



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA  
CURSO DE FARMÁCIA

INGRIDD LOPES PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL USO DE DERIVADO ESTÁVEL DO  
*AURANTRICOLÍDEO A* COMO MARCADOR CELULAR PARA ESTUDOS *IN*  
*VITRO***

Ceilândia, DF  
2014

INGRIDD LOPES PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL USO DE DERIVADO ESTÁVEL DO  
AURANTRICOLÍDEO A COMO MARCADOR CELULAR PARA ESTUDOS *IN*  
*VITRO***

Monografia de Conclusão de Curso apresentada  
como requisito parcial para obtenção do grau de  
Farmacêutico, na Universidade de Brasília,  
Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Prof. Diêgo Madureira de Oliveira

Ceilândia, DF

2014

INGRID LOPES PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL USO DE DERIVADO ESTÁVEL DO  
AURANTRICOLÍDEO A COMO MARCADOR CELULAR PARA ESTUDOS *IN*  
*VITRO***

BANCA EXAMINADORA

---

Orientador: Prof. Diêgo Madureira de Oliveira  
(FCE/Universidade de Brasília)

---

Prof. Paulo Gustavo Barboni Dantas do Nascimento  
(FCE/Universidade de Brasília)

---

Prof. Edgar Guimarães Bione  
(FCE/Universidade de Brasília)

Ceilândia, DF

2014

## AGRADECIMENTOS

A minha mãe Célia Maria, por todo cuidado, incentivo e amor. Por não ter me deixado desistir nos momentos difíceis e por acreditar em mim quando nem eu mesma fui capaz.

Ao José Benedito Schneider, ser humano incrível, e que apesar de pouco tempo em nossas vidas já se tornou peça fundamental. Obrigada por todo suporte à minha família e à minha educação.

Ao professor Paulo Barboni por seu tratamento patriarcal, por ter me feito sentir inclusa e necessária na universidade; por me fazer pertencer.

Ao meu orientador Diêgo por toda a paciência e dedicação, por todas as críticas construtivas, por me inquietar a sair mediocridade e procurar o melhor que há em mim. Obrigada por ter escolhido essa profissão.

Ao meu querido amigo Leandro Pereira por ter me dado a notícia de que eu havia passado no vestibular e por ter trilhado esse caminho ao meu lado.

A minha cachorra Pandora, que não pôde estar ao meu lado na confecção dessa monografia, mas que sempre esteve comigo durante minhas longas horas de estudo.

Aos amigos Thays Thamys, Letícia Soares e Jhonata Lima, que estiveram comigo ao longo desses 5 anos, por terem feito da minha estadia na universidade mais agradável, quase um lar.

A todos os excelentes professores com quem tive a felicidade de expandir meus conhecimentos.

A todos os profissionais incríveis que conheci em meus estágios, pessoas inspiradoras.

A pessoa que entrou e a nova pessoa que agora sai.

Então o futuro vai tomando as formas do agora.  
E toda aquela escuridão de ser aluno, ser sem luz.  
Vai dando lugar a luz do conhecer e principalmente se conhecer.  
Deixar de acreditar nas sombras projetadas nas paredes da caverna.  
Para se apoderar do seu lugar no mundo inteligível.  
O medo se vai e a segurança se chega.

Ingridd Lopes.

## Resumo

LOPES, I. **Avaliação do potencial uso de derivado estável do *aurantricolídeo A* como marcador celular para estudos *in vitro*.** Monografia (Graduação) – Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

Com o crescimento da incidência de câncer na sociedade moderna, tornam-se necessárias atualizações nas metodologias de estudo em cancerologia experimental. Uma estratégia comum e extremamente útil nesse âmbito é a marcação de populações celulares para posterior identificação, o que, nos modelos mais versáteis, é feito por meio de manipulação do material genético. Uma vez que o perfil genético é uma importante característica da célula tumoral, uma técnica substituta para esse tipo de marcação, que não envolvesse acesso direto ao DNA, teria ampla aplicabilidade. O *aurantricolídeo A* é um pigmento fluorescente instável isolado do fungo *Tricholoma aurantium*, mas nossos colaboradores sintetizaram um derivado estável dessa molécula, denominado FLU4, que mantém a fluorescência do pigmento original. Este trabalho demonstra a utilização desse novo composto como marcador celular, caracterizando assim uma ferramenta biotecnológica capaz de substituir, com diversas vantagens, técnicas habituais de marcação por fluorescência, uma vez que o FLU4 é rapidamente internalizado pelas células sem impacto direto em sua viabilidade, promovendo uma marcação duradoura e segura.

Palavras-chave: *aurantricolídeo A*., fluoróforo, cancerologia.

## Abstract

LOPES, I. **Evaluating the potential use of secondary *aurantricolide A*. as stable cellular marker for *in vitro* studies.** Monograph (Graduation) – Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

Because the relevance of cancer in modern society, updates on methodology for experimental oncology are always necessary. A frequent and extremely useful strategy in this context is the marking of cell populations for further identification which, in the most versatile models, is achieved by manipulation of genetic material. Seeing that genetic profile is an important feature of tumor cells, replacement technique for this type of marking that does not involve direct access to DNA would have broad applicability. The aurantricolide A, a fluorescent dye, is an unstable product of *Tricholoma aurantium* metabolism, but our employees have synthesized a stable derivative of this molecule named FLU4 (lab code), that keeps the fluorescence of the original pigment. This work demonstrates the use of this new compound as cellular marker, characterizing a potential biotechnological tool, with several advantages since the FLU4 is quickly internalized by cells with no impact on their viability.

Keywords: *aurantricolídeo A.*, fluorophore, oncology.

## Lista de Abreviaturas e Siglas

CLSM – Microscopia confocal de varredura a Laser

Cy – Cyanine

DAPI – Diagnóstico Avançado por Imagem

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

FLU4 – Metilenodioxo-aurantricolídeo (4)

GFP – Proteína Fluorescente Verde

PALM – Microscopia por Localização Fotoativada

PBS – Tampão Fosfato Salino

SFB – Soro Fetal Bovino

STORM – Microscopia de reconstrução óptica estocástica

UV – Ultra-violeta

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática do fenômeno da fluorescência, no modelo clássico de Bohr.....	12
<b>Figura 2.</b> Luminescência na natureza.....	14
<b>Figura 3.</b> Retrato do padre jesuíta Athanasius Kircher (1602-1680).....	17
<b>Figura 4.</b> O cromóforo fluorescente formado pelo resíduo de aminoácidos 65-67 (Ser-Tyr-Gly) na estrutura primária de GFP.....	22
<b>Figura 5.</b> As bactérias ao lado direito desta placa com ágar estão brilhando como resultado da expressão da proteína verde fluorescente.....	25
<b>Figura 6.</b> <i>Tricholoma aurantium</i> .....	26
<b>Figura 7.</b> Aurantricolídeo A.....	26
<b>Figura 8.</b> Retrossíntese.....	27
<b>Figura 9.</b> Metilenodioxí-aurantricolídeo (4) (FLU4).....	27
<b>Figura 10.</b> Sal de MTT convertido a Formazan em mitocôndrias.....	36
<b>Figura 11.</b> Imunofluorescência direta e indireta.....	38
<b>Figura 12.</b> Excitação FLU4 em luz UV e cristais de FLU4.....	44
<b>Figura 13.</b> Micrografias (microscopia confocal) mostrando localização citoplasmática do FLU4.....	46
<b>Figura 14.</b> Micrografias do experimento de cinética de aquisição de fluorescência em 6 tempos distintos.....	47
<b>Figura 15.</b> Micrografias (microscopia de fluorescência) do experimento de cinética de perda de fluorescência em 4 tempos distintos.....	48
<b>Figura 16.</b> Micrografia (microscopia de fluorescência) demonstrando a diferenciação de células marcadas por FLU4 (seta) das não marcadas.....	48



## Lista de Gráficos e Tabelas

<b>Gráfico 1.</b> Curva de crescimento para MDA-MB-231.....	29
<b>Gráfico 2.</b> Avaliação da ação tóxica do FLU4 em células MDA-MB-231 (por teste do MTT), após 48 horas de exposição.....	40
<b>Gráfico 3.</b> Avaliação da ação tóxica do FLU4 em células MDA-MB-231 (por teste do MTT), após 140 horas de exposição.....	40
<b>Gráfico 4.</b> Efeito tóxico das mais elevadas concentrações de FLU4 testadas após 140 horas de exposição (MTT).....	41
<b>Gráfico 5.</b> Gráfico Dot Plot (Citometria de fluxo).....	44
<b>Gráfico 6.</b> Histograma (Citometria de fluxo).....	45
<b>Tabela 1.</b> Tipos de luminescência.....	13
<b>Tabela 2.</b> Eventos da evolução da luminescência a partir do século XVI.....	14
<b>Tabela 3.</b> Visão geral das propriedades fluorescentes de corantes orgânicos populares e proteínas fluorescentes.....	23
<b>Tabela 4.</b> Informações iniciais sobre a linhagem celular MDA-MB-231.....	28
<b>Tabela 5.</b> Fotomicrografia de células MDA-MB-231 em vários pontos de temporais após a semeadura, a uma densidade celular de $5 \times 10^4$ células viáveis/cm <sup>2</sup> .....	29
<b>Tabela 6.</b> Corantes fluorescentes mais utilizados em Citometria de Fluxo para estimar o conteúdo de DNA nuclear.....	33

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>12</b>
1.1 Breve Histórico da Luminescência e seus Processos.....	12
1.2 Fluoróforos e sua Importância Biotecnológica.....	17
1.3 Marcadores Celulares e o Cientista Farmacêutico.....	18
1.4 Moléculas Fluorescentes no Estudo do Câncer.....	19
1.5 Breve Histórico da Proteína Fluorescente Verde (GFP).....	20
1.6 Fluoróforos Orgânicos.....	22
1.7 Estrutura Molecular e a Fluorescência.....	24
1.8 <i>Tricholoma aurantium</i> .....	24
1.8.1 Síntese do <i>aurantricolídeo A</i> .....	25
1.9 Cultivo Celular.....	27
1.9.1 Linhagem Celular MDA-MB-231.....	28
1.11 Técnicas Associadas ao uso de Fluorescência.....	31
1.11.1 Microscopia de Fluorescência.....	31
1.11.2 Microscopia Confocal.....	31
1.11.3 Citometria de Fluxo.....	32
1.11.4 Imunofluorescência.....	33
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>34</b>
<b>3.OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
3.1 Objetivo Geral.....	35
3.2 Objetivos Específicos.....	35
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>36</b>
4.1 Cultura Celular.....	36
4.2 Obtenção do Composto.....	36
4.3 Avaliação da Toxicidade.....	36

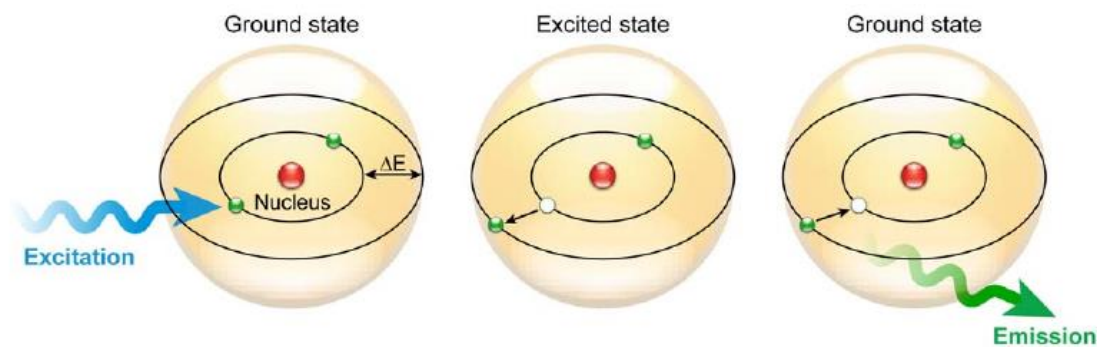
4.4	Localização Intracelular do Composto.....	37
4.5	Cinética de Aquisição de Fluorescência.....	37
4.6	Cinética de Perda de Fluorescência.....	37
4.7	Avaliação do Potencial como Marcador.....	38
4.8	Tratamento Estatístico de Dados.....	38
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>52</b>

## 1- Introdução e Revisão Bibliográfica

### 1.1 BREVE HISTÓRICO DA LUMINESCÊNCIA E SEUS PROCESSOS

A luminescência é o processo de liberação de energia em forma de fótons (luz) que ocorre no relaxamento de um estado de maior energia (estado excitado) para um de menor energia (normalmente o estado fundamental) (ABRAMS & HOLLOWAY, 2004). A forma com que ocorre a excitação determina o tipo de luminescência em questão. Por exemplo, a termoluminescência é a luminescência que ocorre quando a promoção ao estado excitado é por uma fonte térmica. Assim, para a fotoluminescência a fonte de excitação deve ser a luz.

A figura abaixo demonstra o princípio de fluorescência. A absorção de um quantum de luz (azul) faz com que o elétron se mova para uma órbita de energia mais elevada. Depois de residir neste "estado excitado" por um tempo particular denominado tempo de vida de fluorescência, o elétron volta à sua órbita de origem e o fluorocromo dissipa o excesso de energia emitindo um fóton (verde) (ISHKAWA-ANKERHOLD et al 2012).



Fonte: (ISHKAWA-ANKERHOLD et al 2012)

Figura 1. Representação esquemática do fenômeno da fluorescência, no modelo clássico de Bohr.

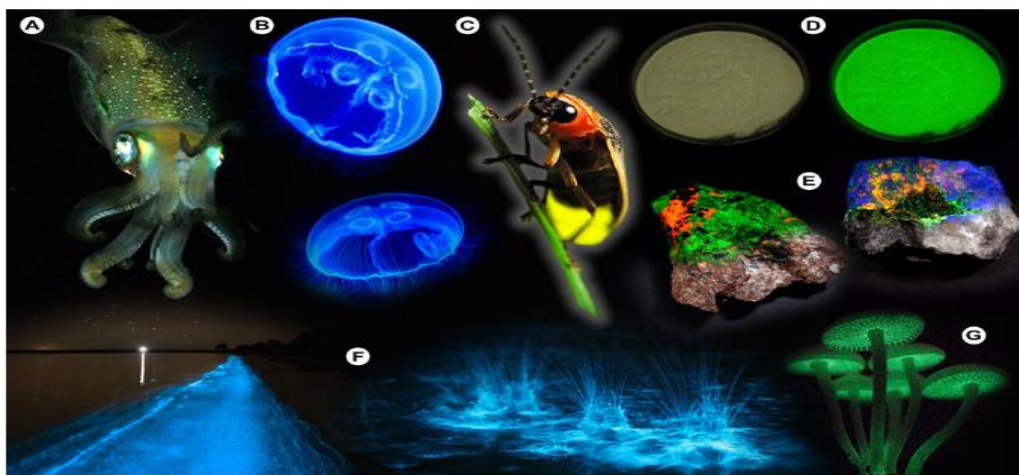
Comumente identificam-se, pelo menos, dois tipos de luminescência: fluorescência e fosforescência. No entanto, processos luminescentes compreendem um grande grupo de fenômenos relacionados que têm origem puramente física, química, e/ou biológicas /bioquímicas

<b>BIOLÓGICO</b>	<b>Bioluminescência</b>		Produzida por organismos
<b>QUÍMICO</b>	<b>Quimiluminescência</b>		Advindas de reações químicas
<b>FÍSICO</b>	<b>Fotoluminescência</b>	Fluorescência	Emissão de fótons (de estados excitados) com uma energia mais baixa do que os fótons absorvidos
		Fosforescência	Fluorescência atrasada (segundos a horas)
	<b>Mecanoluminescência</b>	Triboluminescência	Ligações rompidas, como resultado de quebra ou esmagamento do material
		Fractoluminescência	Rompimento de ligações em cristais devido à quebra
		Piezoluminescência	Pressão exercida
	<b>Cristaloluminescência</b>		Durante a cristalização
	<b>Sonoluminescência</b>		Implosão de bolhas em líquidos quando excitado por som
	<b>Radioluminescência</b>		Radiação ionizante
	<b>Termoluminescência</b>		Resultado de aquecimento
<b>Eletroluminescência</b>		Corrente elétrica	

Fonte: adaptado (DRUMMEN, 2012)

Tabela 1. Tipos de luminescência.

