

Marcadores fluorescentes coloidais: conceitos e aplicações

Colloidal fluorescence markers: concepts and applications

Débora Cristina Olsson^{I*} Ney Luis Pippi^{II} Alceu Gaspar Raiser^{II} Graziela Kopinitis de Oliveira^{III}
Tiago Luis Eilers Treichel^{II} Fabiano Zanini Salbego^I

- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

RESUMO

Os nanocristais coloidais ou quantum dots são pontos quânticos e semicondutores na forma coloidal. Eles têm sido responsáveis por um grande volume de pesquisas, seja no âmbito da ciência básica ou aplicações em campos diversos como sonda luminescente, dentre eles a biotecnologia. O domínio das metodologias desses pontos quânticos é o primeiro e fundamental passo para futuras aplicações como biomarcadores em sistemas biológicos, in vitro e in vivo, devido a vantagens em relação aos fluoróforos orgânicos. O objetivo deste artigo é realizar uma breve revisão sobre marcadores biológicos nanocristais e sua importância nas pesquisas biológicas.

Palavras-chave: nanocristais, quantum dots, biomarcadores, fluorescência.

ABSTRACT

The nanocrystals are quantum dots and semiconductors in aqueous solution. They have been responsible for a large volume of research, either within the basic science and which can be applied in diverse fields such as luminescent probe, among them biotechnology. The field of these quantum dots methodologies is the first and fundamental step for future applications as biomarkers in biological systems in vitro and in vivo, due to advantages over organic fluorophores. This article aims to conduct a review of biological markers nanocrystals and their importance in biological research.

Key words: nanocrystals, quantum dots, biomarkers, fluorescence.

INTRODUÇÃO

Para investigar as células e os processos celulares, é muito importante visibilizar as estruturas e compartimentos moleculares 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 moleculares (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).

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 óptica, desencadeando uma revolução molecular (BORM, 2006).

A nanotecnologia é interdisciplinar e os avanços de vanguarda indicam a possibilidade de

^IDepartamento de Medicina Veterinária, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), 88520-000, Lages, SC, Brasil.
E-mail: oldeby@yahoo.com.br. *Autor para correspondência

^{II}Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

^{III}Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Fortaleza, CE, Brasil.

reprodução e estruturação natural de grandes moléculas (BAKER & MAUCK, 2007). Esse desenvolvimento permite o melhor entendimento sobre o metabolismo molecular que transforma energia química em movimento sem praticamente nenhuma perda de energia (DU, 2006).

Os pontos quânticos semicondutores possuem um raio geralmente na escala de 10 a 100Å (MICHALET et al., 2005), cujas propriedades ópticas sofrem o efeito do confinamento quântico, capaz de mudar ou controlar completamente o comportamento óptico das moléculas, através de medidas de absorção (MARSH et al., 2007). Além das aplicações na área da tecnologia de informação, os pontos quânticos encontram aplicações na área de biotecnologia, que vêm ganhando cada vez mais espaço no mercado tecnológico (SUKHANOVA et al., 2007). A utilização dos pontos quânticos coloidais como marcadores fluorescentes (SZENT-GYORGYI et al., 2008) só ocorre porque há comprometimento do marcador com a permeabilidade do plasma da membrana celular, por endocitose e quimiotaxia, e não provoca efeitos deletérios na fisiologia normal endocítica (AZZAZY et al., 2006).

Na geração atual, os marcadores fluorescentes são feitos de pequenas moléculas de corantes, amplamente utilizados, desde a decodificação do DNA ao auxílio no diagnóstico de infecções (MARSH et al., 2007). Os corantes orgânicos, entretanto, podem ser tóxicos e sofrer desgaste rápido. Além disso, a geração da luminescência requer o bombeio da molécula em ressonância, o que leva à situação típica em que cada corante é excitado por fótons em comprimentos de ondas diferentes (SZENT-GYORGYI et al., 2008).

Os pontos quânticos coloidais ou nanocristais, por outro lado, não são tóxicos e sua fluorescência continua ativa por um tempo 100 vezes maior, comparado aos corantes orgânicos (MARSH et al., 2007). Todos os pontos quânticos podem ser excitados por um único laser luminoso, permitindo a observação de diferentes compostos dentro de uma célula simultaneamente ou podem se ligar às moléculas mísseis, dirigidos a alvos moleculares específicos no interior das células ou seus núcleos (SZENT-GYORGYI et al., 2008).

Os nanocristais podem ser observados utilizando qualquer microscopia fluorescente, de epifluorescência, inclusive confocal e multifocal. No entanto, ao contrário dos fluoróforos convencionais, um único comprimento de onda da luz pode ser utilizado para excitar diversos semicondutores (SIMBERG et al., 2007). Quando colocados sob uma fonte de luz, os pontos quânticos brilham como sinais de neón e seu brilho dura até 48 horas (BORM, 2006). Além do mais, a

fluorescência do nanocristal pode ser detectada por pelo menos quatro gerações celulares, sendo que algumas células podem permanecer marcadas por até duas semanas. Esse tempo é suficiente para acompanhar até mesmo um vírus ou uma mitose celular ao longo de um processo biológico (DONALDSON et al., 2007).

