

UNIVERSIDADE EDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia e Farmacologia

Daniela Silva dos Reis

Estudo da capacidade de amplificação do sinal de fluorescência de anticorpos conjugados com nanopartículas de ouro detectado por citometria de fluxo.

Belo Horizonte

2019

Daniela Silva dos Reis

Estudo da capacidade de amplificação do sinal de fluorescência de anticorpos conjugados com nanopartículas de ouro detectado por citometria de fluxo.

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual.

Orientador: Dr. Luiz Orlando Ladeira
Coorientadora: Dr^a. Lídia Maria de Andrade

Belo Horizonte

2019

043

Reis, Daniela Silva dos.

Estudo da capacidade de amplificação do sinal de fluorescência de anticorpos conjugados com nanopartículas de ouro detectado por citometria de fluxo [manuscrito] / Daniela Silva dos Reis. – 2019.

124 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Luiz Orlando Ladeira. Coorientadora: Dr^a. Lídia Maria de Andrade.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual.

1. Inovação. 2. Biofarmácia. 3. Ouro. 4. Nanopartículas. 5. Citometria de Fluxo. 6. Fluorescência. 7. Cetuximab. I. Ladeira, Luiz Orlando. II. Andrade, Lídia Maria de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 615.12:573



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO PROFISSIONAL EM INOVAÇÃO TECNOLÓGICA E PROPRIEDADE INTELECTUAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

“ESTUDO DA AMPLIAÇÃO DE SINAL DE FLUORESCÊNCIA DE ANTICORPOS CONJUGADOS COM NANOPARTÍCULAS DE OURO POR CITOMETRIA DE FLUXO”

Daniela Silva dos Reis

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 11 de novembro de 2019, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes membros:

Prof.^a. Dra. Ana Maria Caetano de Faria
Instituto de Ciências Biológicas, UFMG

Prof.^a. Dra. Estefânia Mara do Nascimento Martins
Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear

Dra. Lídia Maria Andrade
Instituto de Ciências Exatas, UFMG, Coorientadora

Prof. Dr. Luiz Orlando Ladeira
Instituto de Ciências Exatas, UFMG, Orientador

Belo Horizonte, 11 de novembro de 2019.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Orlando Ladeira, Professor do Magistério Superior**, em 13/01/2022, às 16:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Alberto Tagliati, Membro**, em 18/01/2022, às 12:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1191926** e o código CRC **B442A72D**.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física do Instituto de Ciências Exatas e na Plataforma de Citometria de Fluxo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio Financeiro: Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),
Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT) e a
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG),
Programa Pesquisador Mineiro 00646-16.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus queridos e amados pais, Sueli e Osmar, por todo seu amor e por sempre estarem ao meu lado.

Agradecimentos

Aos meus pais Osmar e Sueli por toda uma vida dedicada à família, pelo incentivo à continuidade dos estudos e principalmente pelo amor.

Ao meu orientador professor Luiz Orlando Ladeira por ter confiado em meu trabalho e pela sensibilidade diante das minhas dificuldades.

À minha coorientadora e amiga Lídia Andrade, a quem serei eternamente grata, pela disponibilidade irrestrita na evolução deste estudo. Obrigada!

Ao Alexandre, pelo amor, compreensão, doação e paciência pelas longas horas de espera no laboratório de citometria.

Às minhas irmãs, Mariana, Luciana e Lucimara pela união e compreensão durante nossa luta.

Aos meus sobrinhos e sobrinhas pela alegria, energia que nos revigora diariamente!

À menina Lu, grande amiga que desde que chegou tem sido sempre companheira!

Às minhas tias e primas pelo apoio e pelo carinho.

À secretária Kelly, pela delicadeza em seus atendimentos.

Ao Misael Silva pela disponibilidade em me ajudar nas aquisições no Amnis.

À doutora Vívian Leite de Oliveira pelos anticorpos CD44 e PECF594.

Às (aos) minhas (meus) amigas (os) que, cada qual à sua maneira, contribuiu para que eu continuasse firme no desenvolvimento deste trabalho: Ângela, Vânia, Enaile, Viviane, Marco, Fernando, Arlesson, Jadir, Nely, Nair, Mari, Sarah, Natália, Fernando, Mauro, Guilherme, Tácio, Washington e Giselle.

Ao meu grande amigo e professor, Adalberto que me inspirou a ser Bióloga.

À professora Ana Maria Caetano pela amizade, por me proporcionar condições para que eu desenvolvesse o meu Mestrado e pela participação nesta banca.

À professora Estefania Mara do Nascimento Martins, por ter aceitado prontamente a participar desta banca.

Aos colegas do laboratório de nanomateriais da UFMG.

Aos professores Rodrigo Resende e Anderson Kennedy pelo uso do Varioskan.

À Plataforma de citometria de fluxo da UFMG pelo uso dos citômetros.

Ao Centro de microscopia da UFMG pela aquisição das imagens.

Ao René Rachou pelo uso do citômetro.

Ao laboratório de nanomateriais pelo uso de suas instalações.

“Você constrói melhores pontes
entre os cientistas, compartilhando informações
ao invés de retê-las”.

Garry Nolan

Resumo

O uso de nanomateriais na área biomédica vem aumentando gradativamente com o aprimoramento das técnicas de síntese e funcionalização. Para que possa ser utilizado de maneira segura o nanomaterial deve ser altamente estável e de baixa toxicidade. Neste trabalho foi proposto estudar a possibilidade de amplificação do sinal de fluorescência, utilizando baixas concentrações de anticorpos primários funcionalizados com nanopartículas de ouro (AuNP) e secundários também em concentrações diminutas e realizar o estudo sistemático da sua estabilidade e baixa toxicidade para as células. As AuNPs puras foram escolhidas por não emitirem sinal de fluorescência após serem interceptadas por uma fonte luminosa, pela sua alta capacidade de absorção e transferência de energia e por não causar toxicidade para as células conhecidas e por serem altamente estáveis. Este trabalho envolveu as seguintes etapas: a) síntese das AuNPs pela rota do citrato de sódio; b) caracterização das AuNPs quanto ao tamanho e a morfologia; c) avaliação da viabilidade celular e ciclo celular; d) biofuncionalização das AuNPs com os anticorpos primários e secundários. Para isto, utilizou-se os anticorpos primários cetuximabe (Cet_{IgG}) e anti-CD44 (CD44_{IgG}), para este último foi feita a identificação do seu ponto isoelétrico pela curva de variação do pH da solução e foram utilizados os anticorpos secundários Alexa Fluor®488_{IgG} (AF488_{IgG}) e Pe-CF594_{IgG1} (Pe-CF594_{IgG}). e) caracterização dos nanocomplexos formados; f) conjugação dos nanocomplexos com os anticorpos secundários; g) avaliação da ligação dos nanocomplexos aos anticorpos secundários; h) reconhecimento das moléculas-alvo presentes na membrana celular pelos nanocomplexos. Os espectros de UV-vis obtidos demonstraram a formação de nanopartículas de ouro, com banda plasmônica característica. Após a funcionalização com o Cet_{IgG} e CD44_{IgG}, a espectroscopia UV-vis foi novamente realizada o que demonstrou sucesso neste procedimento pelos deslocamentos das curvas em relação às AuNPs puras. As AuNPs foram analisadas por microscopia eletrônica (MET) que demonstrou sua morfologia esférica. O estudo de estabilidade das AuNPs, foi realizado através das medições do espalhamento de luz dinâmico (DLS). O potencial zeta foi realizado para confirmar a estabilidade da emulsão coloidal. As AuNPs foram avaliadas antes e após a funcionalização com os anticorpos primários os resultados demonstraram

que as nanopartículas permaneceram dispersas. O teste de fluorimetria confirmou a funcionalização das AuNPs com Cet_{IgG} e CD44_{IgG}, os resultados corroboram os dados obtidos pelo potencial zeta. Para confirmar a conservação do reconhecimento dos epítomos celulares e a amplificação pelos nanocomplexos AuNPCet_{IgG} e AuNPCD44_{IgG} a MET e a citometria de fluxo (CF) e citometria de fluxo com imagem (CFI) foram utilizadas. Os dados obtidos por estas técnicas demonstraram que, após, a funcionalização dos anticorpos primários com as AuNPs não houve prejuízo para reconhecimento e ligação aos receptores de membrana celular. Houve também o melhoramento da detecção do sinal em baixas concentrações pelos anticorpos secundários Alexa Fluor 488 (AF488_{IgG}) e Pe-CF594_{IgG} gerando resultados mais eficientes com espectros de emissões mais estreitos reduzindo a interferência em outros filtros e a redução dos custos da técnica de citometria de fluxo.

Palavras-chave: Nanopartículas de ouro, biofuncionalização, citometria de fluxo, citometria de fluxo com imagem acoplada, fluorescência, anticorpos primários e secundários, ressonância plasmônica, células A431, cetuximabe e anti-CD44.

Abstract

The use of nanomaterials in the biomedical area is gradually increasing with the improvement of synthesis and functionalization techniques. In order to be used safely, the nanomaterial must be highly stable and have low toxicity. In this work it was proposed to study the possibility of amplifying the fluorescence signal, using low concentrations of primary antibodies functionalized with gold nanoparticles (AuNP) and secondary ones also in low concentrations and to carry out a systematic study of their stability and low toxicity to cells. Pure AuNPs were chosen because they do not emit a fluorescence signal after being intercepted by a light source, for their high capacity for energy absorption and transfer and for not causing toxicity to known cells and for being highly stable. This work involved the following steps: a) synthesis of AuNPs by the sodium citrate route; b) characterization of AuNPs in terms of size and morphology; c) evaluation of cell viability and cell cycle; d) biofunctionalization of AuNPs with primary and secondary antibodies. For this, the primary antibodies cetuximab (CetIgG) and anti-CD44 (CD44IgG) were used, for the latter the identification of its isoelectric point by the solution pH variation curve and the secondary antibodies Alexa Fluor®488IgG were used (AF488IgG) and Pe-CF594 IgG1 (Pe-CF594IgG. E) characterization of the formed nanocomplexes; f) conjugation of nanocomplexes with secondary antibodies; g) evaluation of the binding of nanocomplexes to secondary antibodies; h) recognition of the target molecules present in the cell membrane by the nanocomplexes. The UV-vis spectra obtained showed the formation of gold nanoparticles, with a characteristic plasmonic band. After functionalization with CetIgG and CD44IgG, UV-vis spectroscopy was performed again, which demonstrated success in this procedure due to the displacement of the curves in relation to pure AuNPs. AuNPs were analyzed by electron microscopy (MET) that demonstrated their spherical morphology. The AuNPs stability study was carried out through measurements of dynamic light scattering (DLS). The zeta potential was performed to confirm the stability of the colloidal emulsion. AuNPs were evaluated before and after functionalization with primary antibodies the results showed that the nanoparticles remained dispersed. The fluorimetry test confirms the AuNPs functionalization with CetIgG and CD44IgG, the results corroborate the data obtained by the zeta potential. To confirm the

conservation of cell epitope recognition and amplification by the AuNPCetIgG and AuNPCD44IgG nanocomplexes at MET and flow cytometry (CF) and flow cytometry with image (CFI) were used. The data obtained by these techniques demonstrated that, after the functionalization of the primary antibodies with AuNPs, there was no impairment for recognition and binding to cell membrane receptors. There was also an improvement in signal detection at low concentrations by the secondary antibodies Alexa Fluor 488 (AF488IgG) and Pe-CF594IgG, generating more efficient results with narrower emission spectra, reducing interference in other filters and reducing the costs of the cytometry technique. flow.