Emissões de luminescência como a aurora boreal, a luminosidade de animais, e a fosforescência em madeiras foram as primeiras observadas, pois não necessitavam de nada além dos olhos para serem vistas. Os primeiros registros escritos conhecidos sobre fenômenos luminescentes apareceram na literatura chinesa por volta de 1500 a 100 a.C., e tratavam sobre a luminosidade dos vaga-lumes. Na Grécia antiga, Aristóteles registrou observações de emissões luminosas vindas de peixes deteriorados (DRUMMEN, 2012).



Fonte: (DRUMMEN, 2012)

Figura 2. Luminescência na natureza. Família (A) Sepiolidae de lula; (B) *Aurelia aurita*, lua medusas; Nota-se que o brilho azul deriva de difração e não de bioluminescência; (C) a família Lampyridae de vaga-lumes; Sulfeto de zinco (D) pigmento fosforescente (metal alcalino-terroso); (E) pedras fluorescentes (topo é iluminado com luz UV): esquerda = willemita / Calcita; direita = Hardystonite (Ron Teunissen © 2012); (F) água luminescentes no Gippsland Lakes, Austrália (Phil Hart © 2012), que é criada por *Noctiluca scintillans*, uma espécie de dinoflagelados que apresenta bioluminescência; a reação é bioluminescente instantânea, como se observa na foto à esquerda, quando a água é perturbada mecanicamente; (G) *Mycena Chlorophos*, um grande gênero de pequenos cogumelos saprotrophic.

Os eventos mais marcantes na história da luminescência podem ser datados (tabela 2), desde seu primeiro relato registrado até a definição do termo propriamente dito, juntamente, com os nomes dos cientistas que participaram de suas descobertas e evoluções.

Ano	Cientista	Fato observado ou evento histórico
1565	N. Monardes	Emissão de luz por uma infusão de madeira <i>Lignum nephriticum</i> – primeiro relato registrado de observação de fluorescência.
1602	V. Cascariolo	Emissão de luz em uma “pedra bolonhesa” – primeiro relato registrado de observação de fosforescência.
1640	Licetus	Estudo da rocha bolonhesa – primeira definição de uma emissão de luz não térmica.
1833	D. Brewster	Emissão de luz por soluções clorofiladas e cristais de fluorita (CaF <sub>2</sub> ).
1842	E. Becquerel	Emissão de luz do sulfato de cálcio (CaSO <sub>4</sub> ) por excitação com luz ultravioleta.
1845	J. Herschel	Emissão de luz de soluções com sulfato de quinina.
1852	G. G. Stokes	Emissão de luz com radiação UV em soluções com sulfato de quinina – refragibilidade da luz.
1853	G. G. Stokes	Foi introduzido no meio científico o termo fluorescência. Termo que é utilizado ainda hoje.
1858	E. Becquerel	Foi desenvolvido e utilizado o primeiro aparelho denominado de fosforoscópio.
1867	F. Goppelsröder	Primeira análise fluorométrica – determinação de Al <sup>3+</sup> por fluorescência.
1871	A. Von Baeyer	Foi realizada a síntese da fluoresceína.
1888	E. Wiedemann	Introduziu-se o termo luminescência.

Fonte: adaptado de (VALEUR, 2001)

Tabela 2. Eventos da evolução da luminescência a partir do século XVI.

A denominação luminescência, que é uma tradução derivada do termo em latim de Lúçifer (aquele que brilha) (BROWN & CHOWN, 2000), foi introduzida por Eilhardt

Wiedemann em 1888, para distinguir a emissão de luz termicamente excitada, da emissão por moléculas que tenham sido excitadas por outros meios. Assim, emissões tendo uma intensidade luminosa maior que a emissão de um corpo negro naquela frequência e à mesma temperatura, foram classificados como luminescência por Wiedemann e, o tipo de excitação, foi utilizado para classificar o tipo de luminescência. Essa classificação permanece em uso.

O termo fluorescência, entretanto, não possui uma etimologia tão simples, sendo que o mesmo foi introduzido por George Gabriel Strokes, um cientista que era professor de matemática em Cambridge na metade do século XIX, que introduziu o termo no meio científico. Contudo, o primeiro registro de um evento de fluorescência foi feito por Nicolas Monardes, em 1565, um cientista espanhol que relatou a emissão azulada de uma madeira de *Lignum nephriticum* (NETO, 2006). Mais tarde essa madeira foi investigada por Boyle e Newton entre outros, entretanto nenhum conseguiu explicar o fenômeno. Em 1833, David Brewster, um pregador escocês, relatou um feixe de luz passando por extrato alcoólico de folhas (clorofila) parecia avermelhado quando observado por um dos lados. Ele próprio apontou para a semelhança que da emissão azulada oriunda da incidência de um feixe de luz em cristais de fluorita. Em 1845, John Herschel, um famoso astrônomo, sugeriu que as colorações da superfície de soluções de sulfato de quinina e de soluções de *Lignum nephriticum* eram o resultado de “um caso de cor superficial presente em um líquido homogêneo, internamente incolor”. Ele chamou esse fenômeno de “*epipolic dispersion* – dispersão de superfície”. Herchel utilizou prismas para estudar o fenômeno, entretanto ele não percebeu que a luz da superfície tinha um comprimento de onda maior do que a luz incidente. O fenômeno foi mais tarde reinvestigado por Strokes, que publicou o famoso artigo intitulado “On the refrangibility of light”, em 1852 (STROKES, 1852). Ele demonstrou que o fenômeno era a emissão de luz em consequência da absorção de luz.

A verdadeira ciência da fluorescência veio à tona em 1852, com George Gabriel Strokes (1819-1903). Esse cientista aplicou o método científico para o estudo da fluorescência e desenvolveu a lei que leva o seu nome para a fluorescência. A lei de Strokes diz que: - “O comprimento de onda de emissão de fluorescência deve ser maior do que o comprimento da radiação excitante”. De uma maneira simples e genial Strokes realizou um experimento que entrou para a história da ciência. Ele utilizou um prisma e separou o espectro das cores. Após isso passou pela luz separada uma solução com sulfato de quinina e observou que ela emitia luz azul quando passava pela região

invisível do ultravioleta. Sobre o fato o próprio Strokes disse: “É com certeza muito interessante ver o tubo brilhar instantaneamente quando colocado nos raios invisíveis; foi literalmente ver na escuridão”. Apesar da lei ser conhecida com o nome de Strokes, de fato, o primeiro cientista a afirmar que a luz emitida é de comprimento de onda maior do que a luz incidente foi Edmond Becquerel (cientista francês) em seu trabalho de 1842 (BECQUEREL, 1842).

Strokes chamou o efeito de *dispersão reflexiva*, entretanto ele mesmo escreve em uma nota de rodapé que não gostava do termo e que preferia o termo *fluorescência* devido aos minerais *fluorspar* e *fluorspath* que continham fluorita. Em seus trabalhos futuros, o termo utilizado passou a ser fluorescência (*fluorescence*). A grande diferença entre os trabalhos de Becquerel e Strokes é que a substância usada pelo primeiro (sulfato de cálcio) é fosforescente e a substância utilizada pelo segundo (sulfato de quinina) é fluorescente, contudo ambos os experimentos de fundamental relevância para fotoluminescência. Ainda no mesmo século foi feita a diferenciação entre as duas emissões sendo que a fosforescência ficou conhecida como a emissão que permanecia após cessar a fonte de excitação; a fluorescência, ao contrário, se extinguiu imediatamente quando cessava-se a fonte de excitação. Naturalmente, a distinção atual é feita em termos de tempo de duração da emissão após o fim da incidência de luz excitante, pois ambas perduram por certo tempo após a ausência da fonte de excitação. Mas, para fins didáticos, uma vez que na fluorescência (na ordem de ns) o tempo de emissão é muito menor do que a da fosforescência (na ordem de  $\mu$ s), podemos manter a mesma diferenciação feita no século XIX.

A primeira distinção teórica entre ambas foi feita em 1929, por Francis Perrin, (PERRIN, 1929) em sua tese de doutoramento em Paris. Durante o fim do século XIX e metade do século XX, muito se evoluiu na compreensão teórica e importantes experimentos foram realizados. Cientistas como F. Perrin, S. J. Vavilov, E. Gaviola, e A. Jablonski trouxeram inúmeras contribuições e melhoramentos para estudos de luminescência, mas esta história é bem registrada (NICKEL, 1996).

O estudo da luminescência evoluiu desde instrumentos simples, como o espectrômetro de Fraunhofer (1814), para instrumentos bastante sofisticados, ganhando um forte impulso a partir de 1950, com a realização prática de dispositivos de luminescência estimulada (lasers). Estes produzem feixes de ondas eletromagnéticas coerentes e altamente monocromáticas, com amplas aplicações tecnológicas.



Apesar da fluorescência ser observada a milhares de anos, somente há poucas décadas tem sido estudada, controlada e colocada em uso. Muitos consideram Athanasius Kircher (figura) como o fundador da ciência que envolve a fluorescência.



Figura 3. Retrato do padre jesuíta Athanasius Kircher (1602-1680)

## 1.2 FLUORÓFOROS E SUA IMPORTÂNCIA BIOTECNOLÓGICA

A busca por métodos fluorescentes capazes de detectar cada vez menores quantidades de biomoléculas sofreu muitos avanços nos últimos anos (GWINN & VALLYATHAN, 2006). No entanto, foi com o advento da nanotecnologia que as perspectivas para a utilização de nanopartículas em diagnósticos de doenças tornaram-se a principal promessa das pesquisas médicas, principalmente com os estudos que envolvem administração de medicamentos, terapia e investigação genética, marcação molecular e métodos de detecção ótica, desencadeando uma revolução molecular (BORM, 2006).

Ainda hoje, alguns tipos de processos biológicos, até mesmo os que acontecem nas células mais simples, são pouco entendidos. O estudo de processos biológicos, desde células a organismos inteiros, é fundamental para o entendimento de algumas doenças (tais como as neoplasias) e para a descoberta de novas formas de tratamento. Muitas são as abordagens utilizadas para a investigação dos fenômenos biológicos. Dentre as principais, estão às técnicas baseadas em fluorescência, principalmente a microscopia (EUZÉBIO, 2012).

Atualmente existem proteínas que cobrem praticamente todo o espectro eletromagnético. Concomitantemente, técnicas de imagens fluorescentes se

desenvolvem, estando um campo abastecendo a inovação do outro. Impressionantemente, as propriedades de fluorescência, foram utilizadas para desenvolver novos ensaios e as modalidades de imagiologia, que vão desde a transferência de energia para a imagem de interações moleculares para além do limite de difração com microscopia de super-resolução (DRUMMEN, 2012).

De fato, muitos avanços da área biomédica estão associados com a capacidade de se obter e melhorar imagens para o entendimento da estrutura e função celular. Algumas vantagens de técnicas baseadas em fluorescência são, por exemplo: a alta intensidade (permitindo monitoramento de processos em tempo real), e a especificidade (bio)química que advém da afinidade existente entre sondas fluorescentes e as macromoléculas no objeto de estudo. Além disso, a natureza ondulatória e corpuscular da luz vem nos permitindo extrair informações morfológicas, bioquímicas e até mesmo biomecânicas remotamente e não destrutivamente de estruturas inerentes aos sistemas biológicos. Existem ainda outras técnicas importantes na área biomédica, que também utilizam sondas fluorescentes, dentre elas estão a citometria de fluxo e ensaios de imunofluorescência (EUZÉBIO, 2012).

### 1.3 MARCADORES CELULARES E O CIENTISTA FARMACÊUTICO

Fluorescência, a absorção e a reemissão de fótons com maior comprimento de onda é um dos mais incríveis fenômenos da natureza. Sua descoberta e utilização teve, e ainda tem, um grande impacto em pesquisas biológicas e biomédicas, desde que possibilita não só a visualização de processos fisiológicos com alta resolução temporal e espacial, na detecção de múltiplos sinais concomitantemente, no rastreamento de moléculas individuais, na substituição de ensaios radioativos quando possível, também para marcar luminosamente diversos processos biopatológicos em estados de doença, que de outra forma não seria possível. A integração da fluorescência em métodos de detecção em sistemas biológicos se tornou possível por meio de técnicas genéticas (DRUMMEN, 2012).

Imagens de microscopia de fluorescência são amplamente utilizadas em pesquisas biomédicas para estudar processos celulares em culturas celulares ou tecidos simples. Essa prática é motivada pela alta sensibilidade de técnicas de fluorescência, a resolução espacial, que se compara favoravelmente com dimensões celulares, a estabilidade dos marcadores fluorescentes utilizados e as estratégias de

marcação sofisticadas que têm sido desenvolvidas para marcar seletivamente moléculas alvo (STUKER, 2011).

A ampla adoção de plataformas de triagem de conteúdo por parte da indústria farmacêutica e de biotecnologia indica uma nova tendência em incorporar marcadores de pontos específicos em complexos biológicos na descoberta de medicamentos. Se tornando um acessório a mais para ajudar na produção científica por profissionais farmacêuticos.

Os mais recentes avanços em tecnologias de imagens de células vivas e marcadores fluorescentes funcionais têm estimulado o desenvolvimento de uma série de técnicas inovadoras que fornecem um detalhado perfil do comportamento celular e da dinâmica molecular de eventos em complexos *in vitro*. A alta resolução de imagens de processos *in vitro* em andamento anunciam uma nova era de perfil de resposta de drogas (ISHERWOOD et al, 2011).

#### 1.4 MOLÉCULAS FLUORESCENTES NO ESTUDO DO CÂNCER

As moléculas fluorescentes absorvem luz em um comprimento de onda e emitem em um outro comprimento de onda mais longo. Se um dado composto é iluminado no seu comprimento de onda de absorção e então visualizado através de um filtro que permite apenas a passagem de luz com o comprimento de onda emitido, ele brilhará contra um fundo escuro. Como o fundo é escuro, mesmo uma quantidade mínima de corante fluorescente brilhante pode ser detectada. O mesmo número de moléculas de um corante comum, visualizado convencionalmente, seria praticamente invisível, pois ele daria um colorido fraco para a luz transmitida através dessa parte corada da amostra (ALBERTS et al, 2004).

O Câncer é um dos líderes nas causas de mortalidade do mundo. Por ano mais de dez milhões de pessoas são diagnosticadas com essa doença. (RAFIK et al, 2012) Essa enfermidade é considerada um grande problema de saúde pública, e segundo o Instituto Nacional do Câncer estimou-se para o ano de 2013, 518.510 novos casos no Brasil. Os tipos de câncer mais diagnosticados são de pele (134 mil novos casos), próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo de útero (18 mil) (ROSAS et al, 2013).

