



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIAS E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E
NUCLEARES

RAQUEL CORDEIRO DE OLIVEIRA

LECTINAS DE ORIGEM VEGETAL COMO POTENCIAIS SINALIZADORES
TUMORAIS: SteLL E PgTeL

Recife

2022

RAQUEL CORDEIRO DE OLIVEIRA

**LECTINAS DE ORIGEM VEGETAL COMO POTENCIAIS SINALIZADORES
TUMORAIS: STELL E PGTEL**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em tecnologias energéticas e nucleares como requisito parcial à obtenção do título de doutora em tecnologias energéticas e nucleares.

Área de concentração: aplicações de radioisótopos na indústria e medicina.

Orientador: Prof. Dr. Elvis Joacir de França.

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão.

Recife

2022

O48l Oliveira, Raquel Cordeiro de.
Lectinas de origem vegetal como potenciais sinalizadores tumorais: SteLL e PgTeL / Raquel Cordeiro de Oliveira. 2022.
89 f: il.

Orientador: Prof. Dr. Elvis Joacir de França.
Coorientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.
Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, Recife, 2022.
Inclui referências e anexo.

1. Energia nuclear. 2. Lectinas. 3. Radionuclídeos. 4. Pontos quânticos. 5. Sondas. 6. Sarcoma. 7. Biodistribuição. I. França, Elvis Joacir de (Orientador). II. Napoleão, Thiago Henrique (Coorientador). III. Título.

UFPE

621.4837 CDD (22. ed.)

BCTG / 2023 - 17

RAQUEL CORDEIRO DE OLIVEIRA

LECTINAS DE ORIGEM VEGETAL COMO POTENCIAIS SINALIZADORES

TUMORAIS: SteLL E PgTeL

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Tecnologias Energéticas e Nucleares.

Área de concentração: Aplicações de Radioisótopos na Indústria e Medicina.

Aprovada em: 13 / 12 / 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Elvis Joacir de França
Comissão Nacional de Energia Nuclear

Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Robson Ralon de Vasconcelos Alves
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho a Deus, a meus pais, meu
esposo, meus sobrinhos, Bolt e Jade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela força, coragem, fé e renovação que meu deu ao longo desses quatro anos. Foram muitos desafios e, sem Ele, eu não teria conseguido.

Agradeço aos meus pais, Célia e José, por desde minha infância me induzirem ao caminho da educação. Mesmo tendo poucas condições financeiras, eles sempre fizeram de tudo para que eu não deixasse de estudar e realizar meus sonhos. Se cheguei aqui foi graças a eles.

Agradeço ao meu esposo, Kelvin, que sempre é meu refúgio, incentivador dos meus sonhos e loucuras, e o ser humano mais puro e fiel a mim desde que nos conhecemos, em 2010. Desde então trilhamos nossos caminhos juntos, realizamos sonhos e criamos nosso lar. Sem tudo isso eu dificilmente teria aguentado os fardos da vida.

Agradeço à minha irmã Rafaela pelos melhores presentes que eu já recebi: meus sobrinhos, que me serviram de incentivo quando pensei em desistir.

Agradeço aos meus professores orientadores, em especial Mércia, que desde o mestrado apostou no meu potencial quando muitas vezes eu mesma duvidei. Obrigada pelo exemplo de profissional e pesquisador que você me deu, Mércia!

Agradeço também ao professor Thiago, que me acolheu mesmo sem precisar ou ganhar nada com isso. Thiago tornou essa tese possível quando os planos iniciais falharam, e de quebra me deu o BIOPROT, um laboratório que parece mais uma família para mim.

Agradeço aos professores Elvis França, Ana Melo, Emmanuel Pontual e Adriana Fontes, pelas ricas contribuições a esta tese.

Aos amigos que tanto somaram ao longo dessa trajetória, muito obrigada. Em especial a Ana Catarina, Osana, Natalia, Abdênego, Robson, Bob, Alícia, Matheus, dentre outros.

Agradeço à Universidade Federal de Pernambuco, à Comissão Nacional de Energia Nuclear e ao Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste, pelo apoio financeiro, científico e estrutural essenciais para esta tese.

“Um dia, quiçá, regozijar-se-ão ao recordar tais coisas”.

(VIRGÍLIO, 19 a.C., p. 203).

RESUMO

Um dos focos da Cancerologia é a busca por novos compostos, mais específicos e que consigam eliminar e sinalizar a presença de tumores. Recentemente, a busca tem se estendido para o uso de peptídeos e proteínas naturais, como as lectinas, que podem apresentar ação antitumoral. Dentre elas está a lectina SteLL, extraída das folhas da aroeira-da-praia (*Schinus terebinthifolia*), que tem ação antitumoral *in vivo* comprovada. Outra lectina com potencial de aplicação biotecnológica na Glicobiologia é a PgTeL, extraída da sarcotesta de *Punica granatum* (romã), a qual possui atividade antimicrobiana e não apresenta toxicidade *in vivo*. O objetivo desta tese foi investigar a possível aplicação das lectinas SteLL e PgTeL como sondas para sarcoma-180 *in vivo*, para futuras aplicações diagnósticas. Para isto, protocolos de radiomarcagem de SteLL com o radionuclídeo tecnécio metaestável foram testadas, bem como a conjugação de SteLL e PgTeL a sondas ópticas denominadas de pontos quânticos (PQs). Uma vez que não foi possível reproduzir os métodos de CCD, mostrados na literatura, para a quantificação da SteLL radiomarcada, não foram realizados os ensaios *in vivo* com o conjugado de SteLL ao tecnécio metaestável. Os sistemas PQ-SteLL e PQ-PgTeL seguiram para as demais avaliações. Neste sentido, foram investigados a toxicidade aguda e o perfil de biodistribuição dos conjugados PQs-Lectinas *in vivo*. A investigação da toxicidade aguda dos sistemas indicou sua segurança biológica, de forma que não foram observados danos irreversíveis em camundongos. O estudo de biodistribuição dos sistemas mostrou captação destes pelos órgãos de metabolização e eliminação (fígado, baço e rins). PQ-SteLL mostrou maior captação pelas células de sarcoma-180, em comparação a PQs livres e PQ-PgTeL. Nossos resultados mostram que a conjugação de lectinas a PQs é uma alternativa para investigação de novos compostos sinalizadores tumorais. A conjugação de sondas como os PQs a lectinas com propriedades antitumorais levará à obtenção de mais informações *in vivo* acerca da afinidade de lectinas, bem como a possibilidade de reconhecer diferentes glicoformas tumorais.

Palavras-chave: lectinas; radionuclídeos; pontos quânticos; sondas; sarcoma; biodistribuição.

ABSTRACT

One of the aims of Cancerology is the search for new, more specific, compounds that can eliminate and signal the presence of tumors. Recently, this search has extended to the use of peptides and natural proteins, such as lectins, which may have antitumor action. Among them is the lectin SteLL, extracted from the leaves of aroeira-da-praia (*Schinus terebinthifolia*), which has proven *in vivo* antitumor action. Another lectin with potential biotechnological application in Glycobiology is PgTeL, extracted from the sarcotesta of *Punica granatum* (pomegranate), which has antimicrobial activity and does not present toxicity *in vivo*. The aim of this thesis was to investigate the possible application of SteLL and PgTeL lectins as probes for sarcoma-180 *in vivo*, for future diagnostic applications. For this, SteLL radiolabelling protocols with the metastable technetium radionuclide were tested, as well as the conjugation of SteLL and PgTeL to optical probes called *quantum dots* (QDs). The acute toxicity and biodistribution profile of the *in vivo* conjugates were also investigated. Since none of the radiolabelling methods were reproducible, *in vivo* assays with the metastable technetium SteLL conjugate were not performed. The QD-SteLL and QD-PgTeL systems followed for the other evaluations. The investigation of the acute toxicity of the systems indicated their biological safety, so that irreversible damage was not observed in mice. The biodistribution study of the systems showed their uptake by the organs of metabolism and elimination (liver, spleen and kidneys). QD-SteLL showed greater uptake by sarcoma-180 cells compared to free QDs and QD-PgTeL. Our results show that the conjugation of lectins to QDs is an alternative for the investigation of new tumor signaling compounds. The conjugation of probes such as QDs to lectins with antitumor properties will lead to obtaining more *in vivo* information about the affinity of lectins, as well as the possibility of recognizing different tumor glycoforms.

Keywords: lectins; radionuclides; quantum dots; probes; sarcoma; biodistribution.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Árvore da espécie <i>Schinus terebinthifolia</i> e suas estruturas. (A) Árvore localizada em frente ao Departamento de Patologia, na Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE. (B) Folhas e caule da planta, mostrando as fissuras longitudinais. (C) Folhas jovens, de coloração avermelhada. (D) Folha madura.	21
Figura 2 - Partes da romãzeira (<i>Punica granatum</i>).	24
Figura 3 - Reação de complexação entre Tecnécio e grupamentos cisteínas, presentes em proteínas.	29
Figura 4 - Micelas lipídicas contendo droga anticâncer (AF) paclitaxel (PTX) e pontos quânticos (PQs)	31
Figura 5 - Reação de marcação de SteLL com tecnécio, na forma de pertecnetato, e formação de impurezas.	36
Figura 6 - Esquema de análise das amostras, por meio de cromatografia em camada delgada, para quantificação de ^{99m} Tc-SteLL e impurezas.	38
Figura 7 - Esquematização do ensaio cometa realizado 24 h após tratamento dos animais.	44
Figura 8 - Espectrômetro de fluorescência de raios-X por energia dispersiva EDX-720, com as amostras alocadas no carrossel, indicado pela seta.	45
Figura 9 - Desenho experimental para avaliação de biodistribuição em camundongos portadores de sarcoma 180. a) esquema geral do ensaio, b) implante da suspensão de células de S-180 na região dorsal do animal, c) animal portador de S-180.	46
Figura 10 - Picos de emissão e absorção para PQs livres (linhas cheias), PQ-SteLL (A, tracejado) e PQ-PgTeL (B, tracejado).	52
Figura 11 - Registros de consumo de alimento dos grupos testados. a) consumo médio de água (mL); b) consumo médio de ração (g) para o grupo.	55
Figura 12 - Histologia do fígado dos animais dos grupos experimentais.	59
Figura 13 - Histologia dos rins de animais dos grupos experimentais	61
Figura 14 - Concentração de cádmio <i>versus</i> massa dos órgãos, frente aos diferentes tratamentos do ensaio de toxicidade aguda. Dados em média ± erro-padrão da média.	63
Figura 15 - Frequência de eritrócitos policromáticos (EPC) micronucleados, detectados no teste do micronúcleo, em camundongos tratados com PQ, PQ-SteLL, PQ-PgTeL e controles positivo (MTX) e negativo (NaCl 0,9%).	66

Figura 16 - Perfil de biodistribuição de cádmio nos órgãos de animais portadores de sarcoma 180, após 24 h da administração intraperitoneal dos compostos.	70
Figura 17 - Perfil de biodistribuição de cádmio no fígado, baço e rins de animais portadores de sarcoma 180, após 24 horas da administração intraperitoneal dos compostos.	72
Figura 18 - Perfil de biodistribuição de cádmio em duodeno, coração e pulmão de animais portadores de sarcoma 180, após 24 h da administração intraperitoneal dos compostos.	73
Figura 19 - Acumulação de cádmio na massa tumoral de animais portadores de sarcoma-180, após 24 horas da administração intraperitoneal dos compostos.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lectinas com atividade antitumoral isoladas em estruturas de diferentes espécies vegetais.....	20
Tabela 2 - Métodos utilizados para avaliação de percentual de radiomaração e impurezas de ^{99m}Tc -SteLL.....	38
Tabela 3 - Fatores de retenção (RF) para tecnécio hidrolisado e pertecnetato livre, sob diferentes condições cromatográficas.	50
Tabela 4 - Sinais clínico-comportamentais registrados nos diferentes animais e grupos estudados.....	54
Tabela 5 - Média $\pm$ desvio-padrão dos pesos inicial, final e variação em 14 dias, entre os animais de diferentes grupos.....	54
Tabela 6 - Parâmetros hematológicos dos animais tratados. Valores representam média $\pm$ erro-padrão da média (n=5 animais/grupo). Sem diferenças significativas (p < 0,05) ao comparar os grupos tratados ao grupo controle (NaCl 0,9%).	57
Tabela 7 - Parâmetros bioquímicos dos animais tratados. Valores representam média $\pm$ erro-padrão da média (n=5 animais/grupo).	58
Tabela 8 - Avaliação da qualidade do processo analítico empregado para quantificação de cádmio nos órgãos de animais controle e tratados.....	62
Tabela 9 - Índices de dano para cada classe e frequência de dano no ensaio cometa, em camundongos tratados com PQ, PQ-SteLL, PQ-PgTeL e controles.	65
Tabela 10 - Micronutrientes (elementos) quantificados em baço (a), rim (b) e fígado (c) dos animais tratados. Valores expressos em média $\pm$ erro-padrão da média (n=5 animais/grupo). p > 0,05 entre todos os grupos.	68
Tabela 11 - Avaliação da qualidade do processo analítico empregado para quantificação de cádmio nos órgãos de animais controle e tratados.....	69
Tabela 12 - Concentração de cádmio (mg/kg) em órgãos de camundongos tratados com PQ, PQ-SteLL, PQ-PgTeL e controles.....	71

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	LECTINAS: DEFINIÇÃO, ORIGENS e POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO.....	16
2.2	LECTINAS DE ORIGEM VEGETAL.....	18
2.3	LECTINAS DAS FOLHAS DE <i>Schinus terebinthifolia</i> E DA SARCOTESTA DE <i>Punica granatum</i>	20
2.4	MODELO EXPERIMENTAL SARCOMA 180	25
2.5	CONJUGAÇÃO DE PROTEÍNAS E LECTINAS	27
2.5.1	Radiomarcção.....	27
3	OBJETIVOS.....	33
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE STELL	34
4.2	ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE PgTeL	35
4.3	RADIOMARCAÇÃO E CONTROLE DA QUALIDADE.....	36
4.4	CONJUGAÇÃO A PONTOS QUÂNTICOS	39
4.5	ESTUDO DE TOXICIDADE AGUDA.....	40
4.5.1	Tratamentos.....	40
4.5.2	Parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	41
4.5.3	Análise histopatológica.....	41
4.5.4	Quantificação de Cádmio.....	42
4.5.5	Avaliação de genotoxicidade	42
4.5.6	Quantificação de Micronutrientes.....	44
4.6	ESTUDO DE BIODISTRIBUIÇÃO EM ANIMAIS PORTADORES DE SARCOMA 180.....	45
4.6.1	Implante do tumor e administração dos compostos	46
4.6.2	Digestão dos órgãos e análise por meio de forno de grafite	47
4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE STELL E PgTeL	49
5.2	RADIOMARCAÇÃO E CONTROLE DA QUALIDADE.....	49
5.3	CONJUGAÇÃO A PONTOS QUÂNTICOS	52

5.4	ESTUDO DE TOXICIDADE AGUDA.....	53
5.4.1	Parâmetros hematológicos e bioquímicos.....	56
5.4.2	Análises histopatológicas.....	58
5.4.3	Quantificação de Cádmio.....	62
5.4.1	Genotoxicidade.....	64
5.4.3	Quantificação de Micronutrientes.....	66
5.5	ESTUDO DE BIODISTRIBUIÇÃO EM ANIMAIS PORTADORES DE SARCOMA 180.....	69
6	CONCLUSÕES.....	76
	REFERÊNCIAS.....	77
	ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	89

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, os desafios mais importantes da Oncologia estão relacionados com a resistência tumoral às drogas clássicas e a fatores individualizados de cada paciente, tais como cargas genética e genômica. Além disso, os sinalizadores tumorais atualmente usados para rastreio e diagnóstico apresentam limitações, como exemplo a indicação de casos falso-positivos. Entretanto, acredita-se que estes problemas possam ser solucionados com o desenvolvimento de novos fármacos e sistemas diagnósticos (DAGOGO-JACK; SHAW, 2018). Como exemplo de novos sistemas diagnósticos, é possível citar diferentes sondas diagnósticas acopladas a nanopartículas (MADAMSETTY; MUKHERJEE; MUKHERJEE, 2019), peptídeos (BAUM; KULKARNI; CARRERAS, 2012), proteínas sintéticas e naturais (SHI *et al.*, 2011), dentre outros.

Uma alternativa investigada é o uso de compostos naturais como matéria-prima para obtenção de novos agentes diagnósticos (PUNIA; AND; MONTCLARE, 2019; SUN *et al.*, 2019). Além disto, a busca por compostos naturais tem se tornado um alvo de inúmeros estudos, devido à boa biocompatibilidade quando aplicados *in vivo* (LEE *et al.*, 2019). Dentre os derivados naturais investigados estão as proteínas de origem vegetal (SCHILLER *et al.*, 2013; ZHAO; BUTLER; TAN, 2013).

Entre as proteínas naturais, merece atenção a classe das lectinas. Estas podem ser encontradas em animais e plantas, sendo uma característica importante deste grupo sua capacidade de se ligar específica e reversivelmente a carboidratos. Dentre esses carboidratos, lectinas podem ser capazes de reconhecer especificamente glicanos aberrantes presentes na membrana celular de células tumorais, ativando a apoptose e outras vias para eliminação do tumor (CAGNONI *et al.*, 2016; DE CARVALHO PATRICIO *et al.*, 2011; FU *et al.*, 2011; PAZ *et al.*, 2001; PROCÓPIO *et al.*, 2015).

Recentemente, Ramos e colaboradores (2019) investigaram a atividade antitumoral da lectina extraída das folhas de *Schinus terebinthifolia* (SteLL), constatando que esta apresenta ação antitumoral *in vivo* (RAMOS *et al.*, 2019). SteLL não apresentou toxicidade *in vitro* para esplenócitos de camundongo (SANTOS *et al.*, 2021). Em outro estudo, foi mostrado que PgTeL, uma lectina isolada da sarcotesta do fruto de *Punica granatum* (romã) não apresentou ações tóxica e genotóxica *in vivo* em camundongos quando administrada na dose de 100 mg/kg por via intraperitoneal (SILVA *et al.*, 2022). Outro estudo comprovou a ação antitumoral de suco de romã (*Punica granatum*), quando administrado a camundongos portadores do sarcoma de Erlich (HABIBA *et al.*, 2019). Resultados como esse sugerem que ambas as lectinas possuem

afinidade por tecidos tumorais, e podem integrar novos sistemas diagnósticos, isentos ou de baixa toxicidade, uma vez que sejam conjugadas a marcadores de imagem.

Uma abordagem para preparação de novos sistemas diagnósticos é a radiomarcagem. Esta pode ser aplicada a proteínas e peptídeos, originando radiofármacos para diagnóstico e acompanhamento de diversas doenças, principalmente o câncer. De fato, inúmeros são os estudos acerca deste tema, mas raros são os que relatam a radiomarcagem de proteínas e lectinas de origem vegetal (DE CARVALHO PATRICIO *et al.*, 2011; SUN *et al.*, 2014; MORRIS *et al.*, 2018; HIRABAYASHI; ARAI, 2019).

Outra abordagem útil na obtenção de proteínas diagnósticas é a conjugação a marcadores fluorescentes, a exemplo dos pontos quânticos (PQs). Neste aspecto, muitos estudos foram publicados, mas poucos relatam a conjugação de lectinas de origem vegetal a pontos quânticos para aplicação *in vivo* destes conjugados, o que é etapa crucial na aquisição de novos sinalizadores de câncer (XING; RAO, 2008; CUNHA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2021).

Dessa forma, o objetivo dessa tese foi investigar protocolos para conjugação das lectinas SteLL e PgTeL ao tecnécio metaestável (^{99m}Tc) e a PQs de telureto de cádmio (CdTe), bem como obter os perfis *in vivo* de toxicidade aguda, comportamento biológico e biodistribuição dos conjugados. A radiomarcagem e conjugação das lectinas citadas, bem como o conhecimento do comportamento biológico dos sistemas, poderá confirmar a especificidade das lectinas pelos tumores, bem como futuramente originar novos agentes sinalizadores de câncer.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LECTINAS: DEFINIÇÃO, ORIGENS E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Da menor bactéria ao ser humano, a membrana plasmática de cada uma das células contém uma variedade de arranjos de glicanos. Estes glicanos, quando combinados às proteínas e lipídeos, dão origem a glicoproteínas e glicolipídeos, que exercem papéis importantes nos organismos, incluindo funções metabólicas, estruturais e de reconhecimento entre células, patógenos e moléculas (BARRÉ *et al.*, 2019).

As glicoproteínas possuem funções importantes e específicas no que diz respeito às interações células-matriz, nos processos de desenvolvimento embrionário, crescimento e diferenciação celular e no reconhecimento de células estranhas ou alteradas (LASTOVICKOVA; STROUHALOVA; BOBALOVA, 2020). Os oligossacarídeos presentes nas glicoproteínas podem ser agrupados em duas classes: “*N*-ligados” e “*O*-ligados”. A primeira se caracteriza por presença de ligação *N*-glicosídica via grupamento amida do aminoácido asparagina; enquanto os açúcares *O*-ligados se caracterizam pela união à proteína via ligação glicosídica com grupos OH em aminoácidos serina, treonina ou hidroxilisina (WU *et al.*, 2001; LASTOVICKOVA; STROUHALOVA; BOBALOVA, 2020).

Algumas áreas da Biologia consideram os diferentes conjuntos de glicanos e glicoproteínas como “o terceiro código da vida” ou glicocódigo, sendo capaz de armazenar muito mais informações do que o genoma e o proteoma. O glicocódigo é característico para cada tipo celular e ainda são desconhecidos os mecanismos que alteram e coordenam a síntese dele. Porém, sabe-se que as lectinas são excelentes “decodificadoras” de glicanos (CORFIELD, 2017).

As lectinas são uma classe de proteínas ligadoras de carboidratos de grande importância biológica. Parte dessa importância deve-se ao fato de que as lectinas estão fortemente envolvidas nos processos de reconhecimento célula-célula, molécula-molécula e molécula-célula. Por exemplo: lectinas estão envolvidas nas relações simbióticas e patogênicas, como reconhecimento de microrganismos e vírus, nas reações de fixação de células de metástases, dentre outros processos (RIBEIRO; FERREIRA; FREITAS, 2018).

As lectinas permitem a discriminação entre estruturas de glicanos e a separação e determinação de estruturas de oligossacarídeos e glicopeptídeos. Além disso, elas podem ser usadas para isolar um glicoconjugado, célula ou vírus de amostras, ou para purificar e detectar glicoproteínas com cadeias de glicanos patologicamente alteradas. Muitas lectinas diferentes,

geralmente classificadas com base na especificidade de carboidratos, estão disponíveis (HAGE *et al.*, 2012; RUIZ-MAY *et al.*, 2014; S. COULIBALY; C. YOUAN, 2017).

Uma lectina com especificidade a um determinado oligossacarídeo pode ser biotecnologicamente conjugada a um metabólito, peptídeo ou proteína, e ser utilizada para sinalizar células e tecidos. De fato, várias técnicas baseadas em lectinas podem ser usadas na pesquisa de biomarcadores de câncer: cromatografia de afinidade de lectina (LAC), ensaio de lectina ligada a enzima (ELLA), histoquímica com lectinas, *blotting* de lectinas, dentre outras (LASTOVICKOVA; STROUHALOVA; BOBALOVA, 2020). Quando conjugadas a nanopartículas fluorescentes, radioisótopos ou outros sinalizadores, as lectinas tornam-se potenciais agentes sinalizadores (BLOISE *et al.*, 2021).

Neste cenário cabe destacar uma técnica denominada *microarray* de lectinas, onde um conjunto de lectinas conhecidas é imobilizado em um suporte sólido, o que possibilita a análise de complexos de carboidratos presentes em glicoproteínas do soro, células e tecidos (HIRABAYASHI *et al.*, 2013; GUPTA *et al.*, 2020). Nessa técnica também podem ser usados compostos fluorescentes, o que aumenta a sensibilidade de detecção (KUNO *et al.*, 2005).

Em se falando de tratamento, a terapia dirigida, ou terapia-alvo, ocorre quando há conjugação de nanopartículas, ou outros agentes terapêuticos, com componentes específicos para um dado receptor ou molécula tumoral (BHUTIA *et al.*, 2019). Esse tipo de terapia usa como carreadores os anticorpos monoclonais e outras moléculas menores, como as lectinas. Alguns destes conjugados com anticorpos monoclonais são aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*, EUA), uma vez que possuem tolerabilidade biológica e efetividade frente ao tratamento de diversos tumores. Sabe-se que esses conjugados se ligam a componentes extracelulares denominados ligantes e/ou domínios de ligação, e agem sozinhos ou em simbiose com toxinas, quimioterápicos e radioterápicos (RIBEIRO; FERREIRA; FREITAS, 2018).

É um fato que, na quimioterapia convencional, somente uma pequena concentração do quimioterápico efetivamente chega no tumor, devido à ação do sistema retículo-endotelial, que sequestra a droga. Utilizando da especificidade das lectinas frente a tumores, a Nanotecnologia busca vencer a resistência de alguns tumores aos quimioterápicos convencionais, bem como aumentar a taxa de entrega de drogas anticâncer aos sítios tumorais, quando conjugadas às lectinas (YAMAZAKI *et al.*, 2000).

Para aumentar a especificidade das drogas anticâncer, o conjugado deverá idealmente ser captado pela célula alvo, sem ser captado ou captado fracamente com os tecidos adjacentes, de forma a aumentar a especificidade e diminuir ou aniquilar toxicidade em tecidos saudáveis (HU; TATENO; HIRABAYASHI, 2015). Vale ressaltar que é a especificidade das lectinas que garante

o sucesso da terapia-alvo. A partir dessa especificidade, as lectinas têm sido extensamente aplicadas em processos de tipagem e marcação celular, coloração histoquímica, fracionamento de glicoproteínas, dentre outros (LABBÉ *et al.*, 2019). Muitas destas lectinas são de origem vegetal, sendo algumas abordadas em seguida.

2.2 LECTINAS DE ORIGEM VEGETAL

Ao serem agrupadas em relação às suas propriedades de ligação, as lectinas de plantas podem ser subdivididas em diferentes grupos, como, por exemplo, lectinas ligadoras de manose, lectinas ligadoras de galactose/N-acetil-galactosamina, lectinas ligadoras de fucose, entre outras (TEIXEIRA *et al.*, 2018; TSANEVA; DAMME, 2020).

Devido à enorme quantidade de dados estruturais e funcionais que foram acumulados por várias décadas, as lectinas tornaram-se ferramentas para decifrar as relações estrutura-função associadas às macromoléculas. A este respeito, as lectinas ligadoras de manose, representam um importante grupo de proteínas funcionais, levando em conta a ampla distribuição biológica dos *N*-glicanos contendo manose (BARRE *et al.*, 2019).