Keywords: Gold nanoparticles, biofunctionalization, flow cytometry, coupled image flow cytometry, fluorescence, primary and secondary antibodies, plasmon resonance, A431 cells, cetuximab and anti-CD44.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ESQUEMAS

Esquema 1: Citômetro de fluxo	42
Esquema 2: Sistema fluídico.....	43
Esquema 3: Sistema óptico.	45
Esquema 4: Processo de produção de anticorpos monoclonais	48
Esquema 5: Nanocomplexo AuNPCet _{IgG} com função teranóstica	55
Esquema 6: Síntese das nanopartículas de ouro.....	60

FIGURAS

Figura 1: <i>Model A Coulter Counter</i>	25
Figura 2: Cytograph de 1970	27
Figura 3: Citofotômetro Super Dooper Sorter (SDS-1)	28
Figura 4: Livermore Flow Sorter em 1973.	29
Figura 5: Impulsocitômetro - ICP 11.....	30
Figura 6: FACS-I.....	31
Figura 7: Cytofluorograph.	32
Figura 8: FACS-II.....	33
Figura 9: Amnis ImageStream® 100.....	39
Figura 10: COPAS™ BIOSORT System	40
Figura 11: Estruturas das imunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgE e IgD.....	47
Figura 12: Escala de tamanho das AuNPs.....	53
Figura 13: Representação gráfica do fenômeno ressonância plasmônica de superfície localizada.....	54
Figura 14: Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível das AuNPs.....	76
Figura 15: Imagem representativa das AuNPs sintetizadas.	77
Figura 16: Dispersão das AuNPs.	78
Figura 17: Imagem representativa do nanocomplexo AuNPCet _{IgG} por MET.....	86
Figura 18: Imagens representativas de CFI de células A431 marcadas com AuNPCet _{IgGAF488} IgG.	96

Figura 19: Imagens representativas de CFI de células A431 marcadas com AuNPCD44 _{IgG} Pe-CF594 _{IgG}	97
Figura 20: Imagens de CFI mostrando aglomerados dos nanocomplexos.	98

GRÁFICOS

Gráfico 1: Estratégia de <i>gate</i> para aquisição do nanocomplexo AuNPCetI _{gG} AF488I _{gG} por CFI.....	71
Gráfico 2: Configurações das imagens no nanocomplexo AuNPCD44 _{IgG} Pe-CF594 _{IgG} no equipamento de citometria de fluxo com microroscopia de fluorescência acoplada.....	72
Gráfico 3: Estratégia de seleção das populações para análises das fluorescências de AF488 _{IgG} e Pe-CF594 _{IgG}	73
Gráfico 4: Estratégia de seleção para purificação da população para o ciclo celular.	74
Gráfico 5: Curva de concentração do cetuximabe ligado às AuNPs.....	79
Gráfico 6: Espectroscopia de absorção na região do visível das AuNPCet _{IgG}	80
Gráfico 7: Mudança do perfil espectroscópico na região do visível do nanocomplexo AuNPCD44 _{IgG}	81
Gráfico 8: Análise do valor absoluto do potencial zeta das superfícies das AuNPs com a formação do nanocomplexo AuNPCet _{IgG}	82
Gráfico 9: Análise do valor absoluto do potencial zeta das superfícies das AuNPs com a formação do nanocomplexo AuNPCD44 _{IgG}	83
Gráfico 10: Formação do nanocomplexo AuNPCet _{IgG} e AF488 _{IgG} por fluorimetria.	84
Gráfico 11: Formação dos nanocomplexos AuNPCD44 _{IgG} e AuNPPe-CF594 _{IgG} por fluorimetria.	85
Gráfico 12: Ensaio de viabilidade celular e citotoxicidade.....	88
Gráfico 13: Avaliação do ciclo celular das células A431 quando expostas às AuNPs e aos nanocomplexos AuNPCet _{IgG} e AuNPCD44 _{IgG}	90
Gráfico 14: Intensidade média de fluorescência do AuNPCet _{IgG} AF488.....	91
Gráfico 15: Aumento da IMF do AuNPCet _{IgG} AF488 _{IgG} em baixas concentrações.	93
Gráfico 16: Intensidade média de fluorescência por CFI.....	95

Gráfico 17: Perfil de detecção da expressão de EGFR e anti-CD44 por citometria de fluxo.	99
Gráfico 18: Especificidade de ligação dos anticorpos secundários ao IgG do imunoterápico cetuximabe.	100
Gráfico 19: Espectro de absorvância e fluorescência das AuNPs funcionalizadas com AF488 _{IgG} e Pe-CF594 _{IgG}	102

LISTA DE TABELAS

TABELA

Tabela 1: Resumo dos resultados obtidos por citometria de fluxo..... 101

LISTA DE ABREVIATURAS

A431	Carcinoma de Células Escamosas Humano
Ac	Anticorpos
AF488	Alexa Fluor 488 _{IgG}
APC	Alofococianina (do inglês <i>Allophycocyanin</i>)
AuNPCet _{IgG}	Cetuximabe Nanopartículas de Ouro
AuNPs	Nanopartículas de Ouro
BD	Becton Dickinson
CD44 _{IgG}	do inglês <i>Cluster of Differentiation 44</i>
CELL(S)	Célula (s)
Cet _{IgG}	Cetuximabe
CF	Citometria de Fluxo
CFI	Citometria de Fluxo com Imagem
cMAb 225	Anticorpo monoclonal quimérico C225
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EGF	do inglês <i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	do inglês <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EtBr	Brometo de Etídio
FACS	do inglês <i>Fluorescence Activated Cell</i>
FSC	do inglês <i>Forward Scatter</i>
FSC-A lin	do inglês <i>Forward Scatter Area linear</i>
FSC-H lin	do inglês <i>Forward Scatter Height linear</i>
G1	<i>Gap 1</i> , Síntese Proteica
G2	<i>Gap 2</i> , Duplicação dos Centríolos
HeNe	Laser de Hélio-Neon
ICP	Impulsocitômetro
Ig	Imunoglobulinas
IgG	Imunoglobulina tipo G
IMF	Intensidade Média de Fluorescência
LA	Laser Argônio
Mabs	do inglês <i>monoclonal antibodies</i>

nm	Nanômetros
PBS	do inglês <i>Phosphate – Buffered Saline</i>
PD	do inglês <i>Photodiode</i>
PE	Ficoeritrinas
PI	Iodeto de Propídeo
R-PE	do inglês <i>R-Phycoerytrina</i>
RPM	Rotações por minuto
S	Síntese de DNA
SIP	do inglês <i>Sample Injection Port</i>
SPR	Ressonância Plasmônica de Superfície
SSC	do inglês <i>Side Scatter</i>
SSC-A lin	do inglês <i>Side Scatter Area linear</i>
SSC-H lin	do inglês <i>Side Scatter Height linear</i>
t.a	Temperatura ambiente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Objetivo	19
1.1.1	Objetivos gerais	19
1.1.2	Objetivos específicos	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Estado da Arte	21
2.1.1	Introdução à Citometria de Fluxo.....	23
2.2	Anticorpos	46
2.2.1	Anticorpos monoclonais	47
2.3	Cetuximabe breve histórico	48
2.4	Nanociência e Nanotecnologia	49
2.4.1	Breve histórico sobre a nanotecnologia no Brasil	51
2.4.2	Nanopartículas de ouro	52
2.4.3	Ressonância plasmônica de superfície localizada.....	54
2.4.4	Nanopartículas de ouro para aplicação em nanomedicina	55
2.4.5	Estudos de Citotoxicidade	56
2.4.6	Nanopartículas de ouro e estudos de citotoxicidade	57
3	MATERIAL E MÉTODOS	58
3.1	Anticorpos	59
3.1.1	Primários: Cetuximabe e anti-CD44	59
3.1.2	Secundários: Alexa fluor 488 _{IgG} , Pe-CF594 _{IgG} , Alexa fluor 647 _{IgG} e Alexa fluor 555 _{IgG}	59
3.2	Síntese das Nanopartículas de Ouro (AuNPs)	60
3.2.1	Absorbância por espectroscopia no ultravioleta visível.....	61
3.2.2	Microscopia eletrônica de transmissão.....	61
3.2.3	Espalhamento dinâmico de luz.....	62

3.2.4	Espectroscopia de absorção atômica	63
3.2.5	Potencial Zeta (ζ)	63
3.3	Bioconjugação e Caracterização das nanopartículas de ouro com os anticorpos primários cetuximabe e o anti-CD44	64
3.3.1	Bioconjugação das nanopartículas de ouro com anticorpos primários ..	64
3.4	Fluorimetria	65
3.5	Experimentos <i>in vitro</i>	65
3.5.1	Linhagem celular	65
3.5.2	Manutenção da linhagem celular	66
3.5.3	Tripsinização das células	66
3.5.4	Citometria de Fluxo	66
3.5.5	Estratégias para determinação das populações de interesse	70
3.6	Análises Estatísticas	74
4	RESULTADOS.....	75
4.1	Síntese e caracterização espectroscópica e morfológica das AuNPs....	76
4.1.1	Absorbância por espectroscopia no ultravioleta visível.....	76
4.1.2	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	77
4.1.3	Espalhamento dinâmico de Luz (DLS) – Raio hidrodinâmico das partículas	78
4.1.4	Espectroscopia de absorção atômica	79
4.2	Caracterização dos nanocomplexos AuNPCet _{IgG} e AuNPCD44 _{IgG}	79
4.2.1	Curva de concentração do cetuximabe	79
4.2.2	Espectroscopia UV-VIS dos nanocomplexos AuNPCet _{IgG} e AuNPCD44 _{IgG}	80
4.2.3	Potencial Zeta (ζ)	82
4.2.4	Fluorimetria	84
4.2.5	Microscopia eletrônica de transmissão	86
4.2.6	Citometria de Fluxo	87

4.3	As AuNPs aumentam a eficiência de detecção dos anticorpos primários e secundários usando baixas concentrações	92
4.3.1	Citometria por imagem	94
4.3.2	Os nanocomplexos de AuNPCet _{IgG} e AuNPCD44 _{IgG} não alteram a especificidade de ligação aos seus receptores quando marcados simultaneamente.....	99
4.3.3	O nanocomplexo cetuximabe AuNPs aumenta a intensidade média de fluorescência sem causar ligações inespecíficas.	100
5	DISCUSSÃO	103
6	CONCLUSÃO	108
	<hr/> REFERÊNCIAS.....	110

1.1 Objetivo

1.1.1 Objetivos gerais

Este trabalho teve como objetivo geral realizar a síntese e funcionalização das nanopartículas de ouro para aplicação em citometria de fluxo.

1.1.2 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de ouro pela rota do citrato de sódio.
- Caracterizar as nanopartículas de ouro por espectroscopia no ultravioleta visível, microscopia eletrônica de transmissão, espalhamento dinâmico de luz e espectroscopia de absorção atômica.
- Funcionalizar as nanopartículas de ouro com os anticorpos primários cetuximabe e anti-CD44.
- Caracterizar a formação dos nanocomplexos aplicando as técnicas de espectroscopia no ultravioleta visível, microscopia eletrônica de transmissão, espalhamento dinâmico de luz e espectroscopia de absorção atômica.
- Detectar a conservação do reconhecimento dos epítomos celulares pelo nanocomplexos AuNPCet_{IgG} e AuNPCD44_{IgG} por citometria de fluxo convencional e por imagem.
- Verificar o aumento da detecção da emissão do sinal de fluorescência em amostras com baixas concentrações de anticorpos primários e secundários.

2.1 Estado da Arte

A necessidade de mensurar, caracterizar morfológica e quimicamente, assim como detectar partículas e moléculas dispersas em uma suspensão, faz da Citometria de Fluxo (CF) umas das tecnologias mais sofisticadas para validar ou refutar hipóteses científicas. Esse fato deve-se à possibilidade de realizar análises multi-paramétricas de dezenas de milhares de células por segundo. Nas áreas, biomédica, clínica e acadêmica a citometria de fluxo é uma ferramenta fortemente utilizada para o diagnóstico e acompanhamento clínico, permitindo a caracterização das respostas celulares a estímulos específicos, como, por exemplo, é o caso do diagnóstico da Hemorragia Materno Fetal (HMF) (BAIOCHI, et al., 2005; BRAGA et al., 2016).

É importante salientar que a técnica de citometria de fluxo também é relevante na indústria, bem como na pecuária, onde contribui para o controle de qualidade do sêmen criopreservado (SCHENK, et al., 2007), e para contagem bacteriana em amostras de leite. Várias áreas e projetos podem se beneficiar da técnica da citometria de fluxo. Na área da oceanografia, essa metodologia é aplicada para caracterização do fitoplâncton e zooplâncton, podendo trazer informações valiosas sobre possíveis alterações nessas comunidades ecológicas, possivelmente causadas por poluição ambiental, uso insustentável de materiais e despejo de forma inadequada, gerando eventuais modificações em ecossistemas aquáticos que podem prejudicar a qualidade de vida da espécie humana (PARTENSKY *et al.*, 1996).

O estudo das alterações celulares em animais residentes nestes locais é de grande relevância para se intensificar os projetos de proteção e recuperação ambiental. A obtenção de respostas utilizando técnicas multi-paramétricas para um único evento torna necessária a marcação do material de modo extra e/ou intracelular por um conjunto de anticorpos monoclonais (Mabs) marcados fluorescentemente (DANGL; LANIER, et al., 2013).

A citometria de fluxo é uma técnica muito versátil, o sobrenadante da amostra analisada pode ser avaliado empregando micropartículas fluorescentes capazes de captar a molécula de interesse. A qualidade e reprodutibilidade dos resultados

obtidos por essa técnica dependem de um conjunto de fatores: capacidade de detecção da amostra pelo equipamento, nível de expressão da molécula de interesse e, principalmente, eficiência de emissão de fluorescência dos corantes de modo a diminuir a sobreposição entre estas fluorescências (BRAGA et al., 2016).