Com o aumento na incidência mundial de câncer, grandes esforços estão voltados para a busca da cura e/ou controle desta patologia. Atualmente, diversos produtos farmacêuticos, naturais ou sintéticos são utilizados para o tratamento de neoplasias. Assim, estudos em cancerologia experimental *in vitro* tornam-se uma ferramenta importante para a triagem de moléculas antineoplásicas eficazes e seguras. As linhagens de células tumorais podem ser obtidas através de banco de células e mantidas por meio de cultura celular (ROSAS et al, 2013).

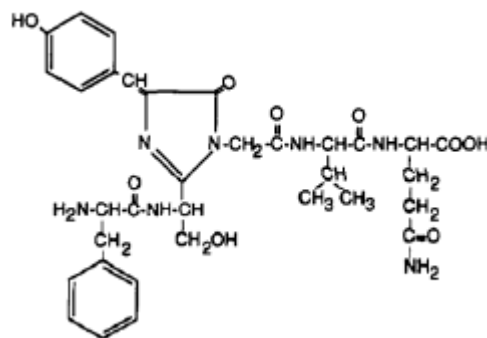
Por isso existe a necessidade de desenvolver novas abordagens para a detecção precoce do câncer e terapia eficaz e, assim, contribuir significativamente para melhorar a sobrevida do paciente e seus cuidados (PARVEEN et al, 2006). Diversas moléculas fluorescentes desse tipo estão, atualmente, em uso em oncologia experimental, principalmente a GFP, que revolucionou a ciência.

### 1.5 BREVE HISTÓRICO DA PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE (GFP, do inglês *green fluorescent protein*)

Em 1960, logo depois de ter se unido à Princeton University, Osamu Shimomura começou a estudar a bioluminescência produzida pela água-viva *Aequorea victoria* (SHIMOMURA et al., 1962). Viajando regularmente para o Estado de Washington para obter espécimes, ele coletou órgãos luminescentes a partir de 20 ou 30 águas-vivas e os espremeu por uma gaze raiom. Seu “espremido” era levemente luminescente, e ele começou a purificar as moléculas responsáveis. Em 1962, seu laboratório descreveu a purificação de uma proteína associada à proteína verde fluorescente, que eles chamaram de aequorina. A primeira referência sobre a proteína verde fluorescente apareceu como uma nota de rodapé daquele artigo, no qual Shimomura descreveu o isolamento de uma proteína, a partir dos espremidos, que formava soluções aparentemente esverdeadas à luz solar e amareladas sob luz de tungstênio, e bastante brilhantes com uma fluorescência esverdeada sob a luz UV. Seus estudos subsequentes gradualmente mostraram que a GFP (EHRENBERG, 2008) possuía uma propriedade especial: continha toda a química necessária para emitir fluorescência por si só. Até aquele momento, a maioria das outras proteínas que sabidamente produziam bioluminescência, como a luciferase do vagalume, necessitavam da adição de outras moléculas para fazê-lo (CHALFIE et al, 1994).

Douglas Prasher, da Woods Hole Oceanographic Institution, foi o primeiro a apreciar o potencial de fundir GFP a outra proteína e usar sua fluorescência (WANG & HAZEZRIGG, 1994) como marcador celular para aquela proteína. Ele teve sucesso na clonagem do gene para GFP e na determinação de sua sequência, descrevendo esse avanço em 1992. Martin Chalfie, na Columbia University, também observou o potencial da GFP. Em colaboração com Prasher, ele expressou a GFP em *E. coli*, descrevendo os resultados do trabalho na *Science* em 1994 (CHALFIE et al, 1994). Esse trabalho demonstrou o potencial do sistema, mostrando que a GFP expressa em um organismo hospedeiro produzia fluorescência sem a necessidade de qualquer outra proteína ou fator da água-viva. Sergey Lukyanov, em Moscou, demonstrou que variantes de GFP poderiam ser clonadas a partir de Anthozoa não bioluminescentes dos recifes de corais, e ele conseguiu expandir o leque de cores desta proteína pela clonagem de uma proteína fluorescente vermelha.

A proteína nativa verde fluorescente (GFP), primeiramente denominada por Morin e Hastings (1971 ab), proveniente da água-viva *Aequorea victoria* (SHIMOMURA et al., 1962) contém 238 aminoácidos (PRASHER et al., 1992). Os resíduos 65-67 (Ser-Tyr-Gly) na sequência de GFP (HEIM et al, 1994) formam, espontaneamente, o cromóforo p-hidroxibenzilideneimidazolinona (CODY et al, 1993; SHIMOMURA, 1979).

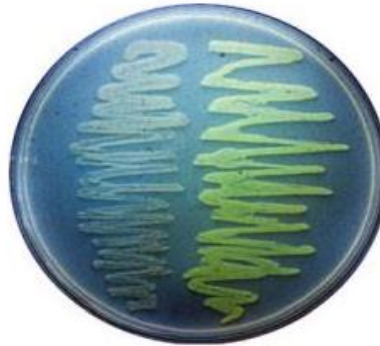


Fonte: (CODY et al, 1993)

Figura 4. O cromóforo fluorescente formado pelo resíduo de aminoácidos 65-67 (Ser-Tyr-Gly) na estrutura primária de GFP

Muito do que sabemos agora sobre a química e a utilidade geral da GFP e de outras proteínas fluorescentes resultou do trabalho subsequente de Roger Tsien (TSIEN, 1998), na Universidade da Califórnia, em San Diego. Seu laboratório construiu vários mutantes de GFP que produzem o leque de cores. Muitos desses mutantes

também melhoram a estabilidade e o brilho dos fluoróforos nas proteínas. Desde meados de 1990, a GFP e suas variantes se tornaram artigos importantes da biologia molecular e celular, iluminando mecanismos e as vias de outras incontáveis proteínas e processos celulares (CHALFIE et al, 1994).



Fonte: (CHALFIE et al, 1994)

Figura 5. As bactérias ao lado direito desta placa com ágar estão brilhando como resultado da expressão da proteína verde fluorescente.

## 1.6 FLUORÓFOROS ORGÂNICOS

Compostos orgânicos fluorescentes apresentam várias vantagens sob materiais inorgânicos, como ambiente amigável, métodos de fabricação de baixo custo e controle de suas propriedades de acordo com sua estrutura química. O permanente desenvolvimento de técnicas dentro da síntese orgânica amplia cada vez mais as possibilidades para o planejamento e obtenção de moléculas até então desconhecidas. Impulsionados pela curiosidade e o desejo de novos conhecimentos que podem ser obtidos através dessas estruturas (PRIEBE, 2010).

Porém alguns desses corantes orgânicos possuem algumas desvantagens que são: a sua alta citotoxicidade, comprometendo as análises em sistemas vivos, a alta taxa de fotoapagamento (não permitindo a aquisição de imagens de eventos em tempo real, que tenham longa duração ou mesmo a manipulação em locais com alta luminosidade), além da necessidade de vários lasers nos equipamentos de análise, visto que cada corante tem um comprimento de onda de absorção específico (EUZÉBIO, 2012). Podemos citar entre eles aqueles que se intercalam ao DNA como o DAPI, Brometo de etídio, entre outros.

Durante os últimos anos a pesquisa no desenvolvimento de novos compostos com propriedades específicas para atuarem como quimiossensores fluorogênicos tem

atraído o interesse pelo aumento na aplicabilidade desses tipos de substâncias nas pesquisas científicas e no desenvolvimento de metodologias para a identificação de diferentes analitos (PRIEBE, 2010).

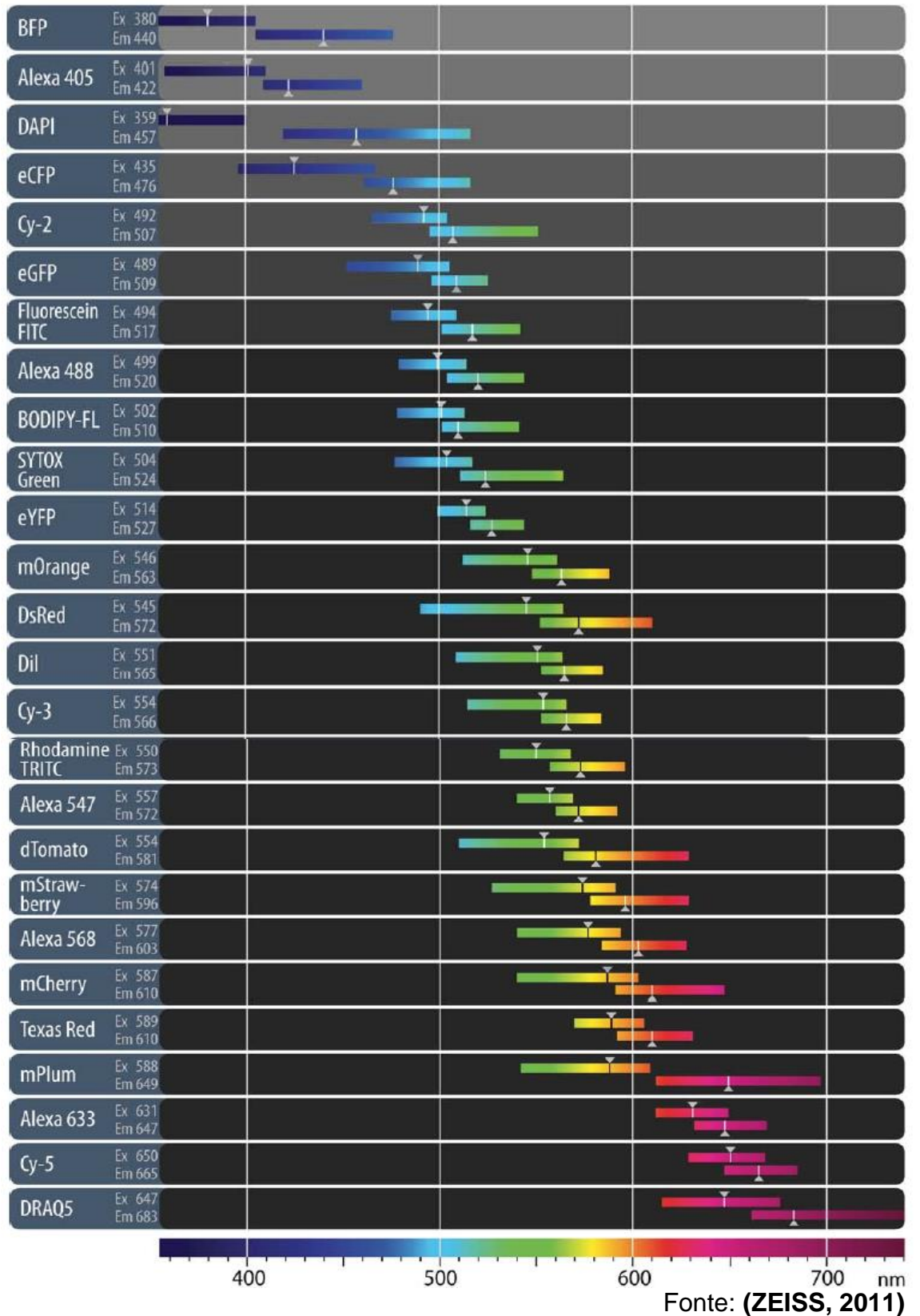


Tabela 3. Visão geral das propriedades fluorescentes de corantes orgânicos populares e proteínas fluorescentes.

### 1.7 ESTRUTURA MOLECULAR E A FLUORESCÊNCIA

Em compostos orgânicos, o fenômeno da fluorescência ocorre tipicamente em estruturas aromáticas. Alguns dos fluoróforos típicos são a quinina, a fluoresceína, a rodamina, o POPOP. A quinina, encontrada em água tônica, foi o primeiro fluoróforo estudado e foi responsável por estimular o desenvolvimento dos primeiros espectrofluorímetros que surgiram somente em 1950. Muitos fluoróforos são encontrados nos dias atuais. Hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, tais como o antraceno e o perileno, são também fluorescentes. Em proteínas o fluoróforo dominante é o grupo do triptofano que absorve próximo de 280nm e emite próximo de 340nm. Em contraste às moléculas orgânicas aromáticas, átomos são geralmente não fluorescentes em fases condensadas. Uma exceção notável é o grupo dos lantanídeos (EUZÉBIO, 2012).

Para investigar as células e os processos celulares, é muito importante visibilizar as estruturas e compartimentos que estão envolvidas na sua bioquímica. As células são quase transparentes à luz microscópica individual e, geralmente, não há possibilidade de observação direta dos compartimentos ultraestruturas (MICHALET et al., 2005). Neste caso, as estruturas de interesse são identificadas com marcadores que possibilitem essa observação direta através de microscopia avançada (AZZAZY et al., 2006).

### 1.8 TRICHOLOMA AURANTIUM

Algumas espécies fúngicas produzem substâncias fluorescentes como metabólito. É o caso de alguns fungos dermatófitos que produzem fluorescência amarelo-esverdeada, devido à presença de triptofano (CARTER, 1988). Este fato faz com que fungos sejam boas fontes de pesquisa para novos agentes fluorescentes.

O *Tricholoma aurantium* é um fungo capaz de produzir uma substância denominada *aurantricolídeo A*, que é um pigmento fluorescente. Este belo *Tricholoma* é facilmente reconhecido pela sua coloração alaranjada, e tampa geralmente viscosa;



possui gosto farinhento; seu caule é distinto; apresenta escamas que terminam perto do ápice, deixando uma zona branca no topo. No entanto, o *Tricholoma aurantium* não possui véu parcial, a aparência dos resultados estaminais é embainhada a partir da disposição das pequenas escamas em vez de um anel verdadeiro. O *Tricholoma aurantium* é um micorrízico com vários coníferos e pode ser encontrada em grande parte da América do Norte (KUO, 2004). Produz esporos brancos, *Pictus suillus* tem escamas vermelhas na tampa e no caule, mas tem poros ao invés de brânquias, na capa (RUSSEL, 2006).

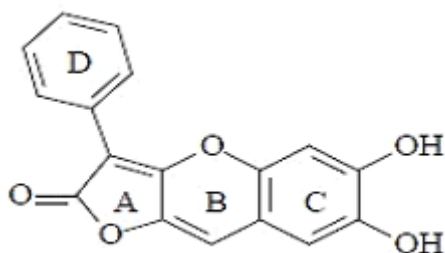


Fonte: (RUSSEL, 2006)

Figura 6. *Tricholoma aurantium*

#### 1.8.1 SÍNTESE DO AURANTRICOLÍDEO A.

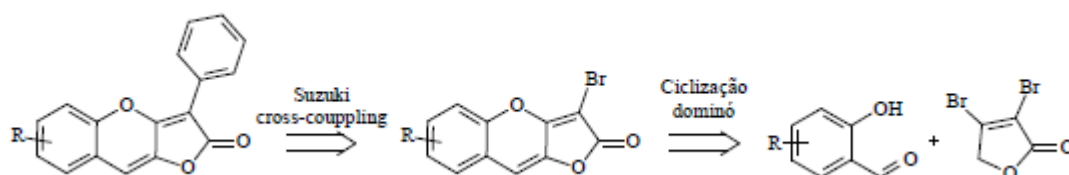
O *aurantricolídeo A* (KLOSTERMEYER, 2000) é um pigmento fluorescente instável isolado do fungo *Tricholoma aurantium*. Durante estudos visando a síntese de derivados estáveis deste produto natural, percebeu-se que a unidade ABC da molécula é responsável pela intensa fluorescência destes heterociclos tanto no estado sólido quanto em solução em diversos solventes orgânicos (OLIVEIRA et al, 2010).