A cor emitida pelos pontos quânticos pode ser alterada controlando-se o seu tamanho. Os pontos pequenos emitem luz azul, verde ou amarela e pontos maiores brilham nas cores laranja, vermelha ou cinza (SIMBERG et al., 2007). Entretanto, nessas pesquisas, há limitações na tecnologia. Por exemplo, a luz não penetra profundamente no organismo, o que tornaria o método viável apenas para doenças de pele ou tecido muito superficial (ITO et al., 2004). Os pontos quânticos também têm uma natureza oleosa, o que dificulta sua interação com os organismos vivos. Esses são alguns dos desafios que o pesquisador terá de vencer antes de tornar a nova tecnologia útil na rotina prática (GWINN & VALLYATHAN, 2006).

Nanomedicamentos

A aplicação da micro e nanotecnologia para o desenvolvimento de medicamentos inteligentes tem recebido grande interesse por parte da comunidade científica e de empresas dos setores farmacêuticos e de biotecnologia. Isso pode ser documentado pelos recentes avanços científicos e tecnológicos que permitiram o registro e comercialização de medicamentos mais eficazes e seguros (SIMBERG et al., 2007).

As pesquisas nesta área concentram-se em três frentes principais: a) o domínio de tecnologia de produção de biofármacos pela tecnologia recombinante, associando esses produtos a micro e nanocarreadores, visando a melhorar a cinética de liberação para atingir um alvo específico (HARISINGHANI et al., 2007); b) o estudo de biocompatibilidade e de biossegurança de nanomateriais desde as etapas de produção, logística de estudos pré-clínicos e clínicos, além da comercialização (MEDINA et al., 2007); c) a aplicação de nanomedicamentos na prevenção e tratamento de doenças de grande impacto econômico e social e a condução de estudos clínicos em animais e humanos por meio de uma rede de relacionamentos envolvendo diferentes fatores biológicos (WITTMAACK, 2007), incluindo a detecção de alterações celulares na entrega da droga alvo e prognóstico de acompanhamento terapêutico (HARISINGHANI et al., 2007).

Nesta área, as propostas dão ênfase ao estudo de sistemas biológicos, usando-se as ferramentas como a pinça óptica e a microscopia de desfocalização. Com essas ferramentas, pode-se estudar e manipular células em tempo real e observá-

las desempenhando suas funções (BORM, 2006). A pinça óptica é uma ferramenta de micromanipulação com um sensor de força na escala de piconewton, apropriado para se medir propriedades mecânicas de biomoléculas (WITTMACK, 2007). Com a microscopia de desfocalização, podem-se medir, em tempo real, flutuações da superfície de células e o emprego dessas técnicas permite obter informações sobre motilidade de parasitas, adesão celular em células neuronais, efeitos de pressão sobre neurônios, fagocitose de parasitas por macrófagos, entre outras aplicações. De uma maneira geral, o objetivo do uso dessas técnicas é o de relacionar propriedades mecânicas das células com suas funções celulares (AAGAARD & ROSSI, 2007).

Marcadores fluorescentes GFPs (Green Fluorescent Protein)

A GFP é uma proteína verde fluorescente que emite luz verde quando é excitada por uma luz azul e tornou-se uma ferramenta valiosa na investigação em biologia celular (KADDUR et al., 2008). As GFPs são homólogas e coloridas, sendo constituídas por proteínas pequenas e compactas, formando uma estrutura denominada cilindro- β e que espontaneamente geram fluoróforos (WITTMACK, 2007). Devido às cores brilhantes, que cobrem todo o espectro visível, essas proteínas são usadas extensivamente como ferramentas de pesquisa (AAGAARD & ROSSI, 2007). As várias cores são originadas de uma entidade fluorescente que é gerada no interior da proteína através da modificação covalente de três resíduos de aminoácidos consecutivos, os quais fazem parte da cadeia polipeptídica, que obtém sua conformação tridimensional nativa para se tornar visivelmente fluorescente (HARTING et al., 2008).

A existência da GFP, proveniente da medusa do pacífico *Aequorea victoria*, em associação próxima com uma luciferase, foi descrita pela primeira vez por SHIMOMURA (1979). O gene então foi clonado a partir do cDNA da medusa (AAGAARD & ROSSI, 2007) e o fluoróforo quimicamente caracterizado (WITTMACK, 2007). A estrutura tridimensional da proteína foi determinada em 1996 por cristalografia de raios X, e as propriedades físicas e bioquímicas do cromóforo foram caracterizadas em detalhe durante a última década (HARTING et al., 2008).