A nanotecnologia vem sendo aplicada em diversos campos do conhecimento, constituindo uma das áreas de grande interesse comercial em termos de pesquisa, desenvolvimento e inovação. Um dos mais recentes avanços da nanotecnologia é o uso de nanopartículas poliméricas com moléculas biológicas que fornecem comandos à maquinaria celular de forma a induzir ou suprimir processos biológicos (PEPPAS, 2004; HILDEBRAND *et al.*, 2006). Um dos desafios nesse campo de pesquisa é melhorar a ligação dessas partículas às células ou, ainda, explorar novas vias de internalização (GU *et al.*, 2007; QIAN, 2003; GABOR *et al.*, 2004).

Nanoestruturas de ouro apresentam propriedades ópticas características e, também, a facilidade de ligação a diferentes substratos, o que as torna um nanomaterial bastante atrativo. Nosso grupo de pesquisa tem se empenhado em desenvolver nanoestruturas capazes de auxiliar no diagnóstico e no tratamento de doenças que até então são de difícil controle. Demonstramos que o nanocomplexo possui estabilidade duradoura quando empregado em protocolos convencionais de marcação com anticorpos (ANDRADE et al., 2019). Entretanto, pouco se sabe sobre formas de avaliação do comportamento de nanoestruturas de ouro dentro das células utilizando a citometria de fluxo como ferramenta de análise, como elas contribuem para alterações nos perfis de tamanho e granulosidade e como as propriedades físicas das nanoestruturas de ouro podem potencializar a eficiência de fluorocromos.

Desta forma, uma investigação mais aprofundada dos fenômenos envolvidos em um possível incremento de fluorescência pelas nanopartículas de ouro pode auxiliar no desenvolvimento de um novo processo de marcação, tornando-o mais eficiente. Desenvolvemos este trabalho com o objetivo investigar o aumento da eficiência de detecção de fluorescência por citometria de fluxo, para reduzir a concentração de anticorpos comerciais, para melhorar a marcação e possibilitar a redução de custos. Esta característica favorecerá o aperfeiçoamento da detecção de moléculas

intracelulares pouco expressas e que emitem sinal de fluorescência de baixa intensidade que poderia levar a interpretação prejudicada na hora da análise dos resultados. Dentro deste contexto, concentramos nossos estudos em estabelecer um processo de bioconjugação das nanopartículas de ouro de maneira simples e econômica, e que melhore expressivamente a capacidade de detecção de moléculas extra e intracelulares. O melhoramento da técnica de citometria de fluxo reduzirá os custos na execução desta metodologia tornando-a mais acessível aos centros de pesquisas e aos laboratórios clínicos.

2.1.1 Introdução à Citometria de Fluxo

O primeiro registro da aplicação da citometria de fluxo foi em 1934, por Andrew Moldavan, onde a suspensão celular previamente marcada era pressionada através de um tubo capilar com luz incidente gerando uma microcorrente amplificada que possibilitava a contagem celular por um dispositivo fotoelétrico conectado à lente ocular de um microscópio (MOLDOVAN, 1934). O desenvolvimento do instrumento por Moldavan só foi possível pela existência prévia do microscópio que, historicamente, acredita-se ter sua origem em 1590, com a fabricação de lentes corretivas por dois holandeses: Hans Janssen e Zacharias Jansse. A origem propriamente dita das lentes é um tanto controversa e data-se do século, XI atribuída ao árabe Ibn al Haitham, sendo o termo microscópio criado em 1618 a partir de duas palavras gregas *Mikros*, pequeno e *Skopein*, observar (MUDRY, 2000).

Vários estudiosos destacaram-se no uso da microscopia. Em 1665, o inglês Robert Hooke realizou observações microscópicas gerando registros significativos em sua obra intitulada “Micrografia” (LAWSON, 2016). É importante salientar que Robert Hooke realizou modificações no microscópio que utilizava, introduzindo uma segunda lente ao equipamento, o que o tornou mais eficiente. Esse pesquisador também foi de suma importância para a ciência, pois a ele se deve o pioneirismo no uso da nomenclatura “célula” para descrever estruturas vazias em cortiça (MUDRY, 2000; ROSA, 2012).

Em 1666 Marcello Malpighi, na Itália, descreveu, perfeitamente, as camadas da pele e dois diferentes corpúsculos renais com uso da microscopia. Em 1674 o inventor Antonie van Leeuwenhoek, o mais conhecido dos usuários da microscopia, contribuiu com o melhoramento desse equipamento que era estruturalmente bem simples, composto por base fixadora para a amostra, um focalizador, uma lente de vidro única e apresentava a capacidade de ampliação de 300 vezes. Tal propriedade possibilitou a identificação de microestruturas com dimensões entre um e dois micrômetros. Nesse mesmo ano, Leeuwenhoek visualizou e caracterizou os glóbulos vermelhos do sangue (MUDRY, 2000). Em 1677, durante seus trabalhos de pesquisa, Leeuwenhoek visualizou e identificou a presença de espermatozoides no sêmen humano e, neste mesmo período, foi reconhecido como criador da microbiologia por sua grande contribuição na identificação e classificação das bactérias em três grupos distintos: cocos, bacilos e espirilos (ALTMAN, 2012).

Apesar de todas as descobertas celulares alcançadas durante este período, o reconhecimento da célula como uma unidade essencial da vida deu-se somente em 1839. No período de 1846 a 1893 houve uma grande evolução na microscopia pelo mecânico alemão, Carl Zeiss que introduziu o sistema de luz, oculares e lentes objetivas. Neste mesmo período, foi descoberto o primeiro corante sintético, a anilina roxa, por William Henry Perkin, possibilitando a distinção entre células brancas e vermelhas na utilização de corantes, e assim como alterações celulares frente a um estado de doença por Paul Ehrlich. Em 1891 Malanchowski e Romanowsky utilizaram azul de metileno como corante fluorescente para células o que auxiliou na identificação do protozoário *Plasmodium sp.* causador da malária (LILLIE, 1978).

No século XX, em 1940 o médico americano Albert Coons, desenvolveu inicialmente uma técnica para identificação da ligação antígeno-anticorpo na qual pode ser quantificada e identificada a presença destas proteínas em tecidos corados (COONS et al., 2013). Iniciou-se neste momento a aplicação da imunofenotipagem, em quando combinaram um anticorpo de antraceno com uma porção fluorescente, que na luz do dia produzia um azul fraco e, quando submetido à luz ultravioleta, emitia um azul intenso, demonstrando que este procedimento não interferia na especificidade da ligação para a detecção de *Streptococcus pneumoniae* (ROBERTS, 1957).

Frank T. em 1947, no período pós Segunda Guerra Mundial, desenvolveu um contador de aerossóis menores de $0,6\mu\text{m}$ de diâmetro para quantificar bactérias e esporos após o uso de armas biológicas. Essas estruturas causavam um pulso elétrico após serem interceptados por uma fonte de luz em um campo escuro e seu espalhamento frontal e lateral eram amplificados e captados por uma célula fotossensível (GUCKER *et al.*, 1947). Logo depois, em 1949, Wallace Coulter criou um dispositivo capaz de contar, rapidamente, partículas individuais em suspensão isotônica e que era alinhado, eletronicamente, entre as câmaras a passagem das hemácias, causando aumento da impedância elétrica do orifício proporcionalmente ao tamanho da célula (Figura 1). Essa criação gerou uma patente que foi concedida em 20 de Outubro de 1959 no *United States Patents Office* sob o número US2656508 A (Figura 1) (COULTER , 1949).

Figura 1: *Model A Coulter Counter*



Legenda: Primeiro contador de células desenvolvido por Wallace Coulter. Fonte: COULTER 1953.

Albert H. Coons e Melvin H Kaplan criaram, em 1950, o fluoróforo fluoresceína conjugada com isotiocianato (FITC) para detectar anticorpos em tecidos. Quando o material era levado ao microscópio de fluorescência, produzia uma coloração verde

após ser interceptado pela luz (COONS et al., 1942). James C. Parker e William R. Horst, desenvolveram em 1953 um dispositivo contador capaz de quantificar por cores, as células do sangue. O equipamento coletava a luz branca incidente sobre a amostra em suspensão e os sinais eram, então, distribuídos conforme intensidade e dispersão amplificadas, frontal e lateral, permitindo que os leucócitos e as hemácias fossem classificados conforme variações nesses parâmetros. A patente desse trabalho foi concedida em 24 de Setembro de 1957 no *United States Patents Office* sob o número US2807416 A “*Device for Automatically Counting Blood Cells*”(PARKER, 1957).

Robert Mellors e Reuben Silvers desenvolveram o primeiro *scanner* micro-fluorométrico. O princípio desta técnica baseava-se em aplicar células do colo do útero em uma lâmina e corar com uma solução fluorescente que era submetida à luz ultravioleta, onde as células normais produzem pulsos com curva mais estreita e com baixo sinal de fluorescência e as células tumorais, por apresentarem seu núcleo maior e hiper Cromático, produzem pulsos com curvas mais amplas e alto sinal de fluorescência (MELLORS et al., 1951). Crosland Taylor publicou em 1953 o artigo “*A Device for Counting Small Particles Suspended in a Fluid Through a Tube*”, em que as células são alinhadas dentro do fluido de solução salina e injetadas rapidamente sem formar turbilhonamento, o que poderia ocasionar dispersão das partículas e erro em sua contagem, em razão de sua abertura maior e, conseqüente, aumento da interceptação da luz (CRICK et al., 1953).

Em 03 de Março de 1959, a Jamer Parke e Willians Horst, foi concedida a patente registrada no *United States Patents Office* sob o número US2875666 A, “*Method of Simultaneously Counting Red and White Blood Cells*”, de um dispositivo capaz de injetar um volume conhecido de sangue. Este equipamento foi um ganho para o estudo e a prática clínica pela sua rapidez e reprodutibilidade em seus resultados (JAMES, 1959). Kamensky, em 1965, introduziu dois avanços importantes no uso da contagem celular: o desenvolvimento de um espectrofotômetro capaz de contar 500 eventos por segundo, o que possibilitou estimar o tamanho do conteúdo de DNA de diversas células do corpo e identificar as variações apresentadas por elas (KAMENSKY et al., 1965).

O Cytograph, (Figura 2), foi o primeiro equipamento a utilizar um laser para a identificação celular. Ele apresentava laser de HeNe com o comprimento de onda de 633nm de excitação e emissão e era capaz de identificar células vivas e mortas por apresentarem alterações em sua membrana, ficando permeáveis ao corante fluorescente azul de tripan (THOMPSON *et al.*, 2008).

Figura 2: Cytograph de 1970



Legenda: Equipamento do Laboratório de Citometria da Universidade Purdue. Fonte: ROBINSON, 2000. Modificado

Foi publicada a patente registrada no *United States Patents Office* US3705771 A de 12 de dezembro de 1972 e o detentor de uso desta tecnologia era a empresa Bio/Physics Systems (KAMENTSKY *et al.*, 1965).

Neste mesmo ano, Mack Fulwyler patenteou um dispositivo capaz de realizar a separação celular por sua característica de tamanho, onde as células encapsuladas por solução salina, após cessar a corrente elétrica eram desviadas para o tubo de coleta e depois de serem interceptadas por um laser a taxa de sobrevivência das células, no final do processo, era de alta qualidade (Figura 3). A tecnologia deste equipamento baseava-se no princípio da deflexão de gotas a “jato” de tinta

eletrostáticas de Richard Sweet, 1964, e coletadas em um reservatório anexo apresentando boa taxa de sobrevivência. Esta tecnologia é baseada nos sistema de aplicação a jato de tinta das impressoras largamente utilizadas nos dias de hoje (FULWYLER, 1965; FULWYLER, 1968).