Fonte: (CUNHA et al, 2009)

Figura 7. Aurantricolídeo A

A síntese destes derivados foi realizada em duas etapas. Inicialmente uma reação de ciclização dominó entre a 3,4-dibromo-2(5H)-furanona (2) e salicilaldeídos seguido de um acoplamento Csp<sup>2</sup>-Csp<sup>2</sup> via reação de Suzuki. (OLIVEIRA et al, 2010)

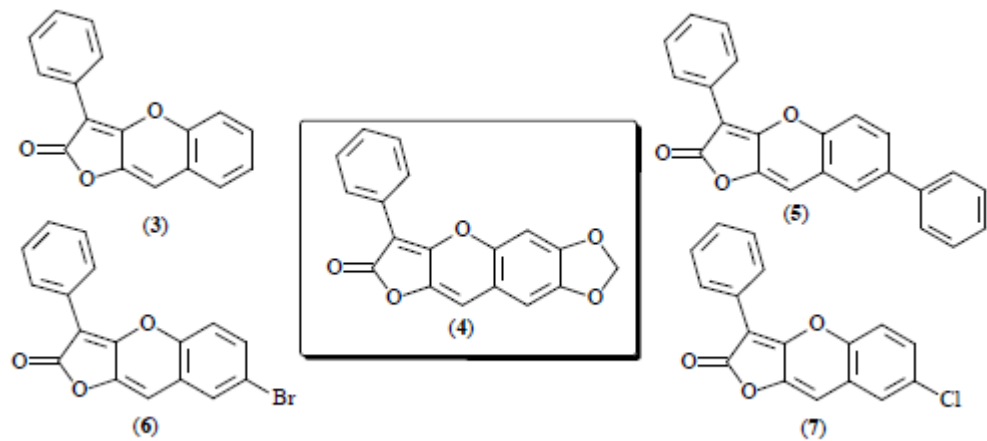


Fonte: (OLIVEIRA et al, 2010)

Figura 8. Retrossíntese

Sabendo da importância de desenvolver moléculas fluorescentes a partir de novas metodologias sintéticas, decidiu-se avaliar a capacidade dessa substância como marcador celular fluorescentes (OLIVEIRA et al, 2010).

As moléculas abaixo foram testadas como marcadores de células tumorais do sistema nervoso central. Os melhores resultados foram obtidos utilizando o metilenodioxí-aurantricolídeo (4) (código: FLU4) como fluoróforo. A maior fluorescência de 4 pode ser racionalizada através do efeito “push-pull” de elétrons pi, no qual a porção metilenodioxí funciona como doador e a carbonila comoceptor (OLIVEIRA et al, 2010). Esse teste foi o primeiro indício de que o composto poderia vir a ser um bom biomarcador, o que nos levou a necessidade de realização de testes mais específicos que comprovassem tal aplicação.



Fonte: (OLIVEIRA et al, 2010)

Figura 9. Metilenodioxaurantricolídeo (4) (código: FLU4)

### 1.9 CULTIVO CELULAR

Um dos métodos mais empregados para estudar as células vivas é o cultivo (ou cultura) celular. Desde que foi possível fazer crescer explantes de tecido durante várias gerações, a técnica de cultivo progrediu notavelmente. Hoje é um dos procedimentos mais utilizados para elucidar problemas fundamentais da biologia celular (ROBERTIS e HIB, 2006).

Antes, a técnica consistia em colocar um explante de um pequeno fragmento de tecido – preferencialmente embrionário – em um meio composto por soro sanguíneo, extrato de embriões e soro fisiológico. A partir de 1955 foram criados meios químicos mais adequados, e agora que conhecemos as necessidades nutricionais das células eucariontes elas podem ser mantidas e desenvolvidas em um meio sintético enriquecido com soro (ROBERTIS e HIB, 2006).

Os cultivos primários (LUISI et al, 2004) são obtidos diretamente dos animais e dos vegetais. O cultivo secundário é obtido por meio de tratamento com tripsina de um cultivo primário, seguido de um novo cultivo em uma nova placa de Petri (ROBERTIS e HIB, 2006) (MORAES et al, 2007).

De uso mais corrente são os cultivos de linhagens estabelecidas (FIOCRUZ, 2008), cujo crescimento se prolonga devido à condição cancerosa das células. Entre as mais usadas encontram-se a HeLa – obtidas de carcinoma humano - as células L

e 3T3 de embrião de rato, as células BHK, obtidas de rim de hamster recém-nascido e as células CHO do ovário do mesmo animal adulto. Quando células normais são cultivadas não sobrevivem por muito tempo, já que ao final de vários subcultivos deixam de se dividir e morrem. As linhagens estabelecidas têm características especiais: dispõem-se estreitamente, necessitam de menor concentração de soro sanguíneo e podem ser heteroplóides (o número de cromossomos varia de uma célula a outra). Um dos avanços mais importantes foi a obtenção de linhagens puras, ou seja, de populações celulares derivados de uma única célula progenitora (ROBERTIS e HIB, 2006) (PERES & CURI, 2005).

#### 1.9.1 LINHAGEM CELULAR MDA-MB-231

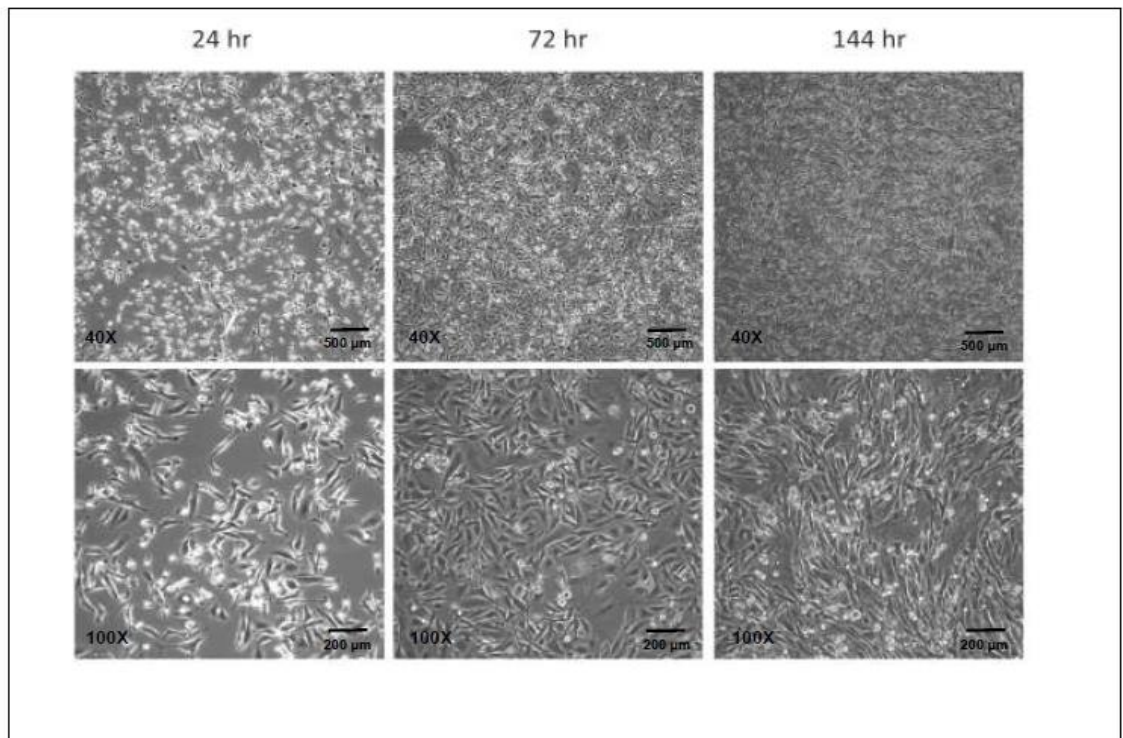
As células MDA-MB-231 são bastante utilizadas e foi esse um dos motivos da sua escolha na realização desse estudo. Para dar prosseguimento à pesquisa, foi necessária uma breve caracterização (**tabela 4**) e análise comportamental da mesma.

<b>Designação:</b>	MDA-MB-231	
<b>Nível de Biossegurança:</b>	1	
<b>Transporte:</b>	Congelada	
<b>Propriedades de crescimento:</b>	Aderente	
<b>Organismo:</b>	<i>Homo sapiens</i>	
<b>Fonte:</b>	<b>Órgão</b>	Glândula mamária; Seio
	<b>Doença</b>	Adenocarcinoma
	<b>Derivado do sítio metastático:</b>	Derrame Pleural

Fonte: adaptado (**ATCC, 2012**)

Tabela 4. Informações iniciais sobre a linhagem celular MDA-MB-231

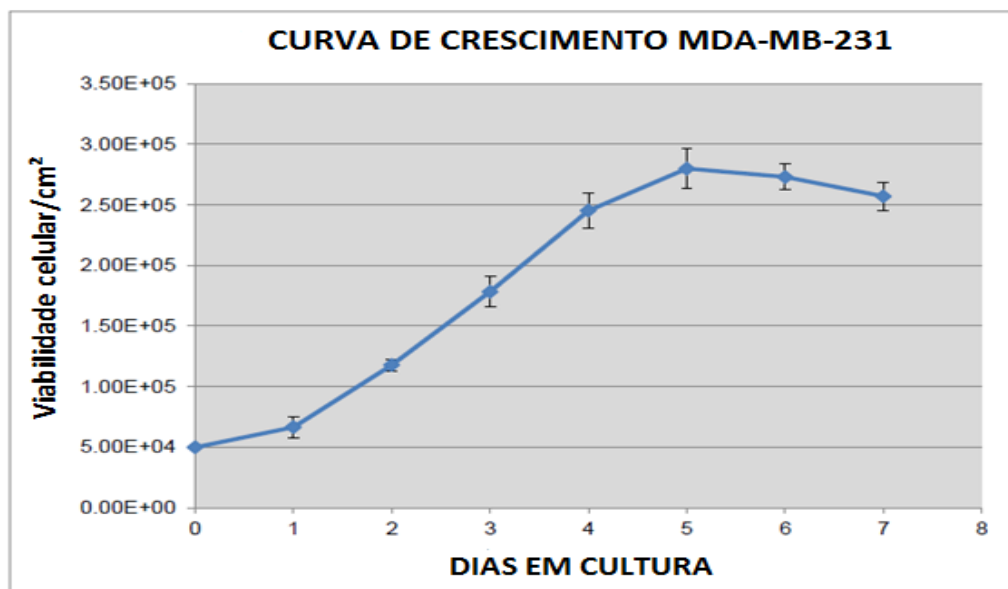
Após sua caracterização, é preciso a definição do seu comportamento quando em cultivo. Esse é um ponto importante já que define a maneira de tratamento dessas células, como a periodicidade da troca do meio de cultura, necessário para sua manutenção, observando estados de confluência e subconfluência, ou seja, de densidade populacional (**tabela 5**).



Fonte: (ATCC, 2012)

Tabela 5. Fotomicrografia de células MDA-MB-231 em vários pontos de temporais após a semeadura, a uma densidade celular de  $5 \times 10^4$  células viáveis /cm<sup>2</sup>.

A curva de crescimento (**gráfico 1**) da linhagem, torna possível o delineamento de experimentos com base no tempo.



Fonte: adaptado (ATCC, 2012)

Gráfico 1. Curva de crescimento para MDA-MB-231; As células foram colocadas em placas a  $5 \times 10^4$  células viáveis/cm<sup>2</sup>; O tempo de duplicação da população (PDT) é de aproximadamente 38 h.

#### 1.10 BREVE HISTÓRICO DA MICROSCOPIA

Os primeiros cientistas a desenvolver a microscopia óptica para observação biológica a nível microscópico foram Robert Hooke and Antonie van Leeuwenhoek. Hooke desenvolveu o microscópio composto, o qual consistia em uma fase com fonte de luz e três lentes ópticas, que em geral, os microscópios mais modernos ainda contêm. Com esse microscópio, Hooke observava insetos, tais como piolhos e pulgas, sementes e secções de plantas. Publicou suas observações e fundamentos de microscopia em 1665 em um livro intitulado "Micrografia" (HOOKE, 1665).

Foi Robert Hooke quem inventou o termo "célula" quando se observa a estrutura porosa parecida com uma caixa de cortiça, porque isso o remeteu as células de um mosteiro-da cellula latim, que significa "um quarto pequeno". No entanto, é preciso que se note que Hooke não observou células como as da nossa atual compreensão biológica da palavra. A observação dos organismos celulares individualmente foi primeiramente conseguida por Antonie van Leeuwenhoek em 1678, com um simples microscópio que contém uma única lente, convexa que poderia resolver detalhes tão pequeno quanto 1  $\mu\text{m}$  (VAN LEEUWENHOEK, 1977). Sua versão de microscópio era mais difícil de manusear que a versão composta de Hooke, mas com ela Leeuwenhoek pôde observar seus "animalcules": várias bactérias, protozoários e espermatozóides, e também os padrões listrados em fibras musculares e fluxo sanguíneo nos capilares. Estes foram passos pioneiros que conduziram o desenvolvimento da microscopia óptica e, conseqüentemente, grandes descobertas biológicas.

O salto da microscopia da luz branca para a microscopia de fluorescência foi, por comparação, pequena, e desde o início do século 20, muitos nomes agora proeminentes foram envolvidos no seu desenvolvimento. August Köhler construiu o primeiro microscópio com iluminação ultravioleta (UV) em 1904 com o trabalho óptico de Zeiss, mas foi Oskar Heimstädt quem desenvolveu o primeiro microscópio rudimentar de fluorescência em 1911, juntamente com o seu estudo de autofluorescência de compostos orgânicos e inorgânicos (HEIMSTADT, 1911).

Melhorias foram feitas em 1929 por Philipp Ellinger e August Hirt e seu microscópio de epi-fluorescência ainda está conceitualmente utilizado em laboratórios de hoje. Com a introdução de lasers (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação) por Gould, Townes, Schawlow, e Maiman (SCHAWLOW & TOWNES, 1958) (SOLON et al, 1961)

Na década de 1960, a falta de poder excitatório abriu caminho para o desenvolvimento da microscopia confocal. Lasers ofereceram o que outras fontes de luz não conseguiram: um alto grau de coerência espacial e temporal, o que significa que o feixe monocromático coerente e difracção limitada pode ser focado num pequeno ponto, alcançar uma muito elevada irradiação local. Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) combina imagens de alta resolução óptica com seletividade profundidade (PAWLEY, 2006) e foi originalmente inventado por Marvin Minsky em 1957 (MINSKY, 1961). Avanços na resolução e profundidade de penetração foram alcançados por meio de microscopia multi-fótons, teoricamente descrito por Maria Göppert-Mayer em 1931 em sua tese de doutorado (GOPPERT-MAYER, 1931), e, posteriormente, desenvolvido por Winfried Denk no laboratório de Watt Webb (DENK et al, 1990)

## 1.11 TÉCNICAS ASSOCIADAS AO USO DE FLUORESCÊNCIA

### 1.11.1 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Corantes fluorescentes como: fluoresceína, rodamina, Cy3, Cy5 e os corantes Alexa, utilizados para corar células, são detectados por um microscópio de fluorescência (LICHTMAN & CONCHELLO, 2005) (PAWLEY, 2006). Este microscópio é semelhante a um microscópio óptico comum, exceto que a luz utilizada para iluminação, originada de uma fonte muito potente, passa através de dois conjuntos de filtros (ALBERTS et al, 2004). Uma das principais vantagens da microscopia de fluorescência é o aumento dramático no sinal de estruturas e moléculas marcadas em contraste com um fundo escuro (ISHIKAWA-ANKERHOLD et al 2012). Por isso, é mais comumente utilizada para detectar proteínas específicas ou outras moléculas em células e tecidos.

