Textbook of Rheumatology* 7th ed. Philadelphia: Elsevier, (2005): 342-555.

[10] R. M. Dommett, N. Klein, M. W. Turner, Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future, *Tissue Antigens*, 68 (2006): 193-209.

[11] K. Takahashi, W.K. Eddie Ip, I.C. Michelow, R.A.B. Ezekowitz, The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule, *Current Opinion in Immunology*, 18 (2006): 16-23.

[12] K. Takahashi, Mannose-binding lectin and the balance between immune protection and complication, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 9 (2011): 1179-1190.

[13] E. Leikina, H. Delanoe-Ayari, K. Melikov, M. Cho, A. Chen, A.J. Waring, W. Wang, Y. Xie, J.A. Loo, R.I. Lehrer, L.V. Chernomordik, Carbohydrate-binding molecules inhibit viral fusion and entry by crosslinking membrane glycoproteins, *Nature Immunology*, 6 (2005): 995-1001.

[14] M. Larvie, T. Shoup, W. Chang, L. Chigweshe, K. Hartshorn, M.R. White, G.L. Stahl, D.R. Elmaleh, K. Takahashi, Mannose-Binding lectin binds to amyloid β

protein and modulates inflammation, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012 (2012): 929803.

[15] P. Garred, M.A. Nielsen, J.A.L. Kurtzhals, R. Malhotra, H.O. Madsen, B.Q. Goka, B.D. Akanmori, R.B. Sim, L. Hviid, Mannose-binding lectin is a disease modifier in clinical malaria and may function as opsonin for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes, *Infection and Immunity*, 71 (2003): 5245-5253.

[16] T.F. Mendonça, M.C Oliveira, L.R. Vasconcelos, L.M Pereira, P. Moura, M.A. Bezerra, M.N. Santos, A.S. Araújo, M.S. Cavalcanti, Association of variant alleles of MBL2 gene with vasoocclusive crisis in children with sickle cell anemia, *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 44 (2010): 224-228.

[17] C.N. Lima, A. Fontes, P.E. Cabral Filho, B.S. Santos, P. Moura, Interactions of mannose binding-lectin with red blood cells by employing cationic quantum dots, *International Journal of Biological Macromolecules*, 125 (2019): 1168-1174.

[18] P.E. Cabral Filho, A.L.C. Cardoso, M.I.A. Pereira, A.P.M. Ramos, F. Hallwass, M.M. Castro, C.F. Geraldes, B.S. Santos, M.C. Pedroso de Lima, G.A. Pereira, A. Fontes, CdTe quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1860 (2016) 28-35.

[19] W.W. Yu, L. QU, W. Guo, X. Peng, Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals, *Chemistry of Materials*, 15 (2003): 2854-2860.

[20] P. Dagtepe, V. Chikan, J. Jasinski, V.J. Leppert, Quantized growth of CdTe quantum dots; observation of magic-sized CdTe quantum dots, *The Journal of Physical Chemistry*, 111 (2007): 14977-14983.

[21] D.P.L.A. Tenório, C.G. Andrade, P.E. Cabral Filho, C.P. Sabino, I.T. Kato, L.B. Carvalho Jr, S. Alves Jr, M.S. Ribeiro, A. Fontes, B.S. Santos, 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 (2015) 237-243.

[22] C.R.A. Cunha, C.G. Andrade, M.I.A. Pereira, P.E. Cabral Filho, L.B. Carvalho Jr, L.C. Coelho, B.S. Santos, A. Fontes, Quantum dot–Cramoll lectin as novel

conjugates to glycobiology, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 178 (2018): 85-91.

[23] S.M. Levitz, Innate recognition of fungal cell walls, *PLoS Pathogens*, 6 (2010): e1000758.

[24] Q. Luo, Y. Lin, J. Peng, S. Liu, Z. Zhang, Z. Tian, D. Pang, Evaluation of nonspecific interactions between quantum dots and proteins, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16 (2014): 7677-7680.

[25] G. Yan, L. Robinson, P. Hogg, Magnetic resonance imaging contrast agents: overview and perspective, *Radiography*, 13 (2007): 5-19.