Figura 3: Citofotômetro Super Dooper Sorter (SDS-1)



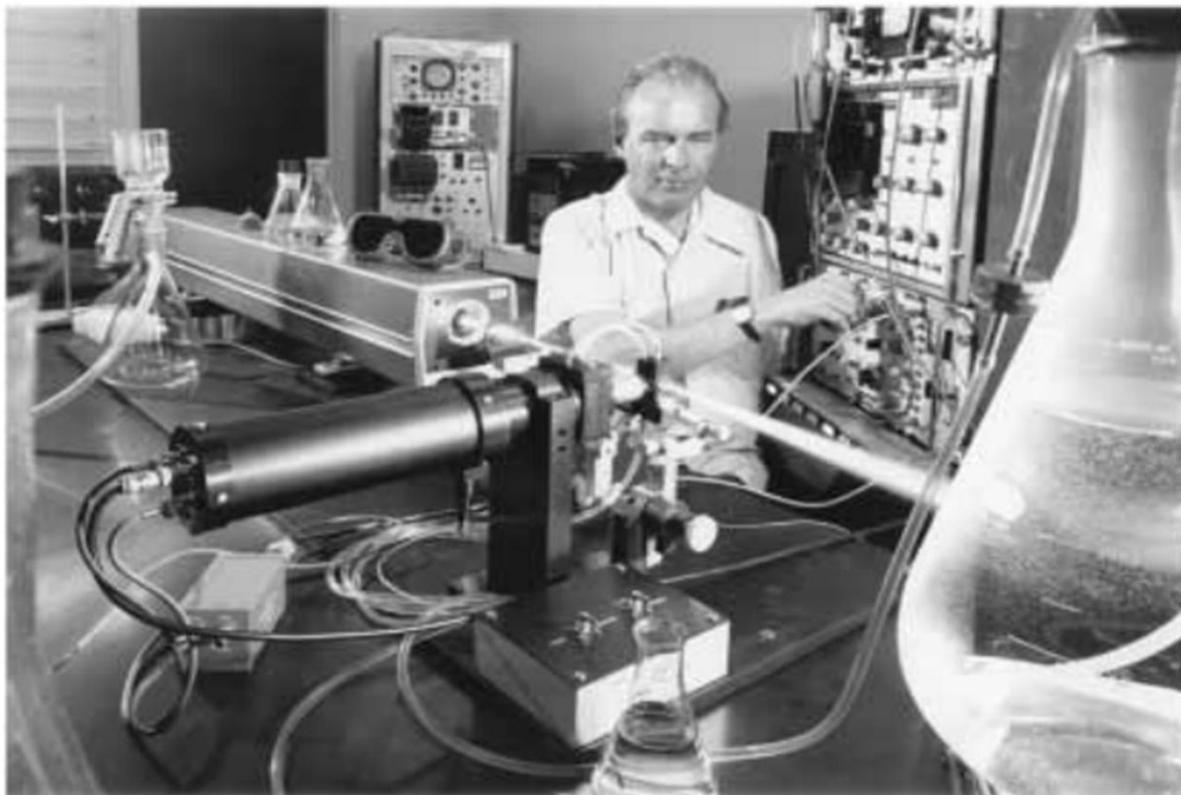
Legenda: (A) Equipamento desenvolvido por Fulwyler e comercializado em 1974 EPICS II B) Ilustração esquemática do sistema de separação e coleta celular criado por Fulwyler. Fonte: FULWYLER, 1968. Modificado

Bruce Hudson, em 1968, iniciou o uso do Iodeto de Propídio (PI) como sonda para quantificação do DNA circular mitocondrial de células tumorais, como alternativa ao uso do Brometo de Etídio (EtBr), técnica desenvolvida por Dittrich e Gohde (FERRAZ, 2014). Os testes de densidade de proteína realizados pelos pesquisadores na Alemanha demonstraram ser 1,8 vezes mais eficiente do que o EtBr (HUDSON *et al.*, 1969).

Marv van Dilla, em 1969, desenvolveu o primeiro citômetro de fluxo de alta velocidade. Este equipamento utiliza o princípio da focalização hidrodinâmica,

diferente dos sistemas anteriormente desenvolvidos e equipados com o laser de Argônio no comprimento de onda 488 nm (Figura 4) (VAN DILLA et al., 1969).

Figura 4: Livermore Flow Sorter em 1973.



Legenda: Marvin Van Dilla, *Lawrence Livermore National Laboratory*. Fonte: Givan, 2001.

O funcionamento do citômetro Livermore Flow Sorter baseava-se em microscopia de eixos de fluxo, iluminação e detecção ortogonal. Esta tecnologia era capaz de determinar a fluorescência do DNA marcado com o fluorocromo desenvolvido por Feulgen (VAN DILLA et al., 1969) e identificar as anormalidades em células tumorais (ELLISON et al., 1975).

Dittrich Wolfgang e Goehde Wolfgang depositaram a patente em 1969 no *The Patent Office* London GB1300585 A, publicada em 20 de Dezembro de 1972 (WOLFGANG, 1972), do Impulsocitômetro-ICP, (Figura 5), primeiro citômetro a ser comercializado pela Phywe AG em Göttingen. A tecnologia até, então, era conhecida como citofotometria e somente anos mais tarde passou denominar-se a citometria de fluxo (HEADQUARTERS, 2000).

Figura 5: Impulsocitômetro - ICP 11

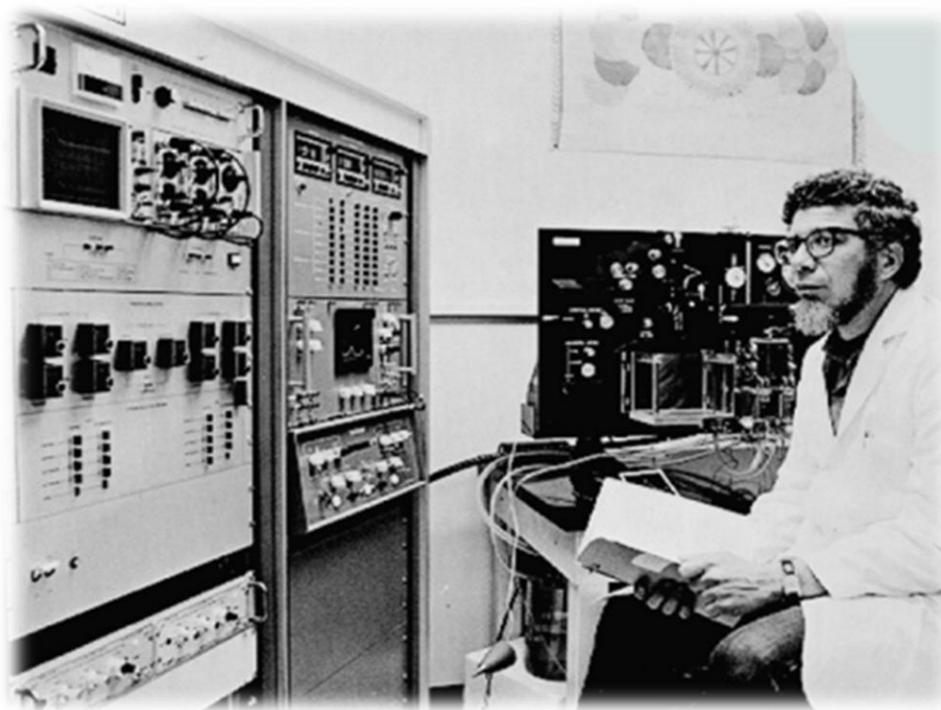


Legenda: Primeiro citômetro comercializado em 1969. Fonte: Arquivo da Universidade de Purdue, 1972.

No ano de 1969, Hullet, Bonner, Barret e Herzenberg, filiados ao Departamento de Genética da Escola de Medicina da Universidade de Stanford, na Califórnia, publicaram artigo *"Cell Sorting: Automated Separation Mammalian Cells as a Function of Intracellular Fluorescence"*, no qual propuseram uma metodologia, mais eficiente e menos laborosa, de segregação e coleta de diferentes tipos celulares, o que fez destes pesquisadores os pioneiros na utilização da marcação celular multi-paramétrica com substâncias fluorescentes. Embasados na capacidade de retenção de compostos fluorescentes (fluorocromasia) pela membrana celular em seu estado íntegro (ROTMAN et al.,1966), foi utilizado um híbrido do SDS-1 desenvolvido por Sweet e Fulwyler. Surge, neste momento, o FACS-I *"Fluorescence Activated Cell*

Sorter”, mas esta versão ainda não era tão eficiente em razão da fonte de luz utilizada pra excitação da amostra, pois a lâmpada de arco de mercúrio utilizada, emite sinais com baixas intensidades, (Figura 6). O modelo mais eficiente foi produzido e patenteado em 1972, como será apresentado adiante (HULETT et al., 1969).

Figura 6: FACS-I



Legenda: Leonard Herzenberg com FACS-I . Fonte: Edward Souza Stanford, 1974.

Em 1970 Kamentsky patenteou o dispositivo capaz de realizar separação celular de células vivas e mortas a partir do melhoramento do Cytograph. O uso do íon laser Argônio comprimento de onda 488 nm funcionando, em conjunto, com o laser HeNe no, Cytofluorograph, proporcionou a análise morfológica e da fluorescência do material em estudo. O Cytofluorograph realiza mais de 100.000 eventos por minuto e esta particularidade o classificava como um equipamento de alta sensibilidade (Figura 7) (KAMENSKY et al.,1974).

Figura 7: Cytofluorograph.



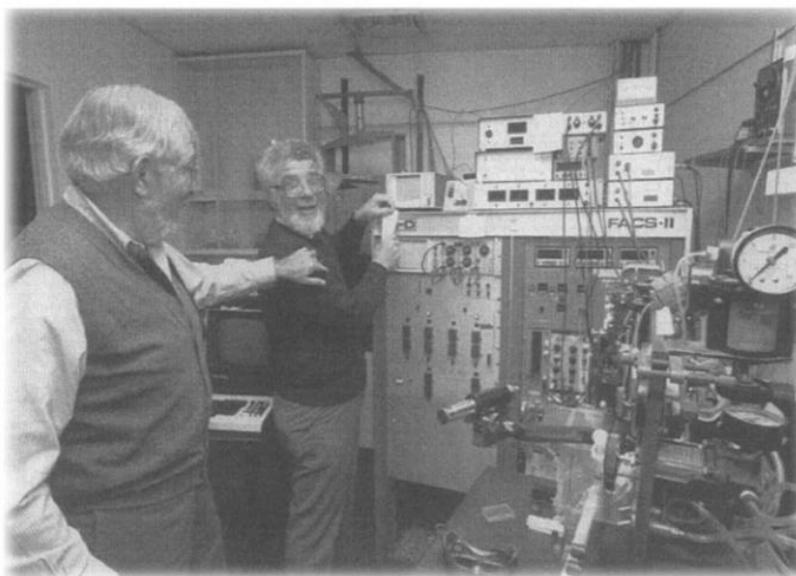
Legenda: Citômetro de fluxo comercializado pela Ortho Diagnostic Systems_{inc}, 1974.

Em 1971 iniciou-se uma concorrência pelo direito de produção da tecnologia desenvolvida por Fulwyler, de um lado a Bencton e Dickinson (BD) e do outro a Coulter, sendo esta última a detentora do direito total sobre a produção e comercialização deste dispositivo pela recém-criada *Particle Technologies* (PT). A *Particles Technologies* tornou-se uma grande fabricante de equipamentos hematológicos e, concomitantemente, foi criada a empresa Bencton e Dickinson Immunodiagnostic Systems, gerenciada por Bernie Shaw em parceria com Leonard Herzenberg, e que dominaria durante muitos anos a produção de citômetros de fluxo (ROBINSON, 2017).

Em 1972, Herzenberg, Melamed e colaboradores publicam o artigo "*Acridine Orange Metachromasia for Characterization of Leukocytes in Leukemia, Lymphoma, and other Neoplasms*" em que foi possível comparar e caracterizar as alterações nucleares e citoplasmáticas em células neoplásicas expostas ao corante Orange, quando analisadas no Cytofluorograph e irradiadas pelo laser azul. No resultado biparamétrico obtido, as células normais apresentam fluorescência vermelha e as neoplásicas apresentam dispersão fluorescente verde, havendo diferença de expressão nos diversos tipos de cânceres analisados (KOHLENER, 1975). Herzenberg em 1972, introduziu no separador celular anterior a fonte de luz usada por van Dilla, o laser Argônio 488nm, aumentando, substancialmente, a resolução do sinal emitido

pelas sondas fluorescentes (HERZENBERG et al., 1976; SHAPIRO, 2004). Herzenberg cria um novo termo que passará então a identificar este dispositivo pela abreviação FACS, do inglês *Fluorescence-Activated Cell Sorting*. Em 1974, juntamente com a *Leland Stanford Junior University*, patentearam esta tecnologia e transferiram para a empresa Bencton & Dickinson o direito de comercialização do citômetro por eles construído. Neste mesmo ano é comercializado o primeiro equipamento denominado FACS-II, (Figura 8).

Figura 8: FACS-II



Legenda: Primeiro citômetro comercializado pela Bencton e Dickinson. Bernard Shoor engenheiro da BD e Leonard Herzenberg. Fonte: HERZENBERG et al., 1976.

Crissman H., 1974, desenvolveu um método capaz de estudar o ciclo celular em 20 minutos, acrescentando na cultura a droga antitumoral Mitramicina que age inibindo a síntese de RNA e intercalando-se ao DNA, emitindo fluorescência proporcional ao a quantidade deste ácido nucléicos encontrados nesta cultura (CRISSMAN et al., 1974).

Em 1975 George Köhler e Cesar Milstein, no MRC Laboratory of Molecular Biology da Universidade Cambridge, desenvolveram um método para produção de anticorpos monoclonais (Mabs) a partir da hibridização de células sanguíneas mielóides tumorais, que possuem alta capacidade de crescimento e linfócitos B do baço de camundongos, previamente imunizados com sangue de ovelha, produzindo

grande número de clones idênticos em cultura celular (GEORGES, 1975). Submeteram o artigo onde descreviam inteiramente a descoberta, porém a revista Nature julgou não ser de interesse público a pesquisa desenvolvida por eles, não realizando a sua publicação.