### 1.11.2 MICROSCOPIA CONFOCAL

O microscópio confocal alcança um resultado similar àquele de deconvolução, pela manipulação da luz antes de ela ser medida; desta maneira, é uma técnica analógica, em vez de digital. Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) é uma técnica que combina imagens de alta resolução óptica (WRIGHT, 2002) com profunda seletividade (PAWLEY, 2006). Os detalhes ópticos do microscópio confocal são complexos, mas a ideia básica é simples. Por isso, essa técnica tem sido utilizada para resolver a estrutura de numerosos objetos tridimensionais complexos, incluindo as redes de fibras citoesqueléticas no citoplasma e o arranjo de cromossomos e genes no núcleo (ALBERTS et al, 2004). Ao invés de iluminar toda a amostra de uma vez, maneira usual, o sistema óptico focaliza a qualquer instante um ponto de luz sobre um único ponto da amostra, a uma profundidade específica (PADDOCK, 2000).

### 1.10.3 CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo foi originalmente desenvolvida, no fim dos anos 50, para a contagem e análise de células sanguíneas (CÔRTE-REAL et al, 2002). No entanto, com a natural evolução técnica e com o aparecimento de novos marcadores fluorescentes, a utilização desta instrumentação generalizou-se a outras áreas e a estudos com outras células, como células vegetais e microbianas (DOLEZEL 1997a).

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas que fluem numa suspensão líquida (BREHM-STECHER & JOHNSON, 2004) (SHAPIRO, 2003) (NEBE-VON-CARON et al, 2000). Esta particularidade é uma das diferenças existentes entre a citometria de fluxo e outras técnicas de análise quantitativa de núcleos isolados ou cromossomos (e.g. microespectrofotometria), que necessitam da fixação das partículas a uma superfície (e.g. lâmina). A medição em fluxo permite análises a alta velocidade (e.g.  $10^2 - 10^3$  partículas por segundo) (DOLEZEL 1997a)



Fluorocromo	Modo de Ligação Primário	Comprimento de Onda	
		Excitação	Emissão
Iodeto de Propídio	Intercalação	525 (Azul-verde)	605 (Vermelho)
Brometo de Etídio	Intercalação	535 (Azul-verde)	602 (Vermelho)
DAPI	Regiões ricas em A-T	345 (UV)	460 (Azul)
Hoechst 33258	Regiões ricas em A-T	360 (UV)	460 (Azul)
Coromicina A3	Regiões ricas em G-C	445 (Violeta-Azul)	570 (Verde)
Mitramicina	Regiões ricas em G-C	445 (Violeta-Azul)	575 (Verde)

Fonte: (LOUREIRO & SANTOS, 2003)

Tabela 6. Corantes fluorescentes mais utilizados em Citometria de Fluxo para estimar o conteúdo de DNA nuclear.

#### 1.11.4 IMUNOFLOURESCÊNCIA

A imunofluorescência é uma técnica que permite a visualização de uma proteína específica ou antígeno em células ou tecidos através da ligação de um anticorpo específico quimicamente conjugado com corante fluorescente, que absorve luz e emite em um determinado comprimento de onda. Existem dois principais métodos de imunofluorescência: direto e indireto (ilustrado abaixo) (INGA et al, 2010).

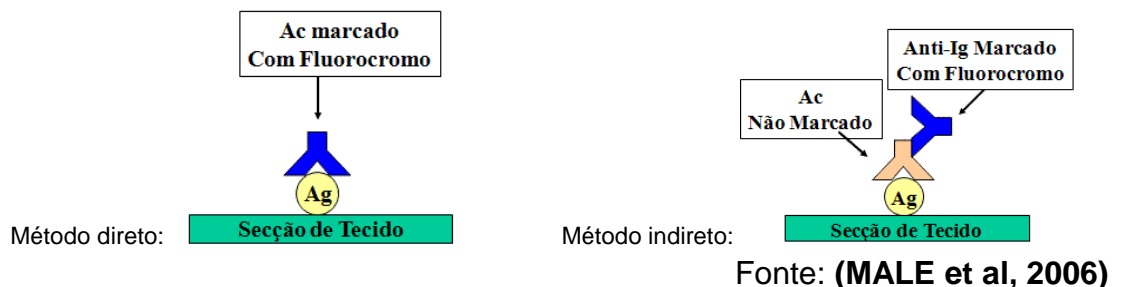


Figura 11. Imunofluorescência direta e indireta.

## 2. Justificativa

Com o aumento na incidência mundial de câncer, grandes esforços estão voltados para a busca da cura e/ou controle desta patologia. Atualmente, diversos produtos farmacêuticos, naturais ou sintéticos, são utilizados para o tratamento de neoplasias. Assim, estudos em cancerologia experimental *in vitro* tornam-se uma ferramenta importante para a triagem de moléculas antineoplásicas eficazes e seguras, além da ampliação do conhecimento sobre a patogênese do câncer. A maior parte das abordagens experimentais nesse sentido se utiliza de linhagens de células tumorais, que podem ser obtidas através de banco de células e mantidas por meio de cultura (ROSAS et al, 2003).

O extraordinário progresso alcançado nos últimos anos pela biologia molecular e celular é consequência do desenvolvimento de novos métodos para o estudo dos componentes celulares, baseados na aplicação de técnicas bioquímicas e biofísicas de última geração. (ROBERTIS e HIB, 2006). Uma estratégia muito usada é a marcação de uma população celular para posterior identificação desta (SUKHDEO et al, 2013), o que permite variados desenhos experimentais. A forma mais usual de fazer tal marcação é por meio de produção de clones estáveis carregando genes como o da green fluorescent protein (GFP), que torna a linhagem fluorescente (FU et al, 2014) sob estímulos adequados. No entanto, a produção de células tumorais transgênicas tem dois inconvenientes, os custos e dificuldades técnicas do método, e a manipulação genética indesejada, já que pode ocasionar mudanças fenotípicas com repercussões importantes, comprometendo a interpretação dos resultados, visto que o background genético das células tumorais é, por vezes, a característica mais relevante para o estudo destas, não sendo interessante modificá-lo.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo desse plano de trabalho é o desenvolvimento de novas metodologias analíticas em biologia celular aplicada ao câncer, utilizando as propriedades da molécula FLU4, a fim de gerar um produto com valor biotecnológico e comercial.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração sub tóxica do FLU4 em células da linhagem MDA-MB-231, de câncer de mama.
- Determinar a intensidade média de fluorescência nas células após tratamento com tal concentração.
- Determinar se tal fluorescência se perde com o tempo ou com os ciclos celulares.
- Determinar se a fluorescência pode ser usada para identificar células previamente marcadas em meio a outras não marcadas.

## 4. Metodologia

### 4.1 Cultura celular

Células MDA-MB-231 (câncer de mama) foram utilizadas nesse estudo. Estas foram cultivadas em placas plásticas de 10 cm de diâmetro, específicas para esse fim, a 37°C em meios de cultura adequados suplementados com ácido pirúvico (1mM), L-(+)-glutamina (2mM), NaHCO<sub>3</sub> (44mM), 10 % (v/v) de soro fetal bovino (SFB), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias. Para os testes, as células foram tripsinizadas e semeadas em placas de 6, 24 ou 96 poços, de acordo com o teste a ser realizado, com densidade e confluência variável, a depender do objetivo.

### 4.2 Obtenção do composto

O FLU4 foi sintetizado e caracterizado no Laboratório de Síntese Orgânica do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia. O composto, sólido, foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) em concentração de 15 mM e estocado a -20°C para realização dos experimentos.

### 4.3 Avaliação da toxicidade

A toxicidade do FLU4 foi avaliada através da investigação da alteração na viabilidade celular por teste do teste do MTT (MOSMANN, 1983). A técnica foi realizada em placas de 96 poços com densidade de 20.000 células por poço. 24 horas após semeadas, as placas foram tratadas com concentrações crescentes de FLU4 por 48 e 140 horas. Depois disso o meio de cultura foi trocado e o MTT, dissolvido em tampão fosfato (PBS), adicionado em cada poço (1 mg/mL). Após duas horas de incubação, as células foram então lisadas pela adição de 100 µL de duodecil sulfato de sódio (SDS) a 20% (p/v) em dimetilformamida a 50% (v/v). Para quantificação da viabilidade, a placa foi submetida a espectrofotometria e a absorbância medida em um comprimento de onda de 630 nm, usando um leitor de microplacas. Todos os experimentos constaram de um grupo controle em que as células foram tratadas apenas com DMSO (concentração final = 0,3% v/v). Os dados foram expressos

relativamente como percentual do grupo controle ou sem tratamento e submetidos às análises estatísticas adequadas.

#### 4.4 Localização intracelular do composto

Depois de adequada determinação dos valores sub tóxicos, culturas confluentes de células foram tratadas por cerca de 2 horas com FLU4, depois das quais foram lavadas com PBS e levadas imediatamente para análise em microscópio confocal sob iluminação com luz UV ( $\lambda=340\text{nm}$ ). Registros foram feitos em micrografias usadas para determinar a localização intracelular do composto fluorescente.

#### 4.5 Cinética de aquisição de fluorescência

O tempo de exposição para aquisição de fluorescência foi investigado por meio de tratamento, por períodos crescentes de tempo, de culturas com concentração sub tóxica do FLU4. Para tal, células da linhagem MDA-MB-231 foram cultivadas sobre lamínula de vidro e fixadas em paraformaldeído após período de tratamento. As lamínulas foram então sobrepostas em lâminas glicerol e analisadas em microscópio confocal sob iluminação com luz UV. Registros foram feitos em micrografias usadas para determinar a presença de fluorescência após cada um dos períodos de tratamento.

#### 4.6 Cinética de perda de fluorescência

Para avaliar a perda de marcação as células foram tratadas com concentração sub tóxica de FLU4 por tempo pré-estabelecido em experimento de cinética de aquisição de fluorescência, e depois foram lavadas com PBS e tiveram o meio trocado por um sem FLU4. Para isso, a cultura também se deu sobre lamínulas que foram submetidas ao processo de fixação em diferentes períodos após a exposição ao composto e analisadas sob microscópio de fluorescência com filtro para UV a fim de identificar alterações na intensidade de fluorescência registrada. As aquisições foram feitas sob mesmas condições técnicas, e o experimento feito sob duas condições distintas, proliferativa (presença de SFB no meio) e não proliferativa (ausência de SFB), para comparação.

#### 4.7 Avaliação qualitativa do potencial como marcador

Para atestar a utilidade do FLU4 como marcador celular, duas culturas distintas de células MDA-MB-231, uma tratada com FLU4 nas condições predeterminadas pelos experimentos anteriores, outra sem qualquer tratamento, foram tripsinizadas e misturadas em suspensão. Uma amostra da mistura foi então levada ao microscópio de fluorescência sob as mesmas condições já descritas para avaliar o potencial em distinguir células oriundas de cada uma das culturas.

#### 4.8 Avaliação quantitativa do potencial como marcador

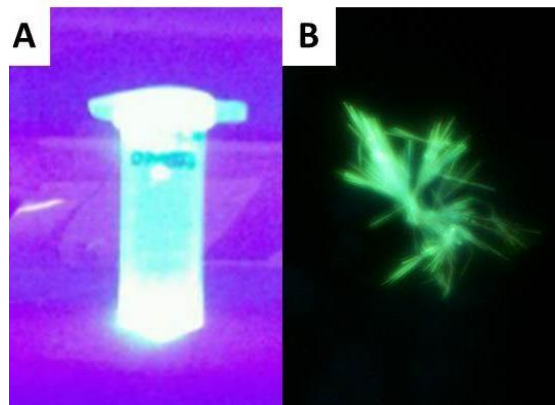
Para a determinação de marcação celular desse composto, por tempo, utilizou-se a técnica de citometria de fluxo. Foram utilizadas duas culturas de células MDA-MB-231. A primeira placa foi tripsinizada e teve 50% da sua população tratada com FLU4 e os outros 50% com a quantidade correspondente de DMSO, durante 10 minutos. As células foram lavadas com PBS e retornaram juntas à placa, com meio comum, durante 24 horas; depois das quais foram novamente tripsinizadas e centrifugadas para a sua passagem no citômetro. A segunda placa passou por exatamente o mesmo processo, entretanto ao invés de 24 horas, apenas 1 hora após misturadas marcadas e não-marcadas, a suspensão foi analisada por citometria. Células não submetidas a qualquer tratamento foram usadas como parâmetro comparativo no equipamento.

#### 4.9 Tratamento estatístico dos dados

Todos os experimentos foram feitos pelo menos em triplicada e todos os dados gerados receberam tratamento estatístico adequado, sendo expressos como mediana e percentis uma vez que não apresentaram distribuição normal. Análises qualitativas das imagens coletadas foram baseadas em múltiplas aquisições, das quais uma representativa do grupo foi escolhida para montagem das figuras. Valores de  $p$  adotados como estatisticamente significantes nas análises foram aqueles inferiores a 0,05. Os testes realizados estão descritos nas legendas das respectivas figuras.

## 5. Resultados

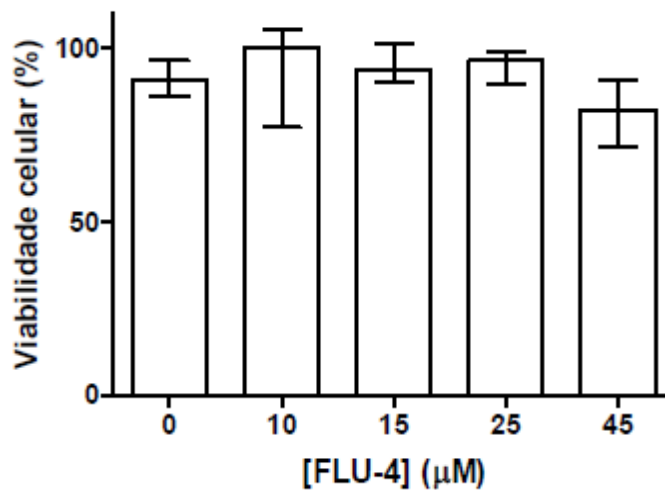
O FLU4 possui um alto nível de fluorescência quando excitado por radiação ultravioleta (**figura 11A**), de modo que concentrações baixas podem ser usadas sem que suas propriedades de marcador fluorescente se percam. Na verdade, concentrações muito elevadas levam ao surgimento de cristais (**figura 11B**), que interferem na viabilidade celular. Nota-se que tal cristal é verde, bem como a cor do composto quando em solução concentrada, mas experimentos posteriores demonstrarão que a fluorescência azul aparece quando o FLU4 é usado em baixa concentração.