Há alguns anos, uma série de proteínas semelhantes à GFP foi encontrada e seu DNA clonado (AZZAZY et al., 2006) e, em alguns desses homólogos, foi encontrado um sistema cromométrico, que foi modificado a partir do estágio verde presente na GFP (HARISINGHANI et al., 2007), sugerindo que a GFP pode representar um dos sistemas mais simples e com o menor número de etapas químicas necessárias para a maturação do cromóforo (KADDUR et al., 2008).

A família das GFPs tem profundo impacto na versatilidade das técnicas disponíveis para a biologia molecular, inclusive para o estudo de doenças como o câncer, problemas de desenvolvimento, defeitos genéticos e contaminações virais (HARTING et al., 2008). A grande variedade de genes codifica tipos celulares, em particular quando utilizadas em conjunto com microscópios fluorescentes (GWINN & VALLYATHAN, 2006). Um exemplo importante da versatilidade foi descrito num artigo a respeito da implantação de células-tronco (CT) embrionárias, derivadas de ratos geneticamente transformados com GFP, em ratos normais (SZENT-GYORGYI et al., 2008). O resultado da implantação das CT pôde ser monitorado e acompanhado visualmente por fluorescência a partir desses marcadores (WITTMACK, 2007).

Uma técnica denominada iluminação de proteínas foi recentemente utilizada para observar o deslocamento de moléculas de sinalização intercelular entre o núcleo e o citoplasma, empregando uma proteína fluorescente com propriedades fotocromáticas reversíveis (JARES-ERIJMAN & JOVIN, 2006). Tais experimentos de biologia celular permitem visualizar e estudar biologia com uma precisão revolucionária, tanto no tempo quanto no espaço, e sua realização se fundamenta na propriedade das GFPs de atuarem como sondas não invasivas (KADDUR et al., 2008).

Em todas as GFPs caracterizadas até hoje, percebeu-se que requerem pelo menos um evento oxidativo nas suas etapas de fluorescência (HARTING et al., 2008). Para gerar o cromóforo verde presente na GFP madura, o mecanismo necessita de um ciclo, uma desidratação e uma oxidação (WITTMACK, 2007). Independentemente da cor final da proteína, o ciclo de um peptídeo da cadeia principal parece exercer um papel central na biossíntese do cromóforo. Esta reação de condensação ocorre antecipadamente no processo de formação do cromóforo, iniciando o processo de modificação covalente e parece ser comum a todas as GFPs (HARTING et al., 2008).

Fenômenos biológicos se baseiam nos processos físico-químicos fundamentais de ligação molecular, associação, mudança conformacional, difusão e catálise. A estrutura hierárquica estabelecida em nível das organelas, células, tecidos e organismos são atribuídos através de uma extensa rede de mecanismos em cascata e de realimentação, baseados nessas reações (BAKER & MAUCK, 2007). Portanto, para se compreender a bioquímica da célula, é necessário elucidar as distribuições e os estados funcionais das moléculas constituintes (HARTING et al., 2008).

A microscopia de fluorescência é perfeitamente adequada para essa tarefa por gerar contraste ao explorar as muitas manifestações da

emissão de luz: sensibilidade, seletividade e modulações nos estados elétrico fundamental e excitado. Além disso, a transferência de energia por ressonância (FRET) é um composto que provê sinais sensíveis a distâncias intra e intermoleculares no intervalo entre 1-10nm. Portanto, a frequência da FRET é capaz de explorar interações moleculares e conformações com uma resolução que supera o limite inerente da microscopia ótica convencional (JARES-ERIJMAN & JOVIN, 2006). A determinação direta do tempo de vida da fluorescência provê uma das mais diretas medidas da transferência dessa energia da fluorescência, sendo uma técnica relativamente insensível a variações na concentração e no caminho ótico (HARTING et al., 2008).

Anisotropia de marcadores fluorescentes

Fundamentalmente, nanocristais fluoróforos absorvem fótons de luz e reemitem com um comprimento de onda diferente. Essas partículas proveem luminosidade e fluorescência fotoestável que podem ser observadas por horas em tecidos marcados e ainda podem ser arquivados permanentemente em quase todos os tipos de material de interesse biológico (PARAK et al., 2005). A medição da anisotropia da fluorescência provê uma poderosa ferramenta à bioquímica, pois, sob excitação com luz polarizada, a emissão de diversas amostras também é polarizada. A extensão da polarização da emissão é descrita em termos da anisotropia (DONALDSON et al., 2007).

A origem da anisotropia reside na existência de momentos de transição para a absorção e emissão de luz com direções específicas dentro da estrutura do fluoróforo (JARES-ERIJMAN & JOVIN, 2006). A anisotropia pode ser diminuída por fatores externos que atuam durante o tempo de vida do estado excitado do marcador. Estes incluem difusão rotacional do fluoróforo e FRET entre os fluoróforos. Ambos os processos resultam em um deslocamento adicional do oscilador da emissão e, portanto, menor anisotropia (LAKOWICZ, 2006).