A falta de experiência na área de proteção de suas invenções também retirou deles o direito de patentear esta metodologia, uma vez que as leis de registro não permitiam a proteção de invenções previamente divulgadas (TANSEY et al., 1995). O reconhecimento desta grande contribuição de Köhler e Milstein para imunologia veio quando receberam parte do prêmio Nobel de 1984 em medicina e fisiologia. A citometria passou a ser aplicada nas diversas áreas da biomedicina. Gray em 1975, realizou pela primeira vez a cariotipagem por citometria de fluxo, usando os corantes EtBr, PI e Hoechst. A quantificação do conteúdo de DNA por cromossomo foi realizada utilizando o *sorter* de van Dilla, e o software CYDAC desenvolvido em 1960 por pesquisadores do *Lawrence Livermore National Laboratory* (GRAY et al., 1975).

Raul Curbelo, em 1976, publicou o artigo “*A Generalized Machine for Automated Flow Cytology System Design*” (CUERBELO et al., 1976), em que já se demonstrava a capacidade de se detectar 8 parâmetros em uma única célula utilizando, apenas, uma fonte de luz, a lâmpada de mercúrio. Este equipamento foi uma adaptação do equipamento desenvolvido na *Block Engineering Cambridge, Massachusetts*, EUA, entretanto esta tecnologia ficou, somente, nos laboratórios desta universidade, servindo como objeto de estudo para desenvolvimento de outras tecnologias (SHAPIRO, 2004).

A necessidade de se detectar co-expressão de antígenos em uma mesma célula é desafio que vem sendo desvendado pela microscopia de fluorescência e a citometria de fluxo parecia muito promissora para ser utilizada como mais uma ferramenta para este estudo e foi então, que Michael Loken, em 1977, ousou testar a detecção de dois antígenos empregando um único laser de Argônio. A aplicação de mais de uma fluorescência gera a necessidade de se retirar as suas sobreposições (compensação) antes das análises. A realização desta compensação manual é muito trabalhosa foi então, que, Loken desenvolveu a compensação eletrônica. A

compensação fundamentava-se no controle do ruído eletrônico gerado pelos corantes, ao serem excitados pelo laser e gerando vazamento em outro canal de detecção. Este problema foi sanado acoplando parte de sinais de fluorescência para um canal acessório (LOKEN, 1977). O alto potencial de aplicação da citometria de fluxo fez com que mais um equipamento chegasse ao mercado. A *Coulter Eletronic*, empresa fundada pelos irmãos Wallace e Joseph Coulter em 1958, iniciou em 1977 a comercialização do seu primeiro citômetro de fluxo separador, *Electronically Programmable Individual Cell Sorter* – EPICS (COULTER, 1970).

O acesso a esta tecnologia trouxe novas possibilidades de uso A os citômetros de fluxo. Inúmeras técnicas começaram a ser testadas aplicando a citometria de fluxo, dentre elas o uso do Alaranjado de Acridine e RNase para caracterizar as fases do ciclo celular, utilizando o equipamento Cytofluorograf (DARZYNKIEWICZ *et al.*, 1977). Microesferas foram utilizadas em citometria de fluxo pela primeira vez no FACS-II por David R. Parks e Herzenberg em 1979. Estas micropartículas eram, até então, aplicadas em microscopia eletrônica de varredura (SEM) (PARKS *et al.*, 1979).

Visser, em 1979, desenvolveu uma técnica específica para determinação do pH intracelular, que determina a possibilidade do transporte transmembrana (VISSER *et al.*, 1979) e Michael Andreeff, em 1980, utilizou pela primeira vez a citometria de fluxo como método para classificação de leucemias pelo nível de ploidias, a distribuição entre células normais e leucêmicas em todas as fases do ciclo celular e comparação das medianas de fluorescências entre RNA e DNA, aquisição realizada no equipamento FC200 (ANDREEFF, *et al.* 1980).

A adaptação da citometria de fluxo a metodologias e reagentes, até então existente, tornava-se cada vez mais comum. Neste momento mais um fluoróforo foi adaptado à citometria de fluxo, o corante extraído de algas e cianobactérias com grande capacidade de absorção de luz. Este trabalho foi desenvolvido por Vernon T. Oi, enquanto fazia seu pós-doutorado no laboratório de Herzenberg e publicado em 1982. Nele foram descritas as propriedades das ficobilinas que foram conjugadas a uma proteína com atividade biológica. A partir deste composto derivou-se vários

outros fluorocromos utilizados posteriormente como a R-Phycoerytrina (R-PE) e a Alociocianina (APC) (OI et al., 1982).

Seguindo a linha de estudo de Gray, 1975, que empenhava-se na cariotipagem por citometria, Weller e Wheelless associaram a técnica de “*slit-scan*” de análise bidimensional por microscopia, técnica desenvolvida por Cambier, 1979, que analisava as células com anormalidades nucleares em estudo citopatológico com a citometria de fluxo, utilizando o sistema de focalização hidrodinâmica a fim de estabilizar a leitura e aumentar o número de células analisadas por segundo (WELLER, 1982).

Novos fluoróforos foram desenvolvidos com o aumento do número de lasers instalados no citômetro. Os corantes R-PE e APC foram criados por Oi e colaboradores, em 1982, e patenteados posteriormente por Lubert Stryer em 1983 no *United States Patents Office*, publicado sob o número US4542104 A de 17 de Setembro de 1985, sendo que os detentores de uso desta tecnologia eram The Board of Trustees of the Leland Stanford Jr. Universidade de Stanford, Califórnia (LUBERT, 1985).

Explorando ainda mais as possibilidades de aplicação da citometria de fluxo, Hedley, em 1983, utilizou suspensão de células tumorais extraídas de blocos de parafina para análise do conteúdo de DNA no equipamento TPS-2 (HEDLEY *et al.*, 1983).

A citometria de fluxo, com toda a sua potencialidade, passou a ser uma ferramenta de interesse de vários fabricantes e as atualizações e novos modelos foram surgindo quase que anualmente. Junto com ela, outros setores estavam diretamente ligados a esta tecnologia, por exemplo, a biotecnologia e a informática, pois para cada modificação sofrida exigia-se um computador, softwares de aquisição e análise de alta eficiência, capazes de captar, processar e armazenar todas as informações produzidas. A fim de dirimir este inconveniente, MURPHY e seus colaboradores em 1984, propuseram um padrão de arquivo de dados, que seria a extensão FCS.1.0, reunindo vários algoritmos gerados no momento da aquisição, que enfim, poderiam ser avaliados em outros sistemas operacionais.

O desenvolvimento computacional dos citômetros e, principalmente, a capacidade de análise em uma única célula de múltiplos parâmetros e com menor interferência de autofluorescência incentivou a busca de novos fluoróforos. Foi então que, Southwick et al., 1990 introduziram o uso do isotiocianato (Cy) derivado dos fluorescentes cianinos nas pesquisas por citometria de fluxo. Phillip Southwick, em 1990, publicou seu artigo utilizando carboximetilindocianina com afinidade por proteínas ou a qualquer grupamento amina com emissão superior aos Cy. Este feito abriu a possibilidade de uso para dupla marcação sem sobreposições de comprimentos de ondas (SOUTHWICK *et al.*, 1990).

Em 1991 Landsdorp e colaboradores, utilizaram um citômetro configurado com um único laser de Argônio 488nm para detectar três fluorescências, incluindo o novo corante conjugado ao PE o cianina pentamentina (Cy5), funcionando por transferência de energia entre eles e resultando em emissão com maior intensidade do que o PE (LANSDORP *et al.*, 1991) .

Mujumdar e colaboradores, 1993, modificou os corantes descritos anteriormente alterando seus grupos funcionais, neste caso, o éster succinimidílico com capacidade de conjugação variável podendo ser excitado por um maior número de lasers podem ser utilizados em microscopia e em citometria de fluxo (MUJUMDAR et al., 1993). Neste mesmo ano foi publicada, a primeira patente pelo *United States Patents Office*, sob o número US5272354 A, de 21 de Dezembro de 1993, um equipamento capaz de produzir imagens de partículas em fluxo, sendo que os detentores de uso desta tecnologia eram Toa Medial Electronics Co., Ltd., Kobe, Japão (KOSAKA, 1992).

Ger van den Engh, em 1994, introduziu o melhoramento da tecnologia de separação celular no modelo MoFlo[®], fabricado pela Cytomation, de alta velocidade de fluxo, separando até 25.000 partículas por segundo, capacidade cinco vezes maior do que os modelos anteriores e o equipamento de escolha por sua alta capacidade de separação dos cromossomas no Projeto de Genoma Humano (SHAPIRO, 2003). A ampliação do número, modificação e refinamento do sistema de arrefecimento dos *lasers*, assim como a expansão do sistema óptico, motivou o desenvolvimento de outros fluoróforos em tandem com espectro de emissão acima 700nm, mais

eficientes para serem aplicados conjuntamente com o Aloficocianina (APC) e ficoeritrina (PE). A construção destes corantes se deu a partir de 1996 por Roederer e colaboradores, introduzindo os fluoróforos PeCy7, APCCy7 e PeCy5 (ROEDERER *et al.*, 1996).

Em apenas um ano a tecnologia evolui de tal maneira que já era possível detectar 8 fluorescências e 10 parâmetros no total, exigindo uma tecnologia computacional ainda mais avançada que possibilitava a compensação eletrônica, uma vez que a manual estava ficando quase inviável de ser realizada. O equipamento utilizado foi um híbrido que reunia as melhores tecnologias dos citômetros e separadores celulares disponíveis para alcançar tal desempenho (ROEDERER *et al.*, 1997). Neste mesmo ano foi publicada pelo United States Patents Office, a patente “*Uses of Green-Fluorescent Protein (GFP)*” sob o número US5491084 A de 13 de Fevereiro, o método para monitorar a atividade gênica de células vivas que expressam esta proteína foi desenvolvido por Chalfie Martin (CHALFIE MARTIN, 1996).

A proteína GFP, que é extraída da água-viva *Aequorea victori*, foi primeiramente purificada e descrita em 1962 por Shimomura *et al.* Amplamente utilizada em técnicas de fluorescência, foi aplicada pela primeira vez em citometria de fluxo por Anderson, M.T. e colaboradores em 1996, para detectar, distinguir e, principalmente, quantificar genes mutantes que expressam esta molécula em seu DNA (ANDERSON *et al.*, 1996).

Bruchez JR., em 1998, infere a possibilidade do uso de quantum dots (QDs), nanopartículas semicondutoras com propriedades distintas, quando em estado macroscópico à citometria de fluxo, pelo seu potencial de armazenamento de energia, emissão sintonizável, regulado pelo seu diâmetro e excitação simultânea. Todas estas qualidades conferem a estas nanopartículas maior reprodutibilidade, uniformidade e precisão com discreta possibilidade de sobreposição quando multiplexados para ensaios biológicos (BRUCHEZ JR., 1998).

A corrida pela introdução de novos fluoróforos, melhores equipamentos, com capacidade de detecção de mais de 10 parâmetros de fluorescência além das informações físicas e morfológicas está longe de se esgotar. Em 2001, Stephen C.

Rosa e colaboradores, empregaram 11 fluorescências no equipamento desenvolvido por ROEDERER M. (1997) e utilizaram o software Flowjo para análise e compensação em sua pesquisa e imunofenotipagem das respostas celulares frente ao HIV (ROSA *et al.*, 2001).

Pouco mais de 10 anos se passaram desde que, Tokihiro Kosaka e colaboradores produziram o primeiro citômetro de fluxo que capturava imagens de células em fluxo, até que a patente depositada pela empresa Amnis Corporation, foi concedida. O depósito foi realizado em 29/03/2000 no *United States Patent*, e publicado em 03/04/2001 sob o número US 6211955 B1 (BASIJL *et al.*, 2001). O equipamento desenvolvido por David Basiji e Willian Ortyn, era capaz de captar imagens de partículas raras em fluxo. A detecção e análise destas partículas só eram possível em um equipamento que agrupasse características como, medição em alta velocidade, processamento de elementos com grandes dimensões, alta resolução espectral, boa resolução espacial, alta sensibilidade e baixa variabilidade de medição (BASIJL *et al.*, 2005) (Figura 9).