Até o momento, várias lectinas foram identificadas em muitas famílias de plantas diferentes. Dentre estas se pode citar o trabalho pioneiro de Agrawal & Goldstein (1965), que relataram que a concanavalina A (ConA), a lectina das sementes de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), era facilmente purificada por simples filtração através de uma coluna contendo gel de dextrano reticulado, com subsequente eluição pela adição de glicose ou manose ao tampão de eluição. Desde então, ConA tem sido aplicada em diversos ensaios sobre glicosilação (MARTÍNEZ-CARMONA *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2018; SIMÕES *et al.*, 2020).

Algumas lectinas reconhecem perfis de glicosilação anormais nas células, como por exemplo *N*-glicanos fucosilados de células cancerígenas, podendo ser usadas como biomarcadores para a detecção de glicoformas de câncer (OKUYAMA *et al.*, 2009). Podemos citar as lectinas LcA de *Lens culinaris* (lentilha), PsA de *Pisum sativum* (ervilha) e LoL-I de *Lathyrus ochrus* (ervilha-do-campo), que mostram forte ligação a *N*-glicanos mono e bi-antenários fucosilados no núcleo de células cancerígenas (DEBRAY; ROUGÉ, 1984; TATENO; NAKAMURA-TSURUTA; HIRABAYASHI, 2009).

De fato, diversos estudos mostram a aplicação de diferentes lectinas de origem vegetal na sinalização de perfis anormais de glicosilação, presentes em várias doenças, incluindo o câncer. Um desses estudos é recente, de Fard e colaboradores (2022), onde foi possível sinalizar linhagens de células cerebrais com diferentes perfis de glicosilação. Os autores realizaram a

conjugação de partículas de nanodiamantes fluorescentes com as lectinas WGA (do gérmen do trigo, *Triticum aestivum*), TL (do tomate, *Lycopersicon esculentum*) e AAL (do fungo pezizalaranja, *Aleuria aurantia*). Estes conjugados marcaram de forma diferente os tipos de células cerebrais, com o conjugado AAL/Nanodiamante (ND) captado preferencialmente por astrócitos de glioblastoma U87-MG, WGA/ND por células de fenótipo neuronal PC12 e TL/ND pelas células microgliais BV-2 (FARD *et al.*, 2022).

Narimatsu e Sato (2018) revisaram as aplicações da lectina de *Wisteria floribunda*, planta chamada comumente de glicínia, como prova para reconhecimento de glicanos aberrantes secretados por células doentes. Os autores confirmam que a lectina em questão pode ser aplicada como biomarcadora de doenças como fibrose hepática, câncer de próstata, câncer de ovário, dentre outros (NARIMATSU; SATO, 2018).

Mas as potencialidades das lectinas vegetais não se restringem apenas à sinalização celular. Ao longo dos anos, diferentes estudos mostram a utilização destas no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas e como potenciais quimioterápicos anticâncer (RAMOS *et al.*, 2019; GOMES *et al.*, 2013). Sobre o potencial antimicrobiano das lectinas, cabe citar os estudos com a lectina PgTeL, extraída da sarcotesta da romã (*Punica granatum*). Constatou-se que PgTeL apresenta efeito antibacteriano contra diferentes espécies (SILVA *et al.*, 2016, 2019a, 2019b, 2021) e antifúngico (SILVA *et al.*, 2018). PgTeL também se mostrou, quando conjugada a pontos quânticos, como uma molécula para estudo do perfil de glicosilação em fungos, a exemplo o *Cryptococcus neoformans* (SILVA *et al.*, 2021). Devido a essa importância, PgTeL foi uma das lectinas de escolha para esta tese.

Como citado, lectinas também se apresentam como potenciais agentes anticâncer. A Tabela 1 mostra algumas das lectinas de origem vegetal que apresentam atividade antitumoral, dentre elas SteLL, extraída das folhas de *Schinus terebinthifolia*, conhecida popularmente como aroeira-da-praia. Esta lectina também será alvo desta tese (RAMOS *et al.*, 2019; HABIBA *et al.*, 2019).

Tabela 1- Lectinas com atividade antitumoral isoladas em estruturas de diferentes espécies vegetais.

Planta	Estrutura	Lectina	Linhagem Tumoral	Referência
<i>Schinus terebinthifolia</i>	Folha	SteLL	Sarcoma-180	RAMOS <i>et al.</i> , 2019.
<i>Microgramma vacciniifolia</i>	Fronde	MvFL	Sarcoma-180	PATRIOTA <i>et al.</i> , 2021.
<i>Viscum album</i>	Folha	VAA-I VAA-II	HUVEC ^a IVEC ^b	VAN HUYEN <i>et al.</i> , 2002.
<i>Sophora flavescens</i>	Rizoma	SFL	HeLa ^c	LIU <i>et al.</i> , 2008.
<i>Polygonatum cyrtonema</i>	Rizoma	PCL	A375 ^d	LIU <i>et al.</i> , 2009.
<i>Calliandra surinamensis</i>	Folha	CasuL	K562 ^e	PROCÓPIO <i>et al.</i> , 2017.
<i>Moringa oleifera</i>	Semente	cMoL	B16-F10 ^f	DE ANDRADE LUZ <i>et al.</i> , 2017.
<i>Microgramma vacciniifolia</i>	Rizoma	MvRL	Carcinoma de Erlich	DA SILVA <i>et al.</i> , 2022.

a: modelo tumoral de células endoteliais de cordão umbilical humano; b: células venosas endoteliais imortalizadas; c: células do carcinoma cervical de Lack; d: células de melanoma humano; e: células de leucemia mieloide crônica; f: células de melanoma murino.

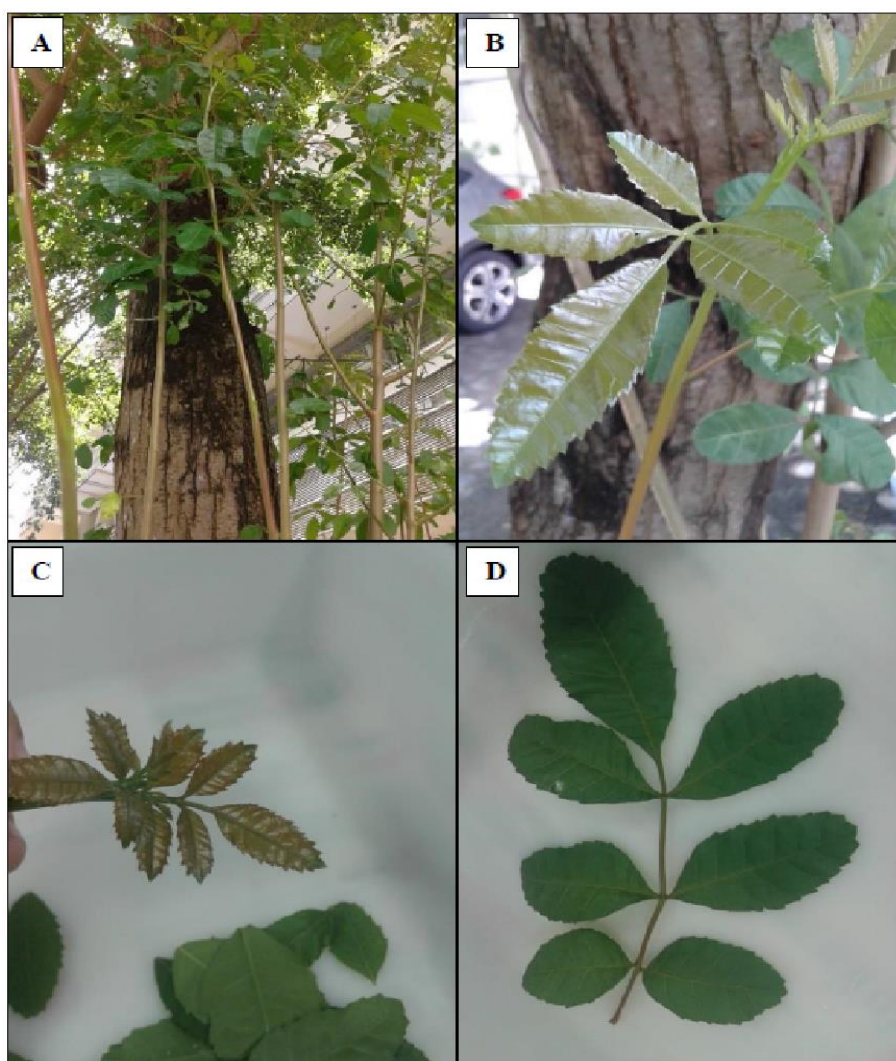
2.3 LECTINAS DAS FOLHAS DE *SCHINUS TEREBINTHIFOLIA* E DA SARCOTESTA DE *PUNICA GRANATUM*

Schinus terebinthifolia Raddi é uma planta amplamente usada na medicina popular, também conhecida como aroeira-da-praia, aroeira vermelha, pimenteira rosa, dentre outros nomes (CARVALHO *et al.*, 2013; GOMES *et al.*, 2013). É utilizada popularmente no tratamento de doenças geniturinárias e também como antitérmica, anti-inflamatória, antibacteriana, antiulcerogênica, dentre outras aplicações (CARVALHO *et al.*, 2013).

Os espécimes de *S. terebinthifolia* são caracterizados por plantas arbóreas que podem atingir até 10 metros de altura, constituídas por folhas pecioladas de cor verde, com nervuras

levemente amareladas (Figura 1). Seu tronco é geralmente retorcido, bastante ramificado, de cor cinza ou parda, áspero, rugoso e com sulcos. Uma característica deste último é sua capacidade de exalar forte cheiro de terebintina, um potente hidrocarboneto antifúngico. Seus frutos são globosos, pequenos e vermelho-rosados (CESÁRIO; GAGLIANONE, 2008; ULIANA *et al.*, 2016).

Figura 1 – Árvore da espécie *Schinus terebinthifolia* e suas estruturas. (A) Árvore localizada em frente ao Departamento de Patologia, na Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE. (B) Folhas e caule da planta, mostrando as fissuras longitudinais. (C) Folhas jovens, de coloração avermelhada. (D) Folha madura.



Fonte: retirado da tese de Ramos, 2019.

Todas as partes citadas desta planta foram e ainda são objeto de investigações frente a diferentes doenças. Além disso, *S. terebinthifolia* é uma das plantas incluídas na Relação

Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, desenvolvida pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2014).

Dos frutos desta espécie, Bendaoud e colaboradores (2010) extraíram um óleo essencial, que mostrou a presença de 62 compostos, como exemplo os alfa e beta-felandreno, alfa terpinol, alfa e beta-fineno, dentre outros. Os autores estimam que estes compostos foram responsáveis pelas atividades antitumorais e antioxidante, *in vitro*, apresentadas pelo óleo em questão (BENDAOU *et al.*, 2010).

Fedel-Miyasato e colaboradores (2014) avaliaram a capacidade anti-inflamatória, imunomoduladora, quimiopreventiva e curadora de feridas do extrato metanólico das folhas de *S. terebinthifolia*. Seus resultados mostraram que a atividade anti-inflamatória do extrato metanólico foi semelhante à da dexametasona, para redução de edema. Além disso, o extrato apresentou ação cicatrizante semelhante à apresentada pela collagenase. O extrato metanólico não foi genotóxico nem mutagênico e, em contrapartida, possui atividade quimiopreventiva, e antimutagênica, avaliada por ensaio cometa e micronúcleo. Quando analisado por cromatografia líquida (LC), o extrato metanólico apresentou ácido fenólico e flavonoides (FEDEL-MIYASATO *et al.*, 2014).

Em se tratando de lectinas, Gomes *et al.* (2013) descreveram o isolamento e a caracterização de uma lectina das folhas de *S. terebinthifolia*, denominada SteLL. Esta é uma proteína básica com atividade hemaglutinante estável a temperaturas entre 30 e 100 °C e pH entre 5 e 8 (GOMES *et al.*, 2013) e inibida pelas glicoproteínas fetuína, ovalbumina e azocaseína (SILVA *et al.*, 2021). SteLL apresentou uma massa molecular nativa de 12,4 kDa e apresentou semelhanças na sequência primária com uma adenosina trifosfato (ATP) sintase e uma F1-ATPase de plantas (SANTOS *et al.*, 2020).

SteLL apresentou ação antimicrobiana frente a diferentes espécies de bactérias e ao fungo *Candida albicans* (GOMES *et al.*, 2013), bem como ação imunomoduladora sobre esplenócitos de camundongo *in vitro* (SANTOS *et al.*, 2020). Nesse último caso, mostrou-se que SteLL apresenta efeito imunomodulatório, devido aos seguintes mecanismos: estímulo de liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-17A, TNF- α , IFN- γ e IL-2), e da citocina anti-inflamatória IL-4, bem como a redução na secreção de óxido nítrico. Ainda nesse aspecto, SteLL aumentou a ação bactericida dos macrófagos contra *Staphylococcus aureus*, por meio de estímulo de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-10, IL-17A e TNF- α), óxido nítrico e ânion superóxido. Neste mesmo estudo foi possível constatar também a ação antimicrobiana de SteLL é parcialmente inibida pela *N*-Acetilglucosamina (LIMA *et al.*, 2019). SteLL apresentou ação antinociceptiva central e periférica em camundongos, sendo seu efeito mediado pelo domínio

de ligação a carboidratos e via receptores delta-opioides (MARINHO *et al.*, 2023). Ainda, foi demonstrado o efeito ansiolítico de SteLL, o qual envolve vias de sinalização monoaminérgicas (LIMA *et al.*, 2022).

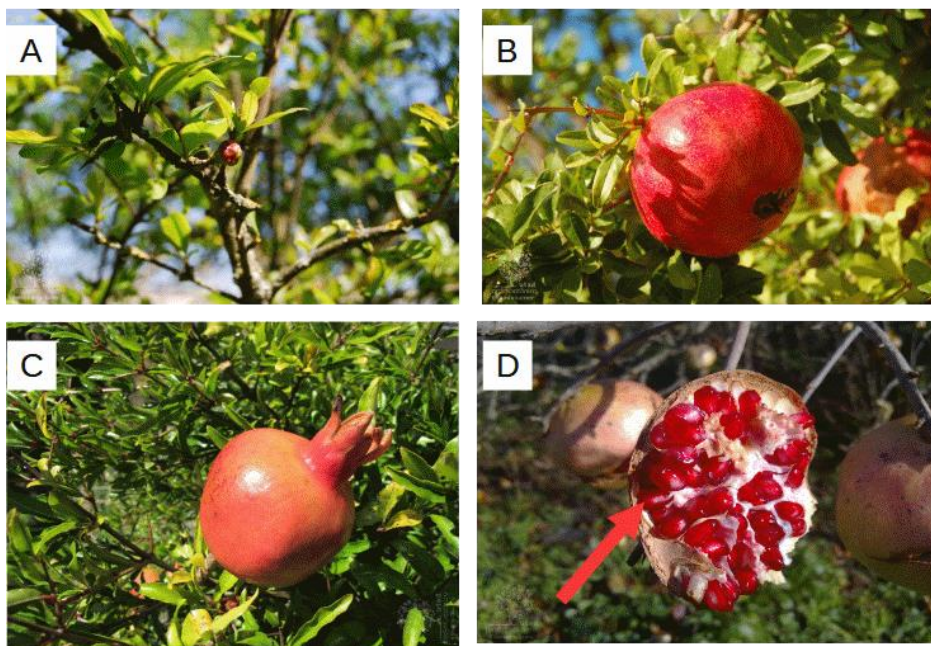
Ramos *et al.* (2019) demonstraram que SteLL induz apoptose em células tumorais de sarcoma-180 *in vitro*. Além disso, quando administrada intraperitonealmente em camundongos, a lectina em questão causou redução do tamanho de tumores do mesmo tipo, bem como redução da vascularização ao redor do sarcoma, sugerindo um efeito antiangiogênico. Neste caso, a ação da lectina se comparou à do metotrexato (controle positivo), mas sem induzir alterações hematológicas e genotóxicas nos animais tratados. Também se constatou que SteLL reduziu o quadro de hiperalgisia devido à presença do sarcoma 180 nas patas de camundongos, devido à sua ação antitumoral e efeito antinociceptivo (RAMOS *et al.*, 2020). Santos *et al.* (2022) demonstraram que SteLL realmente exerce efeito antiangiogênico, utilizando modelo de vascularização em embriões de *Coturnix japonica*. É importante destacar que a ação imunomoduladora descrita para SteLL pode estar direta ou indiretamente ligada à suas capacidades antitumoral e anti-infecciosa (SANTOS *et al.*, 2020).

Além de *S. terebinthifolia*, outra planta medicinal bastante conhecida e estudada é a romãzeira (*Punica granatum*). Esta é um arbusto da família Lythraceae, bastante utilizada na medicina popular e ayurvédica. Seu fruto, a romã, é utilizado popularmente desde a Antiguidade, no controle da diabetes, doenças cardiovasculares, obesidade, infecções bacterianas, inflamações do trato respiratório superior, dentre outros (HABIBA *et al.*, 2019). Este fruto é envolto por uma casca amarelo-avermelhada, semi-rígida, que protege as sementes e a sarcotesta (material gelatinoso que envolve as sementes) (Figura 2).

Extratos da romã são uma rica fonte de fenóis, antocianinas e outros compostos antioxidantes (BASTOS *et al.*, 2018). Além disso, a sarcotesta deste fruto contém uma lectina denominada PgTeL, que é uma proteína de 26 kDa, ligadora de quitina e termoestável, e que recentemente vem recebendo atenção devido às suas atividades antibacteriana e antifúngica (SILVA *et al.*, 2016, 2018, 2019a, 2019b, 2021).

O procedimento de purificação de PgTeL foi estabelecido por Silva e colaboradores (2016), que também constataram, *in vitro*, a ação bacteriostática e bactericida desta lectina, frente a cepas de *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens* e *Streptococcus mutans* (SILVA *et al.*, 2016).

Figura 2 – Partes da romãzeira (*Punica granatum*).



a) galhos e folhas; b) fruto maduro; c) fruto em estágio de maturação; d) fruto maduro, evidenciando sementes envolvidas pela sarcotesta (seta vermelha). Fonte: Jardim Botânico UTAD, 2022.

Posteriormente, Silva e colaboradores (2018) também observaram que PgTeL apresenta ação antifúngica, *in vitro*, frente a cepas de *Candida albicans* e *Candida krusei*, por meio de mecanismos que envolvem o estresse oxidativo, colapso energético, dano à parede celular e ruptura das células leveduriformes (SILVA *et al.*, 2018). Em seguida, também foi constatado que PgTeL apresenta capacidade de inibir agregação e formação de biofilme em cepas de *Staphylococcus aureus*, isoladas de espécimes clínicos (SILVA *et al.*, 2019a).

PgTeL mostrou atividade antibacteriana *in vitro* contra cepas resistentes de *E. coli*, bem como atraso no crescimento bacteriano e alterações no tamanho e na forma das bactérias expostas. Além disso, PgTeL mostrou sinergismo com diferentes classes de antibióticos, e inibição da formação de biofilmes (SILVA *et al.*, 2019b). Estes achados se assemelham aos encontrados para PgTeL frente cepas de *Listeria monocytogenes*, que tiveram o crescimento inibido, aumento da taxa de morte celular, inibição da formação de biofilme, da adesão e da capacidade de invasão a células humanas (SILVA *et al.*, 2021).

Estudo recente acerca da toxicidade de PgTeL revelou que, *in vitro*, a lectina não apresenta afeitos hemolítico ou citotóxico. Além disso, quando administrada *in vivo*, via intraperitoneal, numa dose de 100 mg/kg, a lectina não induziu danos genotóxicos, alterações hematológicas, bioquímicas e nem a nível de órgãos (SILVA *et al.*, 2022). Ou seja: PgTeL não

induz toxicidade aguda, o que abre a possibilidade de esta ser aplicada na investigação de novos compostos biotecnológicos.

Habiba *et al.* (2019) descreveram a ação do suco da sarcotesta da romã frente a células todo carcinoma de Erlich, *in vivo*. Nos animais tratados por meio de gavagem, o número de células tumorais foi significativamente reduzido, sendo comprovado que o suco em questão foi capaz de induzir apoptose tumoral (HABIBA *et al.*, 2019) Os autores atribuíram esse resultado à grande concentração de polifenóis e de lectinas no suco.

2.4 MODELO EXPERIMENTAL SARCOMA 180

O sarcoma 180 (S-180) é um tipo de tumor transplantável, não metastizante e originado nos tecidos conectivos de camundongos (ZUCKERBERG, 1973). Foi descoberto em 1914 e desde então é utilizado como uma das primeiras escolhas de modelos tumorais *in vivo* (ESPERANÇA-MARTINS *et al.*, 2021). Uma das provas da importância do S-180 para estudos *in vivo* pode ser constatada ao pesquisar, na base de dados PubMed, os termos “sarcoma AND antitumoral”. Cerca de 2.972 artigos são obtidos, a maioria deles mostrando a aplicação de S-180 na descoberta de mecanismos e drogas que exerçam função antitumoral.

Estima-se que a grande taxa de aplicação de S-180 nos estudos *in vivo* se deve ao fato de que este tipo de tumor cresce rapidamente quando inoculado em camundongos, tendo cerca de 90% de inoculações bem-sucedidas. Além disso, este modelo tumoral é de fácil obtenção e transplante aos animais e após 15 dias de inoculação já apresenta tamanho e forma visivelmente satisfatórios para investigação de candidatos a drogas sinalizadoras e antitumorais (POST, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

O modelo tumoral em questão foi anteriormente utilizado na investigação de potenciais agentes anticâncer sintéticos (GAO *et al.*, 2017), derivados de cogumelos (SINGH; KAUR; KANWAR, 2016), extratos de plantas (OLIVEIRA *et al.*, 2013; CHENG; LIU; WANG, 2021) e lectinas de origem vegetal. Utilizando modelo animal com S-180, Zuo *et al.* constataram o efeito antitumoral da lectina extraída dos bulbos de *Pinellia ternata* (ZUO *et al.*, 2012). Estudo semelhante foi realizado por Cunha *et al.* (2016), onde se concluiu que a lectina das sementes de *Cratylia mollis*, quando encapsulada em lipossomas, tem aumento da sua internalização em células de S-180. Além da redução do tamanho tumoral, os autores também investigam parâmetros bioquímicos e imunológicos nos animais portadores de S-180, o que pode esclarecer os mecanismos envolvidos no modo de ação das drogas em pesquisa (CUNHA *et al.*, 2016).

Outro estudo foi o de Bastos *et al.* (2018), que usou de S-180 para constatar ação antitumoral do extrato da romã (*P. granatum*). Os autores concluíram que o extrato aquoso da polpa da romã foi capaz de induzir apoptose e inibir o crescimento tumoral, em comparação à solução salina (BASTOS *et al.*, 2018).

Neste cenário, cabe ressaltar novamente o trabalho de Ramos *et al.* (2019), utilizando S-180, *in vivo*, para investigar a capacidade antitumoral do extrato salino de *S. terebinthifolia* e de SteLL isolada, os autores mostraram a redução dos tumores nos animais tratados. Em adição, as análises visual e histopatológica da massa tumoral mostraram redução significativa no número e calibre de vasos secundários que irrigam o S-180, bem como necrose, sugerindo atividade antiangiogênica da SteLL (RAMOS *et al.*, 2019).

O uso de S-180 para investigação de novos agentes antitumorais e diagnósticos, além de ser bem estabelecido, também permite a coleta de amostras do tumor, para posteriores análises bioquímicas, imunológicas e histopatológicas, que irão fornecer informações acerca da toxicidade, capacidade de reconhecimento e mecanismos de ação das lectinas. Isso pode ser visto em diversos estudos, como o de Cai *et al.* (2012), que mostrou a capacidade imunomodulatória do extrato de *Rhodiola rósea* frente a células de S-180; e o de Ferreira *et al.* (2016), evidenciando a ação antitumoral da fração proteica de *Casearia sylvestris*, também em células de S-180, dentre outros (CAI *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2016).

Estudando a composição da membrana celular de S-180, Shin e Carraway (1973) detectaram a presença de várias glicoproteínas de superfície, a maior parte delas com massas moleculares entre 126 e 250 kDa. Os autores citam que o estudo do comportamento destas glicoproteínas de superfície pode evidenciar o funcionamento das células tumorais, bem como sua detecção (SHIN; CARRAWAY, 1973).

De fato, as alterações das glicoproteínas de superfície são um dos principais indicadores da formação de células cancerígenas, sendo a glicosilação aberrante a alteração mais significativa (RETTIG *et al.*, 1992; HAUN *et al.*, 2014). Estas alterações promovem o comportamento invasivo das células tumorais, o que pode levar a metástases. Logo, os estudos acerca dos diferentes perfis de glicosilação tumoral estão sempre no foco da Glicobiologia, de forma que isso levará à descoberta de novos marcadores glicano-baseados, que podem servir como agentes de diagnóstico e prognóstico tumoral (CHRISTIANSEN *et al.*, 2014).

2.5 CONJUGAÇÃO DE PROTEÍNAS E LECTINAS

2.5.1 Radiomarcção

Desde que a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso de insulina em 1982, os fármacos de natureza proteica encontraram seu espaço na terapia e no diagnóstico. Peptídeos e proteínas radiomarcados vêm chamando atenção, devido às suas numerosas vantagens, que, a depender da proteína, vão desde sua especificidade por receptores câncer-específicos (JAMOUS; HABERKORN; MIER, 2013), até a possibilidade de acoplar diferentes agentes sinalizadores em suas estruturas (SHI *et al.*, 2011).

Atualmente, diferentes peptídeos radiomarcados são investigados em ensaios não clínicos para a sua utilização em câncer (por exemplo ^{111}In -DTPA-Octreído), inflamação e infecção (ex. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RP128), imagenologia de trombos ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Apcitide), aterosclerose (ex. ^{18}F -Endotelina-1), diabetes melittus (ex. peptídeo C da insulina marcado com ^{18}F) e Parkinson (ex. ^{18}F -DOPA), dentre outros. Estes peptídeos/proteínas podem ser utilizados como terapêuticos e como ferramentas de diagnóstico para avaliar a presença ou progressão de uma doença, visto que muitos tipos de tumores mostram superexpressão de receptores que podem ser alvo de ligação desses peptídeos (KNIGHT, 2003; VERNON; BALLARD; MODO, 2010; KOOPMANS; GLAUDEMANS, 2012). Entretanto, devido às diferenças genéticas dentre as classes tumorais, estas podem apresentar variações morfológicas e fenotípicas, o que muitas vezes são responsáveis pela inespecificidade dos fármacos atuais (DAGOGO-JACK; SHAW, 2018).