No Caso da GFP, o tempo de vida da fluorescência é muito menor do que o tempo de correlação rotacional (KADDUR et al., 2008), de modo que a difusão rotacional provoca reduzido efeito sobre o valor da anisotropia desta proteína. Por outro lado, um evento de transferência de energia não radiativa pode impor uma redução significativa ao valor inicial da anisotropia (LAKOWICZ, 2006). A emissão do receptor, devido à transferência de energia, é altamente despolarizada porque a orientação da luz emitida não é completamente restringida pela polarização da excitação (GWINN & VALLYATHAN, 2006), o que permite obter mensuração de FRET com alta sensibilidade e contraste. Esta abordagem tem também a vantagem de eliminar

falsos positivos, porque artefatos resultam no aumento da anisotropia (LAKOWICZ, 2006).

FRET entre proteínas marcadas e nanocristais fluorescentes

A detecção precisa de partículas e a interação entre uma molécula alvo com uma proteína, num processo de reconhecimento biológico, geralmente está associada a uma mudança na conformação desta proteína como resposta à ligação. O desenvolvimento de sistemas de reconhecimento sensíveis a tais mudanças são capazes de sinalizar o acontecimento celular, sendo foco da atenção de vários grupos de pesquisa (DONALDSON et al., 2007). Estudos envolvendo FRET entre uma molécula fluorescente doadora ligada ao alvo e uma molécula receptora ligada a uma proteína tem sido utilizados para estudar mudanças na conformação de proteínas e também como resposta a mudanças nas condições da solução aquosa (PARAK et al., 2005). O FRET já tem sido usado extensivamente em aplicações biológicas, entretanto, medidas, tais como o monitoramento da dinâmica de uma proteína sob extensos períodos e o contínuo monitoramento de toxinas ou pequenas moléculas sob condições reais, continuam difíceis de observar quando são utilizados marcadores orgânicos (GWINN & VALLYATHAN, 2006).

Marcadores orgânicos geralmente apresentam espectro de absorção estreito e emissão ampla, além de limites muito baixos de fotodeterioração. Essas limitações são especialmente problemáticas no desenvolvimento de ensaios em que várias moléculas são analisadas simultaneamente, em particular devido à sobreposição dos espectros de emissão (PARAK et al., 2005).

A partir do desenvolvimento das reações de síntese química de precursores organometálicos, foram alcançados importantes avanços para aperfeiçoar as propriedades de fotoemissão dos marcadores nanocristais coloidais, aumentando o interesse na compreensão das propriedades físicas fundamentais e no desenvolvimento de aplicações que fizessem uso das características únicas desses materiais (OLIVEIRA et al., 2009), como o desenvolvimento de células solares, baseados em marcadores com bioluminescência (HUYNH et al., 2002), e a utilização de nanomarcadores coloidais como marcadores em aplicações biotecnológicas (PARAK et al., 2005).

Para sinalizações biológicas, os marcadores nanocristais apresentam propriedades óticas e espectroscópicas únicas, possuindo várias vantagens com relação aos marcadores orgânicos, inclusive em ensaios envolvendo imunofluorescência e FRET (AAGAARD & ROSSI, 2007). Os nanocristais

apresentam propriedades de absorção e emissão moduláveis, em função do diâmetro da partícula. Isso se deve ao efeito de confinamento quântico dos transportadores de carga elétricas (OLIVEIRA et al., 2009). O amplo espectro de absorção permite a excitação simultânea de várias populações de nanocristais ao mesmo tempo. Além disso, avanços na cinética eletroquímica da superfície ampliam substancialmente a eficiência quântica do nanocristal em relação ao contato com a membrana do núcleo celular, potencializando a eficiência quântica, quando comparável aos marcadores orgânicos GFPs (BAKER & MAUCK, 2007).

Diversos métodos têm sido desenvolvidos para dispersar os nanocristais em meio aquoso, para aplicação em bioquímica (PARAK et al., 2005). A fisiologia da superfície dos marcadores coloidais permite a formação de nanocristais-bioconjugados que podem se ligar especificamente a moléculas alvo e formar complexos estáveis. Desse modo, os marcadores nanocristais coloidais têm sido utilizados com sucesso na visualização de células, ensaios imunológicos e hibridação de DNA (MICHALET, et al., 2005).

Aplicação de nanocristais coloidais em pesquisas

Nos últimos anos, os marcadores nanocristais têm sido testados em muitas aplicações biotecnológicas que utilizam fluorescência, incluindo a tecnologia de ensaios de DNA e imunofluorescência de células de origem animal. Alguns dos primeiros e mais bem sucedidos testes utilizaram esses marcadores fixados em imunofluorescências para sinalização de células e tecidos; imunocoloração da membrana de proteínas (SUKHANOVA et al., 2007), fluorescência de microtúbulos (AKERMAN et al., 2002), de actina (SZENT-GYORGYI et al., 2008), de antígenos nucleares e fluorescência para hibridização *in situ* em cromossomos (MICHALET et al., 2005).