Figura 9: Amnis ImageStream® 100



Legenda: Citômetro de fluxo com que gera imagens em tempo real das partículas adquiridas. O Amnis ImageStream® 100 foi um equipamento comercializado em 2006. Fonte: (AMNIS, 2006)

Em 2005 chegou ao mercado o *COPAS™ BIOSORT System*, dispositivo capaz de analisar e separar partículas com grandes dimensões, primeiramente descrito por Galbraith D.W., 1992 e desenvolvido pela *Harvard Bioscience, Inc.*, analisando grãos de pólen e embriões de *Zebra Fish* (Figura 10). Esta tecnologia tornou-se mais uma ferramenta para quantificação do tamanho do genoma vegetal, analisando múltiplos eventos por segundos (BIOMETRICA, 2005).

Figura 10: COPAS™ BIOSORT System



Legenda: O COPAS™ foi desenvolvido com base na citometria de fluxo convencional, entretanto esta tecnologia possibilita a análise de partículas com dimensões aproximadas de 40 a 1.200 μm . Fonte: (BIOMETRICA, 2005).

Por ser ampla a diversidade do campo de aplicação da citometria, sua contextualização histórica apresenta-se extensa e variável. O que pode ser evidenciado nos esforços para inserir o uso de nanomateriais em especial, os QD's,

no estudo de sequencias específicas do DNA por Wang, em 2006. A busca pelo melhoramento desta tecnologia não parou por aqui e atualmente ainda há investimentos no melhoramento da capacidade de detecção, maior velocidade de aquisição e processamento das informações adquiridas de modo o mais automatizado possível.

2.1.1.1 Conceitos em Citometria de Fluxo

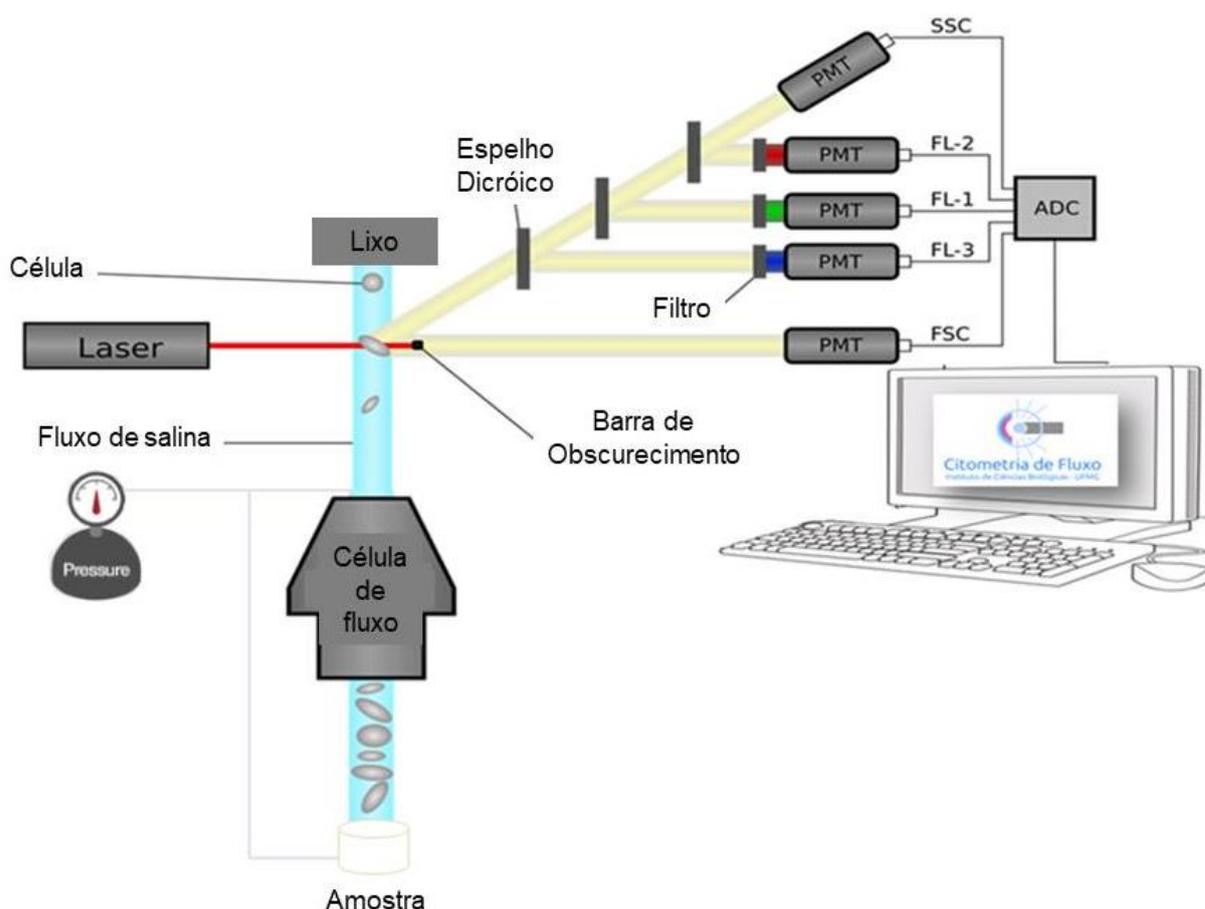
A citometria de fluxo baseia-se na aplicação de um feixe de luz de intensidade constante incidente sobre uma partícula em suspensão de tamanho variável de 0.5 ~ 100 μm , marcada com fluoróforo e transportada por solução isotônica em fluxo de focalização hidrodinâmica em equipamentos convencionais. O espalhamento de luz está relacionado diretamente com suas propriedades morfológicas e estruturais e a fluorescência emitida é proporcional ao comprimento de onda relacionado ao fluoróforo ligado à partícula em estudo (BRAGA et al., 2016).

A amostra, em suspensão, é colocada na porta de injeção de amostra ((SIP) do inglês *sample injection port*), em seguida o tubo é então pressurizado pela bomba pneumática impelindo as partículas para alcançarem a célula de fluxo ou câmara de focalização hidrodinâmica e, através do bico ejetor, essas partículas são conduzidas e alinhadas pela solução de transporte do sistema para a região onde ocorrerá a interceptação do laser sobre cada evento individualmente. A seguir, ao ser interceptada pela fonte luminosa, a partícula emite fluorescência em vários comprimentos de ondas que são detectados e filtrados em seus respectivos conjuntos de filtros e espelhos(BD BIOSCIENCES, 2016).

Em seguida, os sinais luminosos gerados são convertidos em pulsos elétricos amplificados e direcionados à placa analisadora da altura do pulso, gerando um algarismo binário de altura proporcional ao pulso elétrico. O pulso gerado é convertido em dados analógicos em equipamentos mais antigos, ou digitais, nos citômetros mais novos, e decodificados em software específico, capaz de reproduzir Gráfico mono / biparamétrico, informações físicas, químicas e biológicas de cada célula, em função da intensidade de fluorescência e da luz dispersa. O

espalhamento da luz frontal (FSC) revela principalmente o tamanho da partícula, entretanto, seu espalhamento de luz lateral (SSC) ou ortogonal é variável, acompanhando seu grau de complexidade interna e a intensidade de fluorescência dos marcadores. O citômetro é constituído por quatro elementos estruturais principais: sistema fluídico ou hidrodinâmico, sistema óptico, sistema eletrônico e o computacional. Será apresentado a seguir, de maneira resumida, cada componente e sua função (BD BIOSCIENCES, 2016). O Esquema 1 representa um exemplo de citômetro de fluxo.

Esquema 1: Citômetro de fluxo



Legenda: O sistema hidrodinâmico responsável por injetar a amostra e a solução de transporte, através do capilar de aspiração. O sistema óptico com a fonte de excitação e seus respectivos detectores de espalhamento lateral e frontal. O sistema eletrônico converte os sinais de fluorescência em pulsos elétricos e o sistema de computacional do citômetro de fluxo. Adaptada de O'NEILL et al., 2013.

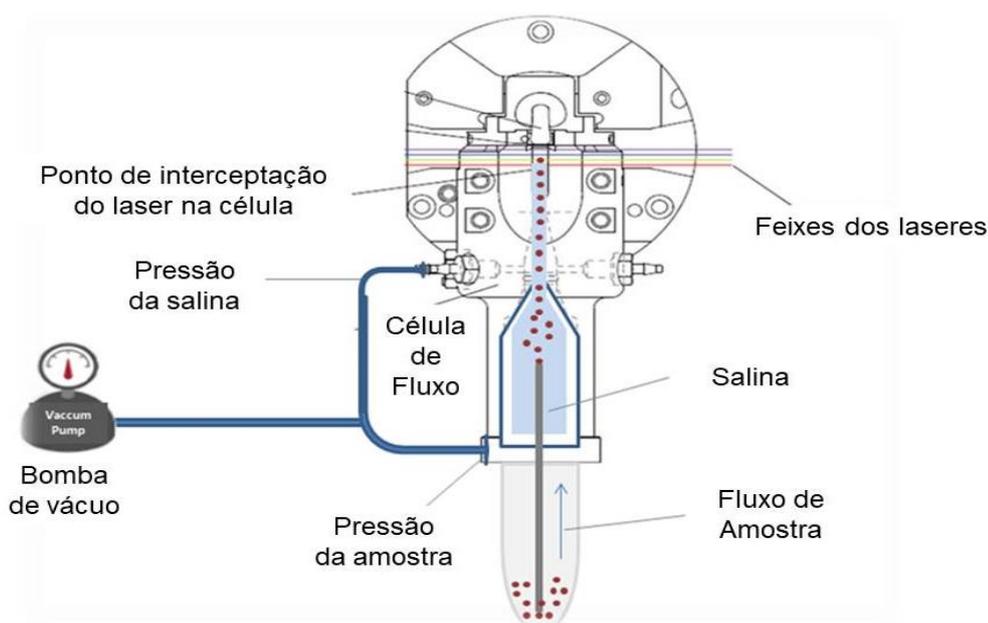
2.1.1.2 Sistema Fluídico

Controla o fluxo da amostra durante a análise. O sistema fluídico ou de focalização hidrodinâmica é composto pelos subsistemas:

- Bomba de pressão (válvulas e restritores de fluxo)
- Porta de injeção de amostras (SIP)
- Célula de fluxo
- Solução isotônica

O processo inicia no momento da conexão do tubo contendo amostra na SIP acionando a bomba de deslocamento positivo (BRASIL, 2013), ligada ao tanque de salina, elevando sua pressão e, ao mesmo tempo, no tubo de amostra, é gerado um vácuo impelindo-a através da agulha de aspiração (revestida por solução isotônica) até alcançar a célula de fluxo. A célula de fluxo é o ponto onde há convergência dos lasers e encontra-se preenchida com solução isotônica, igualmente pressurizada, que exerce tensão sobre as partículas alinhando-as individualmente até o ponto de interceptação pelo laser e, por fim, é conduzido ao reservatório de descarte. Caso o equipamento seja um separador celular o fluxo será direcionado aos tubos coletores (BRASIL, 2013) (Esquema 2).

Esquema 2: Sistema fluídico



Legenda: Estrutura do sistema de focalização hidrodinâmica de um citômetro de fluxo. Adaptada de BECTON, 2006.

2.1.1.3 Sistema Óptico

A parte óptica é composta pela fonte de excitação podendo ser uma lâmpada de arco diodo ou laser, filtros ópticos que atenuam uma faixa específica de radiação, podendo ser *band pass*, *short pass* e de densidade neutra, utilizada para reduzir a intensidade luminosa, os prismas para alinhar e filtrar interferentes no caminho do laser e o sistema de coleta do espalhamento da luz, composto por lentes, espelhos, filtros que direcionam os comprimentos de ondas para os fotodetectores, transdutores de detecção óptica, geralmente são utilizados o fotodiodo e o tubo fotomultiplicador. A eficiência do espalhamento de luz lateral e a de fluorescência são de baixa intensidade exigindo a presença de um dispositivo capaz de amplificar este sinal à uma escala entre 10^5 e 10^7 do fator de multiplicação (NICHOLSON, 1974).