Devido ao seu maior peso molecular e tamanho em comparação aos fármacos sintéticos, os fármacos proteicos são conhecidas por oferecerem maiores possibilidades de interação com sítios tumorais e fornecerem valiosas informações fisiológicas, como a sinalização de marcadores específicos, quantificação destes marcadores por meio de imagens etc. Logo, esses fármacos permitem o desenvolvimento de terapias específicas aos pacientes e meios para ir além das possibilidades da terapia medicamentosa convencional (SUGIURA *et al.*, 2014).

Nas células tumorais, é comum que determinados receptores proteicos sejam superexpressos. Para imagens moleculares, essa superexpressão fornece um alvo clínico útil. Um exemplo são os receptores CD20 nos linfomas não-Hodgkin, que são alvo para anticorpos proteicos anti-CD20, o que possibilita a utilização desses anticorpos como sinalizadores, por meio de métodos de Imagenologia de radionuclídeos. A maioria destes estudos envolve o

radioisótopo tecnécio metaestável (^{99m}Tc) e anticorpos monoclonais, que são proteínas com função imunológica (BELHOCINE *et al.*, 2002; MANKOFF *et al.*, 2008).

Ao se marcar uma molécula protéica com um ou mais radioisótopos, é possível observar a presença do composto no tumor, por meio da Tomografia por Emissão de Fótons Únicos (SPECT) ou outras técnicas em Imagenologia. A crescente capacidade de funcionalizar proteínas com diferentes cadeias laterais permite a entrega do radionuclídeo a sítios de interesse, como exemplo os tumores. Isto se dá por meio de grupos funcionais que podem ser adicionados, resultando em direcionamento para receptores específicos (IRONS; SCHENK; GIAUQUE, 1976; JEGER *et al.*, 2010).

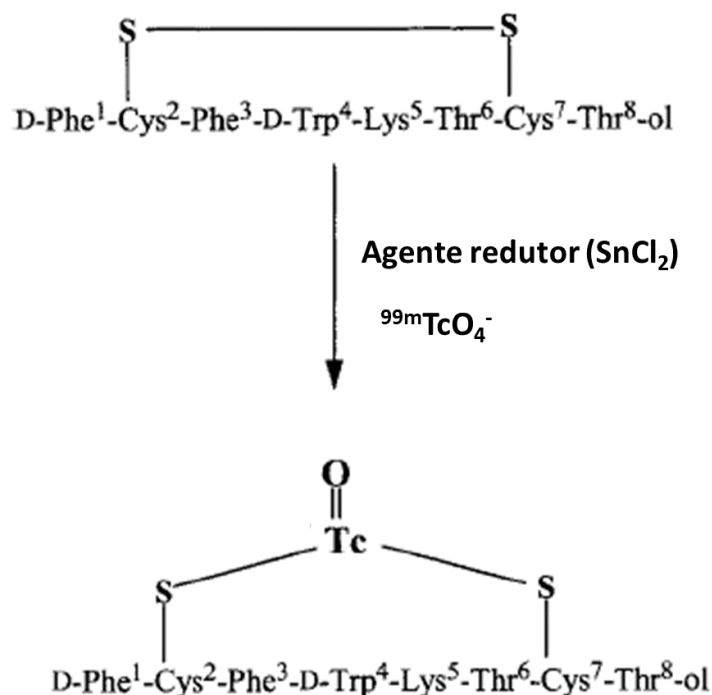
Existem várias estratégias para ligar um radionuclídeo a uma proteína. A escolha da técnica empregada depende, em grande parte, do radionuclídeo utilizado (SUGIURA *et al.*, 2014). Muitas das técnicas presentes na literatura fazem uso de isótopos do iodo-131 e do tecnécio metaestável (^{99m}Tc), os quais podem ser diretamente integrados em uma molécula (GRAHAM; MENDA, 2011; SUZUKI *et al.*, 2011; RICHTER *et al.*, 2015).

Proteínas geralmente contêm o aminoácido cisteína ao longo de sua estrutura. A cisteína é de suma importância no que concerne à radiomarcagem, pois é o único aminoácido natural que contém um grupo tiol, um alvo-chave para a complexação com um radionuclídeo (RANADIVE *et al.*, 1993). Estes grupos tiol possuem a capacidade de formar ligações dissulfeto entre grupos de cisteínas, além disso, são importantes para estrutura e função proteica (ROMBOUTS *et al.*, 2015).

Para que a radiomarcagem seja bem-sucedida, são necessários protocolos que reduzam as pontes dissulfeto formadas pela cisteína, e as transforme em grupos tiol livres, disponíveis para complexar com o radionuclídeo metálico. Existem muitas abordagens capazes de complexar radionuclídeos metálicos nos grupos tióis na estrutura proteica, como as que usam de pequenas concentrações do redutor cloreto estanhoso (SnCl_2) e ácido clorídrico, como forma de reduzir as pontes dissulfeto, permitindo a ligação do tecnécio aos grupos tiol (RHODES; TIJERAS, 2003).

Um estudo com este tipo de abordagem é o de Rahmanian *et al.* (2018). Neste, peptídeos foram incubados em cloreto estanhoso, para acoplar ^{99m}Tc em sua estrutura. O composto obtido apresentou alta pureza radioquímica e alta estabilidade em soro e solução tampão (RAHMANIAN *et al.*, 2018). As etapas de reação detalhadas, do estudo em questão, podem ser exemplificadas na Figura 3.

Figura 3 - Reação de complexação entre Tecnécio e grupamentos cisteínas, presentes em proteínas.



Fonte: Modificado de Okarvi, 2004.

Em relação à radiomarcagem de lectinas, alguns estudos são reportados na literatura. Um deles é o de Lehr e colaboradores (1991), que radiomarcaram a lectina extraída do tomate (*Lycopersicum esculentum*) com o radioisótopo iodo-125 (^{125}I) e mostraram a afinidade desta aos eritrócitos de porco e a células Caco-2 humanas *in vitro* (LEHR *et al.*, 1991). Também há o estudo de Kojima e Jay (1987), que radiomarcaram as lectinas de *Lens culinaris* e *Pisum sativum* (KOJIMA, JAY, 1987) com ^{125}I e gálio-67. Ambas as lectinas, quando administradas via veia caudal em camundongos, mostraram afinidade pelas células tumorais do carcinoma de Erlich.

2.5.2 Conjugação a pontos quânticos

Os pontos quânticos (PQs), do inglês *quantum dots*, são nanocristais semicondutores, com tamanhos variando entre 1,5 a 10 nm. Estes possuem propriedades ópticas fluorescentes únicas e quando excitados, podem emitir luz (MAXWELL *et al.*, 2019).

Os PQs são sintetizados e funcionalizados para executar várias tarefas, como o diagnóstico de doenças e entrega de terapêuticos, podendo servir como um sistema de

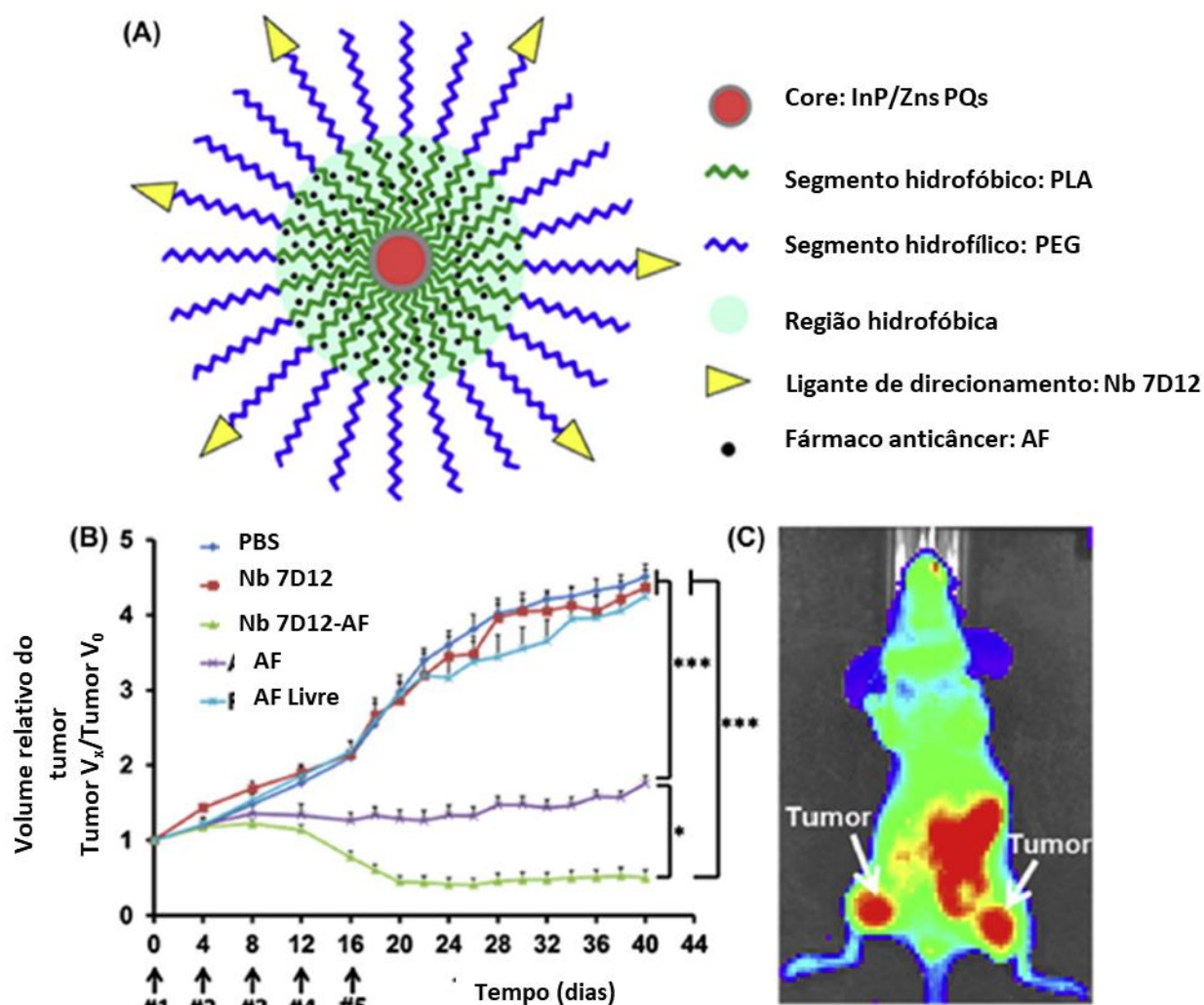
nanopartículas multifuncional. Como um sistema de entrega terapêutica, os PQs podem ser carregados em sua superfície com fármacos anticancerígenos e direcionados ao tecido canceroso, enquanto a fluorescência permitirá a geração de imagens do câncer (HO *et al.*, 2006; XING; RAO, 2008).

Os PQs à base de seleneto de cádmio (CdSe) e telureto de cádmio (CdTe) foram incorporados em vários sistemas compostos de liberação de fármacos, como hidrogéis (WU *et al.*, 2010), sílica (LI *et al.*, 2015), polímeros (SIAFAKA *et al.*, 2021) e lipossomas (OLERILE *et al.*, 2017).

Kang *et al.* (2018) relataram um sistema multifuncional no qual PQs de CdSe associados a paclitaxel (PTX) foram encapsulados em micelas lipídicas (Figura 4). A micela foi direcionada para células cancerosas com receptor de fator de crescimento antiepitérmico (EGFR, receptor comumente superexpresso em câncer). Os resultados da imagem de fluorescência *in vivo* confirmaram a entrada bem-sucedida e a entrega do complexo PQ-PTX-micelas no tecido tumoral de camundongos BALB/c, após 24 h. O sinal fluorescente dos PQs permaneceu elevado no tecido tumoral com o tratamento direcionado ao EGFR, em oposição às micelas não direcionadas. Também foi observado que as micelas direcionadas foram mais eficazes na redução do crescimento tumoral do que as micelas não direcionadas e PTX livre (KANG *et al.*, 2018).

Como é mostrado na Figura 4, a presença dos PQs permitiu que os tumores fossem visualizados por fluorescência NIR *in vivo*, bem como foi útil para monitorar a progressão do tumor. Estudos como esse sugerem a possibilidade de obtenção de novos nanocarreadores, que incorporam vários modos de imageamento (ex. fluorescência e ressonância magnética [MRI] ou tomografia por emissão de pósitrons e fótons [PET/SPECT]), que podem fornecer mais informações sobre a biodistribuição de novos compostos, em comparação aos modos de imageamento tradicionais (XU *et al.*, 2007; MARIANI *et al.*, 2010; MAXWELL *et al.*, 2019).

Figura 4 – Micelas lipídicas contendo droga anticâncer (AF) paclitaxel (PTX) e pontos quânticos (PQs)



Fonte: Modificado de Kang *et al.*, 2018.

a) Estrutura do sistema micela-PQ-AF; b) Volume dos tumores normalizados ao longo do tempo, de sistemas micela-PQ-AF com e sem ligante de direcionamento (Nb 7D12); c) Imagem de camundongo e tumores, obtida em espectro próximo ao infravermelho (NIR), após administração de sistema micela-PQ-Nb 7D12.

Em se falando no uso de PQs conjugados a lectinas, para obtenção de novos compostos para imageamento, alguns trabalhos podem ser citados. Um deles é o de Carvalho e colaboradores (2019), que conjugaram a lectina Cramoll (das sementes de *Cratylia mollis*) a PQs de CdTe, e demonstraram que os conjugados obtidos são específicos e sensíveis na avaliação do perfil glicosilação de células normais e de células do carcinoma ductal invasivo, por meio de imagens de fluorescência *in vitro* (CARVALHO *et al.*, 2019).

Um estudo mais recente, e que comprova as potencialidades dos conjugados PQ-lectinas, é o de Silva e colaboradores (2021). Os autores realizaram conjugação, via adsorção,

de PQs de CdTe às lectinas SteLL e PgTeL, separadamente. Estes conjugados se mostraram estáveis a diferentes situações de estresse térmico e de exposição à ureia, sem prejudicar a capacidade hemaglutinante das lectinas. Além disso, foi constatada a funcionalidade dos conjugados, por meio de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, uma vez que ambos PQ-SteLL e PQ-PgTeL marcaram mais de 90% das células de *Cryptococcus neoformans* *in vitro*. Os autores sugerem que a marcação observada se deve à interação destes conjugados com os carboidratos presentes na parede celular de *C. neoformans*, o que sugere a importância da aplicação destes em estudos de Glicobiologia (SILVA *et al.*, 2021).

Acredita-se que o conhecimento do comportamento biológico dos conjugados de PgTeL ou SteLL poderá dar origem a um novo sinalizador tumoral, que combinará a especificidade e eficácia antitumoral já constatadas de SteLL, às técnicas diagnósticas por Imagenologia. Além disso, devido ao potencial biotecnológico de PgTeL, também se acredita que esta lectina poderá originar um novo sinalizador tumoral, se conjugada a sondas de sinalização (XU *et al.*, 2007; S. COULIBALY; C. YOUAN, 2017).

Uma vez comprovado que os sistemas de conjugação de lectinas a PQ e tecnício possuem especificidade pelo tumor e segurança biológica, estes poderão ser investigados como possíveis agentes sinalizadores, em estudos futuros. Logo, essa comprovação se tornou o objetivo central desta tese.

3 OBJETIVOS

O objetivo desta tese foi avaliar, *in vivo*, conjugados da lectina das folhas de *S. terebinthifolia* (SteLL) ou da lectina extraída da sarcotesta de *Punica granatum* (PgTeL) quanto a toxicidade aguda e biodistribuição.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar as lectinas SteLL e PgTeL, com base nos protocolos disponíveis na literatura;
- Estabelecer protocolos de radiomarcagem para SteLL;
- Conjugar SteLL e PgTeL a PQs de CdTe;
- Realizar estudos de toxicidade aguda de dose única, *in vivo*, dos produtos obtidos após radiomarcagem e conjugação;
- Obter os perfis bioquímicos, hematológicos, de micronutrientes e de cádmio dos animais submetidos à dose única dos sistemas, a fim de investigar a segurança biológica destes;
- Realizar estudo de biodistribuição dos produtos, *in vivo*, em camundongos portadores de Sarcoma 180;
- Obter as primeiras informações *in vivo* acerca dos sistemas constituídos pelas lectinas SteLL e PgTeL conjugadas a PQs.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido em parceria entre o Laboratório de Pesquisa da Divisão de Produção de Radiofármacos, o Serviço de Análises Ambientais (SeAmb), ambos no Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCNNE); o Laboratório de Bioquímica das Proteínas (BIOPROT) e o Grupo de Pesquisas em Nanotecnologia Biomédica (NanoBio), ambos localizados na Universidade Federal de Pernambuco. O estudo faz parte de projeto registrado (A679C62) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

4.1 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE STELL

A lectina extraída das folhas de *Schinus terebinthifolia* Raddi (SteLL) foi isolada segundo método pré-estabelecido (GOMES *et al.*, 2013). Para isto, folhas do espécime vegetal foram coletadas em árvores localizadas na Universidade Federal de Pernambuco, previamente identificadas e atualmente uma exsicata destas está depositada no Instituto Agrônomo de Pernambuco (número 73.431). As folhas em bom estado de conservação foram selecionadas, lavadas e postas para secar, em temperatura ambiente (25 ± 2 °C), durante sete dias. Houve trituração das folhas, em liquidificador doméstico, e cerca de 100 g do pó de folhas foram adicionadas a 300 mL de NaCl 0,15 M, e deixados em homogeneizador durante 16 h, para obtenção do extrato.

O extrato foi filtrado em papel filtro qualitativo, com 80 g de gramatura (Unifil, Brasil), sendo o filtrado posteriormente centrifugado durante 15 min, a 9000 g. O sobrenadante foi retirado e preservado em freezer. Em seguida, 2 mL deste sobrenadante foram aplicados em coluna de quitina (Sigma-Aldrich, EUA) equilibrada com NaCl 0,15 M. Após 24 h da aplicação do extrato, a coluna foi lavada com NaCl 0,15 M, para remoção das proteínas não-adsorvidas e a eluição de SteLL foi realizada utilizando ácido acético 1,0 M (Merck, Alemanha). Na etapa de eluição, cada fração coletada foi monitorada quanto à absorbância (ABS) a 280 nm, sendo aquelas com $ABS > 0,100$ reunidas para posterior diálise. A diálise para remoção de ácido acético ocorreu por meio de uso de membranas de celulose com tamanho de poro de 10 kDa, sendo água de diálise trocada a cada uma hora, num período total de 6 h. O dialisado (SteLL isolada) foi congelado e colocado em processo de liofilização. Os procedimentos foram repetidos até se obter a quantidade necessária de lectina para realização do estudo. Após isso,

todo produto liofilizado foi diluído em NaCl 0,15 M e dosado pelo método de Lowry *et al.*, (1951), até obtenção de amostras contendo 1 mg/mL de SteLL.

A atividade hemaglutinante (AH) foi realizada utilizando eritrócitos de coelho (BING; WEYAND; STAVITSKY, 1967). Para isto, realizaram-se os seguintes passos: em uma fileira de poços de uma placa de 96 poços, com fundo cônico, amostra de 50 µL SteLL a 1 mg/mL foi diluída em 50 µL de NaCl a 0,15 mL. Nos poços subsequentes, a amostra foi diluída serialmente até o final da fileira. Em seguida, 50 µL de eritrócitos previamente fixados em glutaraldeído foram adicionados em cada poço da placa. Após 45 min, em temperatura ambiente (25 ± 2 °C), a AH foi registrada, sendo o inverso da última diluição onde houve total aglutinação dos eritrócitos. A partir disto, também foi calculada a atividade hemaglutinante específica (AHE), como sendo a razão entre a AH e a concentração de lectina nas amostras.

Adicionalmente foi realizado ensaio de inibição de AH, incubando-se as amostras de SteLL com as glicoproteínas azocaseína, fetuína bovina e ovalbumina (0,4 mg/mL), e ao monossacarídeo N-acetil-glucosamina (GlcNAc) a 100 mM, por 15 min, antes da adição da suspensão contendo eritrócitos.

4.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE PgTeL

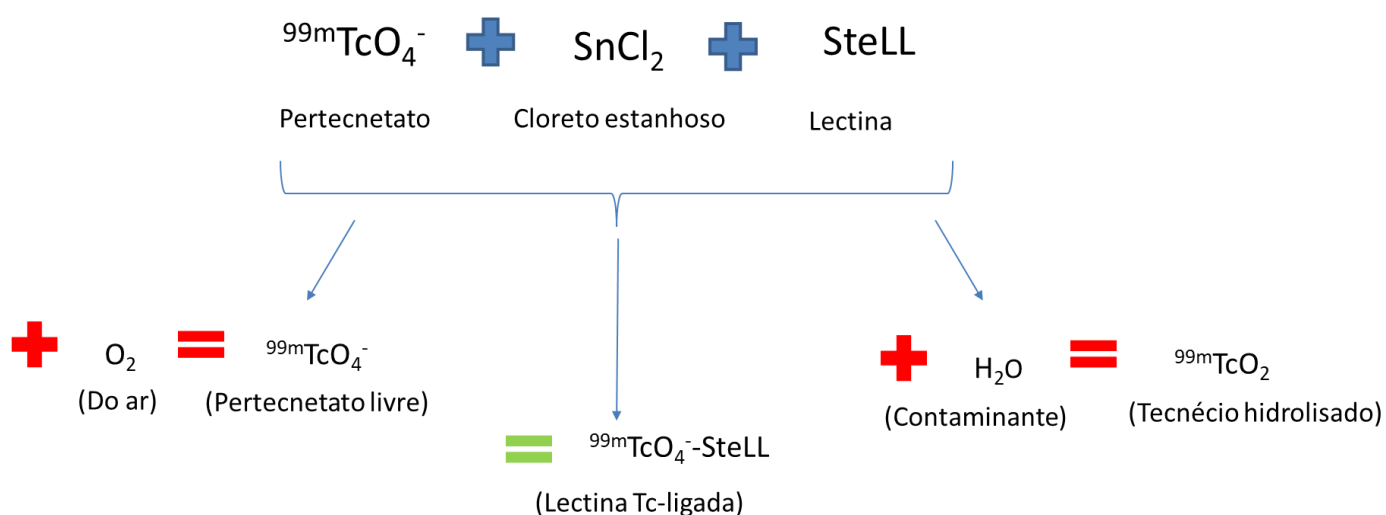
O protocolo de isolamento de PgTeL utilizado foi o descrito por Silva *et al.* (2016). Frutos de *Punica granatum* foram comercialmente obtidos, e suas sementes foram levemente batidas em liquidificador, para remoção do sarcotesta. Deste processo foi possível obter um suco rosado, que foi diluído a 9:10 em solução de NaCl 0,15 M, sendo esta mistura deixada em agitação magnética por 6 h. Após este período, a mistura foi filtrada em papel filtro qualitativo, com 80 g de gramatura, e centrifugada (3000 g, 15 min), o sobrenadante foi tratado com sulfato de amônio a saturação de 30%, durante 4 h. Após centrifugação (3000 g, 15 min), o sobrenadante foi coletado, dialisado contra água destilada e NaCl 0,15 M e então aplicado em colunas de quitina equilibradas com NaCl 0,15 M. A PgTeL adsorvida foi coletada após eluição por ácido acético 1,0 M, com posterior dialise em água destilada, durante 4 h, para eliminação do ácido. Assim como para SteLL, as amostras foram reunidas, dosadas e as AH, AHE e ensaio de inibição foram realizados.

4.3 RADIOMARCAÇÃO E CONTROLE DA QUALIDADE

A radiomarcação de SteLL com o radionuclídeo ^{99m}Tc foi realizada pelo método direto de acoplamento. Para isto, diferentes protocolos de radiomarcação de peptídeos e proteínas foram testados (KOCH *et al.*, 1980; PATRICIO *et al.*, 2011). Em todos eles, soluções de SteLL a 1 mg/mL em NaCl 0,15 M foram utilizadas, bem como agente redutor cloreto estanhoso ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Merck, EUA).

Como mostrado na Figura 5, para obter ^{99m}Tc -SteLL, amostras de 100 μL de SteLL a 1 mg/mL foram incubadas em 100 μL de solução de cloreto estanhoso (1 mg/mL em HCl 0,1 N). Após a agitação, a mistura foi preservada em bancada, protegida da luz e em temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), durante 20 min. Em seguida, 1 mCi de eluato pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) foi adicionado à mistura, que foi agitada e permaneceu protegida da luz durante 10 min. Em seguida, a mistura teve o pH corrigido para 7 ± 1 , por meio da adição de NaOH 1M e HCl 0,01 N. O volume final das amostras foi ajustado para 2 mL com adição de NaCl 0,9%. Este protocolo, para melhor entendimento desta tese, será denominado **Protocolo A**, e foi o mesmo utilizado por Patricio e colaboradores (2011) na radiomarcação da lectina Cramoll 1,4 (PATRICIO *et al.*, 2011).

Figura 5 – Reação de marcação de SteLL com tecnécio, na forma de pertecnetato, e formação de impurezas.



Fonte: Modificado de Mettler e Guiberteau, 2006.

Além do **Protocolo A** de radiomarcção, também foram aplicados protocolos adaptados. Esta adaptação envolveu diferentes condições de temperatura de marcação, tempo e concentrações de cloreto estanhoso. Os protocolos em questão são o que seguem:

Protocolo B: Para avaliar se o processo de correção do pH influencia no percentual de radiomarcção e impurezas, a correção para 7 ± 1 ocorreu antes da incubação de um mCi de pertecnetato de sódio, ao contrário do **Protocolo A**, onde a correção ocorre após a incubação (PATRICIO *et al.*, 2011). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas, reservadas por 10 min e avolumadas para 2 mL.

Protocolo C: Para avaliar a possível interferência da concentração de cloreto estanhoso no percentual de radiomarcção, lotes com volumes de 50, 100, 150 e 400 μL deste reagente foram sintetizados.

Protocolo D: Para avaliar a interferência do tempo de incubação no percentual de radiomarcção de SteLL, ao **Protocolo A** foram incluídos no processo de incubação os tempos 30, 60 e 90 min. Após estes tempos, as amostras foram corrigidas para pH 7 ± 1 e avolumadas para 2 mL.

Protocolo E: Como relatado, a temperatura do processo de radiomarcção pode influenciar no percentual de pureza do produto (HOIGEBAZAR *et al.*, 2010; CHAKRAVARTY *et al.*, 2014; MIN *et al.*, 2015). Dessa forma, ao **Protocolo A** foi adicionado a temperatura de 40 °C ao longo de todo processo de incubação.