Esses marcadores tendem a ser mais brilhantes do que corantes, devido a efeitos compostos de coeficientes de extinção que são de uma ordem de grandeza maior que as da maioria dos corantes (DANESHVAR et al., 2008). Os nanocristais apresentam comparável rendimento quântico e saturação dos níveis de emissões e luz (MEDINA et al., 2007), no entanto, a sua principal vantagem reside na sua resistência à luminescência durante longos períodos de tempo (minutos/horas), permitindo a aquisição de imagens bem contrastadas (MICHALET et al., 2005).

Com isso, a nanotecnologia atual apresentou um profundo impacto sobre ampla possibilidade de aplicações, portanto, trazendo benefícios em muitos aspectos da vida. Recentemente, pesquisadores estudaram a possibilidade de acompanhar a migração celular embrionária ou adulta a

partir da fluorescência refletida pelos nanocristais de suas células descendentes, depois de implantado em um organismo adulto (HARISINGHANI et al., 2007). Uma das maiores dificuldades nessa área é a marcação das células para ser transplantadas e estudos anteriores sobre o destino *in vivo* após transplante são controversos e difíceis de aplicar, devido às limitações técnicas. A identificação de CT é realizada por meio de marcadores de superfície celular (KIRSCHSTEIN, 2001). Contudo, ASAHARA et al. (1997) comentam que a maior dificuldade no isolamento e caracterização de diferentes tipos celulares ocorre devido à ausência de marcadores antigênicos específicos bem determinados.

Com os atrativos da técnica por nanomarcadores, OLIVEIRA et al. (2009) obtiveram sucesso na identificação de CT mesenquimais *in vivo*, utilizando esses marcadores que foram transplantados em infartos de miocárdio experimental em suínos. A técnica desenvolvida permitiu o rastreamento das células e o estudo da migração com fotodegradação reduzida em longo prazo.

STEPHENS & ALLAN (2003) desenvolveram um método para produzir cultura em alta densidade utilizando nanopartículas magnéticas para promover expansão das CT mesenquimais. As partículas magnéticas variam em tamanho de nanômetros a micrômetros e a única característica é a sua reação à força magnética, que é atraída por alta densidade. Esse recurso é utilizado para realizar a biosseparação, incluindo células de triagem. Neste estudo, as forças magnéticas foram usadas para mover as CT mesenquimais marcadas com nanopartículas e mantidas *in situ* para cultivá-los em alta densidade. Foram investigadas as aplicabilidades e a proliferação celular *in vitro* durante 17 dias em média com indução osteogênica. As CT mesenquimais magneticamente marcadas por nanopartículas foram enriquecidas usando ímãs resultando em uma densidade muito mais elevada do que a utilizada em cultura (densidade cultivada, 18cels cm⁻²). Quando elas foram semeadas em alta densidade usando nanopartículas, houve um aumento celular de cinco vezes o número, comparativamente à cultura preparada sem nanopartículas.

Resultados como esses sugerem que culturas usando nanopartículas magnéticas podem ser utilizadas de forma eficiente e segura para expandir CT mesenquimais para a aplicação clínica (GWINN & VALLYATHAN, 2006). A avaliação da imagem luminosa ocorre por alta fotoestabilidade e excitação de um único comprimento de onda (AZZAZY et al., 2006). A imagem molecular permite detectar, quantificar e exibir as alterações moleculares das células que acontecem *in vivo* e *in vitro* (STEPHENS & ALLAN, 2003) e as sondas fluorescentes biológicas são utilizadas devido às suas

qualidades inertes e à capacidade de interagir sem perda de sensibilidade em uma variedade de reações celulares. A gama dinâmica de nanopartículas, com diâmetros inferiores a 100nm, com sondas associadas às moléculas de peptídeos, anticorpos ou ácidos nucleicos para detecção de reação celular os torna ferramentas ideais para exibir a quantificação de reações moleculares *in vivo* (MARSH et al., 2007).

As habilidades dos nanomarcadores para monitorar interações ultra-estruturais em continuidade os tornam ideais para aplicações em terapias. Além disso, o potencial de revestimento de nanomarcadores com os anticorpos, colágeno e outras micromoléculas torna-se biocompatível para uso em diagnóstico. Um crescente de estudos sobre diagnóstico de detecção molecular tem sido publicado em estudos sobre fibroblastos utilizando camundongos. SZENT-GYORGYI et al. (2008) mostraram que as nanopartículas eram mais fluorescentes que os marcadores fluoróforos convencionais. PARAK et al. (2005) também observaram que os marcadores semicondutores coloidais com base imunofluorescente são mais eficientes que marcadores de superfície celular e têm grande eficiência para marcação de citoesqueleto, núcleo e outras organelas intracelulares. Eles também demonstraram que pontos quânticos coloidais bioconjugados são valiosos para monitoração e imagiologia do DNA *in vivo*.