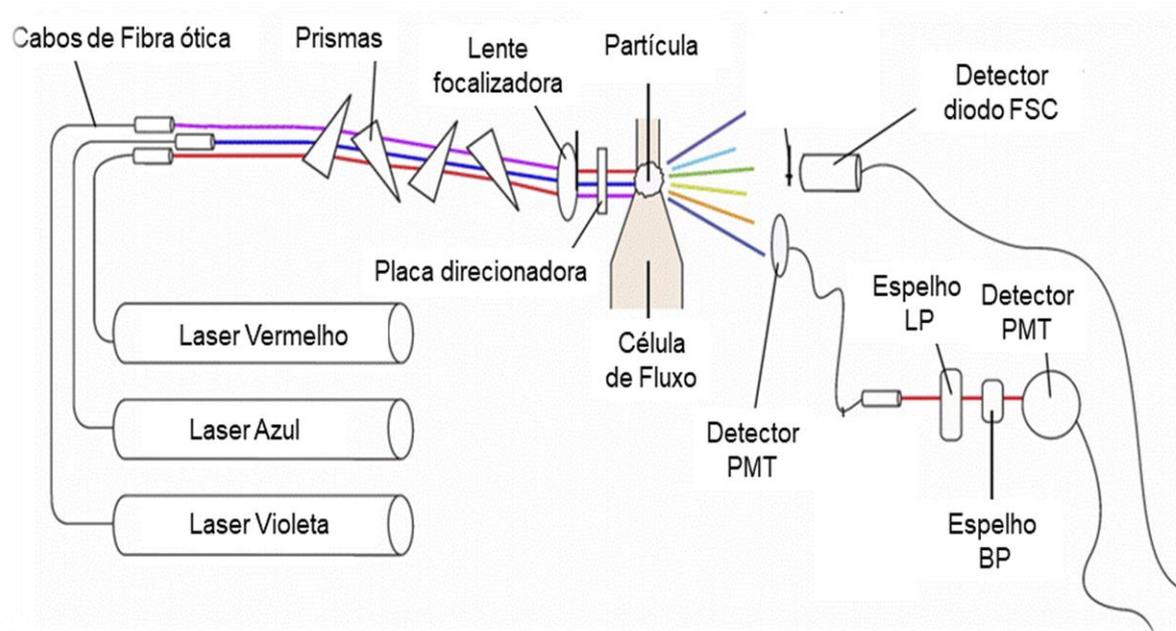
- **Excitação**

A ótica de excitação consiste em vários lasers de comprimento de onda fixo, separados espacialmente na célula de fluxo. Cada lente focaliza a luz do laser na célula de fluxo da cubeta acoplada ao gel (BECTON, 2006).

- **Emissão do sinal de fluorescência**

Os sinais de emissão são transmitidos da célula de fluxo para as matrizes do detector que serão filtrados do maior para o menor comprimento de onda conforme a configuração de cada equipamento (BECTON, 2006).

Esquema 3: Sistema óptico.



Legenda: Sentido do caminho da luz no citômetro de fluxo biparamétrico, apresentando o laser de excitação, o sistema de detecção do espalhamento frontal, o de detecção do espalhamento lateral. Adaptada de BECTON, 2006.

2.1.1.4 Sistema Eletrônico

O sistema eletrônico converte a potência luminosa gerada após a interceptação do laser sobre a partícula que é proporcional às características apresentadas no momento da aquisição em sinal eletrônico com alta impedância de saída. A digitalização do sinal eletrônico pelo fotodetector que capta, convencionalmente, a dispersão luminosa frontal tem baixa amplitude que é resolvida pela presença do fotomultiplicador. Para que seja favorável sua conversão em sinal eletrônico a luz é amplificada no fotomultiplicador (PMT) específico para cada comprimento de onda direcionado (BECTON, 2006).

2.1.1.5 Sistema Computacional

O sistema computacional coleta o sinal eletrônico do fotodiodo e do fotomultiplicador e os converte em dados digitais que possibilita sua análise em programas específicos de análises (BECTON, 2006).

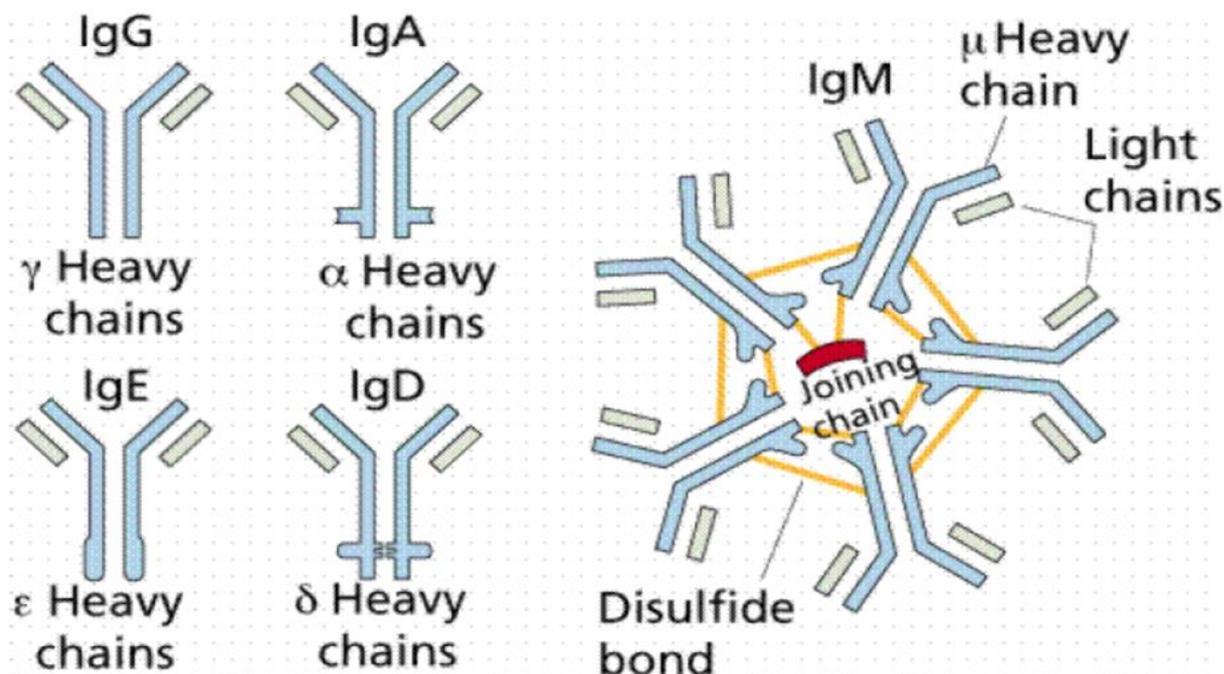
2.2 Anticorpos

Os primeiros relatos quanto ao uso dos anticorpos (Ac) foram em 1830 por Behring e Kitasato onde descreveram que proteínas específicas conferiam proteção contra substâncias tóxicas produzidas por bactérias (KANTHA, 1991). Paul Erlich em 1908 definiu pela primeira vez os receptores celulares, assim como, descreveu detalhadamente as características morfológicas dos leucócitos. As imunoglobulinas (Ig), mais conhecidas como anticorpos (Ac), são denominadas “G” por serem encontradas na região das globulinas em gel de eletrofose.

As imunoglobulinas são glicoproteínas encontradas no plasma, saliva, lágrima, muco e na superfície das células sendo as maiores responsáveis pela resposta imune no organismo. As Ig's possuem funções de ligação a um antígeno específico e função efetora sendo elas fixação do complemento e ligação a células específicas: fagócito, linfócitos e basófilos (GARC, 2013).

As Ig's são constituídas por duas cadeias leves do tipo λ ou κ idênticas (23kD) e duas cadeias pesadas também idênticas (50-70kD), pontes dissulfeto, regiões variáveis e constantes, região da dobradiça, domínios e oligossacarídeos. As imunoglobulinas podem ser divididas em 5 subclasses sendo diferenciadas pela modificação da sequência de aminoácidos da sua cadeia pesada. A imunoglobulina G possui cadeia pesada do tipo γ , a IgM possui cadeia pesada do tipo μ , a IgA possui cadeia pesada do tipo α , a IgE possui cadeia pesada do tipo ϵ e a IgD possui cadeia pesada do tipo δ (MOLINARO et al., 2009) (Figura11).

Figura 11: Estruturas das imunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgE e IgD.

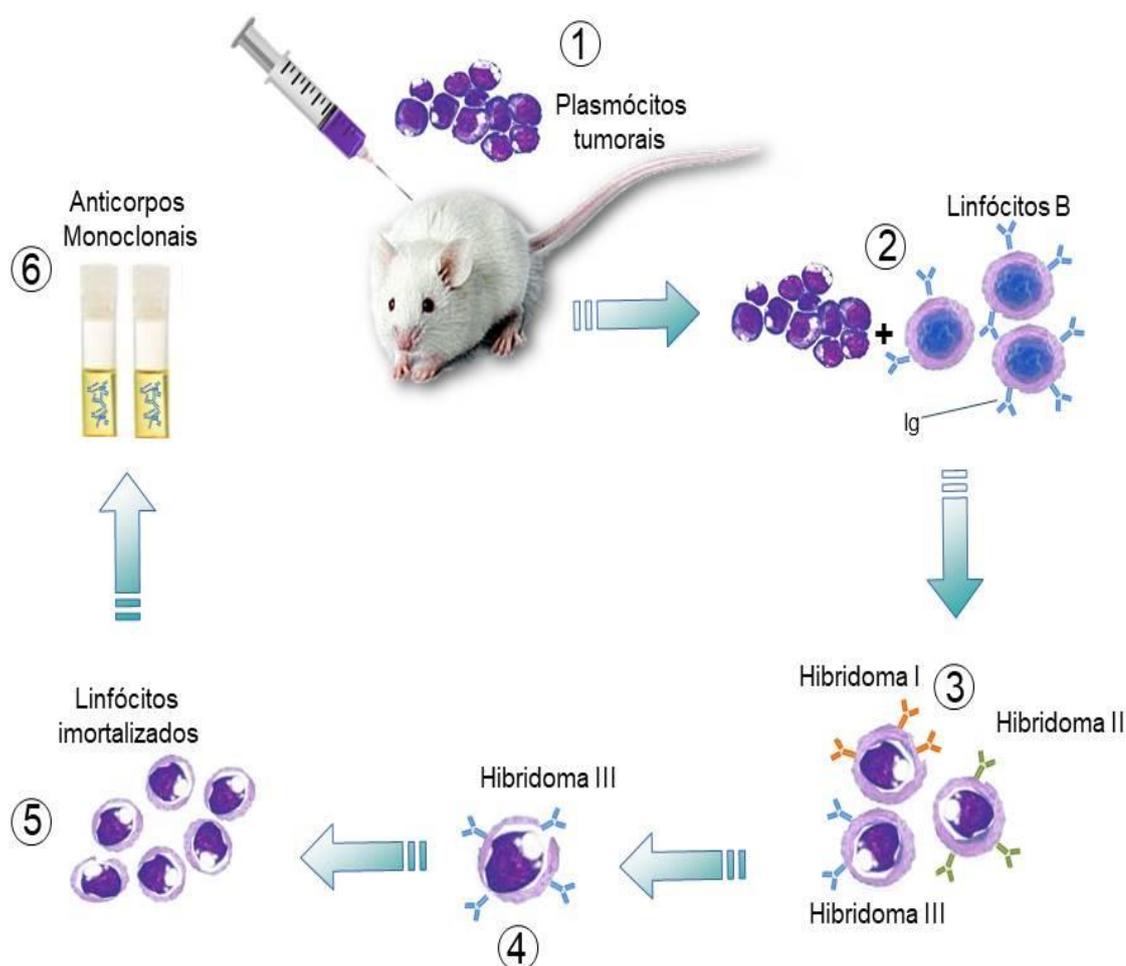


Fonte: (ROITT, 2018).

2.2.1 Anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais são desenvolvidos em laboratório com especificidade para um epítipo específico do antígeno. Esta especificidade faz dos anticorpos monoclonais os mais confiáveis para uso em imunodiagnóstico e imunoterapias. Em 1975 Georges J. F. Köller e César Milstein produziram os primeiros anticorpos monoclonais pela técnica de hibridização. O processo de hibridização consiste, resumidamente, na fusão dos esplenócitos de camundongos imunizados com antígenos específicos com células plasmocíticas tumorais. A partir deste modelo foi possível, também, desenvolver os anticorpos quiméricos que combinam em sua estrutura, a constituição de uma porção variável do anticorpo de camundongo e a região constante do antígeno (ROSALY *et al.*, 2006). A produção da variedade de anticorpos comerciais utilizados em pesquisa, diagnóstico e imunoterapia é baseada no processo onde, linfócitos do tipo B são fundidos com células tumorais e passam a produzir anticorpos específicos indefinidamente, e estas células são conhecidas como linfócitos imortalizados (ROSALY *et al.*, 2006)(Esquema 4).

Esquema 4: Processo de produção de anticorpos monoclonais



Legenda: (1) Plasmócitos tumorais são inoculados no camundongo desencadeando a produção de linfócitos B produtores de anticorpos anti-células tumorais. (2) Os esplenócitos tumorais do camundongo são coletados. (3) Linfócitos B são cultivados em conjunto com plasmócitos tumorais onde ocorre a fusão produzindo hibridomas produtores de anticorpos. (4) Seleção de hibridomas produtores de anticorpos. (5) Hibridomas imortalizados produzem anticorpos indefinidamente, o tempo médio de vida destas células em cultura são de 2 semanas. (6) Anticorpos monoclonais. Fonte: REIS, 2019.