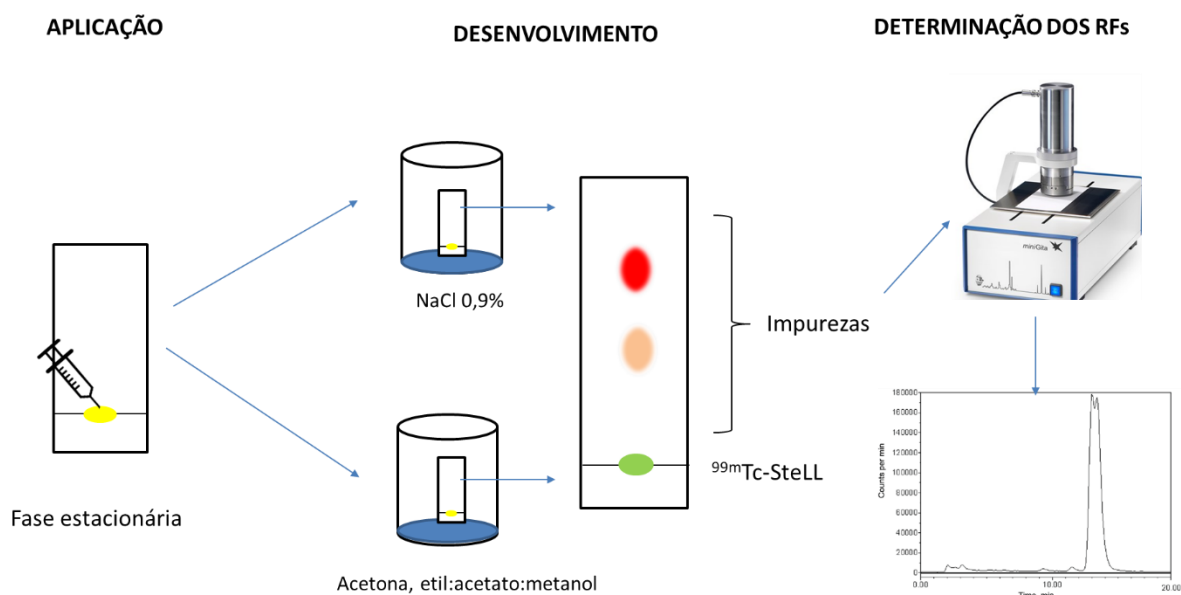
Protocolo F: Como relatado por Diniz (2005), a filtração das amostras é uma das formas de remover as impurezas de radiomarcção, principalmente o tecnécio hidrolisado ($^{99\text{m}}\text{TcO}_2$) (DINIZ *et al.*, 2005). Assim, após síntese de novos lotes por meio do Protocolo A, as amostras foram filtradas em filtros de seringa Millex-GP, com 0,22 μm de tamanho de poro (Merck, Alemanha).

Para avaliar o percentual de radiomarcção e de impurezas obtidos nos diferentes protocolos, foi utilizada a metodologia de cromatografia em camada delgada (CCD). Nesta etapa, além da quantificação do produto de síntese pretendido ($^{99\text{m}}\text{Tc-SteLL}$), também é feita a quantificação das duas impurezas mais relatadas, a saber: pertecnetato livre ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) e tecnécio hidrolisado ($^{99\text{m}}\text{TcO}_2$). Para isto, alíquotas de 2 μL das amostras foram submetidas às seguintes combinações de CCD, citadas na literatura (Tabela 2).

Em todos os métodos de CCD utilizados, as fases estacionárias possuíam diâmetro de 10×2 cm, com aplicação das amostras a 2 centímetros da base, como mostrado na Figura 6. Para a contagem do perfil de radioatividade e estimativa do fator de retenção (RF) dos produtos, foi utilizado o scanner miniGITA TLC scanner (Raytest, Alemanha).

Tabela 2 - Métodos utilizados para avaliação de percentual de radiomaração e impurezas de ^{99m}Tc -SteLL.

Método	Fase estacionária	Fase móvel	Fator de retenção (RF)
Monteiro <i>et al.</i> , 2010	Sílica gel	NaCl 0,9%	$^{99m}\text{TcO}_4^- = 1.0$.
	Papel Whatman No. 1	etil acetato:metanol (8:2)	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2 = 0$.
Patrício <i>et al.</i> , 2011	Papel Whatman No. 1	Acetona	$^{99m}\text{TcO}_4^- = 1.0$. ^{99m}Tc -Lectina = 0.0.
Dias <i>et al.</i> , 2005.	Papel Whatman 3MM	Salina, acetona	$^{99m}\text{TcO}_2$ e ^{99m}Tc -MDP= 1.0.

Figura 6 – Esquema de análise das amostras, por meio de cromatografia em camada delgada, para quantificação de ^{99m}Tc -SteLL e impurezas.

Fonte: A Autora, 2022.

O cálculo da pureza radioquímica do produto (^{99m}Tc -SteLL) foi obtido conforme a equação a seguir:

$$PRQ (\%) = \frac{\text{Contagens no RF do produto}}{\text{Contagens totais da amostra}} \times 100 \quad (4.3.1)$$

Vale ressaltar que não foi realizada tentativa de radiomarcção de PgTeL, uma vez que os resultados iniciais para SteLL não foram reprodutíveis, como será apresentado adiante.

4.4 CONJUGAÇÃO A PONTOS QUÂNTICOS

Os protocolos de conjugação das lectinas SteLL e PgTeL, com pontos quânticos (PQs), foram replicados segundo Silva e colaboradores (2021). Para isto, foram utilizados pontos quânticos de telureto de cádmio (CdTe), sintetizados de acordo com protocolo estabelecido por Cabral Filho *et al.* (2015). Os PQs estabilizados em ácido mercaptosuccínico (MSA) foram sintetizados usando a proporção de 5:1:6 (Cd:Te:MSA), e foram mantidos sob refrigeração entre 4 a 6 °C, até o momento da conjugação.

Para conjugação de CdTe às lectinas, foi utilizado o método de adsorção: inicialmente, as lectinas isoladas e liofilizadas foram diluídas em NaCl 0,9%, originando soluções de 1 mg/mL. Em seguida, o pH das suspensões de PQs foi corrigido para 7 (no caso de SteLL e suspensão de PQ puro) e para 8 (no caso de PgTeL), utilizando-se de solução de MSA (4,9%, p/v). Vale ressaltar que, com base em estudos prévios, os pH citados foram determinados como ideais para obtenção e estabilização dos conjugados (SILVA *et al.*, 2021).

As lectinas foram então incubadas nas suspensões de PQs, na proporção de 1:5 (lectina/PQ). No caso da suspensão de PQ não-conjugados, houve adição de água ultrapura no lugar da solução de lectina a 1 mg/mL. As amostras foram homogeneizadas durante 2 h, em temperatura ambiente (22 ±2 °C), utilizando mixer Bio RS 24 (BioSan, Letônia), e então armazenadas durante 15 dias, sob refrigeração entre 4 a 6 °C. Este processo originou os conjugados denominados PQ-SteLL e PQ-PgTeL. Em seguida, os sistemas foram caracterizados opticamente, por meio de espectros de emissão, utilizando o espectrofluorômetro LS55, com comprimento de onda a 488 nm (PerkinElmer, USA).

Após esse período, os conjugados foram purificados via centrifugação, para remoção de metais pesados e outros agentes tóxicos. Para isso, filtros de 10 kDa foram utilizados (Thermo Fisher Scientific, EUA). Os conjugados foram submetidos a quatro ciclos de centrifugação por 2000 g, durante 10 min. A cada ciclo, foi adicionado aos conjugados um volume de NaCl 0,9% proporcional ao que passava pelo filtro, de forma a retirar a maior quantidade de impurezas possível das amostras.

Após a purificação, a concentração de PQ nas amostras foi determinada por meio de espectroscopia de absorção a 558 nm, usando o espectrofotômetro UV-Vis 1800 (Shimadzu, Japão). Em seguida, esta concentração foi normalizada para todos os conjugados, tendo como

referência a de menor valor dentre as caracterizadas por espectroscopia (2,2 μM); por meio da diluição em NaCl 0,9%. Até o momento de utilização, as amostras foram mantidas sob refrigeração entre 4 a 6 °C.

4.5 ESTUDO DE TOXICIDADE AGUDA

A investigação da toxicidade dos sistemas foi realizada, baseada nos guias da FDA e OECD, para avaliação *in vivo* de toxicidade em dose única (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA, 1996; ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, 2001).

Para este estudo, foram utilizados camundongos fêmeas Swiss albinas (*Mus musculus*), obtidas do biotério do Instituto Keizo Asami (ILIKA), da UFPE. No momento da administração dos sistemas via intraperitoneal, todos animais possuíam 60 ± 5 dias de idade. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (22 ± 2 °C) e 12 h de ciclo diurno/noturno, com livre acesso a ração e água.

No que concerne às etapas envolvendo uso animal, o projeto em questão se encontra aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPE (Registro 007/2022), como consta na folha de aprovação do Anexo A.

4.5.1 Tratamentos

Foi estabelecido como padrão a quantidade de 5 animais por grupo (n=20). Estes animais foram divididos nos seguintes grupos:

Grupo 1, NaCl 0,9% (controle negativo);

Grupo 2, Sham (pontos quânticos não-conjugados);

Grupo 3, PQ-SteLL;

Grupo 4, PQ-PgTeL.

Previamente à administração, a concentração dos conjugados e da solução de PQs não-conjugados foi normalizada para a de menor valor (2,2 μM), por meio da diluição em NaCl 0,9%. Em cada um dos animais dos grupos, foi injetado o volume de 200 μL das substâncias citadas, por meio de injeção intraperitoneal. Durante a primeira hora pós injeção, os animais foram observados. Sinais clínicos respiratórios, gastrointestinais, motores, convulsões, sinais oculares, piloereção e sinais cutâneos foram registrados, como indicativos de toxicidade.

Ao longo de 14 dias, além dos sinais clínicos citados, também foi observado o peso, consumo de água e ração de todos os animais em cada um dos grupos. Todos os parâmetros avaliados foram tabulados para a realização de comparações estatísticas entre os diferentes grupos de animais.

4.5.2 Parâmetros bioquímicos e hematológicos

Completados os 14 dias pós administração, os animais foram submetidos a jejum de 6 h, anestesiados com quetamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), em seguida realizada coleta de sangue por punção cardíaca. O sangue coletado foi distribuído em tubos secos e com anticoagulante EDTA. O sangue em tubo seco foi centrifugado a 1400 g, durante 5 min, para obtenção do soro, a ser submetido às análises bioquímicas: albumina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina, proteínas totais, creatinina e uréia, usando kits específicos (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil) e um analisador COBAS Mira Plus (Roche Diagnostics Systems, Basel, Suíça).

O sangue coletado em EDTA foi submetido à análise hematológica, realizada utilizando um analisador automático (Counter ABC Vet, Montpellier, França) e microscopia óptica; os parâmetros avaliados foram: número de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e análise total e diferencial dos leucócitos.

4.5.3 Análise histopatológica

Após eutanásia dos animais, seus fígados e rins foram coletados. A análise histológica destes órgãos de animais do controle e de tratados com as foi realizada por microscopia óptica. Fragmentos dos órgãos foram fixados em formalina tamponada (10%, v/v) durante 24 h, e em seguida desidratados através de uma série gradual de etanol (70-100%), diafanizados em xilol, e incluídos em parafina. Os cortes histológicos (5 µm) foram corados com hematoxilina-eosina e montados usando lamínulas com resina Entellan (Merck, Alemanha). Os materiais foram analisados em microscópio de luz, da marca OLYMPUS BX-49 e fotografados em foto microscópio OLYMPUS BX-50.

4.5.4 Quantificação de Cádmio

De forma adicional ao estudo de toxicidade aguda, foi quantificada a concentração de cádmio, o componente do *core* dos PQs, no fígado, baço e rins dos animais nos quais os sistemas foram administrados. Fragmentos do baço, fígado e rins dos animais controle e testes foram coletados, após anestesia e eutanásia. Os espécimes foram congelados, liofilizados, macerados, homogeneizados e pesados. Em seguida, foram alocados em tubos Falcon de 50 mL, estéreis e previamente pesados. Os espécimes foram digeridos pela adição de 4 mL de ácido nítrico destilado (HNO₃ 33%), durante 24 h. Em seguida, foram submetidos a três ciclos de uma hora em sonicador a 80 °C, com adição de 0,5 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) após o primeiro e segundo ciclo.

Após completa digestão dos espécimes, os tubos Falcon foram deixados em bancada durante 1 h, avolumados para 20 mL com adição de água MilliQ e novamente pesados. Em seguida, foram submetidos a centrifugação a 2000 g, durante 15 min, envoltos por plástico filme e armazenados sob refrigeração (4 a 6 °C), até o momento da análise por espectrometria.

Para quantificação de cádmio (Cd) foi utilizado o espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite, modelo Varian AA 240Z (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), alocado no Serviço de Análises Ambientais (SeAmb, CRCN NE). O sinal de Cd foi mensurado de acordo com parâmetros e configurações sugeridas no manual do equipamento. Soluções padrão de Cd, entre 100 e 1 partes por bilhão (ppb) foram preparadas, por meio de solução estoque comercial. Padrões de controle da qualidade (3 ppb de Cd) foram lidos pelo equipamento a cada 10 amostras de órgão lidas. A concentração de Cd em cada órgão foi calculada, em miligramas por quilograma, com base em curva analítica, gerada a partir dos padrões, e que determina a concentração com base na absorbância detectada pelo equipamento.

As concentrações foram agrupadas para cada órgão e tipo de substância testada. Os dados foram expressos como média ± DP. A qualidade do processo analítico foi averiguada por meio da análise das soluções padrão e de material de referência certificado TM1 (MOREIRA *et al*, 2018).

4.5.5 Avaliação de genotoxicidade

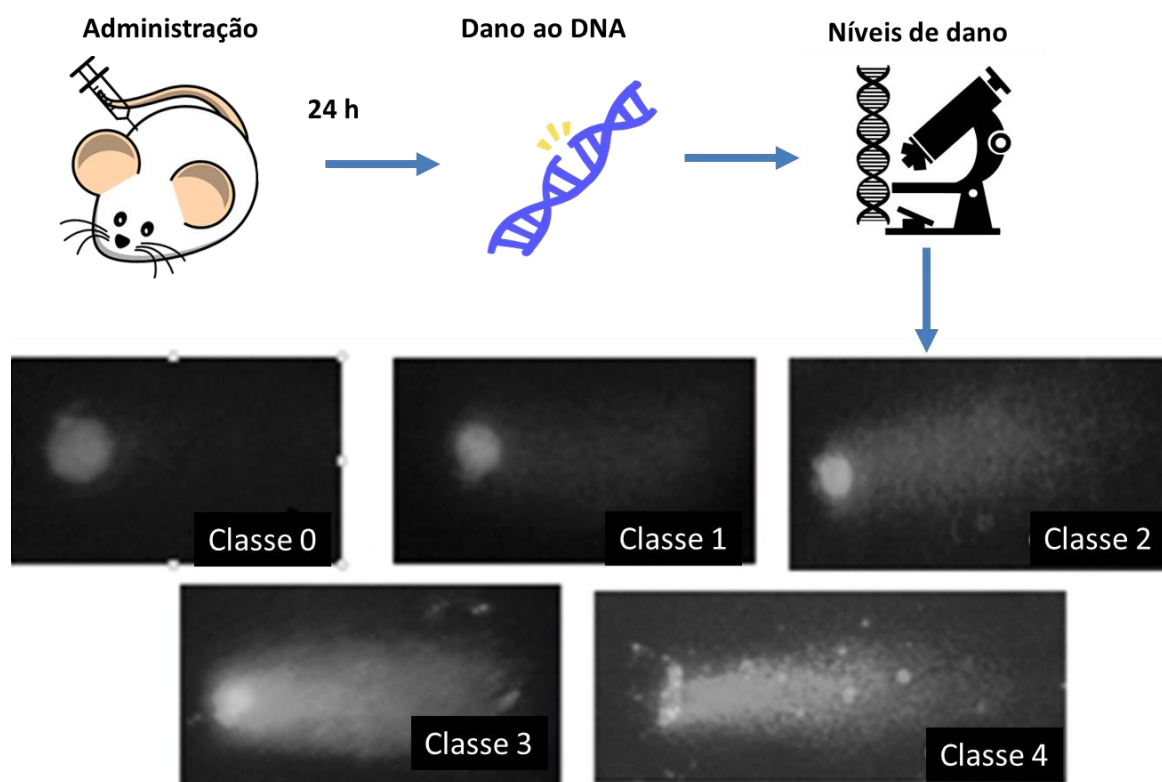
O ensaio cometa foi realizado de acordo com os procedimentos descritos por Singh *et al*. (1988) com modificações. Além dos grupos citados no tópico 4.5.1, foi adicionado grupo controle positivo (CP, n=5), ao qual foi administrado metotrexato (MTX) a 20 mg/kg por

injeção intraperitoneal. Após 24 h, 60 μ L de sangue total foram coletados da veia caudal por punção venosa e uma alíquota (20 μ L) foi misturada com 110 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) a 37 °C. Em seguida, a mistura foi depositada em lâminas totalmente solidificadas cobertas com uma camada de agarose padrão e revestidas com lamínula. Foi adotado o padrão de três lâminas para cada animal. As lâminas foram mantidas a 4 °C por 30 min, imersas durante 24 h a 4 °C em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM e Tris 10 mM com ajuste do pH para 10 utilizando NaOH), em seguida transferidas para cuba de eletroforese e cobertas com solução tampão (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH 13). A eletroforese foi realizada a 4 °C, por 20 min, corrente de 32V e 300 mA. Após a corrida, as lâminas foram submersas em solução de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7.5) por 20 min, secas e fixadas com etanol absoluto durante 15 min. Para análise, as lâminas foram coradas com iodeto de propídeo (50 μ L, 20 μ g/mL) e para cada animal foram analisados 100 nucleoides em microscópio de fluorescência, os quais foram classificados de acordo com o dano observado (classes 0, 1, 2, 3 ou 4, conforme Figura 7). Vale ressaltar que, quanto maior a classe, maiores e mais significativos são os danos causados ao DNA (CORDELLI *et al.*, 2021).

O índice de danos foi calculado multiplicando o número de nucleoides observados em cada classe de dano pelo valor da classe. A frequência de dano (%) foi calculada com base no número de células com cauda em relação às células sem danos, a cada tratamento.

Como preconizado pela OECD 474 (OECD, 2016), posteriormente ao ensaio cometa, é necessária a realização de mais um teste de genotoxicidade. Assim, foi realizado o teste do micronúcleo em eritrócitos. Após 48 h dos tratamentos descritos anteriormente, 60 μ L de sangue total foram coletados da cauda dos animais por punção venosa. O sangue coletado de cada animal (5 μ L) foi depositado em três lâminas coradas previamente com laranja de acridina (1 mg/mL) e coberto com lamínula (EIJ *et al.*, 1999). Posteriormente, as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência Zeiss-Imager M2, com objetiva de 40X, utilizando o filtro Alexa Fluor 488. A presença de micronúcleos foi analisada em 200 eritrócitos policromáticos (EPC) por animal.

Figura 7 – Esquematização do ensaio cometa realizado 24 h após tratamento dos animais.



Fonte: Modificado de Pereira *et al.*, 2012.

4.5.6 Quantificação de Micronutrientes

De modo a complementar o estudo de toxicidade aguda e verificar possíveis interferências nutricionais nos resultados, os micronutrientes presentes no fígado, baço e rins de animais controle e teste foram quantificados. Os microelementos investigados e quantificados foram: enxofre (S), potássio (K), fósforo (P), cloro (Cl), ferro (Fe) sódio (Na), magnésio (Mg), alumínio (Al), cálcio (Ca), manganês (Mn), cobre (Cu), zinco (Zn), estrôncio (Sr). Para isso, logo após eutanásia dos animais, fragmentos dos órgãos citados foram congelados e liofilizados. Em seguida, foram macerados até a formação de um pó homogêneo. Os pós foram alocados em células de análise próprias e analisados por meio do espectrômetro de fluorescência de raios-X por energia dispersiva EDX-720, mostrado na Figura 8 (Shimadzu, Kyoto, Japão).

Figura 8 – Espectrômetro de fluorescência de raios-X por energia dispersiva EDX-720, com as amostras alocadas no carrossel, indicado pela seta.

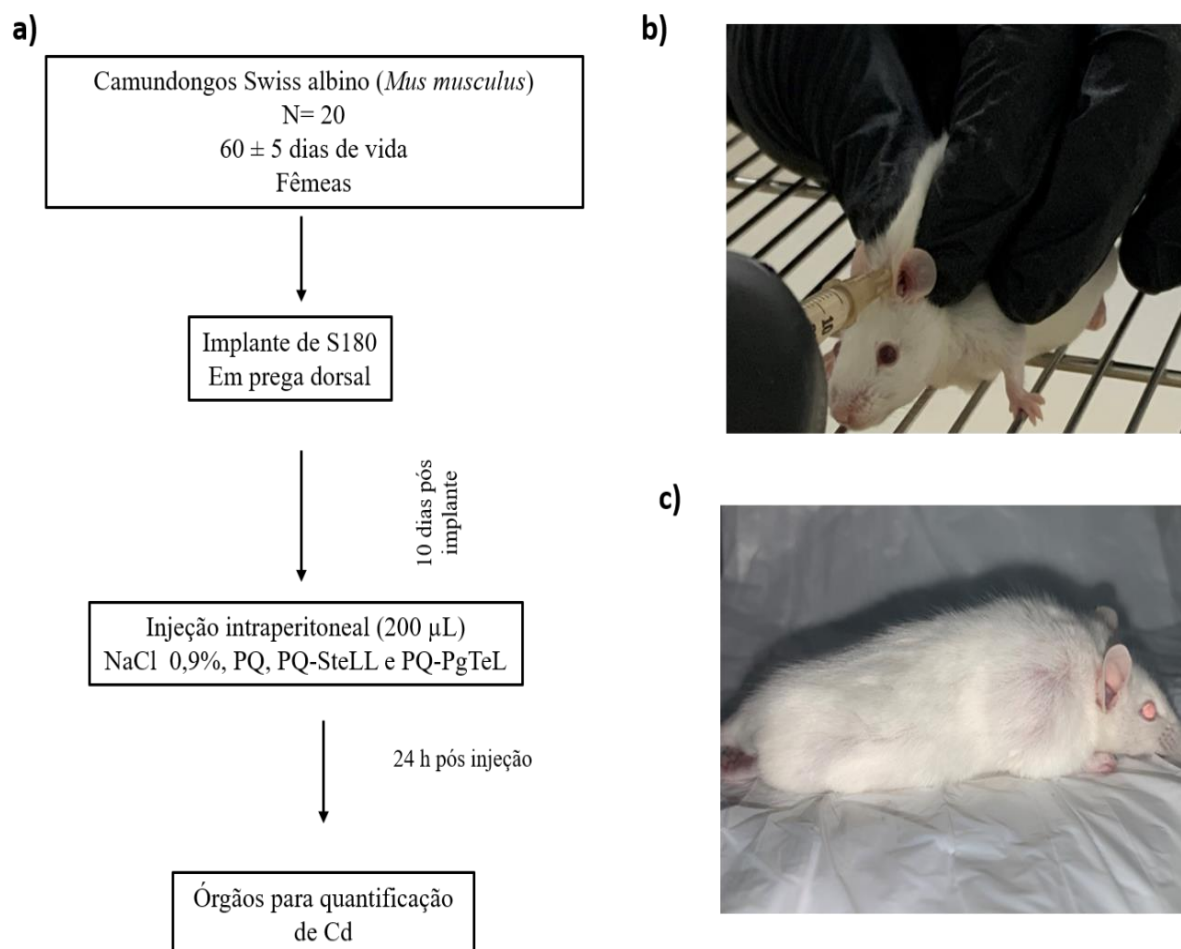


Fonte: A Autora, 2022.

4.6 ESTUDO DE BIODISTRIBUIÇÃO EM ANIMAIS PORTADORES DE SARCOMA 180

A Figura 9 mostra o desenho experimental para o estudo de biodistribuição dos conjugados, após 24 h da administração dos conjugados, em camundongos fêmeas portadoras de sarcoma 180. Uma vez que o Cd é o principal constituinte do core dos PQs de CdTe, o perfil de biodistribuição dos conjugados foi obtido mensurando, por meio de espectrometria em forno de grafite, as diferenças na concentração de Cd em órgãos de camundongos não tratados, tratados com PQs e tratados com os conjugados.

Figura 9 – Desenho experimental para avaliação de biodistribuição em camundongos portadores de sarcoma 180. a) esquema geral do ensaio, b) implante da suspensão de células de S-180 na região dorsal do animal, c) animal portador de S-180.



Fonte: A Autora, 2022.

Nesta etapa foram utilizados outros 20 camundongos fêmeas Swiss albino (*Mus musculus*), com 60 ± 5 dias de vida. Estes foram divididos em quatro grupos: NaCl 0,9% (n=5), Sham (n=5), PQ-SteLL (n=5) e PQ-PgTeL (n=5). As concentrações de Cd quantificadas foram agrupadas segundo tratamento e órgão analisado, e expressas como média $\pm$ DP.

4.6.1 Implante do tumor e administração dos compostos

Um camundongo macho Swiss (*Mus musculus*), portador de sarcoma 180 na forma ascítica, foi doado pelo Biotério de Experimentação Animal do Departamento de Antibióticos, UFPE. O animal portador foi sacrificado por meio de anestesia e punção cardíaca, e a punção

intraperitoneal foi realizada, para coleta de cerca de 20 mL do líquido peritoneal, contendo as células sarcomatosas.

Em seguida, 40 μ L do líquido com células sarcomatosas foram injetados em prega subcutânea na região dorsal dos 20 animais citados no tópico 4.6 (Figura 9b). Após dez dias do implante, os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos teste: NaCl 0,9%, PQ (Sham), PQ-SteLL e PQ-PgTeL. A estes foram administrados 200 μ L das soluções citadas, intraperitonealmente. Após 24 h, os animais foram anestesiados por meio de quetamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e sacrificados por punção cardíaca. Foram coletados, além da massa tumoral, os seguintes órgãos: coração, pulmão, fígado, baço, rins e duodeno. Todos foram congelados, liofilizados, digeridos e submetidos à espectrometria em forno de grafite para quantificação de cádmio.

4.6.2 Digestão dos órgãos e análise por meio de forno de grafite

A massa tumoral e os órgãos foram congelados, liofilizados, macerados, homogeneizados e pesados em balança com seis casas decimais. Em seguida, foram alocados em tubos Falcon de 50 mL, estéreis e previamente pesados. Os espécimes foram digeridos pela adição de 4 mL de ácido nítrico destilado (HNO_3 33%) durante 24 horas. Em seguida, foram submetidos a três ciclos de uma hora em sonicador a 80 °C, com adição de 0,5 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) após o primeiro e segundo ciclo.