**Figura 11.** A. Excitação da substância FLU4 quando exposto à luz UV a olho nu. B. Cristais formados pelo acúmulo da substância, microscopia de fluorescência.

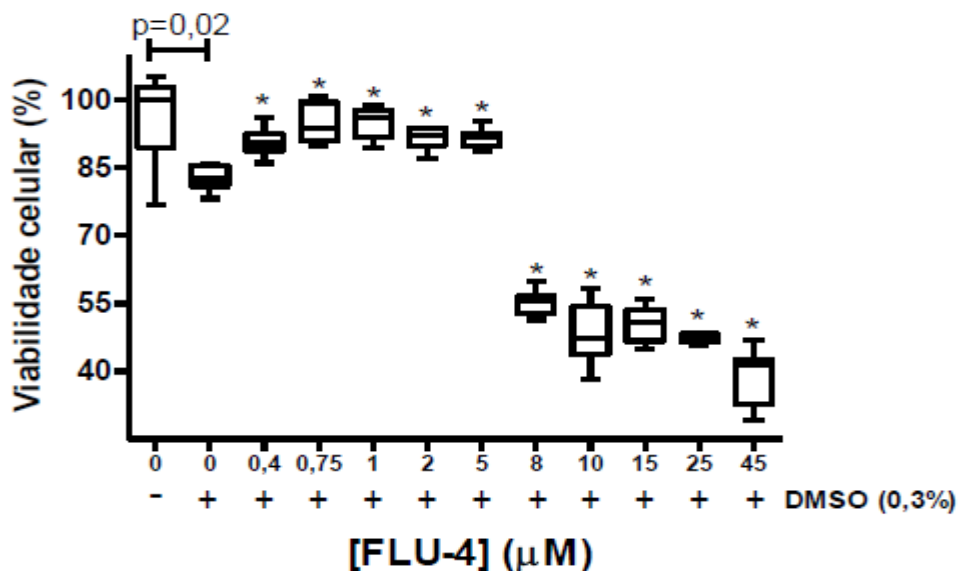
Quanto à toxicidade, característica importante na caracterização de um a molécula candidata à marcadora de células viáveis, após 48 horas de tratamento nenhuma redução significativa na viabilidade foi evidenciada nos grupos tratados com FLU4 com concentrações de 10  $\mu\text{M}$  a 45  $\mu\text{M}$  (**gráfico 2**) (ausência de diferença significativa em relação ao controle).

Assim, a concentração de 20  $\mu\text{M}$  foi escolhida, por segurança, para realização dos testes posteriores, uma vez que está abaixo da máxima concentração sub tóxica testada para o tempo de exposição de 48 horas.



**Gráfico 2.** Avaliação da ação tóxica do FLU4 em células MDA-MB-231 (por teste do MTT), após 48 horas de exposição. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos teste e o controle (*KruskalWallis*, seguido do teste de Dunns).

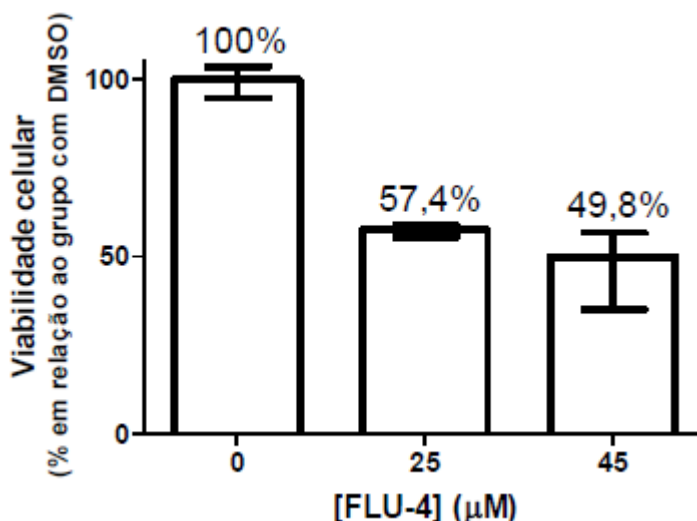
Apesar de caracterizada a segurança do composto, a avaliação da toxicidade se estendeu por um período prolongado (140 horas), incluindo readministração do composto no momento da troca de meio. Primeiramente, ressalta-se que o DMSO, mesmo à baixas concentrações, apresenta toxicidade nessas condições experimentais, como fica evidente no gráfico apresentado (**gráfico 3**).





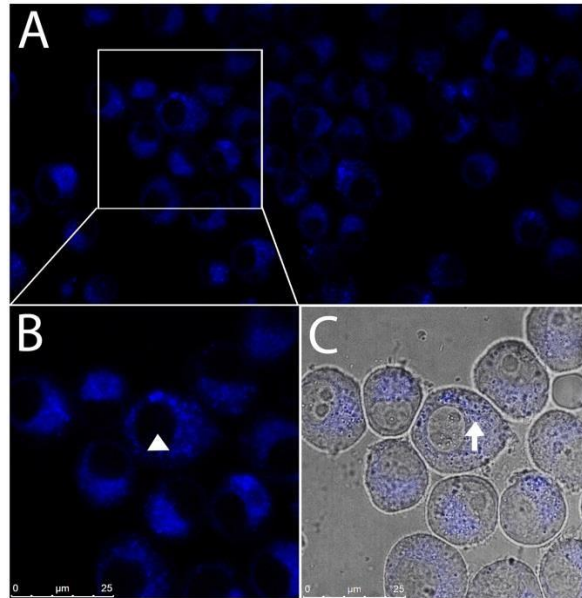
**Gráfico 3.** Avaliação da ação tóxica do FLU4 em células MDA-MB-231 (por teste do MTT), após 140 horas de exposição. Houve redução significativa na viabilidade provocada pelo DMSO, bem como diferença estatisticamente significativa entre este e os grupos teste (*Mann-Whitney para comparação entre controles e Kruskal-Wallis*, seguido do teste de Dunns, para as demais. \* =  $p < 0,01$ ).

Surpreendentemente, concentrações baixas de FLU4 não só não foram tóxicas, como apresentaram algum tipo de efeito protetor contra os danos causados pelo solvente (**gráfico 3**). Já as concentrações acima de 6  $\mu\text{M}$  testadas apresentaram toxicidade (redução significativa da viabilidade quando comparadas com o controle de DMSO) após tão longo período de incubação, mas ainda assim, nenhuma das concentrações reduziu a viabilidade em mais que 50%. Desse modo, não foi possível efetuar o cálculo matemático para estimativa da  $\text{IC}_{50}$  por meio de regressão; porém, como a mais alta concentração testada reduziu, em termos práticos, a viabilidade à metade (**gráfico 4**), pode-se dizer que o valor de  $\text{IC}_{50}$  da FLU4 para MDA-MB-231 após 140h de tratamento é de 45  $\mu\text{M}$ .



**Gráfico 4.** Efeito tóxico das mais elevadas concentrações de FLU4 testadas após 140 horas de exposição (MTT).

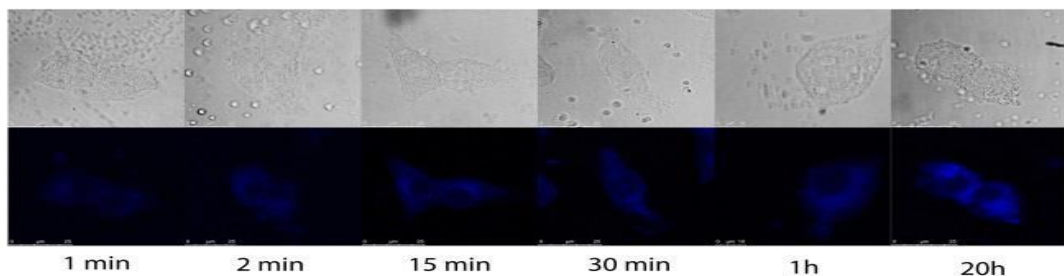
Determinado o perfil de toxicidade, e escolhida a concentração de trabalho de 20  $\mu\text{M}$ , concentração em que não há ocorrência de danos proeminentes às células vivas, estas foram tratadas por duas horas e analisadas à microscopia confocal para determinação de localização do composto.



**Figura 12.** A- Micrografias (microscopia confocal) mostrando localização citoplasmática do FLU4. B- Campo ampliado evidenciando ausência do marcador no núcleo (cabeça de seta). C- Células marcadas sob iluminação dupla (UV e luz branca), evidenciando o acúmulo perinuclear do FLU4 (seta).

A interpretação das imagens permite concluir que a droga difunde-se no citoplasma, com acúmulo preferencialmente perinuclear, e organização granulosa, sugerindo localização em vesículas (**figura 12**). Outro achado importante é o de que o núcleo não é marcado pela substância.

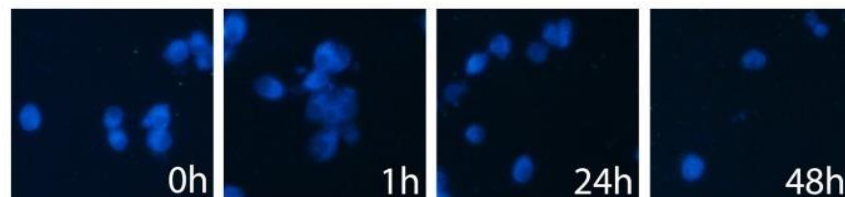
A cinética de aquisição de fluorescência, por sua vez, deixou claro que o FLU4 é quase que imediatamente internalizado (é possível visualizar fluorescência mesmo após 1 minuto apenas de exposição (**figura 13**). Além disso, o aumento de intensidade não acompanha o tempo de exposição, sugerindo um mecanismo saturável de internalização



**Figura 13.** Micrografias do experimento de cinética de aquisição de fluorescência em 6 tempos distintos. Figura superiores: Luz branca, inferiores: UV.

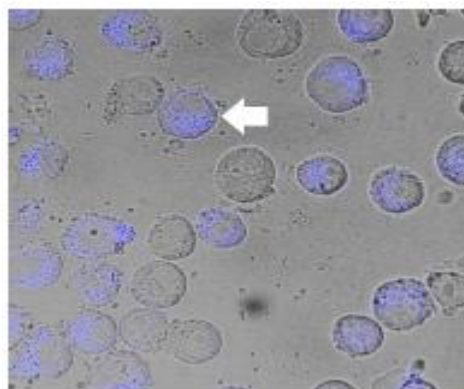
Cabe ressaltar que após 10 horas de exposição já ocorre formação de cristais no interior da célula, como ocorre também após tratamento com concentrações muito elevadas de FLU4.

Na cinética de aquisição de fluorescência se observa que o tempo ideal de exposição da célula ao composto se encontra entre 30 minutos e 1 hora, sendo este último escolhido como tempo de trabalho. Assim, a análise de cinética de perda de fluorescência foi feita sob estas condições: 20  $\mu$ M de FLU4 e 1 hora de exposição. Neste caso, o experimento mostrou que mesmo após 48 horas da exposição inicial as células mantêm a fluorescência (**figura 14**).



**Figura 14.** Micrografias (microscopia de fluorescência) do experimento de cinética aquisição de fluorescência em 4 tempos distintos.

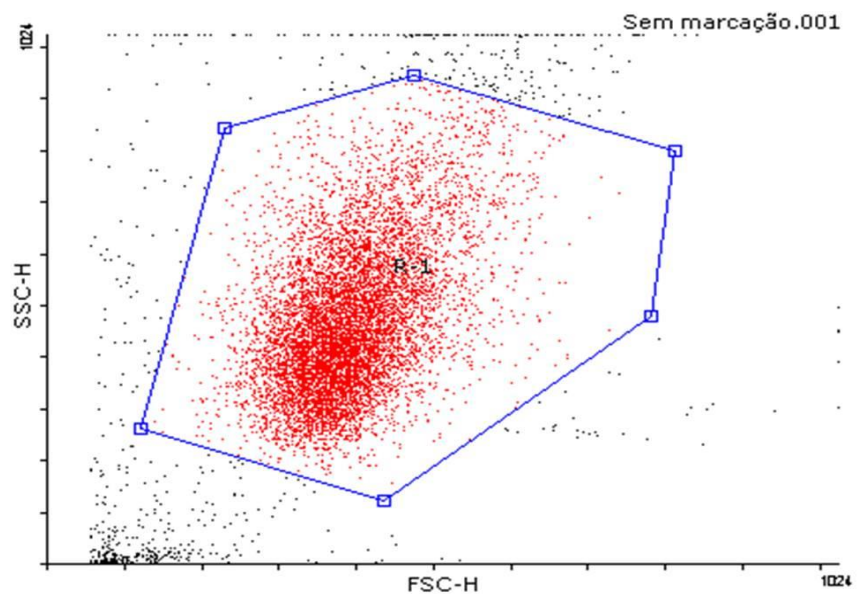
Não há diferença na intensidade de fluorescência observada em nenhum dos tempos se comparados dados dos experimentos em condições proliferativas e não proliferativas, o que indica que o fenômeno de divisão celular não impacta significativamente na perda de fluorescência, levando a crer que o acúmulo de FLU4 no interior da célula garante reserva de marcador suficiente para garantir a fluorescência da cultura por várias passagens. Segundo os dados observados pela microscopia.



**Figura 15.** Micrografia (microscopia de fluorescência) demonstrando a diferenciação de células marcadas por FLU4 (seta) das não marcadas.

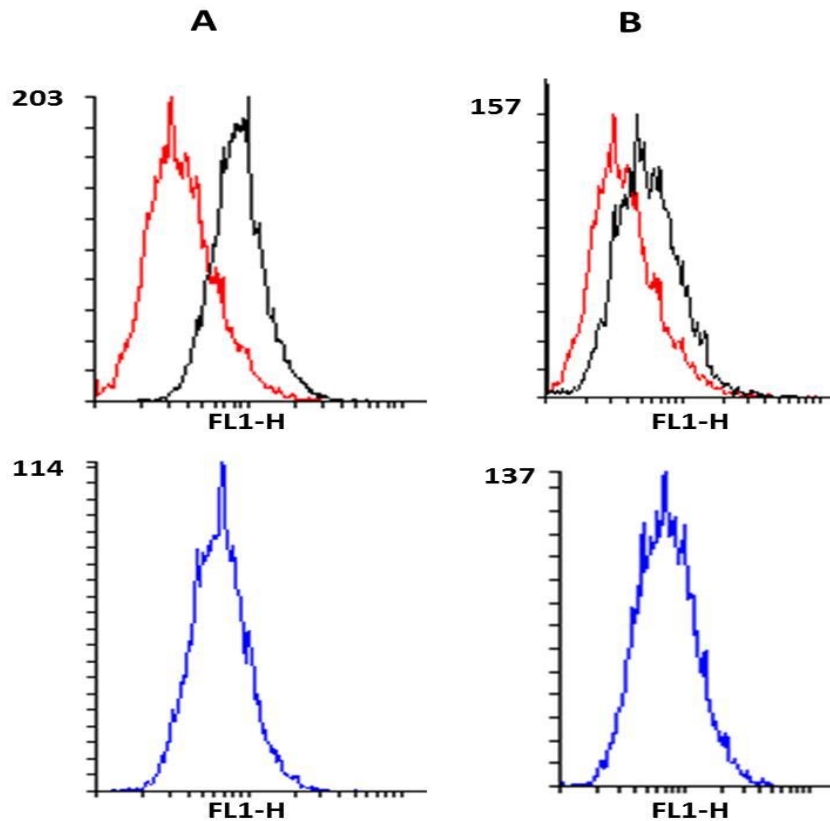
Um experimento simples pôde demonstrar, de maneira qualitativa, a utilidade do FLU4 como marcador (**figura 15**), ao permitir a distinção de duas populações celulares com base na presença da fluorescência perinuclear. Porém, esse dado foi gerado em tempo inferior a 1 hora após a mistura dessas duas populações de células.