GAO et al. (2004) relataram que na imagiologia do câncer, em estudos em animais *in vivo* com pontos quânticos, ocorre captação, conservação e distribuição desses marcadores principalmente no fígado, baço, cérebro, coração, rins e pulmões em ordem decrescente. Esses avanços na nanomedicina oferecem a possibilidade de novas oportunidades na detecção precoce do diagnóstico para o tratamento de doenças e, sem dúvida, a nanotecnologia terá um profundo impacto sobre um grande número de aplicações médicas mais baratas e seguras (MEDINA et al., 2007).

Um dos principais desafios da indústria é a falta de informação sobre os eventuais efeitos negativos sobre a saúde e meio ambientes causados pela exposição a diferentes nanopartículas. Órgãos governamentais devem desenvolver campanhas de orientações de segurança para a nanotecnologia industrial e farmacêutica, incluindo o fabrico, o controle da exposição ao material, controle ambiental e liberação de nanopartículas, seus riscos e avaliações para promover a nanotecnologia na sua economia (DONALDSON et al., 2007). A favor dessa tecnologia está a engenharia tecidual, no que concerne o desenvolvimento de produtos para a medicina (AAGAARD & ROSSI, 2007), porém, esta revolução que atualmente encontra-se na vanguarda poderá

produzir mudanças e efeitos positivos e negativos na saúde e meio ambiente (SIMBERG et al., 2007).

Terapia utilizando nanocristais em Medicina Veterinária

O número de pesquisas visando às terapias regenerativas utilizando CT tem aumentado consideravelmente nos últimos anos no Brasil. Estudos recentes vêm sendo realizados, descrevendo a utilização alógena e autógena das CT para a reparação de diversos tecidos. A grande aplicação em Medicina Veterinária deve-se também à geração de modelos experimentais aplicáveis em paciente humanos.

Pesquisadores do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária de Santa Maria (UFSM) estão utilizando CT adultas *in vivo* e cultivadas, colhidas da medula óssea na regeneração de lesões provocadas cirurgicamente em tecidos com variados graus de vascularização, em trabalhos experimentais e aperfeiçoando protocolos de transplantes destas nas lesões com finalidades terapêuticas. Tendo em vista as dificuldades expostas, os grupos de pesquisa estão utilizando nanomarcadores Qtracker 655 com objetivo de identificação e quantificação de CT *in vivo* e *in vitro* precedendo a inoculação tecidual e posteriormente durante as fases de cicatrização.

OLSSON (2009) confirmou a identificação por *imprint* fluorescente de células mononucleares da medula óssea, por influência de nanocristal, quando inoculadas, sem alterar a viabilidade das células no botão celular antes do implante tecidual e durante o processo de regeneração de tendão calcâneo de cães, durante o período de sete dias de evolução. TOGNOLI et al. (2009) concluíram que os nanocristais são marcadores eficientes para avaliar a curto prazo de tempo a presença de CT mesenquimais, quando administradas pela via subconjuntival no tratamento experimental de úlcera de córnea por substância de caráter básico em cães.

OLIVEIRA et al. (2010) investigaram, através de microscopia óptica com luz fluorescente, a luminescência de CT colhidas da medula óssea e transplantadas após isolamento em defeito ósseo tibial experimental em cães. Concluíram que os marcadores fluorescentes Q-tracker são úteis na identificação de CT mesenquimais em tecido ósseo, analisadas durante uma semana. O tempo de análise foi determinado com base no comportamento dos nanocristais que perdem sua fluorescência ao longo do tempo. Esse tempo se mostrou satisfatório, pois as células ainda estavam fluorescentes. No presente trabalho, optou-se pela utilização do marcador nanocristal Qtracker-665, pois, de acordo com PARAK et al. (2005), este marcador possui a capacidade de marcar quase todo tipo de material de interesse biológico.

Seguindo as recomendações de OLIVEIRA et al. (2010), SALBEGO (2010) detectou fluorescência em 100% das análises que fez em enxerto ou implante homólogo, na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães, associado à inoculação da fração total de células mononucleares da medula óssea, porém com diferentes graus de intensidade. Os resultados obtidos foram similares àqueles concluídos por OLIVEIRA et al. (2010) e OLSSON (2009), na marcação da fração de células com o mesmo marcador. No estudo, os autores verificaram que o nanocristal Qtracker-655 é realmente eficiente na marcação celular, embora seu tempo de viabilidade como marcador seja relativamente curto, não permitindo o acompanhamento da atividade celular por períodos mais prolongados. Também concluiu que não se pode afirmar que as células marcadas emitem fluorescência após uma semana de sua inoculação no foco da fratura. É possível que a fluorescência detectada à microscopia, após sete dias de observação, seja proveniente de células mortas localizadas no interior de fagócitos em atividade no foco de fratura ou na necessidade de uma análise mais profunda da fluorescência celular em microscopia multifocal.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A marcação celular com nanocristais é uma alternativa diagnóstica promissora, pois a possibilidade de detecção precoce de doenças pelo método da fluorescência aumenta a expectativa de vida tanto em humanos, quanto em animais. As recentes descobertas da nanotecnologia sobre o comportamento específico da cromatografia por bioafinidade celular revelou-se um método simples e preciso, conseqüentemente, adequado à rotina laboratorial, aumentando as perspectivas terapêuticas. Contudo, essa possibilidade deve ser considerada com entusiasmo e cautela, visto que a nanotecnologia é uma ciência em crescente estudo, sendo importante que as análises sejam realizadas em longo prazo.