Após completa digestão dos espécimes, os tubos Falcon foram deixados em bancada durante 1 h, avolumados para 30 mL com adição de água ultrapura e novamente pesados. Em seguida, foram submetidos a centrifugação a 2000 g, durante 15 min, envoltos por plástico filme e armazenados sob refrigeração (4 a 6 °C), até o momento da análise por espectrometria.

Para quantificação de cádmio (Cd) foi utilizado o espectrômetro de absorção atômica Varian AA 240Z, equipado com forno de grafite Zeeman (Agilent Technologies, Califórnia, EUA). O sinal de Cd foi mensurado de acordo com parâmetros e configurações sugeridas no manual do equipamento. As mensurações foram realizadas em comprimentos de onda de 326 e 288 nm, e para cada comprimento de onda foram construídas curvas de calibração. No caso da curva em 326 nm, os padrões utilizados foram de 0,1, 0,2 e 0,3 ppm. Para 288 nm, os padrões utilizados na construção da curva foram 2, 4,7 e 10 ppb.

Padrões de controle da qualidade foram lidos pelo equipamento a cada 10 amostras de órgão (0,2 ppm na curva a 326 nm e 10 ppb na curva de 288 nm). A concentração de Cd em cada órgão foi calculada. Novamente, a qualidade do método analítico foi averiguada por meio

da análise das soluções padrão e de material de referência certificado TM1 (MOREIRA *et al*, 2018).

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Análises estatísticas e gráficos foram realizados no software Prism versão 9.4 (GraphPad, Califórnia, EUA). O nível de significância para cada teste foi fixado em 5% ($p < 0,05$). Inicialmente, todos os dados foram submetidos a teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Na ausência de normalidade, o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi aplicado, para estimativa do valor p .

No caso de normalidade dos dados, estes foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) de um fator, acrescido de testes *post-hoc* pelo método de Tukey.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO DE STeLL E PgTeL

A lectina extraída das folhas de *Schinus terebinthifolia* (STeLL) foi isolada e purificada, conforme protocolo de Gomes e colaboradores (GOMES *et al.*, 2013). A mesma apresentou, no teste de hemaglutinação, AH de 2048. A AH específica para esta lectina foi 1019, sendo neutralizada quando incubada com azocaseína, fetuína e ovalbumina.

Para a lectina extraída da sarcotesta de *Punica granatum* (PgTeL), o teste de hemaglutinação indicou AH de 512, e a AH específica determinada foi de 163. A atividade hemaglutinante de PgTeL foi neutralizada quando incubada com fetuína, e fortemente reduzida na presença de ovalbumina.

Estes resultados corroboram com os obtidos por Silva e colaboradores (2021), e indicam que ambas lectinas foram isoladas, uma vez que os mesmos protocolos de isolamento foram aplicados (SILVA *et al.*, 2021).

5.2 RADIOMARCAÇÃO E CONTROLE DA QUALIDADE

Estudos indicam que, devido a seu alto peso molecular e densidade, peptídeos e proteínas radiomarcados permanecem no ponto de aplicação da amostra, apresentando fator de retenção (RF) igual a zero 0, sendo este o comportamento esperado para o produto ^{99m}Tc -STeLL. Outros analitos, se presentes, deverão apresentar RF maior que zero, a depender do método cromatográfico (MIKAEILI; ERFANI; SABZEVARI, 2017; RAHMANIAN *et al.*, 2018). Estes resultados são observados em diversos radiofármacos peptídicos, a exemplo: ^{99m}Tc -Cramol (PATRICIO *et al.*, 2011), ^{99m}Tc -MIBI (MONTEIRO *et al.*, 2010) e ^{99m}Tc -cefuroxime (LAMBRECHT; DURKAN; UNAK, 2008).

As impurezas de síntese e seus respectivos RFs, detectadas nas nossas amostras, são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3 - Fatores de retenção (RF) para tecnécio hidrolisado e pertecnetato livre, sob diferentes condições cromatográficas

PRODUTO	FASE ESTACIONÁRIA	FASE MÓVEL	RF
Tecnécio Hidrolisado ($^{99m}\text{TcO}_2$)	W1 ^a	Acetona	0,033
		NaCl 0.9%	0,041
	3MM ^b	Acetona	0,041
		NaCl 0.9%	0,033
	SG ^c	Acetona	0,041
		NaCl 0.9%	0,133
Pertecnetato Livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$)	W1	Acetona	0,880
		NaCl 0.9%	0,404
	3MM	Acetona	0,759
		NaCl 0.9%	0,641
	SG	Acetona	0,815
		NaCl 0.9%	0,704

a: papel qualitativo Whatman® número 1; b: papel cromatográfico Whatman® 3MM; c: sílica gel TLC F254 100.

Em todos os métodos cromatográficos aplicados nesta tese, nossos resultados mostraram que a impureza pertecnetato livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) permaneceu adequadamente separada dos demais compostos. Entretanto, a impureza tecnécio hidrolisado ($^{99m}\text{TcO}_2$) permaneceu no ponto de aplicação das amostras (RF 0), independentemente do método cromatográfico utilizado. Isto é um problema, uma vez que o RF de ^{99m}Tc -SteLL também seria zero ou algo próximo disso. Sem a separação clara dos compostos e a determinação individual de seus RFs, se torna impossível a quantificação e estimativa do percentual de radiomarcagem.

Estes resultados não estão em concordância com estudos publicados, nos quais é possível separar as impurezas de radiomarcagem do peptídeo ou proteína radiomarcados. Em

nenhum dos protocolos de radiomarcção foi possível atestar se houve radiomarcção da SteLL ou simplesmente a formação de impurezas, uma vez que apenas o pertecnetato livre foi claramente separado e quantificado. Nem mesmo empregando a filtração a 0,22 μm , uma forma conhecida de remoção de impurezas, foi possível atestar a formação de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SteLL. Isto porque a amostra não passou pelos filtros, possivelmente devido a seu tamanho molecular ser maior do que o suportado pelas membranas filtrantes.

Nossos resultados sugerem que ocorrem falhas importantes quando se opta por utilizar a cromatografia em camada delgada (CCD) para quantificar a eficiência de radiomarcção de novos compostos, especialmente em se tratando de peptídeos $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -conjugados. Uma vez que foi impossível separar e identificar os RFs para a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SteLL e impurezas usando métodos publicados, alguns estudos publicados podem superestimar a eficácia de radiomarcção, ignorando a presença de impurezas críticas à qualidade do produto.

De forma a confirmar o exposto acima, foi realizada uma breve revisão de literatura na base PubMed, utilizando os termos “TLC chromatography $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ”, excluindo os artigos de revisão e os que não fossem escritos em inglês, foram obtidos 30 estudos. Desses cerca de 13,33% não deixam claro qual método de separação das impurezas, e cerca de 43,33% não mencionam a clara separação e/ou quantificação entre o produto de interesse, $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ e $^{99\text{m}}\text{TcO}_2^-$.

Dentre esses estudos está o de Bozkurt e colaboradores (2009), que mostra a clara separação e os fatores de retenção diferentes para impurezas e o peptídeo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG3, usando a combinação das fases estacionárias sílica gel e papel cromatográfico Whatman 1 e 3MM. As fases móveis empregadas foram metil etil cetona:etil acetato 4:6 e acetonitrila (BOZKURT *et al.*, 2009). Também há o estudo de Proulx (1989), que utilizou um dos nossos métodos de conjugação testados e CCD, e obteve a separação clara e quantificação de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI, $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ e $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$, utilizando combinação de sílica gel, NaCl 0,9% e acetona (PROULX; BALLINGER; GULENCHYN, 1989). Entretanto, nenhum destes estudos foi reprodutível para nosso composto.

Logo, pudemos concluir que o uso da CCD para controle da qualidade e quantificação de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SteLL não é adequado, e pode ser limitado na investigação de outros compostos peptídicos. Nossos resultados sugeriram falta de reprodutibilidade das metodologias, bem como a impossibilidade de identificação e quantificação das impurezas do produto, o que poderia levar a resultados superestimados ou falso-negativos. Novos métodos e protocolos são necessários para avaliação dos agentes peptídicos radiomarcados, como os envolvendo

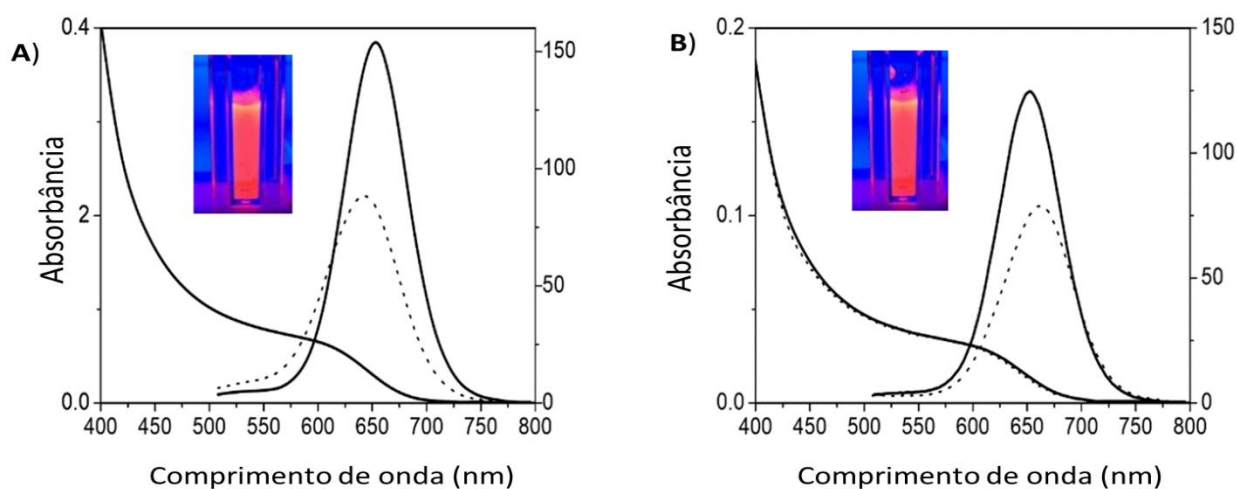
cromatografia líquida de alta eficiência (MARTINS *et al.*, 2019) e filtração das amostras em filtros de exclusão por tamanho molecular (PIRES; PALMER, 2021).

Uma vez que não havia possibilidade de uso de outros métodos cromatográficos para caracterização eficiente do produto, as tentativas de radiomarcagem da SteLL foram abandonadas, e optou-se por sua conjugação a pontos quânticos e investigação dos novos sistemas como uma sonda tumoral.

5.3 CONJUGAÇÃO A PONTOS QUÂNTICOS

Conforme tópico 4.4, a conjugação das lectinas SteLL e PgTeL a PQs de telureto de cádmio (CdTe) foi realizada. Os picos de emissão fluorescente foram 643 nm para PQ-SteLL e 680 nm para PQ-PgTeL (Figura 10). Esses achados corroboram com os de Silva e colaboradores (2021).

Figura 10 - Picos de absorção e emissão para PQs livres (linhas cheias), PQ-SteLL (A, tracejado) e PQ-PgTeL (B, tracejado).



Fonte: A Autora, 2022.

Por meio da equação de Lambert-Beer e dos espectros de absorção obtidos em UV-Vis, foi possível calcular as concentrações de conjugado nas amostras obtendo-se 2,2 μM para PQ-SteLL e 4,35 μM para PQ-PgTeL. No caso da solução Sham, a concentração de PQs estimada foi 3,1 μM . Como citado anteriormente, todas as amostras foram normalizadas, por meio de diluição em NaCl 0,9%, para concentração de menor valor obtida (2,2 μM). Após a diluição, todas amostras foram administradas aos animais.

5.4 ESTUDO DE TOXICIDADE AGUDA

O perfil de toxicidade aguda em dose única, após 14 dias, foi investigado para os dois conjugados (PQ-SteLL e PQ-PgTeL), bem como para um grupo Sham (apenas PQ) e outro controle negativo (NaCl 0,9%).

Os sinais clínicos e comportamentais observados em cada um dos grupos, durante a primeira hora após injeção dos compostos e ao longo de 14 dias, são relatados na Tabela 4. Em parênteses está o tempo no qual o sintoma se manifestou. O registro e correlação destes sintomas e os sistemas afetados, com o tipo de solução administrada aos animais, é importante na classificação de sua toxicidade, bem como é requisito quando se tratando de estudos de toxicidade aguda (SCHUPPAN; DAYAN; CHARLESWORTH, 1986; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA, 1996; ISO, 2017).

Como pontuado, todos os grupos que receberam amostras contendo PQs, seja na forma conjugado ou puro, apresentaram sinais clínicos entre o primeiro minuto e 24 h após administração intraperitoneal. Dentre estes, o grupo que apresentou mais sintomas foi o Sham, que recebeu amostra de pontos quânticos não conjugados. Entretanto, nenhum destes sintomas apresentou duração superior a 24 h, em todos os grupos estudados. Também vale ressaltar que em nenhum dos grupos houve morte de animais ou indicativos de lesões graves/irreversíveis. Assim, podemos considerar que os sinais clínicos apresentados não indicam toxicidade aguda relacionada aos compostos testados.

Podemos confirmar a hipótese acima por meio da avaliação de peso dos camundongos. Uma vez que os sintomas apresentados cessaram nas primeiras 24 h após administração, os animais apresentaram perfil normal de peso corpóreo, em comparação ao grupo controle. Os dados para este parâmetro são mostrados na Tabela 5, onde são apresentados os valores de peso inicial e final dos animais, bem como a variação após 14 dias da administração.

Tabela 4 – Sinais clínico-comportamentais registrados nos diferentes animais e grupos estudados.

GRUPO EXPERIMENTAL	SINAL CLÍNICO	SISTEMAS ENVOLVIDOS (ISO, 2017).
G1 – NaCl 0,9%	Não apresentou	-
G2 – Sham	Diminuição da deambulação (1 min); Distensão abdominal (15 min); Contração abdominal (30 min). Piloereção, diarreia, cromodacriorreia (24 h).	Sistema nervoso central (SNC), somatomotor, sensorial, neuromuscular, gastrointestinal e autonômico.
G3 – PQ-SteLL	Diminuição da deambulação (15 min); Autolimpeza (30 min). Piloereção, cromodacriorreia (24 h).	Sistema nervoso central (SNC), somatomotor, sensorial, neuromuscular e autonômico.
G4 – PQ-PgTeL	Contração abdominal (15 min); Pedalada (15 min); Autolimpeza (30 min). Piloereção, cromodacriorreia (24 h)	Sistema nervoso central (SNC), somatomotor, sensorial, neuromuscular e autonômico.

Tabela 5 – Média $\pm$ desvio-padrão dos pesos inicial, final e variação em 14 dias, entre os animais de diferentes grupos.

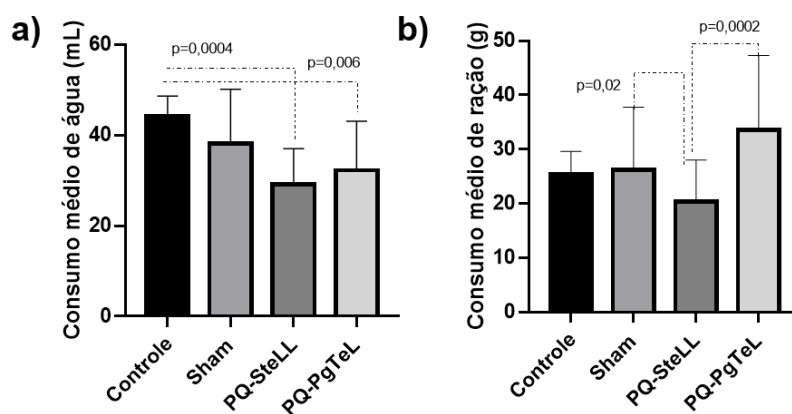
Grupos	Peso corpóreo (g)		Variação (g)
	Inicial	Final	
NaCl 0,9%	28,8 $\pm$ 2,1	29,0 $\pm$ 1,8	0,2 $\pm$ 0,1
Sham	32,0 $\pm$ 0,8	33,0 $\pm$ 1,5	1,0 $\pm$ 0,7
PQ-SteLL	31,0 $\pm$ 1,1	31,0 $\pm$ 0,8	0
PQ-PgTeL	31,0 $\pm$ 0,5	31,0 $\pm$ 0,5	0

Ao analisar os dados acima por meio de ANOVA seguida do teste de Tukey, não foram encontradas diferenças significativas acerca do peso dos animais dos quatro grupos ($p > 0,05$). Isto sugere que, mesmo havendo diferenças comportamentais nos animais que receberam

pontos PQs, estas diferenças não induziram toxicidade limitante para investigação clínica dos conjugados.

Ainda sobre os parâmetros comportamentais, o consumo médio de água e ração para cada grupo foi registrado (Figura 11). Em relação à água, houve diferenças significativas no consumo entre os grupos NaCl 0,9% versus PQ-SteLL ($p=0,0004$) e PQ-PgTeL ($p=0,0061$), quando se obtendo o valor p ajustado por teste de Tukey. Em relação ao grupo controle, os grupos PQ-SteLL e PQ-PgTeL consumiram menos 15 e 12 mL de água, respectivamente.

Figura 11 – Registros de consumo de alimento dos grupos testados. a) consumo médio de água (mL); b) consumo médio de ração (g) para o grupo.



Fonte: A Autora, 2022.

Quando analisando o consumo de ração, houve diferenças significativas entre os grupos PQ-SteLL e PQ-PgTeL ($p=0,0002$), uma vez que o primeiro grupo consumiu cerca de 13,2 g de ração a menos em relação ao segundo grupo. Também houve diferenças significativas entre os grupos Sham e PQ-SteLL ($p=0,02$), uma vez que o primeiro grupo consumiu 16,5 g de ração a mais que o segundo grupo.

Apesar das diferenças estatísticas significativas citadas, vale relembrar que não houve impacto no peso médio dos animais utilizados, quando comparando os diferentes grupos. Isso porque, após os 14 dias de observação, não ocorreram variações de peso acima de 20%, como preconizado pela OECD (OECD, 2001; ZHANG *et al.*, 2011).

Portanto, os resultados comportamentais ao longo de 14 dias não indicam toxicidade aguda *in vivo* dos conjugados PQ-SteLL e PQ-PgTeL. Entretanto, estes resultados devem sempre estar aliados à investigação de genotoxicidade e marcadores hematobiológicos, como os mostrados a seguir.

5.4.1 Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Os resultados de parâmetros hematológicos 14 dias após administração são mostrados na Tabela 6. Para estes, o teste ANOVA acusou valor $p > 0,05$, excluindo qualquer possibilidade de diferenças significativas entre os grupos. Dos mesmos animais, foram obtidos os valores acerca de marcadores bioquímicos, os quais são mostrados na Tabela 7.

Novamente, não foram detectadas diferenças significativas entre marcadores bioquímicos dos grupos controle e tratados com PQs, conjugados ou não, visto que o ANOVA acusou valor $p > 0,05$ entre os grupos. Estes resultados corroboram, mais uma vez, com a hipótese da ausência de toxicidade dos compostos, quando aplicados *in vivo*. Além disso, indicam a segurança da realização dos demais testes que esta tese propôs, quando agregados aos resultados de histopatologia dos órgãos dos animais, mostrados a seguir.

Tabela 6 – Parâmetros hematológicos dos animais tratados. Valores representam média $\pm$ erro-padrão da média (n=5 animais/grupo). Sem diferenças significativas ($p < 0,05$) ao comparar os grupos tratados ao grupo controle (NaCl 0,9%).

Parâmetro	Tratamento			
	NaCl 0,9 %	Sham	PQ-SteLL	PQ-PgTeL
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	5,46 $\pm$ 0,45	5,60 $\pm$ 0,45	5,79 $\pm$ 0,52	5,69 $\pm$ 0,42
Hematócrito (%)	38,65 $\pm$ 3,64	36,95 $\pm$ 3,05	37,48 $\pm$ 3,48	37,86 $\pm$ 3,23
Hemoglobina (g/dL)	14,2 $\pm$ 0,37	14,81 $\pm$ 0,55	14,43 $\pm$ 0,56	14,34 $\pm$ 0,42
VCM (fL)	48,25 $\pm$ 4,05	47,65 $\pm$ 4,16	45,23 $\pm$ 4,25	46,52 $\pm$ 4,33
HCM (pg)	16,24 $\pm$ 0,30	16,33 $\pm$ 0,52	16,25 $\pm$ 0,32	16,33 $\pm$ 0,35
CHCM (%)	37,45 $\pm$ 3,12	36,57 $\pm$ 3,24	38,16 $\pm$ 3,21	37,40 $\pm$ 3,37
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	8,02 $\pm$ 0,68	8,34 $\pm$ 0,65	8,31 $\pm$ 0,54	8,26 $\pm$ 0,64
Segmentados (%)	62,24 $\pm$ 5,11	62,76 $\pm$ 4,32	61,75 $\pm$ 6,10	61,35 $\pm$ 5,57
Linfócitos (%)	31,54 $\pm$ 3,03	30,91 $\pm$ 3,25	33,18 $\pm$ 3,65	32,24 $\pm$ 3,14
Monócitos (%)	3,75 $\pm$ 0,37	3,92 $\pm$ 0,46	3,87 $\pm$ 0,45	3,40 $\pm$ 0,42
Basófilos (%)	0,21 $\pm$ 0,04	0,23 $\pm$ 0,04	0,20 $\pm$ 0,03	0,18 $\pm$ 0,04
Eosinófilos (%)	3,45 $\pm$ 0,27	3,26 $\pm$ 0,31	3,19 $\pm$ 0,24	3,13 $\pm$ 0,25

VCM: volume corpuscular médio; MCH: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração corpuscular média de hemoglobina.

Tabela 7 – Parâmetros bioquímicos dos animais tratados. Valores representam média $\pm$ erro-padrão da média (n=5 animais/grupo).

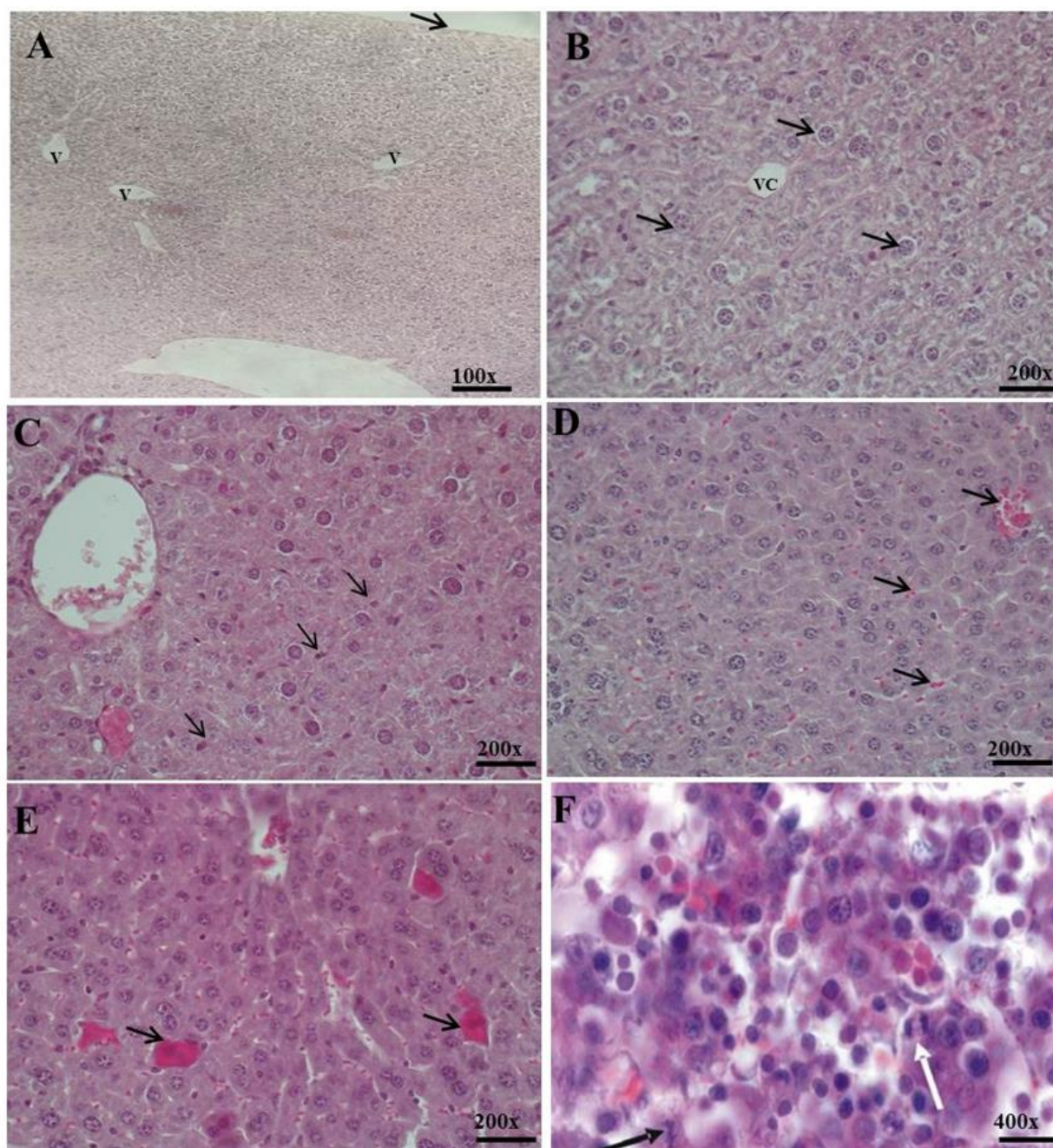
Parâmetro	Tratamento			
	NaCl 0,9%	Sham	PQ-SteLL	PQ-PgTeL
Albumina (g/dL)	30,65 $\pm$ 2,92	31,12 $\pm$ 2,42	32,15 $\pm$ 2,70	30,89 $\pm$ 3,02
ALT (U/L)	68,73 $\pm$ 5,15	67,79 $\pm$ 5,15	68,05 $\pm$ 5,43	67,54 $\pm$ 5,10
AST (U/L)	92,17 $\pm$ 7,74	95,30 $\pm$ 7,11	93,54 $\pm$ 6,55	93,62 $\pm$ 7,18
GGT (U/L)	12,45 $\pm$ 0,42	12,26 $\pm$ 0,38	12,36 $\pm$ 0,32	12,30 $\pm$ 0,31
Fosfatase Alcalina (IU/L)	11,62 $\pm$ 0,39	11,94 $\pm$ 0,31	11,25 $\pm$ 0,27	11,27 $\pm$ 0,33
Proteínas Totais (g/dL)	62,27 $\pm$ 5,14	61,55 $\pm$ 6,03	61,43 $\pm$ 5,27	62,11 $\pm$ 5,39
Creatinina (mg/dL)	3,32 $\pm$ 0,31	3,75 $\pm$ 0,39	3,59 $\pm$ 0,36	3,28 $\pm$ 0,31
Ureia	0,27 $\pm$ 0,04	0,32 $\pm$ 0,05	0,29 $\pm$ 0,06	0,32 $\pm$ 0,05

ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; GGT: gama glutamil transferase. Sem diferenças significativas ($p < 0,05$) ao comparar os grupos tratados ao grupo controle (NaCl 0,9%).