[26] J. Wang, X. Huang, F. Zan, C. Guo, C. Cao, J. Ren, Studies on bioconjugation of quantum dots using capillary electrophoresis and fluorescence correlation spectroscopy, *Electrophoresis*, 33 (2012): 1987-1995.

[27] W.F. Oliveira, M.P. Cabrera, N.R.M. Santos, T.H. Napoleão, P.M.G. Paiva, R.P. Neves, M.V. Silva, B.S. Santos, L.C. Coelho, P.E. Cabral Filho, A. Fontes, M.T.S. Correia, Evaluating glucose and mannose profiles in *Candida* species using quantum dots conjugated with Cramoll lectin as fluorescent nanoprobe, *Microbiological Research*, 230 (2020): 26330.

[28] M. W. Turner, The role of mannose-binding lectin in health and disease, *Molecular Immunology*, 40 (2003): 423-429.

5 - CONCLUSÃO

- ✓ Foram sintetizados PQs de CdTe estabilizados/funcionalizados com AMS coloidalmente estáveis, com intensa fluorescência, na região espectral do vermelho, com diâmetro médio de 3,5 nm.
- ✓ Após avaliação de diferentes estratégias para conjugar a rhMBL aos PQs, o melhor conjugado foi obtido pelo método de adsorção, em pH 6,0, e este foi capaz de marcar eficientemente leveduras de *C. albicans*;
- ✓ O conjugado escolhido manteve as propriedades ópticas semelhantes às observadas para os PQs;
- ✓ Após ensaios de inibição do conjugado, incubação sem cálcio e com cálcio e com a adição de EDTA, verificou-se que o nanossistema desenvolvido foi capaz de se ligar especificamente aos carboidratos expressos nas paredes das leveduras de *C. albicans*. Também foi observado que o cálcio é fundamental no reconhecimento de carboidratos pela rhMBL pela sua porção DRC;
- ✓ Dessa forma, conclui-se que foi obtido um bioconjugado PQs-rhMBL eficiente e específico que demonstrou ser uma ferramenta prática e versátil para auxiliar em estudos da glicobiologia e capaz de ser aplicado em diversas áreas da biomedicina.

REFERÊNCIAS

ÅKERMAN, M. E. *et al.* Nanocrystal targeting in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 20, p. 12617-12621, 2002.

ALGAR, W. R. *et al.* The controlled display of biomolecules on nanoparticles: a challenge suited to bioorthogonal chemistry. **Bioconjugate Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 825-858, 2011.

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

ATKINSON, J. P.; EISEN, H. N. Complement system. **Kelley's Textbook of Rheumatology**. 7th ed. Philadelphia: Elsevier, p. 342-355, 2005.

BAGHER, A. M. Quantum dots applications. **Sensors & Transducers**, v. 198, n. 3, p. 37-43, 2016.

BHUSHAN, B. Introduction to nanotechnology. In: BHUSHAN, B. Springer Handbook of Nanotechnology. 4. ed. Springer. Berlin. p. 1–18, 2017.

BILAN, R. *et al.* Quantum dot surface chemistry and functionalization for cell targeting and imaging. **Bioconjugate Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 609-624, 2015.

BREGER, J.; DELEHANTY, J. B.; MEDINTZ, I. L. Continuing progress toward controlled intracellular delivery of semiconductor quantum dots. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 7, n. 2, p. 131-151, 2015.

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 (BBA)-General Subjects**, v. 1860, n. 1, p. 28-35, 2016.

CABRERA, M. P. *et al.* Highly fluorescent and superparamagnetic nanosystem for biomedical applications. **Nanotechnology**, v. 28, n. 28, p. 285704, 2017.

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

CARVALHO, M. E. T. *et al.* Evaluating the glyco-phenotype on breast cancer tissues with quantum dots-Cramoll lectin conjugates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 302-308, 2019.

CESAR, C. L. Quantum dots as biophotonics tools. In: Quantum Dots: Applications in Biology. **Humana Press**. New York. p. 3-9, 2014.

CHOU, K. F.; DENNIS, A. M. Förster resonance energy transfer between quantum dot donors and quantum dot acceptors. **Sensors**, v. 15, n. 6, p. 13288-13325, 2015.

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

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

DAN, X.; LIU, W.; NG, T. B. Development and applications of lectins as biological tools in biomedical research. **Medicinal Research Reviews**, v. 36, n. 2, p. 221-247, 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.