REFERÊNCIAS

- AAGAARD, L.; ROSSI, J.J. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Advances Drug Delivery Reviews*, v.30, n.59, p.75-86, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1978219/pdf/nihms-25447.pdf>>. Acesso em 30 de mar.2007 doi: 10.1016/j.addr.2007.03.005.
- AKERMAN, M.E. et al. Nanocrystal targeting in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.332, p.12617-12621, 2002. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/99/20/12617.full.pdf+html>>. doi: 10.1073. Acesso em: 25 de fev. 2008.
- ASAHARA, T. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, v.275, p. 964-967, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/275/5302/964.full.pdf>>. doi: 10.1126. Acesso em: 22 de mar. 2006.
- AZZAZY, H.M.E. et al. Nanodiagnostics: 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.
- BAKER, B.M.; MAUCK, R.L. The effect of nanofiber alignment on the maturation of engineered meniscus constructs. *Biomaterials*, v.28, n.11, p.1967-1977, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIImg&_imagekey=B6TWPB-4MRN9S7-2-1&_cdi=5558&_user=10&_pii=S0142961207000051&_origin=search&_coverDate=04%2F30%2F2007&_sk=999719988&view=c&wchp=dGLbVzzzSkzk&md5=8273292c0f8dd0cadf3cd5bce04b2c9&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: 04 de jan 2008. doi: 10.1016.
- 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: 17 set. 2008. doi:10.1186/1743-8977-3-11.
- DANESHVAR, H. et al. Imaging characteristics of zinc sulfide shell, cadmium, telluride core quantum dots. *Nanomedicine*, v.3, p.21-29, 2008. Disponível em: <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/17435889.3.1.21?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori:rid:crossref.org&rft_dat=cr_pub%3dpubmed>.doi:10.2217/17435889.3.1.21>. Acesso em: 11 nov. 2010.
- DONALDSON, K. et al. Nanotoxicology. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, v.61, n.9, p.727-728, 2007. Disponível em: <<http://oem.bmj.com/content/61/9/727.1.extract>>. Acesso em: 11 nov. 2010. doi: 10.1136/oem.2004.013243.
- DU, W. Optical molecular imaging for systems biology: from molecule to organism. *Anal Bioanal Chem*, v.386, p.444-457, 2006. Disponível em: <<http://www.novoseek.com/article/PMC/1592253/>>. Acesso em: 4 fev 2010. doi:10.1007/s00216-006-0541-z.
- GAO, X. et al. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Natural Biotechnology*, v.22, n.8, p.969976, 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/nbt/journal/v22/n8/full/nbt994.html>>. Acesso em: 17 out. 2008. doi:10.1038/nbt994.
- 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: 12 nov. 2010. doi:10.1289/ehp.8871.
- HARISINGHANI, M. et al. Utility of a new bolus-injectable nanoparticle for clinical cancer staging. *Neoplasia*, v.9, n.12, p.1160-1165, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2134912/pdf/neo0912_1160.pdf>. Acesso em: 6 dez. 2010. doi: 10.1593/neo.07940.
- HARTING, M.T. et al. Isolation of mesenchymal stem cells (MSC) from green fluorescent protein positive (GFP+) transgenic rodents: the grass is not always green(er). *Stem*