5.4.2 Análises histopatológicas

A análise morfológica do fígado dos animais de todos os grupos experimentais mostrou que esse órgão se apresentou anatomicamente normal apresentando, externamente, uma delgada cápsula constituída por mesotélio, e lóbulos contendo veias de vários calibres. Além disso, o parênquima mostrou hepatócitos dispostos desordenadamente em torno da veia centro lobular. Essas células apresentam morfologia poliédrica, núcleo central, nucléolo proeminente e citoplasma acidófilo (Figura 12).

Figura 12 - Histologia do fígado dos animais dos grupos experimentais



A- Grupo controle negativo (NaCl 0,9%), apresentando delgada cápsula de mesotélio (seta) e vasos de vários calibres (v). B- Grupo controle negativo com hepatócitos (setas) e a veia centrolobular (vc). C- Grupo sham, apresentando células de Kupffer (setas). D- Grupo PQ-SteLL com acúmulo de sangue tecidual (setas). E- Grupo PQ-PgTeL com predominância de células hematopoiéticas (setas). F- Grupo PQ-PgTeL apresentando hepatócitos em mitose (setas).

Verificou-se ainda, entre os hepatócitos, capilares sinusóides, com células de Kupffer na sua parede, como observado por Fischer e colaboradores (2010), nos fígados de animais tratados com albumina conjugada a pontos quânticos (FISCHER *et al.*, 2010).

No entanto, os grupos PQ-SteLL e PQ-PgTeL apresentaram um maior acúmulo de sangue tecidual com pequenas áreas de possível congestão, além da presença de células hematopoiéticas (megacariócitos). Entretanto, não foram observadas hipertrofia e necrose das células hepáticas, corroborando com os valores normais de parâmetros bioquímicos, mostrados anteriormente, para todos os grupos estudados.

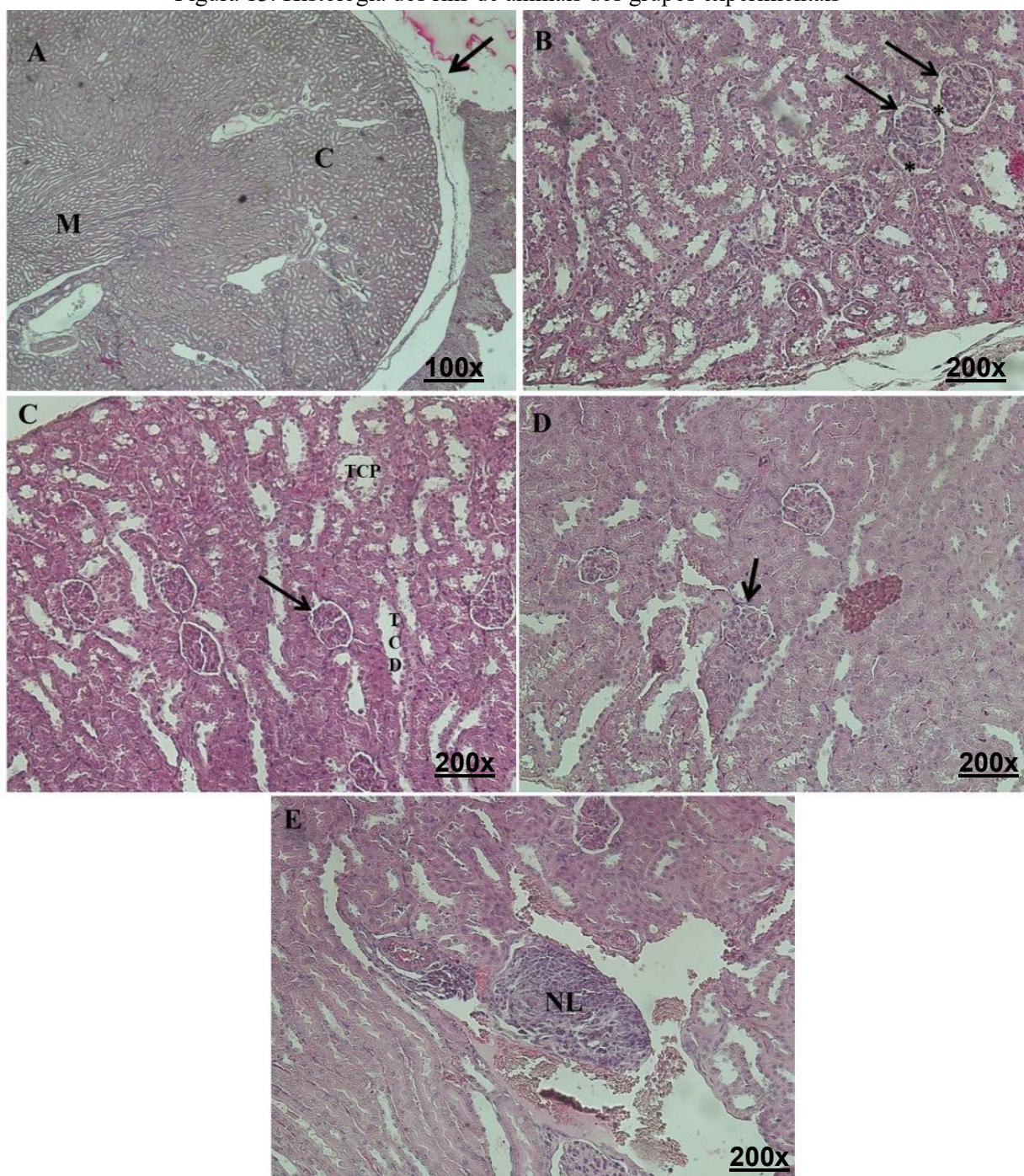
Os megacariócitos são células com núcleo multilobado, citoplasma eosinofílico e homogêneo, e frequentemente são associados ao processo de hematopoiese (LE MOS *et al.*, 2012). Quando presentes no fígado, estas células indicam processo de hematopoiese extramedular, um dos mecanismos do organismo para síntese de novas células sanguíneas, numa forma de reparar danos (CENARIU *et al.*, 2021).

Foi observado no grupo PQ-PgTeL hepatócitos em atividade mitótica. Esta atividade pode ser justificada pela ação das células de Kupffer ativadas, que promovem liberação da interleucina 6, relacionada à ativação do processo mitótico para regeneração hepática (OZAKI, 2021). Esta observação, quando comparada aos achados dos ensaios de genotoxicidade, confirmam a transitoriedade e o baixo índice de dano do conjugado PQ-PgTeL, bem como a capacidade do organismo em reparar estes danos.

Conforme a Figura 13, os rins dos animais do grupo NaCl 0,9%, Sham e PQ-SteLL demonstraram estar bem preservados, estando revestidos por uma cápsula de tecido conjuntivo, apresentando, ainda, a região cortical e medular bem delimitadas. Na região cortical, observam-se os glomérulos e o espaço subcapsular bem definidos, além de túbulos contorcidos proximais e distais com características normais, sem nenhuma alteração. Entretanto, nos rins dos animais do grupo PQ-PgTeL, foram observados alguns corpúsculos com ausência do espaço subcapsular e a presença de nódulos linfóides.

Sabe-se que a formação de tecidos linfóides no parênquima renal está associada a condições inflamatórias. Esses tecidos contêm linfócitos B e T, células dendríticas, circundadas por vasos neolinfáticos, ou seja, células capazes de metabolizar e eliminar nanopartículas. Além disso, considera-se que os nódulos linfóides renais são uma das primeiras estruturas formadas, pelos rins, nos processos anti-inflamatórios e autoimunes renais (MANDACHE, PENESCU, 2011). Apesar da ausência de alguns dos espaços subcapsulares renais, não houve indícios de danos irreversíveis a este órgão.

Figura 13: Histologia dos rins de animais dos grupos experimentais



A- Grupo controle negativo apresentando o rim revestido por tecido conjuntivo (seta) e delimitado pela região cortical (C) e medular (M). B- Grupo Sham observa-se a presença de glomérulos renais (seta) e um espaço subcapsular evidente (asterisco). C- Grupo PQ-SteLL com características morfológicas normais do túbulo contorcido distal (TCD) e proximal (TCP), além da presença de glomérulos (seta). D- Grupo PQ-PgTeL com alguns corpúsculos com ausência do espaço subcapsular (seta). E- Grupo PQ-PgTeL apresentando nódulos linfóides.

Logo, podemos inferir que, independentemente do tratamento ao qual os animais foram submetidos, não houve indícios de toxicidade aguda irreversível no fígado e rins, os dois órgãos

que mais captam os conjugados. Esse fato pode ser confirmado pelos resultados de parâmetros comportamentais, genotóxicos, hematológicos, bioquímicos e histológicos.

5.4.3 Quantificação de Cádmio

A qualidade do método analítico para quantificação de cádmio foi estimada, com base no tratamento e análise de três replicatas do material de referência certificado, e seus dados são mostrados na Tabela 8. Os valores do Número En entre -1 e 1 indicam qualidade do procedimento analítico em nível de 95%. Logo, o método apresentou-se adequado para as análises propostas.

Tabela 8 - Avaliação da qualidade do processo analítico empregado para quantificação de cádmio nos órgãos de animais controle e tratados.

Amostra	Valor obtido (mg/kg)	Incerteza (mg/kg)	Valor certificado (mg/kg)	Incerteza do valor certificado (mg/kg)	Número E_n^*
TM1-1	0,614	0,121	0,580	0,100	0,218
TM1-2	0,682	0,135	0,580	0,100	0,610
TM1-3	0,704	0,148	0,580	0,100	0,938
				Média	0,589

TM1-1: material de referência, replicata um; TM1-2: material de referência, replicata 2; TM1-3: material de referência, replicata 3. *: incerteza padrão.

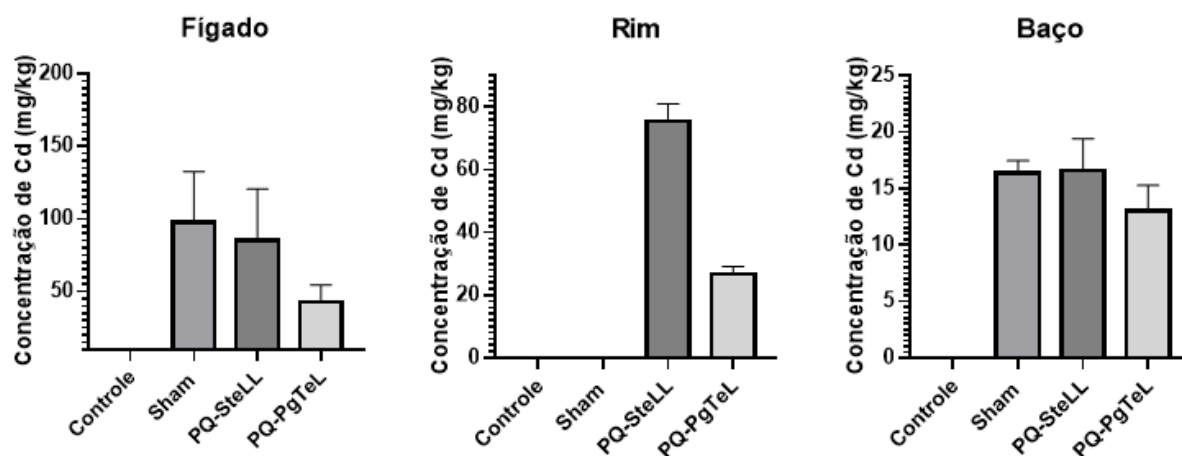
A literatura cita que as nanopartículas que não se degradam *in vivo*, como é o caso dos PQs, podem sofrer três mecanismos de eliminação: via captação pelo sistema retículo endotelial, via sistema hepático, via fezes ou por filtração renal (SOO CHOI *et al.*, 2007). Com base nessa informação, foram analisadas as concentrações dos conjugados e de PQs livres no baço, fígado e rins dos animais aplicados na investigação de toxicidade aguda. Uma vez que o componente do núcleo dos PQs de CdTe é o cádmio, esse elemento foi quantificado.

Os gráficos de concentração de cádmio em cada órgão de animais sadios são mostrados na Figura 14. Os valores são expressos em miligrama de cádmio por quilograma dos órgãos.

Observa-se que a concentração do elemento nos órgãos de animais controle ficou abaixo da concentração mínima detectável (0,03 mg/kg), confirmando sua ausência.

Em ordem decrescente, os órgãos que apresentaram maior acúmulo de cádmio foram fígado, rim e baço. No caso dos testes em grupos Sham, a presença de cádmio foi detectada no fígado e baço de animais tratados, e se assemelha ao estudo de Nguyen e colaboradores (2019). Ao administrar intravenosamente CdTe a animais, os autores constataram que, após uma semana, os órgãos que mais acumularam cádmio foram fígado, baço e rins, respectivamente (NGUYEN *et al.*, 2019).

Figura 14 – Concentração de cádmio *versus* massa dos órgãos, frente aos diferentes tratamentos do ensaio de toxicidade aguda. Dados em média $\pm$ erro-padrão da média.



Fonte: A Autora, 2022.

A maior concentração dos conjugados e PQ no fígado pode ser explicada pelo fato de que esse órgão, que é um componente do sistema retículo-endotelial e de eliminação, sequestra cerca de 30 a 90% das nanopartículas que chegam à corrente sanguínea (ZHANG *et al.*, 2016; LU; TANG; ZHANG, 2019). Estudo prévio de Fischer e colaboradores (2010) mostrou que a proteína albumina, quando conjugada a PQs, foi fagocitada por células de Kupffer, uma vez que estas células possuem tropismo por nanopartículas com carga (FISCHER *et al.*, 2010).

Ainda em relação ao fígado, não foram observadas diferenças estatísticas significativas das concentrações de cádmio entre grupos tratados com PQs livres, conjugados a Stell ou PgTeL (p corrigido $\geq 0,6$). O mesmo foi observado em relação ao baço, para o qual nenhuma diferença estatística significativa foi observada, em se comparando aos grupos Sham, PQ-Stell

e PQ-PgTeL (p corrigido $\geq 0,5$). Logo, a hipótese é de que a conjugação às lectinas não altera o perfil de captação dos pontos quânticos pelo baço e fígado.

A captação de PQs de CdTe pelo baço, se justifica pelo fato de que este é outro importante órgão do sistema retículo-endotelial. Nele, o sangue é filtrado, anticorpos são sintetizados e as respostas imunes acontecem. Diversos estudos mostram a captação de sistemas de pontos quânticos pelo baço (NGUYEN *et al.*, 2019; LIANG; ZHANG; TANG, 2022).

As concentrações médias de Cd nos rins dos animais foram zero para o grupo Sham, $75,33 \pm 5,7$ para PQ-SteLL, e $28,82 \pm 2,35$ para PQ-PgTeL. O teste de Tukey acusou diferença estatística significativa entre os grupos, indicando que dos três tratamentos, PQ-SteLL foi a que mais se depositou nos rins dos animais.

No caso das proteínas globulares, diâmetros hidrodinâmicos entre 5-6 nm são associados à eliminação rápida e eficiente do organismo via filtração renal e excreção urinária (LUND *et al.*, 2003). Este dado mostra que, conjugados nesse intervalo de diâmetro serão facilmente eliminados e evitarão a presença de toxicidade. Com base na metodologia de Soo (2007), os diâmetros hidrodinâmicos calculados para SteLL e PgTeL são 4,69 nm e 6,05 nm, respectivamente (SOO CHOI *et al.*, 2007). Estes diâmetros ainda não consideram o tamanho do conjugado destas lectinas com os PQs, mas se aproximam do limiar para eliminação renal rápida, citada acima.

No caso do CdTe, a conjugação a uma molécula orgânica frequentemente resulta no aumento do diâmetro hidrodinâmico final dos pontos quânticos, o que muitas vezes pode dificultar a eliminação renal dos conjugados (SOO CHOI *et al.*, 2007). Logo, podemos inferir que o acúmulo dos conjugados nos rins se deve ao diâmetro das moléculas estar acima do limiar de filtração renal. Além disso, não houve acúmulo de cádmio nos rins de animais do grupo Sham, reforçando a hipótese de que os conjugados apresentam captação renal, principalmente PQ-SteLL.

5.4.5 Genotoxicidade

Na Tabela 9 é possível observar os resultados obtidos no ensaio cometa, para cada um dos tratamentos utilizados. Nossos resultados mostram que o grupo tratado com PQ-PgTeL, apresentou índice e frequência de danos significativamente maiores em comparação ao controle negativo (G1). Entretanto, estes danos foram menores quando se comparou o mesmo grupo ao controle positivo.

Tabela 9 – Índices de dano para cada classe e frequência de dano no ensaio cometa, em camundongos tratados com PQ, PQ-SteLL, PQ-PgTeL e controles.

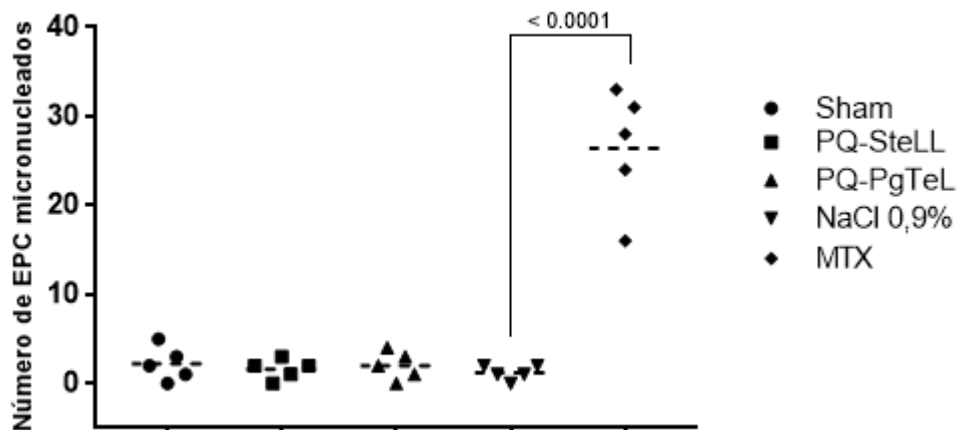
Grupo	Classe de dano					Índice de dano	Frequência de dano
	0	1	2	3	4		
CP	9,2 ± 8,7*	24,2 ± 4,4	20,0 ± 1,9*	33,8 ± 3,5*	12,8 ± 4,3*	216,8 ± 22,5*	90,8 ± 8,7*
CN	78,2 ± 1,3 [#]	20,0 ± 0,9	1,6 ± 0,6 [#]	0,2 ± 0,2 [#]	0 ± 0 [#]	23,8 ± 2,0 [#]	21,8 ± 1,4 [#]
Sham	76,8 ± 2,6 [#]	17,0 ± 2,1	5,0 ± 1,3 [#]	0,8 ± 0,4 [#]	0,4 ± 0,4 [#]	31,0 ± 4,9 [#]	23,2 ± 2,7 [#]
PQ-SteLL	66,8 ± 4,9 [#]	22,8 ± 2,3	7,4 ± 1,5 [#]	1,8 ± 0,7 [#]	1,2 ± 0,1 [#]	47,8 ± 10,2 [#]	33,2 ± 4,1 [#]
PQ-PgTeL	28,8 ± 5,3 [#]	36,4 ± 2,7 [#]	28,8 ± 2,3*	9,4 ± 1,9 ^{#*}	4,6 ± 0,9	124,6 ± 10,5 ^{#*}	71,2 ± 5,3*

Dados mostrados como média ± erro-padrão da média. CP: controle positivo (metotrexato), CN: controle negativo (NaCl 0,9%). * p < 0,05 em relação ao controle negativo. # p < 0,05 em relação ao controle positivo.

Entretanto, ao comparar os resultados do ensaio com os do teste de micronúcleo (Figura 15), que foi realizado 48 h após a administração dos compostos, notou-se ausência de indicadores de dano permanente ao material genético em todos os grupos tratados. Estes achados podem ser justificados pelo fato de que o ensaio cometa revela lesões transientes no DNA, incluindo as que poderão ser restauradas presentes no processo de reparo do DNA (BAGHAT, 2017). O ensaio cometa é altamente sensível e capaz de detectar o emparelhamento errado de bases na fita de DNA causado por diferentes agentes. No entanto, esses danos são passíveis de correção pelos mecanismos endógenos. Estudo mostra que até mesmo alguns fármacos estabelecidos como não carcinogênicos também testaram positivo em ensaio cometa (KIRKLAND *et al.*, 2019).

Assim, podemos notar a importância de realizar o teste de micronúcleo em paralelo ao ensaio cometa, com o objetivo de observar se os danos primários irão induzir alterações cromossômicas, carcinogênicas e se essas serão transmitidas para outras gerações (CORDELLI *et al.*, 2021; MOLLER, 2017).

Figura 15 - Frequência de eritrócitos policromáticos (EPC) micronucleados, detectados no teste do micronúcleo, em camundongos tratados com PQ, PQ-SteLL, PQ-PgTeL e controles positivo (MTX) e negativo (NaCl 0,9%).



Fonte: A Autora, 2022.

Com base nos resultados, podemos inferir que, apesar do conjugado PQ-PgTeL ter induzido dano ao DNA nas primeiras 24 h, esse dano não se originou quebras cromossômicas (danos clastogênicos) ou segregação cromossômica anormal (danos aneugênicos), uma vez que não houve a produção de micronúcleos. Entretanto, ainda são necessários estudos para elucidar a causa dos danos causados por PQ-PgTeL, observados no ensaio cometa. A exemplo podemos citar os testes de micronúcleo em medula óssea aliado ao ensaio cometa em hepatócitos (KIRKLAND *et al.*, 2019).

5.4.3 Quantificação de Micronutrientes

Na Tabela 10 são mostradas, em partes por milhão (ppm), as concentrações dos elementos quantificados em baço, fígado e rim dos animais tratados. Sódio (Na), magnésio (Mg), alumínio (Al), cálcio (Ca), manganês (Mn), cobre (Cu), zinco (Zn), estrôncio (Sr) também foram investigados nas amostras, entretanto, não apresentaram quantidades acima da concentração mínima determinável pelo equipamento.

Em todos os órgãos e diferentes tratamentos, a análise de variância indicou que não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Logo, independente do tratamento, as concentrações de enxofre, potássio, fósforo, cloro e ferro nos órgãos dos animais permaneceu a mesma. Esta constatação foi confirmada pelo teste de Tukey, que indicou valor p maior que

0,9 para todos os grupos. Assim, podemos afirmar que o aspecto nutricional de micronutrientes não influenciou, tampouco exerceu influência, no ensaio de toxicidade aguda.

Além disso, os resultados acerca do aspecto nutricional corroboram com a avaliação de peso, hematologia, bioquímica e genotoxicidade. Em conjunto, estes indicam ausência de toxicidade aguda dos conjugados.

Tabela 10 – Micronutrientes (elementos) quantificados em baço (a), rim (b) e fígado (c) dos animais tratados. Valores expressos em média $\pm$ erro-padrão da média (n=5 animais/grupo). $p > 0,05$ entre todos os grupos. G1: NaCl 0,9%, G2: Sham, G3: PQ-SteLL, G4: PQ-PgTeL.

	Fígado				Baço				Rins			
Elemento	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
S	12656,75 $\pm 256,89$	14054,20 $\pm 1197,35$	14144,00 $\pm 574,69$	15310,00 $\pm 317,63$	10733,00 $\pm 495,62$	11725,86 $\pm 1179,21$	10822,80 $\pm 445,68$	11383,60 $\pm 250,54$	6695,75 $\pm$ 1193,60	7210,20 $\pm$ 1112,04	8798,60 $\pm$ 147,98	8249,00 $\pm$ 398,50
K	11363,00 $\pm 150,63$	11481,60 $\pm 714,45$	11260,80 $\pm 112,58$	11283,50 $\pm 491,87$	11258,25 $\pm 3231,50$	14759,64 $\pm 980,92$	15787,60 $\pm 384,27$	16554,80 $\pm 416,08$	7732,25 $\pm$ 807,54	7835,80 $\pm$ 788,27	8656,40 $\pm$ 166,71	8383,40 $\pm$ 229,44
P	6449,50 $\pm$ 108,46	7373,00 $\pm$ 494,93	7122,60 $\pm$ 183,10	7957,00 $\pm 397,74$	9504,25 $\pm$ 789,36	9134,42 $\pm$ 738,57	9822,60 $\pm$ 457,46	10600,80 $\pm 646,80$	6155,75 $\pm$ 763,65	6361,40 $\pm$ 725,206	6821,60 $\pm$ 98,59	6488,80 $\pm$ 321,78
Cl	3624,25 $\pm 366,61$	3427,40 $\pm$ 551,88	2918,60 $\pm$ 160,35	4570,80 $\pm$ 1728,39	6154,50 $\pm$ 261,14	5495,80 $\pm$ 619,37	5948,00 $\pm$ 142,67	6356,22 $\pm 142,81$	3881,75 $\pm 560,96$	3941,40 $\pm$ 607,78	4488,4 ± 1 07,28	4351,60 $\pm$ 246,25
Fe	488,25 $\pm$ 70,40	1314,21 $\pm$ 803,80	527,20 $\pm$ 53,79	471,20 $\pm$ 123,72	3067,00 $\pm 291,96$	3965,30 $\pm 927,52$	4758,00 $\pm 532,47$	6267,20 $\pm 1249,30$	401,250 $\pm 54,29$	292,01 $\pm 49,903$	241,80 ± 2 4,24	264,80 $\pm 10,83$

5.5 ESTUDO DE BIODISTRIBUIÇÃO EM ANIMAIS PORTADORES DE SARCOMA

180

A qualidade do método analítico de quantificação de cádmio foi estimada, com base em cinco replicatas do material de referência certificado, e seus dados são mostrados na Tabela 11. Vale ressaltar que os materiais de referência passaram pelo mesmo processo de pesagem, digestão, tratamento e análise que as amostras contendo órgãos passaram.

Os valores do Número En entre -1 e 1 indicam qualidade do procedimento analítico em nível de 95%. Uma vez que a média estimada para o número En foi 0,5, o método apresentou-se adequado para as análises propostas.