DOMMETT, R. M.; KLEIN, N.; TURNER, M. W. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. **Tissue Antigens**, v. 68, n. 3, p. 193-209, 2006.

DONG, Y. *et al.* Polyamine-functionalized carbon quantum dots for chemical sensing. **Carbon**, v. 50, n. 8, p. 2810-2815, 2012.

DUMESTRE-PERARD, C. *et al.* Evaluation and clinical interest of mannan binding lectin function in human plasma. **Molecular Immunology**, v. 39, n. 7-8, p. 465-473, 2002.

EDDIE IP, W. K. *et al.* Mannose-binding lectin and innate immunity. **Immunological reviews**, v. 230, n. 1, p. 9-21, 2009.

EZEKOWITZ, R. A. *et al.* A human serum mannose-binding protein inhibits in vitro infection by the human immunodeficiency virus. **Journal of Experimental Medicine**, v. 169, n. 1, p. 185-196, 1989.

FEINBERG, H. *et al.* Crystal structure of the CUB1-EGF-CUB2 region of mannose-binding protein associated serine protease-2. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 10, p. 2348-2359, 2003.

FONTES, A. *et al.* Quantum dots in biomedical research. **Biomedical Engineering - Technical Applications in Medicine**, 1st ed. InTech, Rijeka, p. 269-290, 2012.

FOUBERT, A. *et al.* Bioconjugation of quantum dots: Review & impact on future application. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 83, p. 31-48, 2016.

FREIRE, F. C. O. A introdução de fitopatógenos e doenças emergentes na agricultura cearense. **Essentia - Revista de Cultura, Ciência e Tecnologia da UVA**, v. 16, n. 2, 2015.

GAO, X. *et al.* Quantum dots bearing lectin-functionalized nanoparticles as a platform for in vivo brain imaging. **Bioconjugate Chemistry**, v. 19, n. 11, p. 2189-2195, 2008.

GAO, X.; NIE, S. Quantum dot-encoded mesoporous beads with high brightness and uniformity: rapid readout using flow cytometry. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 8, p. 2406-2410, 2004.

GARRED, P. *et al.* Mannose-binding lectin and its genetic variants. **Genes and Immunity**, v. 7, n. 2, p. 85-94, 2006.

GARRED, P. *et al.* Mannose-binding lectin is a disease modifier in clinical malaria and may function as opsonin for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9, p. 5245-5253, 2003.

GARRED, P. *et al.* Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. **The Lancet**, v. 349, n. 9047, p. 236-240, 1997.

GHIRAN, I. *et al.* Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 12, p. 1797-1808, 2000.

- HAN, Hee-Sun *et al.* Quantum dot/antibody conjugates for in vivo cytometric imaging in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 5, p. 1350-1355, 2015.
- HANSEN, S.; HOLMSKOV, U. Structural aspects of collectins and receptors for collectins. **Immunobiology**, v. 199, n. 2, p. 165-189, 1998.
- HERMANSON, G. T. Bioconjugate techniques. **Academic Press**, 2013.
- HESS, C.; STEIGER, J. U.; SCHIFFERLI, J. A. Complement and its role in immune response. **Schweizerische Medizinische Wochenschrift**, v. 128, n. 11, p. 393-399, 1998.
- IPE, B. I *et al.* Dynamic light-scattering analysis of the electrostatic interaction of hexahistidine-tagged cytochrome P450 enzyme with semiconductor quantum dots. **ChemPhysChem**, v. 7, n. 5, p. 1112-1118, 2006.
- JACK, D. L.; KLEIN, N. J.; TURNER, M. W. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. **Immunological Reviews**, v. 180, n. 1, p. 86-99, 2001.
- JEONG, Heon-Ho *et al.* Profiling surface glycans on live cells and tissues using quantum dot-lectin nanoconjugates. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 18, p. 3290-3295, 2012.
- 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.
- KILPATRICK, D. C. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. **Transfusion Medicine**, v. 12, n. 6, p. 335-352, 2002.
- KIM, H. *et al.* Polyacrylamide gel electrophoresis of semiconductor quantum dots and their bioconjugates: materials characterization and physical insights from spectrofluorimetric detection. **Analyst**, v. 143, n. 5, p. 1104-1116, 2018.
- KLICKSTEIN, L. B. *et al.* Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q. **Immunity**, v. 7, n. 3, p. 345-355, 1997.
- KOCH, A. *et al.* Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. **JAMA**, v. 285, n. 10, p. 1316-1321, 2001.
- KRISHNA, V. D. *et al.* Nanotechnology: Review of concepts and potential application of sensing platforms in food safety. **Food Microbiology**, v. 75, p. 47-54, 2018.

LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 45-55, 2011.

LARVIE, M. *et al.* Mannose-binding lectin binds to amyloid β protein and modulates inflammation. **BioMed Research International**, v. 2012, 929803, 2012.

LEIKINA, E. *et al.* Carbohydrate-binding molecules inhibit viral fusion and entry by crosslinking membrane glycoproteins. **Nature Immunology**, v. 6, n. 10, p. 995, 2005.

LEVITZ, S. M. Innate recognition of fungal cell walls. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 4, e1000758, 2010.

LI, J. *et al.* Mixed ligand system of cysteine and thioglycolic acid assisting in the synthesis of highly luminescent water-soluble CdTe nanorods. **Chemical Communications**, n. 15, p. 1740-1741, 2004.

LIM, J. *et al.* Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, n. 1, 381, 2013.

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

MALHOTRA, R. *et al.* Human leukocyte C1q receptor binds other soluble proteins with collagen domains. **Journal of Experimental Medicine**, v. 172, n. 3, p. 955-959, 1990.

MAMEDOVA, N. *et al.* Albumin–CdTe nanoparticle bioconjugates: preparation, structure, and interunit energy transfer with antenna effect. **Nano Letters**, v. 1, n. 6, p. 281-286, 2001.

MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1434-1446, 2012.

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

MENDONÇA, T. F. *et al.* Association of variant alleles of MBL2 gene with vasoocclusive crisis in children with sickle cell anemia. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 44, n. 4, p. 224-228, 2010.

MICHALET, X.; BENTOLILA, L. A.; WEISS, S. Molecular imaging: physics and bioapplications of quantum dots. In: *Advances in Medical Physics*. **Medical Physics**, p. 111-127, 2008.

MICHALET, X. *et al.* Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. **Science**, v. 307, n. 5709, p. 538-544, 2005.

MUKHERJEE, A.; SHIM, Y.; SONG, J. M. Quantum dot as probe for disease diagnosis and monitoring. **Biotechnology Journal**, v. 11, n. 1, p. 31-42, 2016.

MURRAY, C. B.; NORRIS, D. J.; BAWENDI, M. G. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E= sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 19, p. 8706-8715, 1993.

NETH, O. *et al.* Deficiency of mannose-binding lectin and burden of infection in children with malignancy: a prospective study. **The Lancet**, v. 358, n. 9282, p. 614-618, 2001.

NILSSON, C. L. Lectins: analytical tools from nature. In: *Lectins*. **Elsevier**, p. 1-13, 2007.

OGDEN, C. A. *et al.* C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and cd91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 6, p. 781-795, 2001.

OKAZAKI, H. *et al.* Difference in *Ulex europaeus* agglutinin I-binding activity of decay-accelerating factor detected in the stools of patients with colorectal cancer and ulcerative colitis. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 143, n. 3, p. 169-174, 2004.

OLIVEIRA, J. F. C. **Lectinas vegetais: de moléculas de defesa de plantas às suas diversas aplicações biotecnológicas**. 2018. 62 p. (Dissertação) Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2018.

OLIVEIRA, W. F. *et al.* Evaluating glucose and mannose profiles in *Candida* species using quantum dots conjugated with Cramoll lectin as fluorescent nanoprobos. **Microbiological Research**, v. 230, 26330, 2020.

PAIVA, P. M. G; COELHO, L. C. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* mart. (camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 113-118, 1992.

PEREIRA, G. *et al.* (Bio)conjugation Strategies Applied to Fluorescent Semiconductor Quantum Dots. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 12, p. 2536-2561, 2019.

PEREIRA, M. I. A. **Quantum dots bioconjugados a proteínas para identificação de antígenos eritrocitários do sistema ABO por citometria de fluxo**. 2014. 75 p. Monografia em Bacharelado em Biomedicina, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2014.