- cells and development, v.19, n.14, p.951-963, 2008. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/pdf/10.1089/scd.2008.0046>>. Acesso em: 11 nov.2009. doi:10.1089/scd.2008.0046.
- HUYNH, W.U. et al. Hibryd nanorod-polymer solar cells. **Science Magazine**, v.292, n.5564, p.2425-2427, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/295/5564/2425.full.pdf>>. Acesso em: 6 fev. 2009. doi: 10.1126/science.1069156.
- JARES-ERIJMA, N.E.A.; JOVIN, T.M. Imaging molecular interactions in living cells by FRET microscopy. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.10, p.409-416, 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIImg&_imagekey=B6VRX-4KST3VT-1-H&_cdi=6246&_user=10&_pii=S1367593106001281&_origin=search&_coverDate=10%2F31%2F2006&_sk=999899994&view=c&wchp=dGLbVtzzSkzS&md5=f30910fac0e78152b3001689e2312acf&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2010. doi:10.1016/j.cbpa.2006.08.021.
- KADDUR, K. et al. Extraction of green fluorescent proteins with sonoporation. **Journal of the Acoustical Society of America**, v.123, n.5, p.3218-3223, 2008. Disponível em: <http://pubget.com/paper/18530155>. doi: 10.1121/1.2933412. Acesso em: 21 nov. 2010.
- KIRSCHSTEIN, R. Stem cells: scientific progress and future research directions [online]. **Department of Health and Human Services**, June 2001. Disponível em: <<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/2001report>>. On line. Acesso em: 29 jun. 2010.
- LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3.ed. Baltimore: Springer, 2006. p.353-382. Disponível em: <http://ebookey.org/Principles-of-Fluorescence-Spectroscopy-by-Joseph-R-Lakowicz_98211.html>. Acesso em: 21 nov. 2010.
- MARSH, J.N. et al. Molecular imaging with targeted perfluorocarbon nanoparticles: quantification of the concentration dependence of contrast enhancement for binding to sparse cellular epitopes. **Ultrasound Medicine Biological**, v.33, n.6, p.950-958, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1978071/?tool=pubmed>>. Acesso em: 11 dez. 2010. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2006.12.007.
- MEDINA, C. et al. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. **British Journal of Pharmacology**, v.150, p.552-558, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2189773/?tool=pubmed>>. Acesso em: 7 ago 2010 doi: 10.1038/sj.bjp.0707130.
- 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: 19 ago.2010. doi: 10.1126/science.1104274.
- OLIVEIRA, D.M. et al. Labeling of human mesenchymal stem cells with quantum dots allows tracking of transplanted cells engrafted in infarcted pig hearts. **Einstein**, v.7, p.284-289, 2009. Disponível em: <<http://apps.einstein.br/revista/arquivos/PDF/1246-Einstein%20v7n3p284-9.pdf>>. Acesso em: 4 dez.2010.
- OLIVEIRA, G.K. et al. Autologue mononuclear stem cells and morphogenetic bone protein in experimentally induced tibial defect healing in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.1, p.72-79, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v62n1/v62n1a10.pdf>>. Acesso em: 4 dez. 2010. doi: 10.1590/S0102-09352010000100010.
- OLSSON, D.C. **Transplante de células-tronco com a fração total de células mononucleares autógenas da medula óssea na reparação aguda primária de tendão calcâneo de cães**. 2009. 175f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.
- PARAK, W.J. et al. Labelling of cells with quantum dots. **Nanotechnology**, v.16, p.9-25, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2189773/?tool=pubmed>>. Acesso em: jun.2008. doi: 10.1088/0957-4484/16/2/R01.
- SALBEGO, F.Z. **Exerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea**. 2010. 211f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.
- SHIMOMURA, O. Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein. **FEBS Letters**, v.104, p.220-222, 1979.
- SIMBERG, D. et al. Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, n.3, p.932-936, 2007. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/104/3/932.full.pdf+html>>. Acesso em: 4 maio, 2010. doi 10.1073/pnas.0610298104.
- STEPHENS, D.J.; ALLAN, V.J. Light microscopy techniques for live cell imaging. **Science**, v.300, p.82-86, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/300/5616/82.full>>. Acesso em: 4 maio de 2010. doi: 10.1126/science.1082160.
- SUKHANOVA, A. et al. Nanocrystal-encoded fluorescent microbeads for proteomics: antibody profiling and diagnostics of autoimmune diseases. **Nano letters**, v.7, p.2322-2327, 2007. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdfplus/10.1021/nl070966%2B>>. Acesso em: 03 de out.2009. doi: 10.1021/nl070966+.
- SZENT-GYORGI, C. et al. Fluorogen-activating single-chain antibodies for imaging cell surface proteins. **Nature biotechnology**, v.26, p.235-240, 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/nbt/journal/v26/n2/pdf/nbt1368.pdf>>. Acesso em: 13 maio, 2009. doi:10.1038/nbt1368.
- TOGNOLI, G.K. et al. Transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea em úlcera de córnea experimental em cães. **Ciência Rural**, v.39, p.148-155, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v39n1/a39cr448.pdf>>. Acesso em: 28 fev. 2010. doi: 10.1590/S0103 84782008005000039.
- WITTMACK, K. Search of the most relevant parameter for quantifying lung inflammatory response to nanoparticle exposure: particle number, surface area, or what? **Environmental Health Perspectives**, v.115, n.2, p.187-194, 2007. Disponível em: <<http://ehp03.niehs.nih.gov/article/fetchArticle.action?articleURI=info%3Adoi%2F10.1289%2Fehp.9254>>. Acesso em: 17 abr. 2008. doi:10.1289/ehp.9254.