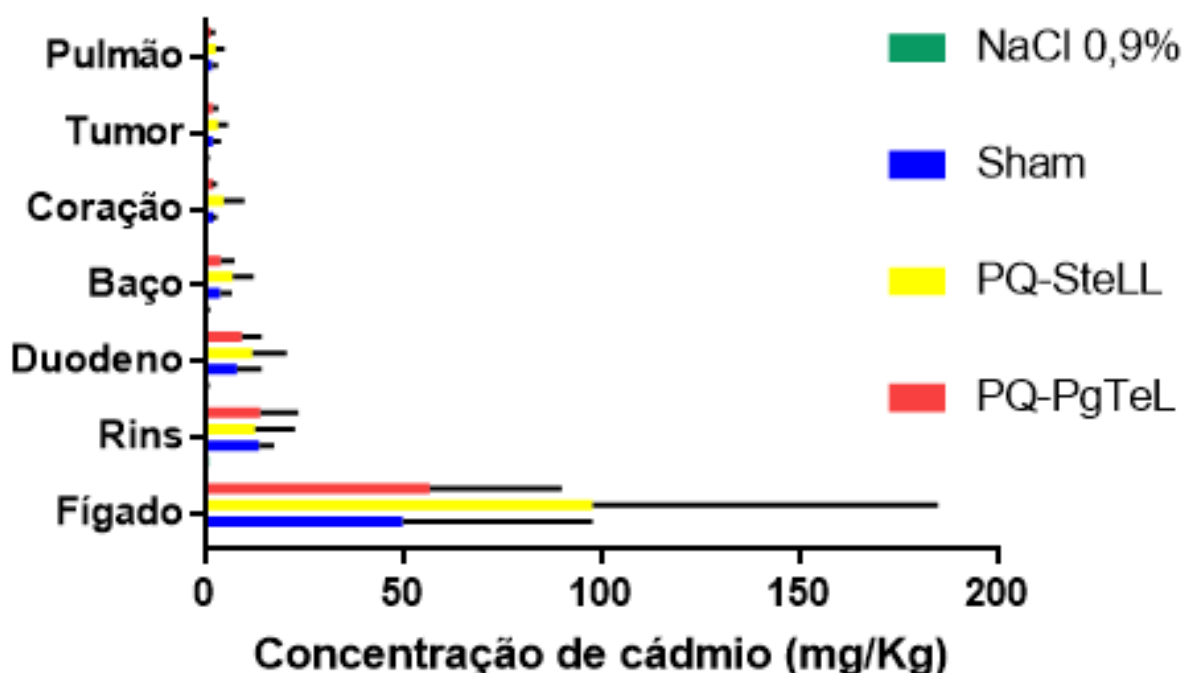
Tabela 11 - Avaliação da qualidade do processo analítico empregado para quantificação de cádmio nos órgãos de animais controle e tratados.

Replicatas	Valor obtido (mg/kg)	Incerteza (mg/kg)	Valor certificado (mg/kg)	Incerteza do valor certificado (mg/kg)	Número E_n^*
TM1-1	0,76	0,18	0,580	0,100	0,8
TM1-2	0,73	0,18	0,580	0,100	0,7
TM1-3	0,74	0,18	0,580	0,100	0,8
TM1-4	0,60	0,15	0,580	0,100	0,1
TM1- 5	0,74	0,18	0,580	0,100	0,8
Média					0,5

TM1-1: material de referência, replicata um. *: índice de qualidade do processo analítico.

Após certificação do método, o perfil de biodistribuição de PQs livres e conjugados a SteLL e PgTeL foram adquiridos. As concentrações de cádmio versus órgão são mostradas na Figura 16. Corroborando com o observado na quantificação de cádmio do ensaio de toxicidade aguda, os órgãos que mais captaram os sistemas de PQs foram, em ordem decrescente: fígado, rins, duodeno, baço, coração, tumor e pulmão.

Figura 16 - Perfil de biodistribuição de cádmio nos órgãos de animais portadores de sarcoma 180, após 24 h da administração intraperitoneal dos compostos



Fonte: A Autora, 2022.

Dados de média e desvio padrão para cada órgão e tratamento são apresentados também na Tabela 12. Novamente pode-se observar a grande captação dos compostos nos órgãos do sistema retículo endotelial (fígado e baço), bem como pelos rins. Estes achados se assemelham aos de Chen e colaboradores (2022), que observaram a maior captação de PQs de CdSe em fígado e rins. Os autores ainda concluíram que as vias hepatobiliar e renal são as maiores responsáveis pela degradação e eliminação dos nano compostos (CHEN *et al*, 2022).

A presença de PQ não-conjugados, PQ-SteLL e PQ-PgTeL em órgãos como duodeno, coração e pulmão pode ser explicada pela presença destes na circulação sanguínea. Foi observado que, uma vez no sangue de camundongos, os compostos de PQs se espalham sistemicamente e, dependendo de sua afinidade, tamanho e funcionalização, se depositam em maior quantidade em determinados órgãos (NGUYEN *et al*, 2019; DU *et al*, 2019). Além disso, no caso do duodeno, a captação observada pode ser justificada por sua proximidade ao sítio de injeção intraperitoneal.

Tabela 12 – Concentração de cádmio (mg/kg) em órgãos de camundongos tratados com PQ, PQ-SteLL, PQ-PgTeL e controles.

Órgão	Tratamento			
	NaCl 0,9%	Sham	PQ-SteLL	PQ-PgTeL
Fígado	0,00±0,00	62,42±21,96 ^a	97,88±43,24 ^a	70,97±4,98 ^a
Rins	1,19±0,42	13,65±1,59 ^a	15,78±3,66 ^a	17,49±2,58 ^a
Duodeno	0,43±0,03	10,06±1,94 ^a	14,94±2,48 ^a	9,23±1,97 ^a
Baço	0,42±0,12	4,86±0,30 ^a	8,70±1,47 ^a	4,92±1,13 ^a
Coração	0,00±0,00	2,19±0,13 ^a	4,75±2,04 ^a	2,01±0,19 ^a
Tumor	0,19±0,16	1,96±0,62 ^{a,b}	4,06±0,44 ^{a,c}	1,91±0,38 ^{a,b}
Pulmão	0,00±0,00	1,69±0,40 ^a	2,75±0,70 ^a	1,45±0,26 ^a

Dados mostrados como média ± erro-padrão da média. a: $p < 0,05$ em relação ao grupo NaCl 0,9%. b: $p < 0,05$ em relação ao grupo PQ-SteLL. c: $p < 0,05$ em relação ao grupo PQ-PgTeL.

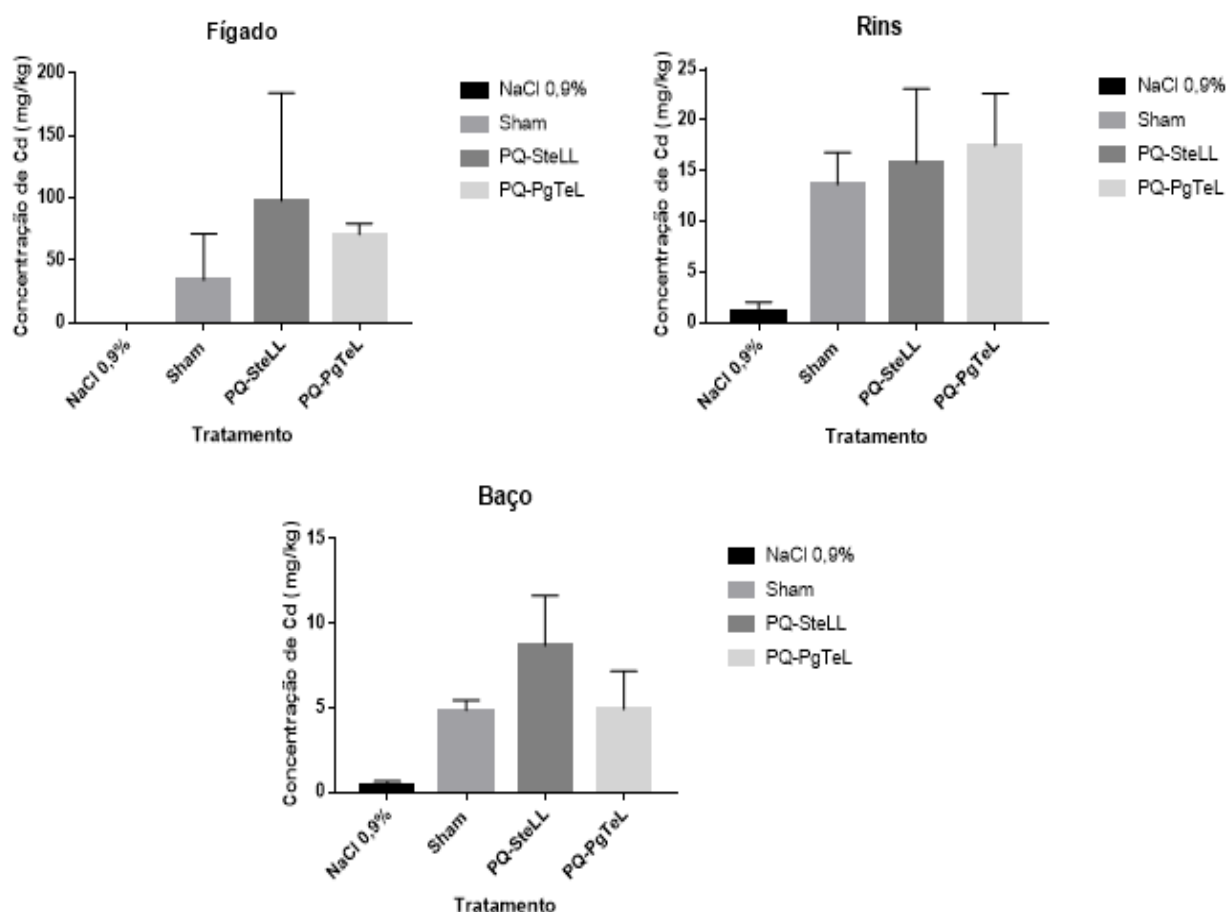
Analisando separadamente cada órgão, podemos observar com mais clareza o comportamento dos conjugados *in vivo*. A Figura 17 mostra as concentrações de cádmio no fígado, rins e baço dos animais. Uma vez que estes três órgãos são importantes componentes do sistema retículo endotelial e de eliminação de compostos, cabe os agrupar para análise.

No caso do fígado, foi observado que a maior concentração de cádmio ocorreu no grupo PQ-SteLL ($97,88 \pm 43,24$ mg/kg), porém não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados. Estes resultados, quando comparados aos obtidos em ensaio de toxicidade, reforçam a hipótese de que a conjugação não altera o perfil de captação de dos PQs neste órgão.

No caso dos rins, foi observado que o grupo PQ-PgTeL apresentou maior deposição ($17,49 \pm 2,58$ mg/kg), em comparação aos grupos Sham e PQ-SteLL. Entretanto, a comparação estatística entre os grupos não acusou diferenças significativas. Estes achados diferem do achado no ensaio de toxicidade aguda de 14 dias, onde os rins não apresentaram captação no grupo Sham e mostraram maior concentração de PQ-SteLL do que PQ-PgTeL. Uma vez que

estes resultados representam grupos de órgãos com 24 h após administração, pode-se inferir que o tempo pós administração dos conjugados apresenta influência direta no perfil de captação apresentado pelos rins.

Figura 17 - Perfil de biodistribuição de cádmio no fígado, baço e rins de animais portadores de sarcoma 180, após 24 horas da administração intraperitoneal dos compostos.



Fonte: A Autora, 2022.

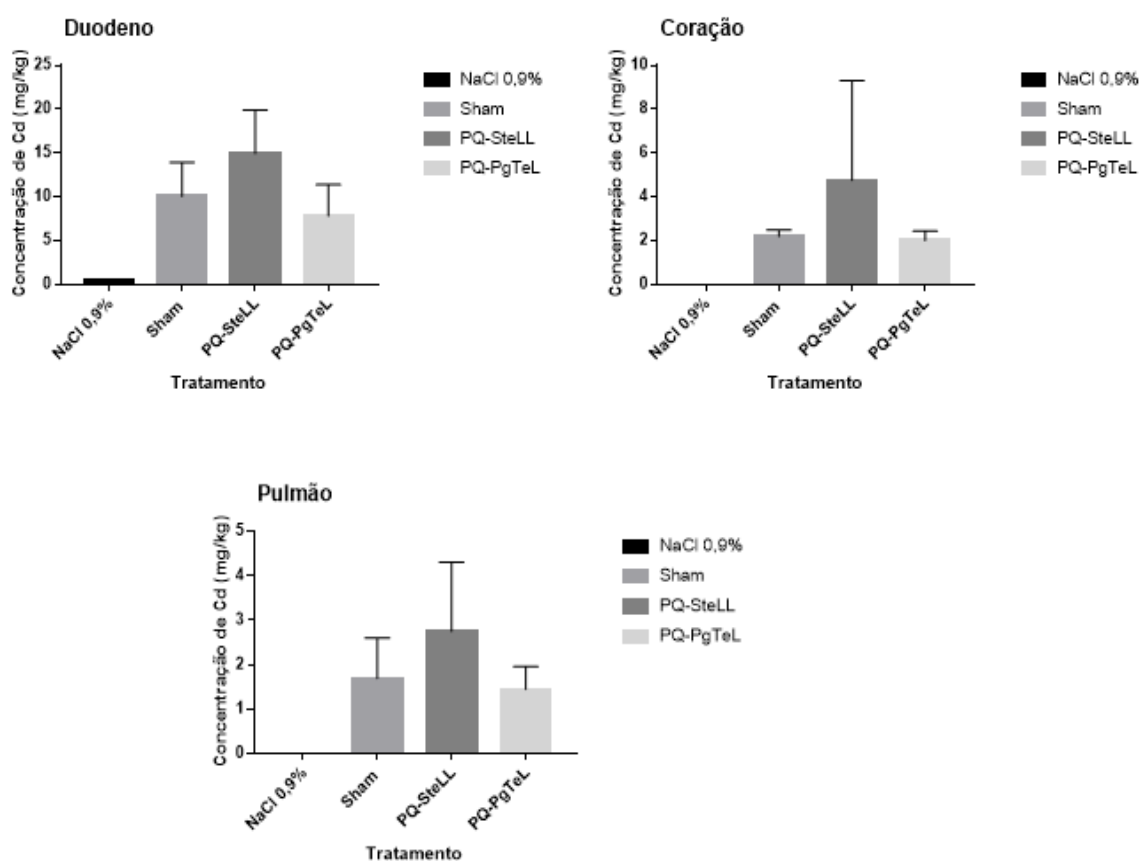
Para o baço, a maior concentração de cádmio observada foi no grupo PQ-Stell ($8,70 \pm 1,47$ mg/kg), porém sem diferença estatística significativa entre Sham e PQ-PgTeL. Este resultado se assemelha ao encontrado no baço de animais, após 14 dias da administração dos compostos.

A literatura cita que uma das formas de evitar a captação e eliminação de nano compostos são a encapsulação e funcionalização. Du e colaboradores (2019) demonstraram que a funcionalização de PQs CdTe com polietilenoglicol levou à redução de captação no fígado e rins, bem como reduziu o estresse oxidativo e toxicidade do composto *in vivo* (DU *et al*, 2019).

Logo, estima-se que essa abordagem poderia ser relevante se aplicada aos conjugados PQ-SteLL e PQ-PgTeL, evitando a grande absorção dos compostos no fígado, baço e rins.

Por apresentar proximidade ao sítio de injeção intraperitoneal, o duodeno foi um dos órgãos que passou pela quantificação de cádmio, para avaliação da captação dos compostos em estudo. Os resultados são mostrados na Figura 18.

Figura 18 - Perfil de biodistribuição de cádmio em duodeno, coração e pulmão de animais portadores de sarcoma 180, após 24 h da administração intraperitoneal dos compostos.



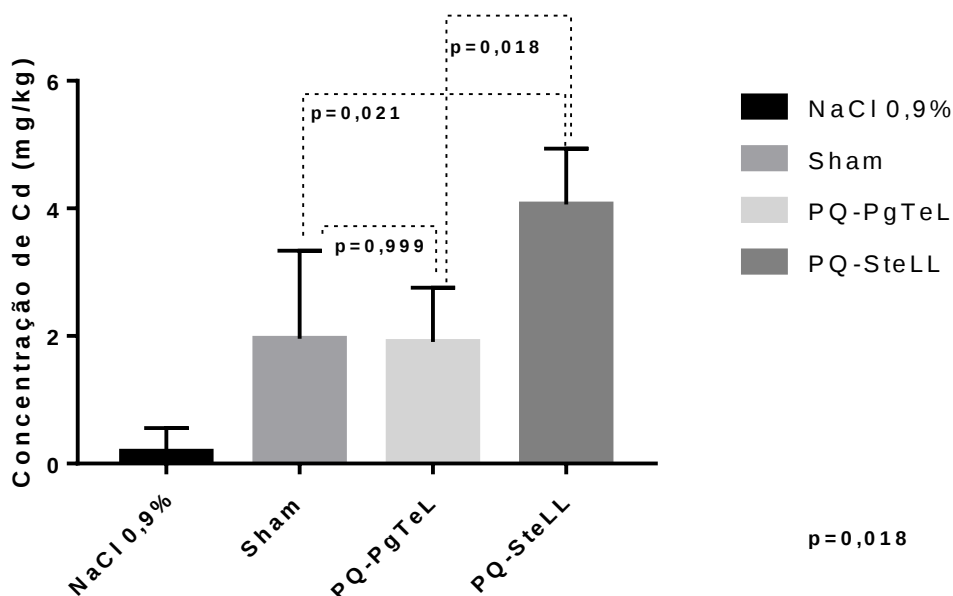
Fonte: A Autora, 2022.

Foi observada captação dos conjugados no duodeno, sobretudo em relação a PQ-SteLL ($14,94 \pm 2,48$). Entretanto não foram estimadas diferenças significativas entre os grupos, excluindo a influência da composição na absorção pelo duodeno. O mesmo comportamento foi observado para coração e pulmão, que apresentaram maior captação média de PQ-SteLL, mas sem diferença estatística entre os grupos tratados.

Em relação aos tumores de sarcoma-180, o perfil de captação foi alterado conforme a composição do tratamento (Figura 19). Foi observada maior absorção pelos grupos PQ-SteLL,

Sham e PQ-PgTeL, em ordem decrescente. Além disso, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, de forma que PQ-SteLL apresentou maior afinidade tumoral em relação aos demais grupos.

Figura 19 - Acumulação de cádmio na massa tumoral de animais portadores de sarcoma-180, após 24 horas da administração intraperitoneal dos compostos.



Fonte: A Autora, 2022.

Estes resultados, quando aliados aos de Ramos e colaboradores (2019), reforçam que a lectina extraída das folhas de *S. terebinthifolia* apresenta afinidade pelas células de sarcoma-180 *in vivo* (RAMOS, *et al.*, 2019). Além disso, reforçam também que a capacidade antitumoral observada no estudo em questão se deve realmente à especificidade da lectina. Logo, a conjugação de SteLL a sinalizadores pode ser uma alternativa eficaz para a investigação de novos compostos diagnósticos.

Em relação à lectina de *Punica granatum* conjugada, não foi observada captação preferencial nas células tumorais. Entretanto ainda existem alternativas que podem ser utilizadas na investigação das capacidades desta lectina, como exemplo a conjugação a anticorpos tumor-específicos, a injeção do conjugado diretamente no sítio tumoral, dentre outros (ROBERT *et al*, 2013; LI *et al.*, 2018; KANG *et al*, 2018).

Nossos resultados mostram que a conjugação de lectinas a PQs é uma alternativa eficaz para confirmação da especificidade de lectinas a sítios tumorais. Por meio desta confirmação e da conjugação de lectinas com especificidade tumoral a sondas diagnósticas, estudos futuros

poderão chegar à obtenção de compostos sinalizadores. Além disso, os sistemas obtidos não apresentaram indicativos de toxicidade irreversível e danos *in vivo*, mostrando sua segurança e aplicabilidade em estudos futuros.

6 CONCLUSÕES

Esta tese buscou avaliar o perfil *in vivo* de sondas baseadas em lectinas de origem vegetal, radiomarcadas e conjugadas a PQs. Resumindo-se, foram encontrados os seguintes resultados:

- Foi possível reproduzir os protocolos de isolamento das lectinas SteLL e PgTeL;
- Não foi possível, com base nos métodos de cromatografia por camada delgada, determinar o percentual de radiomarcagem da SteLL ao radionuclídeo tecnécio metaestável. Para isto, sugerimos a aplicação de novos protocolos de radiomarcagem e quantificação dos produtos;
- Os protocolos de Silva e colaboradores (2021) para conjugação de SteLL e PgTeL a PQs de CdTe foram reproduzidos. A partir disso, foram obtidos os conjugados PQ-SteLL e PQ-PgTeL;
- Os ensaios de toxicidade aguda, bem como os perfis bioquímico, hematológico e de micronutrientes revelaram ausência de toxicidade irreversível, causada pelos sistemas PQ-SteLL e PQ-PgTeL;
- O estudo de biodistribuição dos sistemas mostrou afinidade destes pelos órgãos de metabolização e eliminação (fígado, baço e rins). Além disso, PQ-SteLL mostrou maior afinidade pelas células de sarcoma-180, em comparação a pontos quânticos livres e PQ-PgTeL. Logo, a conjugação de lectinas a PQs é uma alternativa eficaz para elucidação da especificidade de lectinas a sítios tumorais;
- Como perspectiva, sugerimos a investigação *in vivo* da acumulação de PQ-SteLL e PQ-PgTeL, em tempo real, por meio de câmaras automatizadas de imageamento, como observado para outros sistemas contendo PQs.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, B. B.; GOLDSTEIN, I. J. Specific binding of concanavalin A to cross-linked dextran gels. *The Biochemical journal*, v. 96, n. 3, p. 23–25, 1965.
- BALLINGER, J. R. Theranostic radiopharmaceuticals: established agents in current use. *The British Journal of Radiology*, 2018. Disponível em: <<http://www.birpublications.org/doi/10.1259/bjr.20170969>>.
- BARRE, A. et al. Overview of the structure–Function relationships of mannose-specific lectins from plants, Algae and Fungi. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 2, 2019.
- BASTOS, T.S. et al. In vivo antitumor effect of the aqueous extract of Punica granatum in the sarcoma 180 murine model. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 12, n. 26, p. 415–426, 2018.
- BAUM, R. P.; KULKARNI, H. R. Theranostics: From molecular imaging using Ga-68 labeled tracers and PET/CT to personalized radionuclide therapy - the bad berka experience. *Theranostics*, v. 2, n. 5, p. 437–447, 2012.
- BAUM, R. P.; KULKARNI, H. R.; CARRERAS, C. Peptides and receptors in image-guided therapy: Theranostics for neuroendocrine neoplasms. *Seminars in Nuclear Medicine*, v. 42, n. 3, p. 190–207, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2012.01.002>>.
- BECK, A. et al. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nature Reviews Immunology*, v. 10, n. 5, p. 345–352, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri2747>>.
- BELHOCINE, T. et al. Increased uptake of the apoptosis-imaging agent 99mTc recombinant human annexin V in human tumors after one course of chemotherapy as a predictor of tumor response and patient prognosis. *Clinical Cancer Research*, v. 8, n. 9, p. 2766–2774, 2002. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L35025718>>.
- BENDAOUD, H. et al. Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of Schinus Molle L. and Schinus Terebinthifolius Raddi Berries Essential Oils. *Journal of Food Science*, v. 75, n. 6, p. 466–472, 2010.
- BHAGAT, J. Combinations of genotoxic tests for the evaluation of group 1 IARC carcinogens. *Journal of Applied Toxicology*, v. 38, n. 1, p. 81–99, 2018.
- BHUTIA, S. K. et al. Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. *Pharmacological Research*, v. 144, n. January, p. 8–18, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.04.001>>.
- BING, D. H.; WEYAND, J. G. M.; STAVITSKY, A. B. Hemagglutination with Aldehyde-Fixed Erythrocytes for Assay of Antigens and Antibodies. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 124, n. 4, p. 1166–1170, 1967.

- BLOISE, N. et al. Targeting the “sweet side” of tumor with glycan-binding molecules conjugated-nanoparticles: Implications in cancer therapy and diagnosis. *Nanomaterials*, v.1 fev. 2021.
- BOOY, E. P. . et al. Monoclonal and bispecific antibodies as novel therapeutics. *Apoptotic Pathways as Targets for Novel Therapies in Cancer and Other Diseases*, p. 229–242, 2005.
- BOZKURT, M. F. et al. Quality control of instant kit ^{99m}Tc -mercapto acetyl triglycine with inter- and intra-operator measurements. *Hellenic Journal of Nuclear Medicine*, v. 12, n. 1, p. 59–62, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografia da Espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-da-praia). v. 5, p. 68, 2014.
- CABRAL FILHO, P. E. C. et al. Blood group antigen studies using CdTe quantum dots and flow cytometry. *International Journal of Nanomedicine*, v. 10, p. 4393–4404, 2015.
- CAI, Z. et al. Antitumor effects of a purified polysaccharide from *Rhodiola rosea* and its action mechanism. *Carbohydrate Polymers*, v. 90, n. 1, p. 296–300, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.039>>.
- CARVALHO, M. E. T. et al. Evaluating the glycophenotype on breast cancer tissues with quantum dots-Cramoll lectin conjugates. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 138, p. 302–308, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.088>>.
- CARVALHO, M. G. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 15, n. 1, p. 158–169, 2013.
- CENARIU, D. et al. Extramedullary hematopoiesis of the liver and spleen. *Journal of Clinical Medicine*, v. 10, n. 24, p. 1–12, 2021.
- CESÁRIO, L. F.; GAGLIANONE, M. C. Biologia floral e fenologia reprodutiva de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) em Restinga do Norte Fluminense. *Acta Botanica Brasilica*, v. 22, n. 3, p. 828–833, 2008.
- CHAKRAVARTY, R. et al. Matching the decay half-life with the biological half-life: ImmunoPET imaging with ^{44}Sc -labeled Cetuximab Fab fragment. *Bioconjugate Chemistry*, v. 25, n. 12, p. 2197–2204, 2014.
- CHEN, G. et al. Long-term chemical biotransformation and pathways of Cd-based quantum dots in mice. *Nano Today*, v. 44, p. 101504, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nantod.2022.101504>>.
- CHENG, D. H.; LIU, Y.; WANG, L. Antitumor Effects of Ethanol Extract from *Ventilago leiocarpa* Benth on Sarcoma 180 Tumor-Bearing Mice and Possible Immune Mechanism. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, n. 530022, p. 1–7, 2021.
- CHRISTIANSEN, M. N. et al. Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics*, v. 14, n. 4–5, p. 525–546, 2014.
- CORDELLI, E.; BIGNAMI, M.; PACCHIEROTTI, F. Comet assay: A versatile but complex

tool in genotoxicity testing. *Toxicology Research*, v. 10, n. 1, p. 68–78, 2021.