PETERSEN, S. V.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. The Mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. **Molecular Immunology**, v. 38, n. 2-3, p. 133-149, 2001.

PILLA, V. *et al.* Photothermal spectroscopic characterization in CdSe/ZnS and CdSe/CdS quantum dots: a review and new applications. **Quantum Dots: A Variety of New Applications**, p. 3-22, 2012.

SANTOS, B. S.; FARIAS, P. M. A.; FONTES, A. Semiconductor quantum dots for biological applications. In: Handbook of Self-Assembled Semiconductor Nanostructures for Novel Devices in Photonics and Electronics. **Elsevier**, p. 773-798, 2008.

SARAN, A. D. *et al.* An optimized quantum dot-ligand system for biosensing applications: Evaluation as a glucose biosensor. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 384, n. 1-3, p. 393-400, 2011.

SEYFARTH, J.; GARRED, P.; MADSEN, H. O. Extra-hepatic transcription of the human mannan-binding lectin gene (*mbi2*) and the MBL-associated serine protease 1–3 genes. **Molecular Immunology**, v. 43, n. 7, p. 962-971, 2006.

SILVA, F. O. *et al.* O estado da arte da síntese 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. *et al.* Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 11, p. 1226-1240, 2008.

STEFFENSEN, R. *et al.* Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. **Journal of Immunological Methods**, v. 241, n. 1-2, p. 33-42, 2000.

STUART, L. M. *et al.* Mannose-binding lectin-deficient mice display defective apoptotic cell clearance but no autoimmune phenotype. **Journal of Immunology**, v. 174, n. 6, p. 3220-3226, 2005.

SUMMERFIELD, J. A. *et al.* Association of mutations in mannanose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. **BMJ**, v. 314, n. 7089, p. 1229, 1997.

TAKAHASHI, K. *et al.* The mannanose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 1, p. 16-23, 2006.

TALAPIN, D. V. *et al.* Synthesis of surface-modified colloidal semiconductor nanocrystals and study of photoinduced charge separation and transport in nanocrystal-polymer composites. **Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures**, v. 14, n. 1-2, p. 237-241, 2002.

TAYLOR, M. E. *et al.* Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannanose-binding protein. **Biochemical Journal**, v. 262, n. 3, p. 763-771, 1989.

TENNER, A. J.; ROBINSON, S. L.; EZEKOWITZ, R. A. B. Mannanose binding protein (MBP) enhances mononuclear phagocyte function via a receptor that contains the 126,000 Mr component of the C1q receptor. **Immunity**, v. 3, n. 4, p. 485-493, 1995.

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.

TRAPIELLA-ALFONSO, L. *et al.* Clickable-zwitterionic copolymer capped-quantum dots for in vivo fluorescence tumor imaging. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 10, n. 20, p. 17107-17116, 2018.

TSUTSUMI, A.; TAKAHASHI, R.; SUMIDA, T. Mannose binding lectin: genetics and autoimmune disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 4, n. 6, p. 364-372, 2005.

TURNER, M. W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. **Immunol Today**, Cambridge, v. 17, n. 11, p. 532-540, 1996.

TURNER, M. W. The role of mannose-binding lectin in health and disease. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 7, p. 423-429, 2003.

VANDIVIER, R. W. *et al.* Role of surfactant proteins d, d, and c1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and cd91 as a common collectin receptor complex. **Journal of Immunology**, v. 169, n. 7, p. 3978-3986, 2002.

VARKI, A. *et al.* Nematoda-Essentials of Glycobiology. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2009.

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

YAU, T. *et al.* Lectins with potential for anti-Cancer therapy. **Molecules**, v. 20, p. 3791- 3810, 2015.

WEGNER, K. D.; HILDEBRANDT, N. Quantum dots: bright and versatile in vitro and in vivo fluorescence imaging biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 14, p. 4792-4834, 2015.

WEIS, W. I.; DRICKAMER, K.; HENDRICKSON, W. A. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. **Nature**, v. 360, n. 6400, p. 127-134, 1992.

WU, X. *et al.* Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 41-46, 2003.

ZUBCEVIC, N. *et al.* Effects of plant lectins on human erythrocyte agglutination. **Serbian Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 17, n. 3, p. 207-214, 2016.