Na determinação da capacidade de marcação celular por citometria de fluxo, primeiramente, definimos a população de interesse por meio da realização de um gate (**gráfico 5**) capaz de delimitar os eventos de interesse a partir da granulosidade x tamanho celular. O gate determina a densidade populacional mais fiel a ser utilizada, retirando as interferências e debris, padronizando assim, a população celular a ser trabalhada em diversos experimentos, de acordo com a quantidade de eventos selecionados.



**Gráfico 5.** Gráfico Dot Plot (Citometria de fluxo). SSC-H em y indica a granulosidade das células enquanto o FSC-H em x indica tamanho, caracterizando assim, a população celular (MDA-MB-231) em estudo.

Ao definirmos a população celular de interesse para o estudo, foram gerados gráficos de fluorescência a partir da passagem em fluxo dessas células pelo Citômetro, como foi demonstrado a seguir no gráfico 6.



**Gráfico 6.** Histograma (Citometria de fluxo). Em y temos o número de células, divididos em picos, por 10000 eventos selecionados em escala linear. E em x se observa a intensidade de fluorescência em escala logarítmica. Em vermelho temos a caracterização da fluorescência de células MDA-MB-231 sem marcação, enquanto em preto temos a fluorescência da mesma população celular, porém marcada com FLU4. A situação em azul acontece quando temos a população de células marcadas e não marcadas analisadas conjuntamente. A: análise 1 hora após a marcação. B: Análise após 24 horas em cultura.

O citômetro utilizado no experimento possui apenas 4 filtros (FL1-H a FL4-H). Nenhum deles específico para a coloração azul, cor essa de emissão do fluoróforo em estudo. Por conta dessa limitação técnica, foi utilizado o filtro FL1-H mais específico para a coloração verde, porém o que mais se aproxima na escala de fluorescência da cor azul. Utilizamos esse filtro para corroborar a teoria de que é possível utilizar esse fluoróforo na técnica de citometria; mesmo que a faixa utilizada seja pouco específica, ele gera uma emissão de fluorescência específica para células marcadas que se diferencia daquela fluorescência emitida por células sem marcação. E isso explica a parte de sobreposição entre o histograma vermelho e o preto (**gráfico 5**). Além da ressalva de que a apresentação gráfica de intensidade de fluorescência é feita em escala logarítmica.

O gráfico vermelho permanece o mesmo na figura A e B, o que acontece é o deslocamento para a esquerda do preto o que indica a perda da fluorescência gerada pelo composto, retornando as células para seu estado básico de fluorescência, a partir do tempo de exposição e as decorrentes passagens mitóticas. Em azul ocorre uma mistura da população de células marcadas e não marcadas, gerando um terceiro padrão de fluorescência, esse acontecimento pode ter algumas explicações como: a passagem, depois de algum tempo, da fluorescência de células marcadas para células não marcadas ou a diminuição de fluorescência após passagens mitóticas da célula; fatores esses que necessitam de confirmação por meio de outros testes.

Diferentemente do que pôde ser observado na micrografia (**figura 15**), após tempos mais elevados de cultivo entre populações células marcadas e não marcadas, pode levar a passagem, de alguma forma, dessa fluorescência, gerando uma nova população celular em que a fluorescência se distribui de maneira mais homogênea. Entretanto, muito pouco pode ser afirmado somente com esses dados, deve-se levar em conta a falta de filtro específico e demais interferentes na escrita deste resultado.

## 6. Discussão

Pesquisas em cancerologia requerem um número cada vez maior de ferramentas experimentais, o que abre um campo para o desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos voltados para tal necessidade, como substâncias que sirvam como marcadores *in vitro* para a utilização em técnicas de citometria de fluxo e imunocitoquímica, em ensaios de proliferação celular, testes de atividade biológica de moléculas, técnicas de viabilidade celular, entre outros. O composto testado tem potencial para todos esses empregos, e apresenta características moleculares que o tornam especialmente interessante. O *aurantricolídeo A* é um pigmento fluorescente isolado do fungo *Tricholoma aurantium* (KLOSTERMEYER, 2000); o grupo catecol deixa instável essa molécula, razão pela qual a aquisição do quinto ciclo pela estrutura, dando origem ao FLU4, a estabiliza (**figura 9**), apesar da unidade ABC da molécula ser a responsável pela intensa fluorescência destes heterociclos (OLIVEIRA et al, 2010). A composição molecular desse composto permite a emissão de fluorescência, quando excitado, mesmo em baixíssima quantidade, como pôde ser observado nesse trabalho, o que torna ainda mais atrativo seu uso como marcador. Além disso, sua síntese tem bom rendimento e se utiliza de reagentes relativamente baratos (CUNHA et al, 2009).

O FLU4 é uma substância de fácil internalização celular (o processo é tão intenso que, se submetida a altas concentrações, a célula acumulará cristais da substância no citoplasma), que não interage diretamente com os ácidos nucléicos e parece formar depósitos vesiculados, principalmente em região correspondente ao citoplasma, não tendo indicativos de sua internalização pelo núcleo celular se encontra, principalmente, na região perinuclear tornando viável também uma possível correlação com o complexo de Golgi, já que se desconfia de um processo ativo para a internalização celular desse composto. Estudos adicionais revelarão se há alguma especificidade nessa localização.

Os dados mostrados sugerem que desenhos experimentais complexos, como o tratamento simultâneo de células com características distintas (normais e tumorais, por exemplo) no mesmo ambiente, sejam realizados com a possibilidade de distinção das populações celulares em qualquer momento do experimento, e isso sem manipulação genética e com reagente de fácil aplicação e baixo custo. O FLU4 pode beneficiar, ainda, ensaios clássicos de microscopia (ROBERTIS e HIB, 2006;

ALBERTS et al, 2004) e, principalmente, citometria de fluxo (CÔRTE-REAL et al, 2002), pois com a natural evolução técnica e o aparecimento de novos marcadores fluorescentes, a utilização desta instrumentação generalizou-se a outras áreas e a estudos com outras células, como células vegetais e microbianas, necessitando sempre de ferramentas adicionais (DOLEŽEL 1997a), e a sensibilidade de detecção do FLU4 pode ser um grande diferencial nesse sentido.

Muitos protocolos têm sido desenvolvidos para a localização de componentes celulares, incluindo imunomarcação com anticorpos e proteínas fluorescentes de fusão (GIEPMANS et al, 2006). Contudo, todos os protocolos têm limitações incluindo, mas não se limitando, a fração da proteína alvo marcada, especificidade, resolução e preservação estrutural.

O FLU4 não apresenta, em pequenas quantidades, grandes problemas à viabilidade celular, sendo esse um dos grandes diferenciais dessa molécula. Como o composto ao ser internalizado é vesiculado e, diferentemente de muitos marcadores utilizados nos dias de hoje, ele não demonstra indícios de interferência na síntese de ácidos nucleicos ou na depleção de oxigênio celular, sendo essa primeira teoria corroborada por fotos de microscopia que mostram sua dispersão no interior da célula, estando comumente localizado na região perinuclear e espalhado pelo citoplasma. Por outro lado, após diversas passagens ou em concentrações relativamente acima da considerada ideal pode ocorrer o acúmulo da substância, e assim, com a formação de cristais afetar a preservação estrutural da célula.

Essa característica faz do FLU4 um ótimo aliado à técnica de citometria de fluxo, pois ao permitir que as células continuem vivas vários experimentos *in vitro* se tornam realizáveis entre diferentes populações celulares, marcadas e não marcadas, podendo acompanhar e identificar, o comportamento dessas células, de acordo com as expectativas geradas para o experimento, sem a necessidade de interrupção da sua continuidade ou perdas produzidas por interferências do marcador à célula. Muitos corantes são conhecidos por afetar a viabilidade da célula, principalmente por sua interferência nos ácidos nucleicos, tais como o DAPI e o Brometo de etídio.

Com relação à sua especificidade, não se aplica. Esse composto é indiferencialmente internalizado por populações de células de mamífero, durante os experimentos outras linhagens celulares também foram utilizadas, porém a MDA-MB-231 foi escolhida como forma de padronização dos métodos, e isso torna o seu uso ainda mais amplo. Quem decide o grupo celular a ser marcado é o pesquisador e não



um grupo específico de proteínas as quais se tornariam o alvo deste marcador. Por isso sua aplicação é tão genérica, cabendo em várias técnicas que utilizam marcação fluorescente como base.

A resolução do FLU4 em diferentes tipos de microscopia (SJOLLEMA et al, 2012) como as de fluorescência e confocal, com a utilização do filtro correto, é excelente. O que permite tão boa visibilidade do composto ao marcar as células a serem visualizadas por essas técnicas, é sua intensa fluorescência mesmo em concentrações muito baixas, além de sua dispersão por toda a célula.

Temos um bom número de técnicas em microscopia que têm por base o confinamento temporal da fluorescência e da precisa localização espacial de fluorocromos individuais por foto comutação repetida. Essas técnicas utilizam um número bastante limitado de fluorocromos que podem ser empregados, o conjunto final formará uma imagem 3D reconstruída com super-resolução. Estes incluem abordagens de iluminação estruturada (SIM) (GUSTAFSSON, 2005), Microscopia de localização por foto ativação (PALM) (BETZIG et al, 2006), Microscopia de reconstrução óptica estocástica (STORM) (HUANG et al, 2008) (RUST, 2006) e outros.

Técnicas como a PALM e STORM contam com o uso de sondas fluorescentes que podem ser “ligadas” de forma reversível entre um estado fluorescente “on” e um estado escuro “off” ou, pelo menos, pode ser fotoativado. Em STORM, originalmente um interruptor cyanine é utilizado; um par de corantes emissores carbocianina laranja e vermelho, Cy3 e Cy5, em que Cy5 (GRAHAM et al, 2009) pode alternar entre os estados fluorescente “on” e escuro “off” desde que um segundo corante ativador, Cy3, esteja em estreita proximidade. A principal desvantagem da STORM é que a maioria das sondas orgânicas utilizadas impede a formação de imagem de células vivas, porque eles exigem a remoção de oxigênio molecular ou de um ambiente redutor, o que coloca a célula em um estado de estresse extremo.

STORM direta (dSTORM), uma variação da técnica original, não requer a utilização de interruptores emparelhados, mas ainda assim utiliza corantes convencionais de carbocianina, isolados (por exemplo, Cy5, Alexa Fluor 647, e vários corantes da série ATTO). Uma grande vantagem é que estes corantes de carbocianina podem ser utilizados em células vivas, na marcação de biomoléculas de interesse.

Esse seria mais um campo de emprego seguro e barato em que o FLU4 se faria útil, em dissonância com outros fluoróforos já utilizados (ENDESFELDER et al, 2011).

Além dos fatores citados podemos também nos ater a sua ótima fluorescência o que nos forneceria imagens de ótima qualidade; e sua baixíssima toxicidade, que mesmo em 144 horas de exposição celular, não tornou possível o cálculo da IC50%.

O FLU4 também pode ser empregado como marcador secundário na técnica de imunofluorescência. Isto requer um anticorpo altamente seletivo, com uma elevada afinidade com o alvo de interesse, como anticorpo primário e, além disso, um equilíbrio de métodos de fixação e coloração que fornecem preservação ótima da estrutura celular, mantendo tanto a acessibilidade e antigenicidade (MORPHEW, 2007).

Durante a síntese do composto vários derivados foram obtidos e permaneceram com sua capacidade de fluorescer, sua fácil manipulação molecular faz com que esse composto seja bastante versátil, podendo adaptar-se à porção da cadeia pesada de diversos anticorpos.

Outro fator importante que merece destaque é o fato de existirem poucos fluoróforos de membrana que emitem fluorescência em azul, como o Alexa 405 (tabela 2), e isso faz com que seu valor no mercado seja bastante elevado. A maioria, e ainda são poucos, com emissão em azul são intercalantes de DNA ou interferem de alguma forma na viabilidade celular, o que torna a aplicabilidade do FLU4 ainda mais atrativa.

A insinuação da perda de fluorescência (**gráfico 6**) durante o cultivo de células marcadas, por um período de tempo mais prolongado, faz com que o FLU4 possa, ainda, ser utilizado como indicador de proliferação celular. Quanto mais passagens celulares são realizadas menor se torna a fluorescência daquela população de células, o que demonstra atividade proliferativa em maior ou menor intensidade. Uma boa aplicação dessa metodologia é a observação após tratamento com drogas antiproliferativas, utilizadas no tratamento do câncer, sendo esse um dos testes básicos na inovação de novas classes desses fármacos.

Dessa forma, o derivado do *aurantricolídeo* A testado demonstra grande potencial de utilização em pesquisa na área de biologia celular.

## 7. Conclusão

A tecnologia luminescente foi inegavelmente uma luz brilhante no desenvolvimento humano e da ciência. Especialmente nas últimas décadas em que temos visto grandes avanços com a descoberta de proteínas fluorescentes, novos métodos de imagem de seres microscópicos, microscopia de super-resolução, lasers e LEDs, apenas para citar alguns. As próximas décadas serão certamente muito emocionantes para nós que trabalhamos na interface da nanociência, química, medicina, farmácia e biologia.

Tendo em vista essa necessidade crescente de novos produtos biotecnológicos para serem empregues como ferramentas experimentais, dá-se maior importância para estudos de substâncias e suas possíveis aplicações, ainda mais quando se trata de um fluoróforo orgânico sintetizado por cientistas brasileiros, em seu próprio território.

O FLU4 é uma droga com baixo grau de toxicidade, sendo utilizado em concentrações adequadas não interfere na viabilidade celular, sendo esse um ponto bastante positivo, principalmente, quando se trata de sua utilização na técnica de citometria de fluxo. Por causa do seu emprego em diversas técnicas de pesquisa, ele se mostra um bom agente biotecnológico a ser estudado, trazendo maiores facilidades com custo acessível.

## Referências Bibliográficas

ABBE, E. **Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung** (Contributions to the theory of the microscope and microscopical observation). Archiv für Mikroskopische Anatomie 1873, 9, 413–418.

ABRAMS, B. L.; HOLLOWAY, P.H. Chem. Rev. 2004, 104, 5783-5801.

ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith; WALTER, Peter. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, 2004 – 4ª edição.

**Thawing, Propagating, and Cryopreserving Protocol**. NCI-PBCF-HTB26 (MDA-MB-231) Breast Adenocarcinoma, American Type Culture Collection (ATCC); 2012, version 1.5.

AZZAZY, H.M.E. et al. **Nanodiagnosics: a new frontier for clinical laboratory medicine**. Clinical Chemistry, v.52, p.1238-1246, 2006. Disponível em: <<http://www.clinchem.org/cgi/reprint/52/7/1238.pdf>>. Acesso em: 28 de jun. 2008. doi: 10.1373/clinchem.2006.066654.

BECQUEREL, E. **Annales de Chimie et Physique** 1842, 9, 257-322.