CORFIELD, A. Eukaryotic protein glycosylation: a primer for histochemists and cell biologists. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 147, n. 2, p. 119–147, 2017.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.10.020>>.

DA CUNHA, C. R. A. et al. Encapsulation into stealth liposomes enhances the antitumor action of recombinant Cratylia mollis lectin expressed in Escherichia coli. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n. SEP, p. 1–11, 2016.

DAGOGO-JACK, I.; SHAW, A. T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 15, n. 2, p. 81–94, 2018.

DE BRITO MARQUES RAMOS, D. et al. Evaluation of antitumor activity and toxicity of Schinus terebinthifolia leaf extract and lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 233, n. January, p. 148–157, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.01.011>>.

DE CARVALHO PATRICIO, B. F. et al. Radiolabeling of cramoll 1,4: Evaluation of the biodistribution. *International Journal of Peptides*, v. 2011, p. 10–12, 2011.

DEBRAY, H.; ROUGÉ, P. The fine sugar specificity of the Lathyrus ochrus seed lectin and isolectins. *FEBS Letters*, v. 176, n. 1, p. 120–124, 1984.

DINIZ, S. O. F. et al. Technetium-99m ceftizoxime kit preparation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, n. SPECIL ISS. 2, p. 89–96, 2005.

DOS SANTOS, A. J. C. A. et al. Schinus terebinthifolia leaf lectin (SteLL) is an immunomodulatory agent by altering cytokine release by mice splenocytes. *3 Biotech*, v. 10, n. 4, p. 1–9, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13205-020-2137-2>>.

DU, Y. et al. The effect of PEG functionalization on the: In vivo behavior and toxicity of CdTe quantum dots. *RSC Advances*, v. 9, n. 22, p. 12218–12225, 2019.

ECKELMAN, W. C.; PAIK, C. H.; REBA, R. C. Radiolabeling of Antibodies. *Cancer Research*, v. 40, n. 8, p. 3036–3042, 1980.

EMA. ICH M3 (R2) - Non-clinical Safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals. *ICH Guideline*, v. 3, n. R2, p. 31, 2009. Disponível em: <<http://www.ich.org/products/guidelines/multidisciplinary/article/multidisciplinary-guidelines.html>>.

ESPERANÇA-MARTINS, M. et al. Sarcoma metabolomics: Current horizons and future perspectives. *Cells*, v. 10, n. 6, 2021.

FARD, M. G. et al. Targeting cell surface glycans with lectin-coated fluorescent nanodiamonds. *Nanoscale Advances*, 2022. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=D2NA00036A>>.

FEDEL-MIYASATO, L. E. S. et al. Evaluation of anti-inflammatory, immunomodulatory, chemopreventive and wound healing potentials from *Schinus terebinthifolius* methanolic extract. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 24, n. 5, p. 565–575, 2014.

FERREIRA, P. M. P. et al. Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin X: In vivo and ex vivo methods and microscopy examinations. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 186, p. 270–279, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.011>>.

FISCHER, H. C. et al. Exploring primary liver macrophages for studying quantum dot interactions with biological systems. *Advanced Materials*, v. 22, n. 23, p. 2520–2524, 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. Guidance for Industry Single Dose Acute Toxicity Testing. *October*, v. 1, n. August, p. 3, 1996.

GAO, L. et al. Enhanced antitumor efficacy of poly(D,L-lactide-co-glycolide)-based methotrexate-loaded implants on sarcoma 180 tumor-bearing mice. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 11, p. 3065–3075, 2017.

GOMES, F. S. et al. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. *Journal of Applied Microbiology*, v. 114, n. 3, p. 672–679, 2013.

GRAHAM, M. M.; MENDA, Y. Radiopeptide Imaging and Therapy in the United States. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 52, n. Supplement_2, p. 56S-63S, 2011. Disponível em: <<http://jnm.snmjournals.org/cgi/doi/10.2967/jnumed.110.085746>>.

GUPTA, B. et al. Plant lectins and their usage in preparing targeted nanovaccines for cancer immunotherapy. *Seminars in Cancer Biology*, n. November 2019, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.02.005>>.

HABIBA, U. et al. Study of lectin, antioxidant, cytotoxicity and anticancer properties of *Punica granatum* fruit juice against EAC cells in Swiss Albino mice. *International Journal of Biosciences (IJB)*, v. 14, n. 2, p. 482–489, 2019.

HAGE, D. S. et al. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 69, p. 93–105, 2012.

HAUN, R. S. et al. CD109 Overexpression in Pancreatic Cancer Identified by Cell- Surface Glycoprotein Capture. *J Proteomics Bioinform*, v. 78, n. 2, p. 711–716, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>>.

HIRABAYASHI, J. et al. Lectin microarrays: Concept, principle and applications. *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 10, p. 4443–4458, 2013.

HIRABAYASHI, J.; ARAI, R. Lectin engineering: The possible and the actual. *Interface Focus*, v. 9, n. 2, 2019.

HO, Y. P. et al. Evaluating the intracellular stability and unpacking of DNA nanocomplexes by quantum dots-FRET. *Journal of Controlled Release*, v. 116, n. 1, p. 83–89, 2006.

HOIGEBAZAR, L. et al. Synthesis and characterization of nitroimidazole derivatives for

- ⁶⁸Ga-labeling and testing in tumor xenografted mice. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 53, n. 17, p. 6378–6385, 2010.
- HU, D.; TATENO, H.; HIRABAYASHI, J. Lectin engineering, a molecular evolutionary approach to expanding the lectin utilities. *Molecules*, v. 20, n. 5, p. 7637–7656, 2015.
- HUNG, J. C. Comparison of various requirements of the quality assurance procedures for (18)F-FDG injection. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, v. 43, n. 11, p. 1495–1506, 2002.
- IRONS, R. D.; SCHENK, E. A.; GIAUQUE, R. D. *Energy dispersive X ray fluorescence spectroscopy and inductively coupled plasma emission spectrometry evaluated for multielement analysis in complex biological matrices* *Clinical Chemistry*, 1976. .
- ISO, I. O. for S. *Biological Evaluation of Medical Devices, Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity 10993.61010-1* © Iec:2001, 2017. .
- JAMOUS, M.; HABERKORN, U.; MIER, W. Synthesis of peptide radiopharmaceuticals for the therapy and diagnosis of tumor diseases. *Molecules*, v. 18, n. 3, p. 3379–3409, 2013.
- JEGER, S. et al. Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase. *Angewandte Chemie - International Edition*, v. 49, n. 51, p. 9995–9997, 2010.
- KANG, S. J. et al. Anti-EGFR lipid micellar nanoparticles co-encapsulating quantum dots and paclitaxel for tumor-targeted theranosis. *Nanoscale*, v. 10, n. 41, p. 19338–19350, 2018.
- KIM, H. et al. Theranostic designs of biomaterials for precision medicine in cancer therapy. *Biomaterials*, v. 213, n. April, p. 119207, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.05.018>>.
- KIRKLAND, D. et al. In vivo genotoxicity testing strategies: Report from the 7th International workshop on genotoxicity testing (IWGT). *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 847, n. March, p. 403035, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.03.008>>.
- KNIGHT, L. C. Non-oncologic applications of radiolabeled peptides in nuclear medicine. *The quarterly journal of nuclear medicine : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR)*, v. 47, n. 4, p. 279–291, 2003.
- KOCH, K. et al. Binding of Technetium-99m to Plasma Proteins: Influence on the Distribution of Tc-99m Phosphate Agents. *THE JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE*, p. 1080–1085, 1980.
- KOJIMA, S.; JAY, M. Comparisons of labeling efficiency, biological activity and biodistribution among ¹²⁵I-, ⁶⁷Ga-DTPA- and ⁶⁷Ga-DFO-lectins. *European Journal of Nuclear Medicine*, v. 13, n. 7, p. 366–370, 1987. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00252997>>.
- KOOPMANS, K. P.; GLAUDEMANS, A. W. J. M. Rationale for the use of radiolabelled peptides in diagnosis and therapy. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular*

Imaging, v. 39, n. SUPPL.1, p. 4–10, 2012.

KUMAR, A. et al. A novel colchicine-based microtubule inhibitor exhibits potent antitumor activity by inducing mitochondrial mediated apoptosis in MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells. *Tumor Biology*, v. 37, n. 10, p. 13121–13136, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s13277-016-5160-5>>.

KUNO, A. et al. Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray: A new strategy for glycan profiling. *Nature Methods*, v. 2, n. 11, p. 851–856, 2005.

LABBÉ, J. et al. Mediation of plant–mycorrhizal interaction by a lectin receptor-like kinase. *Nature Plants*, v. 5, n. 7, p. 676–680, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41477-019-0469-x>>.

LASTOVICKOVA, M.; STROUHALOVA, D.; BOBALOVA, J. Use of Lectin-based Affinity Techniques in Breast Cancer Glycoproteomics: A Review. *Journal of Proteome Research*, v. 19, n. 5, p. 1885–1899, 2020.

LEHR, C. . et al. Bioadhesion by means of specific binding of tomato lectin. *Pharmaceutical Research*, v. 9, n. 4, p. 547–553, 1991.

LIMA, I. M. de S. F. et al. Schinus terebinthifolia leaf lectin (SteLL) has anti-infective action and modulates the response of Staphylococcus aureus-infected macrophages. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019.

LI, M. M. et al. Biodistribution and toxicity assessment of intratumorally injected arginine–glycine–aspartic acid peptide conjugated to CdSe/ZnS quantum dots in mice bearing pancreatic neoplasm. *Chemico-Biological Interactions*, v. 291, n. June, p. 103–110, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.06.014>>.

LI, Z. et al. Quantum dots loaded nanogels for low cytotoxicity, pH-sensitive fluorescence, cell imaging and drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, v. 121, p. 477–485, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.016>>.

LIANG, Y.; ZHANG, T.; TANG, M. Toxicity of quantum dots on target organs and immune system. *Journal of Applied Toxicology*, v. 42, n. 1, p. 17–40, 2022.

Lima, B.R.F et al. The Anxiolytic Activity of Schinus terebinthifolia Leaf Lectin (SteLL) Is Dependent on Monoaminergic Signaling although Independent of the Carbohydrate-Binding Domain of the Lectin. *Pharmaceuticals*, v. 15, p. 1364–137, 2022. Disponível em <<https://doi.org/10.3390/ph15111364>>.

LOPES, J. C. et al. In vitro and in vivo antitumoral activity of a ternary copper (II) complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 533, n. 4, p. 1021–1026, 2020.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)>.

LU, J.; TANG, M.; ZHANG, T. Review of toxicological effect of quantum dots on the liver. *Journal of Applied Toxicology*, v. 39, n. 1, p. 72–86, 2019.

- LUND, U. et al. Glomerular filtration rate dependence of sieving of albumin and some neutral proteins in rat kidneys. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, v. 284, n. 6 53-6, p. 1226–1234, 2003.
- MADAMSETTY, V. S.; MUKHERJEE, A.; MUKHERJEE, S. Recent trends of the bio-inspired nanoparticles in cancer theranostics. *Frontiers in Pharmacology*, v. 10, n. October, p. 1–12, 2019.
- MANKOFF, D. A. et al. Tumor Receptor Imaging. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 49, n. Suppl_2, p. 149S-163S, 2008.
- MARIANI, G. et al. A review on the clinical uses of SPECT/CT. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, v. 37, n. 10, p. 1959–1985, 2010.
- MARTÍNEZ-CARMONA, M. et al. Lectin-conjugated pH-responsive mesoporous silica nanoparticles for targeted bone cancer treatment. *Acta Biomaterialia*, v. 65, p. 393–404, 2018.
- MARTINS, P. D. A. et al. Tc-sestamibi by high performance liquid chromatography (HPLC). *Proceedings of International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2019*, p. 1855–1859, 2019.
- MAXWELL, T. et al. *Quantum dots*. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.
- MIKAEILI, A.; ERFANI, M.; SABZEVARI, O. Synthesis and evaluation of a ^{99m}Tc -labeled chemokine receptor antagonist peptide for imaging of chemokine receptor expressing tumors. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2017.07.004>>.
- MIN, K. et al. Development of a radiolabeled peptide-based probe targeting MT1-MMP for breast cancer detection. *PLoS ONE*, v. 10, n. 10, p. 1–12, 2015.
- MONTEIRO, E. G. et al. Método Alternativo para a Determinação de Pureza Radioquímica de MIBI- ^{99m}Tc . *Proceedings of Congresso Brasileiro de Física Médica*, p. 97–100, 2010.
- MORRIS, O. et al. A review of approaches to ^{18}F radiolabelling affinity peptides and proteins. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jlcr.3634>>.
- NARIMATSU, H.; SATO, T. *Wisteria floribunda agglutinin positive glycobiomarkers: a unique lectin as a serum biomarker probe in various diseases* Expert Review of Proteomics Taylor and Francis Ltd, , 1 fev. 2018. .
- NGUYEN, K. C. et al. Biodistribution and Systemic Effects in Mice Following Intravenous Administration of Cadmium Telluride Quantum Dot Nanoparticles. *Chemical Research in Toxicology*, v. 32, n. 8, p. 1491–1503, 2019.
- OECD. ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute oral toxicity : acute toxic class method. *Oecd Guideline for Testing of Chemicals*, n. December, p. 1–14, 2001.
- OKUYAMA, S. et al. Strict binding specificity of small-sized lectins from the red alga *Hypnea japonica* for core (α 1-6) fucosylated N-glycans. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 73, n. 4, p. 912–920, 2009.

- OLERILE, L. D. et al. Near-infrared mediated quantum dots and paclitaxel co-loaded nanostructured lipid carriers for cancer theragnostic. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 150, p. 121–130, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.032>>.
- OLIVEIRA, A. C. et al. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by *Kielmeyera rugosa* Choisy (Calophyllaceae). *Natural product research*, v. 27, n. 23, p. 2248–2250, 2013.
- OZAKI, M. Cellular and molecular mechanisms of liver regeneration: Proliferation, growth, death and protection of hepatocytes. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, v. 100, n. October 2019, p. 62–73, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.10.007>>.
- PAPPENHEIMER, J. R.; RENKIN, E. M.; BORRERO, L. M. Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes; a contribution to the pore theory of capillary permeability. *Am. J. Physiol*, v. 7, n. 10, p. 659, 1951.
- PATRICIO, B. F. de C. et al. Radiolabeling of cramoll 1,4: Evaluation of the biodistribution. *International Journal of Peptides*, v. 2011, p. 10–12, 2011.
- PIRES, I. S.; PALMER, A. F. Selective protein purification via tangential flow filtration – Exploiting protein-protein complexes to enable size-based separations. *Journal of Membrane Science*, v. 618, n. September 2020, p. 118712, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.memsci.2020.118712>>.
- POST, S. M. Mouse models of sarcomas: critical tools in our understanding of the pathobiology. *Clinical Sarcoma Research*, v. 2, n. 1, p. 1–9, 2012.
- PROCÓPIO, T. F. et al. *Schinus terebinthifolius* Leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. *PLoS ONE*, v. 10, n. 5, p. 1–19, 2015.
- PROULX, A.; BALLINGER, J. R.; GULENCHYN, K. Y. Routine determination of radiochemical purity of ^{99m}Tc-MIBI. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part*, v. 40, n. 1, p. 95–97, 1989.
- PUNIA, K.; AND, J. B. K.; MONTCLARE, J. K. Protein Biomaterials for Theranostic Applications. *Molecular Systems Design & Engineering*, 2019.
- RABINOVICH, G. A.; CROCI, D. O. Regulatory Circuits Mediated by Lectin-Glycan Interactions in Autoimmunity and Cancer. *Immunity*, v. 36, n. 3, p. 322–335, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.004>>.
- RAHMANIAN, N. et al. ^{99m}Tc labeled HYNIC-EDDA/tricine-GE11 peptide as a successful tumor targeting agent. *Medicinal Chemistry Research*, v. 27, n. 3, p. 890–902, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00044-017-2111-7>>.
- RAMOS, D. de B. M. et al. Antinociceptive activity of *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 259, n. May, p. 112952, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112952>>.
- RANADIVE, G. N. et al. A new method of technetium-99m labeling of monoclonal antibodies through sugar residues. A study with TAG-72 specific CC-49 antibody. *Nuclear*

Medicine and Biology, v. 20, n. 6, p. 719–726, 1993.

RENWICK, A. G. et al. Risk-benefit analysis of micronutrients. *Food and Chemical Toxicology*, v. 42, n. 12, p. 1903–1922, 2004.

RETTIG, W. J. et al. Identification of endosialin, a cell surface glycoprotein of vascular endothelial cells in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 89, n. 22, p. 10832–10836, 1992.

RHODES, B. A.; INCORPORATED, R.; TIJERAS, N. E. Direct Labeling of Proteins with ^{99m}Tc. v. 18, n. 1, p. 1–10, 2003.

RIBEIRO, A. C.; FERREIRA, R.; FREITAS, R. *Plant Lectins: Bioactivities and Bioapplications*. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2018. v. 58

RICHTER, S. et al. Rerouting the metabolic pathway of ¹⁸F-labeled peptides: The influence of prosthetic groups. *Bioconjugate Chemistry*, v. 26, n. 2, p. 201–212, 2015.

ROBERTS, J. R. et al. Lung toxicity and biodistribution of Cd/Se-ZnS quantum dots with different surface functional groups after pulmonary exposure in rats. *Particle and fibre toxicology*, v. 10, p. 1–17, 2013.

ROMBOUTS, I. et al. Formation and reshuffling of disulfide bonds in bovine serum albumin demonstrated using tandem mass spectrometry with collision-induced and electron-transfer dissociation. *Scientific Reports*, v. 5, n. June, p. 1–11, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep12210>>.

RUIZ-MAY, E. et al. A comparative study of lectin affinity based plant n-glycoproteome profiling using tomato fruit as a model. *Molecular and Cellular Proteomics*, v. 13, n. 2, p. 566–579, 2014.

S. COULIBALY, F.; C. YOUAN, B.-B. Current status of lectin-based cancer diagnosis and therapy. *AIMS Molecular Science*, v. 4, n. 1, p. 1–27, 2017.

SARUP SINGH, R.; PREET KAUR, H.; RAKESH KANWAR, J. Mushroom Lectins as Promising Anticancer Substances. *Current Protein & Peptide Science*, v. 17, n. 8, p. 797–807, 2016.

SCHUPPAN, D.; DAYAN, A. D.; CHARLESWORTH, F. A. Single Dose Toxicity. *The Contribution of Acute Toxicity Testing to the Evaluation of Pharmaceuticals*, p. 61–64, 1986.

SHI, J. et al. Transforming a Targeted Porphyrin Theranostic Agent into a PET Imaging Probe for Cancer. 2011.

SHIN, B.; CARRAWAY, K. L. CELL SURFACE CONSTITUENTS OF SARCOMA 180 ASCITES TUMOR CELLS. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 330, p. 254–268, 1973.

SIAFAKA, P. I. et al. Current update on nanoplatforms as therapeutic and diagnostic tools: A review for the materials used as nanotheranostics and imaging modalities. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 16, n. 1, p. 24–46, 2021.

SILVA, A. R. et al. Quantum dots conjugated to lectins from *Schinus terebinthifolia* leaves

(SteLL) and Punica granatum sarcotesta (PgTeL) as potential fluorescent nanotools for investigating *Cryptococcus neoformans*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 192, n. October, p. 232–240, 2021.

SILVA, A. R. et al. Acute toxicity and genotoxicity assessment of PgTeL, a lectin from pomegranate sarcotesta, in mice. *South African Journal of Botany*, v. 000, 2022.

SILVA, P. M. et al. The juicy sarcotesta of Punica granatum contains a lectin that affects growth, survival as well as adherence and invasive capacities of human pathogenic bacteria. *Journal of Functional Foods*, v. 27, p. 695–702, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2016.10.015>>.

SILVA, P. M. et al. PgTeL, the lectin found in Punica granatum juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 108, p. 391–400, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.039>>.

SILVA, P. M. et al. Punica granatum sarcotesta lectin (PgTeL) impairs growth, structure, viability, aggregation, and biofilm formation ability of *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 123, p. 600–608, 2019a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.030>>.

SILVA, P. M. et al. Punica granatum sarcotesta lectin (PgTeL) has antibacterial activity and synergistic effects with antibiotics against β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 135, p. 931–939, 2019b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.011>>.

SILVA, P. M. et al. Antibacterial effects of the lectin from pomegranate sarcotesta (PgTeL) against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 131, n. 2, p. 671–681, 2021.

SIMÕES, E. P. et al. Nanostructured impedimetric lectin-based biosensor for arboviruses detection. *Talanta*, v. 208, n. 1, p. 1–7, 2020.

SOO CHOI, H. et al. Renal clearance of quantum dots. *Nature Biotechnology*, v. 25, n. 10, p. 1165–1170, 2007.

SUGIURA, G. et al. Radiolabeling strategies for tumor-targeting proteinaceous drugs. *Molecules*, v. 19, n. 2, p. 2135–2165, 2014.

SUN, H. X. et al. Anti-tumor and immunomodulatory activity of peptide fraction from the larvae of *Musca domestica*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 153, n. 3, p. 831–839, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.03.052>>.

SUN, T. et al. A Melanin-Based Natural Antioxidant Defense Nanosystem for Theranostic Application in Acute Kidney Injury. *Advanced Functional Materials*, v. 29, n. 48, p. 1–9, 2019.

SUZUKI, K. et al. Synthesis and evaluation of a novel ^{68}Ga -chelate-conjugated bisphosphonate as a bone-seeking agent for PET imaging. *Nuclear Medicine and Biology*, v. 38, n. 7, p. 1011–1018, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2011.02.015>>.

TALITA, S. B. et al. In vivo antitumor effect of the aqueous extract of *Punica granatum* in the sarcoma 180 murine model. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 12, n. 26, p. 415–426, 2018.

TATENO, H.; NAKAMURA-TSURUTA, S.; HIRABAYASHI, J. Comparative analysis of core-fucose-binding lectins from *Lens culinaris* and *Pisum sativum* using frontal affinity chromatography. *Glycobiology*, v. 19, n. 5, p. 527–536, 2009.

TEIXEIRA, M.A; RAJEWSKI, A.; HE, J.; CASTANEDA, O.G.; LITT, A.; KALOSHIAN, I. Classification and phylogenetic analyses of the Arabidopsis and tomato G-type lectin receptor kinases. *BMC Genomics*, v. 19, n.1, p. 1-20, 2018.

TSANEVA, M.; VAN DAMME, E.J.M. 130 years of Plant Lectin Research. *Glycoconjugate Journal*, v. 37, n. 5, p. 533-551, 2020.

ULIANA, M. P. et al. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. *Industrial Crops and Products*, v. 83, p. 235–240, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.077>>.

VIRGÍLIO; **Eneida**. Tradução de Carlos Alberto Nunes; organização, apresentação e notas de João Angelo Oliva Neto. São Paulo: Editora 34, 2014 (1ª Edição). 896 p.

VERNON, A. C.; BALLARD, C.; MODO, M. Neuroimaging for Lewy body disease: Is the in vivo molecular imaging of α -synuclein neuropathology required and feasible? *Brain Research Reviews*, v. 65, n. 1, p. 28–55, 2010.

WANG, M. et al. Time-dependent toxicity of cadmium telluride quantum dots on liver and kidneys in mice: Histopathological changes with elevated free cadmium ions and hydroxyl radicals. *International Journal of Nanomedicine*, v. 11, p. 2319–2328, 2016.

WU, A. M. et al. A guide to the carbohydrate specificities of applied lectins-2 (updated in 2000). *Advances in experimental medicine and biology*, v. 491, p. 551–585, 2001.

WU, W. et al. In-situ immobilization of quantum dots in polysaccharide-based nanogels for integration of optical pH-sensing, tumor cell imaging, and drug delivery. *Biomaterials*, v. 31, n. 11, p. 3023–3031, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.011>>.

XING, Y.; RAO, J. Quantum dot bioconjugates for in vitro diagnostics & in vivo imaging. *Cancer Biomarkers*, v. 4, n. 6, p. 307–319, 2008.

XU, H. et al. Preparation and preliminary evaluation of a biotin-targeted, lectin-targeted dendrimer-based probe for dual-modality magnetic resonance and fluorescence imaging. *Bioconjugate Chemistry*, v. 18, n. 5, p. 1474–1482, 2007.

YAMAZAKI, ' N et al. *Endogenous lectins as targets for drug delivery* *Advanced Drug Delivery Reviews*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/drugdeliv>.

YURT LAMBRECHT, F.; DURKAN, K.; UNAK, P. Preparation, quality control and stability of ^{99m}Tc -cefuroxime axetil. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 275, n. 1, p. 161–164, jan. 2008.

ZHAI, Q. et al. Protective effects of dietary supplements containing probiotics, micronutrients, and plant extracts against lead toxicity in mice. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. SEP, p. 1–11, 2018.

ZHANG, X. yan et al. Measurement and comparisons of organ weight, organ coefficient, hematological parameters and hematological biochemical parameters of specific pathogen free Balb/c mice. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, v. 15, n. 41, p. 7734–7737, 2011.

ZHANG, Y. N. et al. Nanoparticle–liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination. *Journal of Controlled Release*, v. 240, p. 332–348, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.020>>.

ZUCKERBERG, C. Ultrastructure of Sarcoma 180. *Cancer Research*, v. 33, n. 10, p. 2278–2282, 1973.

ZUO, Z. et al. Purification and characterization of a novel plant lectin from pinellia ternata with antineoplastic activity. *SpringerPlus*, v. 1, n. 1, p. 1–9, 2012.

• **ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO
USO DE ANIMAIS**



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife – PE – Brasil
Fones: 2126 8842
ceua@ufpe.br

Ofício nº 34/22

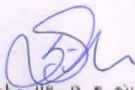
Recife, 06 de junho de 2022

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Thiago Henrique Napoleão**
Departamento de Bioquímica
Processo nº 007/2022

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação de toxicidade e biodistribuição in vivo de quantum dots conjugados à lectina vegetal para uso teranóstico**”. Registrado com o nº 007/2022 sob a responsabilidade de **Prof. Thiago Henrique Napoleão** o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 31/05/2022

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	. 01/06/2022 a 30/11/2022
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> , linhagem Swiss, Camundongo heterogénico
Nº de animais	180 camundongos
Peso/Idade	30 a 40g Adultos (60 dias):
Sexo	(180) Fêmea
Origem: Biotério de Criação	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA-UFPE
Destino: Biotério de Experimentação	Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Bioquímica da UFPE

Atenciosamente


Prof. Sebastião R. F. Silva
Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691