BEHRAMAND; GALLARDO, Hugo; MOLIN, Fernando. **Síntese e caracterização de compostos fluorescentes em forma de V derivados do 5,6-dibromo-2,1,3-benzotiadiazol**. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário-Trindade, Florianópolis, SC, 2012.

BETZIG, E.; PATTERSON, G.H.; SOUGRAT, R.; LINDWASSER, O.W.; OLENYCH, S.; BONIFACINO, J.S.; DAVIDSON, M.W.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; HESS,

H.F. **Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution.** Science 2006, 313, 1642–1645.

BRAGANÇA, Thaís; SEHNEN, Dayany; BENAMOR, Letícia; JESUS, Liliane; VALENTIM, Rodrigo; ZAMBUZZI, Willian; TAKAMORI, Esther. **Manual de Procedimentos Operacionais: Protocolos para avaliação de citotoxicidade.** Laboratório Multidisciplinar de Odontologia (LAMP); Duque de Caxias, 2012.

BREHM-STECHER, B., AND JOHNSON, E. A. (2004) **Single-cell microbiology: Tools, technologies, and applications.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68, 538–559.

BROWN, C; CHOWN, G. (organizadores). **Dicionário Internacional de Teologia do Novo Testamento.** 2ª edição, São Paulo: Vida Nova, 2000, p.2272.

BORM, P.J.A. **The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC.** Particle and fibre toxicology, v.3, n.11, p.1-35, 2006. Disponível em: <<http://www.particleandfibretoxicology.com/content/pdf/1743-8977-3-11.pdf>>. Acesso em: 16 set. 2014. doi:10.1186/1743-8977-3-11.

CARTER, G. R. **Fundamentos da Bacteriologia e Micologia Veterinária.** São Paulo: Roca, 1988. p. 11-15, 225-233.

CHALFIE, M; Y. Tu; G. EUSKIRCHEN; W. W. WARD; and D.C. PRASHER. 1994. **Green fluorescent protein as a marker for gene expression.** Science 263:802-805.

CODY, W.C., PRASHER, D.C. et al. (1993) **Biochemistry** 32 1212-1218.

CÔRTE-REAL, M.; SANSONETTY, F.; LUDOVICO, P.; PRUDÊNCIO, C.; RODRIGUES, F.; FORTUNA, M.; SOUSA, M.; SILVA, M. e LEÃO, C. 2002. **Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras.** Boletim de Biotecnologia 71: 19-33.

COX, Michael M; DOUDNA, Jennifer A.; O'DONNELL, Michael. **Biologia Molecular Princípios e Técnicas.** Dados eletrônicos – Porto Alegre: Artmed, 2012.

CUNHA, S.; OLIVEIRA, C. C. **Síntese de derivados estáveis do *aurantricolideo* A.(QO-059)** In: 32ª reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza.

DENK, W.; STRICKLER, J.H.; WEBB, W.W. **Two-photon laser scanning fluorescence microscopy.** Science 1990, 248, 73–76.

DIB, Eduardo et al. **Corantes Vitais em cromovitrectomia.** Arq Bras Oftalmol. 2009;72(6):845-50.

DOLEZEL, J. 1991. **Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants.** Phytochemical Analysis 2: 143-154.

DOLEZEL, J. 1997a. **Applications of flow cytometry for the study of plant genomes.** Journal of Applied Genetics 38 (3): 285-302.

DOLEZEL, J. 1997b. **Flow cytometry, its application and potential for plant breeding.** Current Topics in Plant Cytogenetics Related to Plant Improvement 97: 80-90.

DRUMMEN, Gregor. **Fluorescent Probes and Fluorescence (Microscopy) Techniques— Illuminating Biological and Biomedical Research.** Molecules 2012, 17, 14067-14090; doi:10.3390/molecules171214067.

EHRENBERG, Mâns. **The Green fluorescent protein: discovery, expression and development.** Kungl Vetenskapsakademien, Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry, Uppsala, 2008.

ENDESFELDER, U.; MALKUSCH, S.; FLOTTMANN, B.; MONDRY, J.; LIGUZUNSKI, P.; VERVEER, P.J.; HEILEMANN, M. **Chemically induced photoswitching of fluorescent probes--a general concept for super-resolution microscopy.** *Molecules* 2011, 16, 3106–3118.

EUZÉBIO, Paulo. **Corantes Orgânicos como Marcadores Celulares em Diagnóstico.** Grupo Pesquisa Piauí, Teresina/PI, 2012.

FU Y, CHANG H, PENG X, BAI Q, Yi L, ZHOU Y, ZHU J, MI M. **Resveratrol Inhibits Breast Cancer Stem-Like Cells and Induces Autophagy via Suppressing Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway.** *PLoS One*. 2014 Jul 28;9.

**Manutenção de linhagens de células animais.** In: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Manual da qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2008.

GIEPMANS BNG, ADAMS SR, ELLISMAN MH, TSIEN RY (2006) **The fluorescent toolbox for assessing protein location and function.** *Science* 312: 217–224. doi:10.1126/science.1124618.

GOPPERT-MAYER, M. **Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen** (on elementary acts with two quantum jumps). *Annalen der Physik* 1931, 401, 273–294.

GRAHAM T. Dempsey, MARK Bate, WALTER E. Kowtoniuk, DAVID R. Liu, ROGER Y. Tsien, and XIAOWEI Zhuang. **Photoswitching Mechanism of Cyanine Dyes.** San Diego, California. 18192 9 J. AM. CHEM. SOC. 2009, 131, 18192–18193.

GUSTAFSSON, M.G. **Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005, 102, 13081–13086.

GWINN, M.R.; VALLYATHAN, V. **Nanoparticles: health effects - pros and cons. Environmental Health Perspectives.** v.114, n.12, p. 1818-1825, 2006. Disponível em:

<<http://ehp03.niehs.nih.gov/article/fetchArticle.action?articleURI=info:doi/10.1289/ehp.8871>>. Acesso em: 16 set. 2014. doi:10.1289/ehp.8871.

HEIM, R. et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 12501-12504.

HEIMSTADT, O. **The fluorescence microscope** (Das Fluoreszenzmikroskop). Z Wiss Mikrosk 1911, 28, 330–337.

Hellen C. ISHIKAWA-ANKERHOLD; Richard ANKERHOLD and Gregor P. C. DRUMMEN. **Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM.** Molecules 2012, 17, 4047-4132; doi:10.3390/molecules17044047.

HOOKE, R. **Micrographia: or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses**, 1st ed.; Martyn, J., Allestry, J., Eds.; The Royal Society: London, UK, 1665; p. 246.

HUANG, B.; WANG, W.; BATES, M.; ZHUANG, X. **Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy.** Science 2008, 319, 810–813.

INGA et al. Glossário para leitura do artigo **“Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids”** de Sturm et al. (2006), BMP201 ano 2010.



ISHERWOOD, Beverley; TIMPSON, Paul; MCGHEE, Ewan; ANDERSON, Kurt; CANEL, Marta; SERRELS, Alan; BRUNTON, Valerie; CARRAGHER, Neil O. **Live Cell in Vitro and in Vivo Imaging Applications: Accelerating Drug Discovery.** *Pharmaceutics* 2011, 3, 141-170; doi:10.3390/pharmaceutics3020141.

KLOSTERMEYER, D.; Knops, L.; Sindlinger, T.; Polborn, K. e Steglich, W. J. *Eur.J. Chem.* 2000, 4, 603.

KUO, M. (2004, December). **Tricholoma aurantium.** Retrieved from the MushroomExpert.Com Web site: [http://www.mushroomexpert.com/tricholoma\\_aurantium.html](http://www.mushroomexpert.com/tricholoma_aurantium.html) Visualizado em: 22/07/2014.

LAKOWICZ, Joseph R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy.** University Of Maryland Biotechnology Institute; Springer-Verlag New York Inc, 2006.

LICHTMAN, J.W.; CONCHELLO, J.A. **Fluorescence microscopy.** *Nat. Methods* 2005, 2, 910–919.

LOUREIRO, João; SANTOS, Conceição. **Aplicação da Citometria de Fluxo ao Estudo do Genoma Vegetal.** Métodos em Biotecnologia – Citometria de Fluxo I, Aveiro – Portugal, 2003.

LUIZI, Simone; BARBACHAN, João Jorge; CHIES, José; FILHO, Manoel. **A cultura de células como ferramenta para estudos do comportamento pulpar.** *R. Fac. Odonto, Porto Alegre*, v. 45, n-1, p. 3-8, jul. 2004.

MALE et al. **Immunology.** 7th edition, 2006.

MATZ, M. et al. (2002) **BioEssays** 24 953-959.

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

<<http://www.sciencemag.org/content/307/5709/538.full.pdf>>. Acesso em: 16 set.2014. doi: 10.1126/science.1104274.

MINSKY, M. **Microscopy apparatus**. U.S. Patent US3013467, 1961.

MORIN, J.G. and Hastings, J.W. (1971a) *J. Cell Physiol.* 77 303-312.

MORIN, J.G. and Hastings, J.W. (1971b) *J. Cell Physiol.* 77 313-318.

MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica**. São Paulo: Rocca, 2007. 503 p.

MORPHEW MK (2007) **3D immunolocalization with plastic sections**. *Methods Cell Biol* 79: 493–513. doi:10.1016/S0091-679X(06)79019-7.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays**. *J. Immunol. Meth.* 1983; 65:55-63.

NACCACHE, Rafik; RODRIGUEZ, Emma Martín; BOGDAN, Nicoleta; SANZ-RODRIGUEZ, Francisco; CRUZ, Maria del Carmen; FUENTE, Ángeles; VETRONE, Fiorenzo; JAQUE, Daniel; SOLÉ, José; CAPOBIANCO, John A. **High Resolution Fluorescence Imaging of Cancers Using Lanthanide Ion-Doped Upconverting Nanocrystals**. *Cancers* 2012, 4, 1067-1105; doi:10.3390/cancers4041067.

NEBE-VON-CARON, G., STEPHENS, P. J., HEWITT, C. J., POWELL, J. R., AND BADLEY, R. A. (2000) **Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting**. *J. Microbiol. Meth.* 42, 97–114.

NETO, Benno Amaro. **Síntese de novas moléculas fotoluminescentes com conjugações pi-estendidas com potencial para aplicação em sistemas OLEDs.** Tese de doutoramento, Porto Alegre, 2006.

OLIVEIRA, Caio; OLIVEIRA, Diêgo; EL-BACHÁ, Ramon; CUNHA, Silvio. Metilenodioxo-aurantricolídeo: **Novo fluoróforo para biologia celular.** 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia – SP.

PADDOCK, S.W. **Principles and practices of laser scanning confocal microscopy.** Mol. Biotechnol. 2000, 16, 127–149.

PARVEEN, S.; SAHOO, S.K. **Nanomedicine—Clinical applications of polyethylene glycol conjugated proteins and drugs.** Clin. Pharmacokinet. 2006, 45, 965–988.

PAWLEY, J.B. **Handbook of Biological Confocal Microscopy.** 3rd ed.; Springer US: New York, NY, USA, 2006.

PEDROSA, Rozangela; FELIPE, Karina; KVIECINSKI, Maicon. **Avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT: Protocolo para Células Aderentes.** Laboratório de Bioquímica (LABIOEX), Santa Catarina.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 283 p.

PERRIN, F. Tese de Doutorado 1929, Paris; **Annales de Physique** 1929, 12, 2252-2254. Para detalhes ver: NICKEL, B. EPA Newsletter 1996, 58, 9-38.

PRASHER, D. et al. (1992) **Gene** 111 229-233.

PRIEBE, Jonas Miguel. **Síntese de Quimiossensores Fluorescentes Derivados do Cloreto de 5-(N,N-Dimetilamino)Naftaleno-1-Sulfonila para Sinalização de Íons**. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, 2010.

ROBERTIS, Eduardo; HIB, José. **De Robertis Bases da Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Editora Ganabara Koogan 4ª edição, 2006.

ROSAS, M. S. L.; SILVA, B. N. M.; PINTO, R. G. M. P.; SILVA, B. V.; SILVA, R. A.; GUERRA, L. R.; SOARES G. C. M. T.; CASTRO, H. C; LIONE, V. O. F. **Incidência do Câncer no Brasil e o Potencial Uso dos Derivados de Isatinas na Cancerologia Experimental**. Rev. Virtual Quim., 2013, vol. 5 nº2 , 243-265. Data de publicação na Web: 30 de abril de 2013.

RUSSEL, Bill. **Field Guide to Wild Mushrooms of Pennsylvania and the Mid-Atlantic**. Pennsylvania State University, 2006.

RUST, M.J.; BATES, M.; ZHUANG, X. **Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)**. Nat. Methods 2006, 3, 793–795.

SCHAWLOW, A.L.; TOWNES, C.H. **Infrared and optical masers**. Phys. Rev. 1958, 112, 1940–1949.

SHAPIRO, H. M. (2003) **Practical Flow Cytometry**. 4th ed. Wiley-Liss, Hoboken, NJ

SHIMOMURA, O., JOHNSON, F.H. and SAIGA, Y. (1962) J. **Cell**. Comp. Physiol. 59 223-240.

SHIMOMURA, O. (1979) FEBS Letters 104 220-222.

SILVA TL, REIS A, HEWITT C, ROSEIRO JC. **Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos**. Bol Biotecnol, p.32-40, 2001.

SJOLLEMA KA, SCHNELL U, KUIPERS J, KALICHARAN R, GIEPMANS BNG (2012) **Correlated Light Microscopy and Electron Microscopy**. Elsevier. 17 pp. doi:10.1016/B978-0-12-416026-2.00009-1.

SOLON, L.R.; ARONSON, R.; GOULD, G. **Physiological implications of laser beams**. Science 1961,134, 1506–1508.

STROKES, G. G. Phil. Trans. 1852, 142, 463-562.

STUKER, Florian; RIPOLL, Jorge; RUDIN, Markus. **Fluorescence Molecular Tomography: Principles and Potential for Pharmaceutical Research**. Pharmaceutics 2011, 3, 229-274; doi:10.3390/pharmaceutics3020229

SUKHDEO K, Paramban RI, Vidal JG, Elia J, Martin J, Rivera M, Carrasco DR, Jarrar A, Kalady MF, Carson CT, Balderas R, Hjelmeland AB, Lathia JD, Rich JN. **Multiplex flow cytometry barcoding and antibody arrays identify surface antigen profiles of primary and metastatic colon cancer cell lines**. PLoS One. 2013;8

SUZANO, Sara; SEQUEIRA, Júlio; PESSOA, Adriana; PORTO, Camila; OLIVEIRA, Deílson. **Proliferação celular nos linfomas caninos**. Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo, v. 45, n. 4, p. 313-319, 2008.

TSIEN, R. (1998) **Annu. Rev. Biochem.** 67 509-544.

VALET, G. 2002. **Predictive medicine by cytomics: potential and challenges**. Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents 16 (2): 164-167.

VALEUR, B. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications**. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001, p. 5.

VAN Leeuwenhoek, A. **The Select Works of Antony van Leeuwenhoek: Containing His Microscopical Discoveries in Many of the Works of Nature;** Arno Press, A New York Times Co.: New York, NU, USA, 1977; p. 674.

WANG, S.X. and HAZELRIGG, T. (1994) Nature 369 400-403.

WRIGHT, S.J.; WRIGHT, D.J. **Introduction to confocal microscopy. Methods Cell Biol.** 2002, 70, 1–85.pics/cancer/en/> Acesso em: 29 out 2013.