2.3 Cetuximabe breve histórico

A descoberta da glicoproteína conhecida como *Eythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog* (ErbB) ou fator de crescimento epidérmico (EGF) um dos membros da família de receptores de membrana, ocorreu em 1984 pelo médico John Mendelsohn e seus colaboradores. Este grupo de pesquisadores foram pioneiros no desenvolvimento de células secretoras de anticorpos monoclonais

quiméricos C225 ou cetuximabe (cMAb 225), que se ligam ao receptor EGF (GOLDSTEIN et al., 2006). Este anticorpo é capaz de inibir o desenvolvimento de células tumorais que expressam o EGFR em sua membrana. A patente deste método de produção de anticorpos foi registrada no *United States Patents Office* em 01 de Março de 1984 e publicada em 24 de Julho de 1990 sob o número US4943533 A, sendo o detentor de uso desta tecnologia a Universidade da Califórnia (MENDELSON et al., 1990).

Em 2004, foi aprovada a patente depositada pela empresa *ImClone Systems Incorporated*, da medicação intravenosa cetuximabe, para imunoterapia de pacientes com resultados positivos de tumores que expressam EGFR em suas células (GOLDSTEIN et al, 2006).

Esforços estão sendo feitos desde em busca da melhor forma de estocagem (MAHLER et al., 2005) e combinações de terapias a fim de tratar e aumentar a sobrevida dos pacientes oncológicos.

2.4 Nanociência e Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma ciência que permite a manipulação e fabricação de materiais em escala nanométrica 10^{-9} metro. O conceito de nanopartículas e sua utilização para entrega direcionada de fármacos foi inspirada no termo “*Magic Bullets*” criado por Paul Ehrlich em 1913 (KREUTER et al., 2007). A denominação nanotecnologia surgiu, pela primeira vez em 1959, em uma reunião anual da Sociedade Americana de Física, onde Richard Feynman ministrou uma palestra denominada “*There’s Plenty of Room at the Bottom*”, onde incentivava a manipulação de materiais em escala atômica (FEYNMAN, 1959). Esta característica proporciona grandes perspectivas para utilização de nanoestruturas na área biomédica (NARENDRA, 2016).

A nanobiotecnologia envolve o desenvolvimento de tecnologias como produtos farmacêuticos e dispositivos eletrônicos na, escala nanométrica, para diagnóstico e tratamento de patologias. A escala da nanotecnologia é definida pela Iniciativa Nacional de Nanotecnologia dos Estados Unidos (NNI) para promover o

desenvolvimento da pesquisa em nanotecnologia, como "ciência, pesquisa e tecnologia, realizada em nanoescala" 1-100 nm (SAADEH et al., 2014). Uma característica marcante das nanoestruturas é conservarem a mesma constituição química do seu estado macroestrutural, porém com propriedades físico-químicas distintas do material conhecido anteriormente (ZHANG, 2015).

A progressão na ciência e na medicina foi marcada pela capacidade dos pesquisadores de estudar e entender o mundo que nos rodeia em uma escala cada vez menor. Nesse contexto, as primeiras nanoestruturas de acrilamida, ligadas à polímeros de materiais biologicamente ativos, com o potencial de liberação prolongada de antígenos, foi desenvolvida em 1969 por Jorg Kreuter e colaboradores e sua patente foi concedida em 26 de Maio de 1981 no United States Patents Office sob o número US4269821, mostrando-se uma tecnologia promissora na substituição dos adjuvantes utilizados até então (KREUTER, 1995). Mesmo sendo tão promissor o uso das nanopartículas na área biomédica sua aplicabilidade ainda é contestada por não haver uma metodologia capaz de identificar a localização das nanopartículas nos compartimentos celulares (CANCINO et al., 2014).

Grande foram os esforços da equipe do pesquisador Gerd Binnig Rohrer, conhecido como o pai da nanotecnologia, por desenvolver um dispositivo capaz de identificar estas nanoestruturas. Em 1982 foi concedida a patente US4343993A pelo escritório United States Patents do microscópio de varredura e tunelamento (STM) que revolucionou a área de nanotecnologia. O uso das nanopartículas para fins teranóstico, onde nanomaterial aplicado servirá para o tratamento específico e direcionado de doenças, a partir do diagnóstico específico da patologia. Esta metodologia vem sendo introduzida gradativamente em centros de tratamento oncológico (CHO et al., 2008).

2.4.1 Breve histórico sobre a nanotecnologia no Brasil

As pesquisas em nanotecnologia no Brasil vêm sendo produzidas desde a década de 1990, conforme publicações registradas na plataforma de periódicos da CAPES/MEC. Em 2001 o conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, investiu financeiramente pela primeira vez no desenvolvimento da área de nanotecnologia contribuindo assim o crescimento dos trabalhos neste campo (PLENTZ et al.,2013).

O Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC) compôs o grupo responsável por preparar o Programa Nacional Quadrienal de Nanotecnologia através da portaria MCT nº 252, de 16 de Maio de 2003. Para garantir a capacitação dos setores com grandes possibilidades de desenvolvimento tecnológico (MCTIC, 2003).

Os investimentos em nanotecnologia incentivaram fortemente o desenvolvimento de produtos nesta área assim como o crescimento do número de publicações. O depósito da primeira patente brasileira na área de nanotecnologia ocorreu em 2004, no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), de um produto cosmético ou farmacêutico que possui em sua composição nanopartículas poliméricas (CABALLERO et al., 2006). Em 19 de Agosto de 2005 foi lançado pelo presidente Luiz Inácio Lula da Silva, o Programa Nacional de Desenvolvimento da Nanociência e da Nanotecnologia, com o objetivo de incentivar o desenvolvimento de novos produtos e ampliar as pesquisas na área nanotecnológica e (PLENTZ et al.,2013).

A produção científica na área de nanotecnologia no Brasil aumentou mais de 50 vezes entre os anos de 1997 e 2012, conforme é demonstrado pelo site do *Web of Science* assim como o número de patentes depositadas. Por se tratar de uma área promissora, e os resultados positivos produzidos neste período favoreceram a criação em 2012 do Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologias (SisNANO). Este sistema foi instituído pela portaria MCTI nº245, de 05 de abril de 2012, com o objetivo de gerir e promover o desenvolvimento do campo da nanotecnologia no Brasil.

Os esforços do Brasil para fortalecer os investimentos para o desenvolvimento científico avançou, com a instituição da Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia (IBD) em 2019 (MCTIC, 2019). Neste mesmo ano foi inaugurada a sede do Centro de Tecnologia em Nanomateriais e Grafeno (CTNano) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), no Parque Tecnológico de Belo Horizonte (BH-TEC). O centro tem como objetivo promover o desenvolvimento de pesquisas, produtos e serviços, assim como a transferência de tecnologias na área nanotecnológica.

Toda dedicação em promover ações que busquem investimentos, regulamentação e ampliação do setor nanotecnológico no Brasil, tem proporcionado crescimento científico e tecnológico de maneira gradual que podem contribuir para a economia do país.

2.4.2 Nanopartículas de ouro

A história da descoberta do ouro ainda não está bem definida, estudiosos do assunto relatam que seu primeiro uso data-se de cinco mil anos atrás na Bulgária e o ouro em seu estado nanoparticulado foi utilizado pela primeira vez pelos chineses e pelos egípcios na antiguidade para fins terapêuticos e ornamentais (BOISSELIER *et al.*, 2009). Um dos exemplos mais documentados de nanotecnologia da história são os vitrais medievais. A característica coloração vermelha do ouro (resultado da redução do tetracloroaúrico com fósforo branco em uma mistura de água bifásica e dissulfeto de carbono) em seu estado nanoparticulado, foi descrito por Faraday, em 1857 em seu artigo científico. As nanopartículas de ouro (AuNPs) em suspensão possuem dimensões variáveis entre 1 e 100 nanômetros em pelo menos 50% da amostra e apresentam propriedades como grande área superficial, efeito de confinamento quântico e ressonância plasmônica de superfície, espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS), propriedades ópticas não-lineares (NLO) e efeito de carga quantizada (KLAR *et al.*, 1998; CAO *et al.*, 2002; XIA *et al.*, 2015; SHAHRIARI *et al.*, 2010). Suas propriedades podem ser controladas durante sua síntese e sua coloração está diretamente ligada ao seu tamanho. A Figura 12 apresenta o perfil de modificação da coloração da solução com o aumento do tamanho das AuNPs.

Figura 12: Escala de tamanho das AuNPs.



Legenda: A modificação da coloração caracteriza a modificação de tamanho das AuNPs durante o processo de síntese. Imagem adaptada de nano Compositix

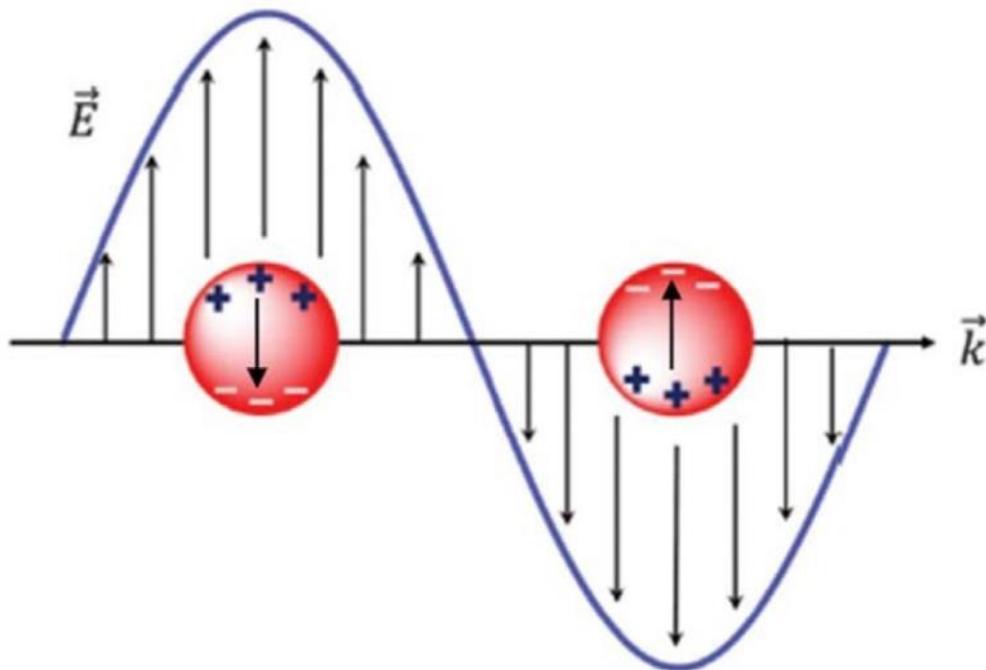
O conjunto destas características proporciona às nanopartículas de ouro grande potencial de aplicabilidade em diversas áreas na biofarmacêutica, principalmente pela sua biocompatibilidade. Explorando sua capacidade de fluxo através da membrana pode ser utilizado para transportar medicamentos para o meio intracelular e sua liberação controlada é considerada padrão ouro em ensaios biológicos de dose resposta estabelecido pelo Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST), por sua ação antimicrobiana, na agricultura também funciona na entrega de praguicidas, hormônios e em adubação, facilitando a absorção pelas plantas, medicina diagnóstica, indústria têxtil, biorremediação e painéis solares (INGALE et al., 2013). Diversos processos de construção das nanopartículas foram propostos como, a química verde (Y.X. *et al.*, 2011) usando água mili-Q[®] HAuCl₄, luz branca e aminoácidos. O método Turkevich, onde a preparação da suspensão de nanopartículas emprega o citrato de sódio com a função redutora e estabilizante afim de inibir a agregação do metal da solução (J. TURKEVICH, 1951). A descrição detalhada do processo utilizado para síntese de AuNPs deste trabalho será apresentado na seção de métodos.

Entretanto, vale ressaltar que Bokowskaja foi o primeiro a propor o citrato de sódio como agente redutor para preparo da nanopartículas de ouro (BOKOWSKAJA, 1934) e que as demais rotas de síntese foram inspiradas nela.

2.4.3 Ressonância plasmônica de superfície localizada

A ressonância plasmônica de superfície localizada (*Localized Surface Plasmon Resonance*, (LSPR)) é um fenômeno caracterizado pela oscilação coletiva de elétrons ressonantes de um espectro eletromagnético específico na superfície das nanopartículas. Esta oscilação acontece em razão do deslocamento das cargas das nanopartículas em direção oposta às das cargas do campo eletromagnético da onda incidente, gerando um dipolo elétrico na superfície das partículas. O deslocamento das cargas gera a formação de um campo restaurador das partículas restabelecendo o equilíbrio das cargas que foram distorcidas durante o processo. O acoplamento da restauração do campo magnético e do dipolo elétrico gera a ressonância plasmônica (CHANG *et al.*, 2012). A capacidade de absorção máxima de energia luminosa pelas nanopartículas quando irradiadas por uma fonte é proporcionada por este fenômeno (Figura 13).

Figura 13: Representação gráfica do fenômeno ressonância plasmônica de superfície localizada.

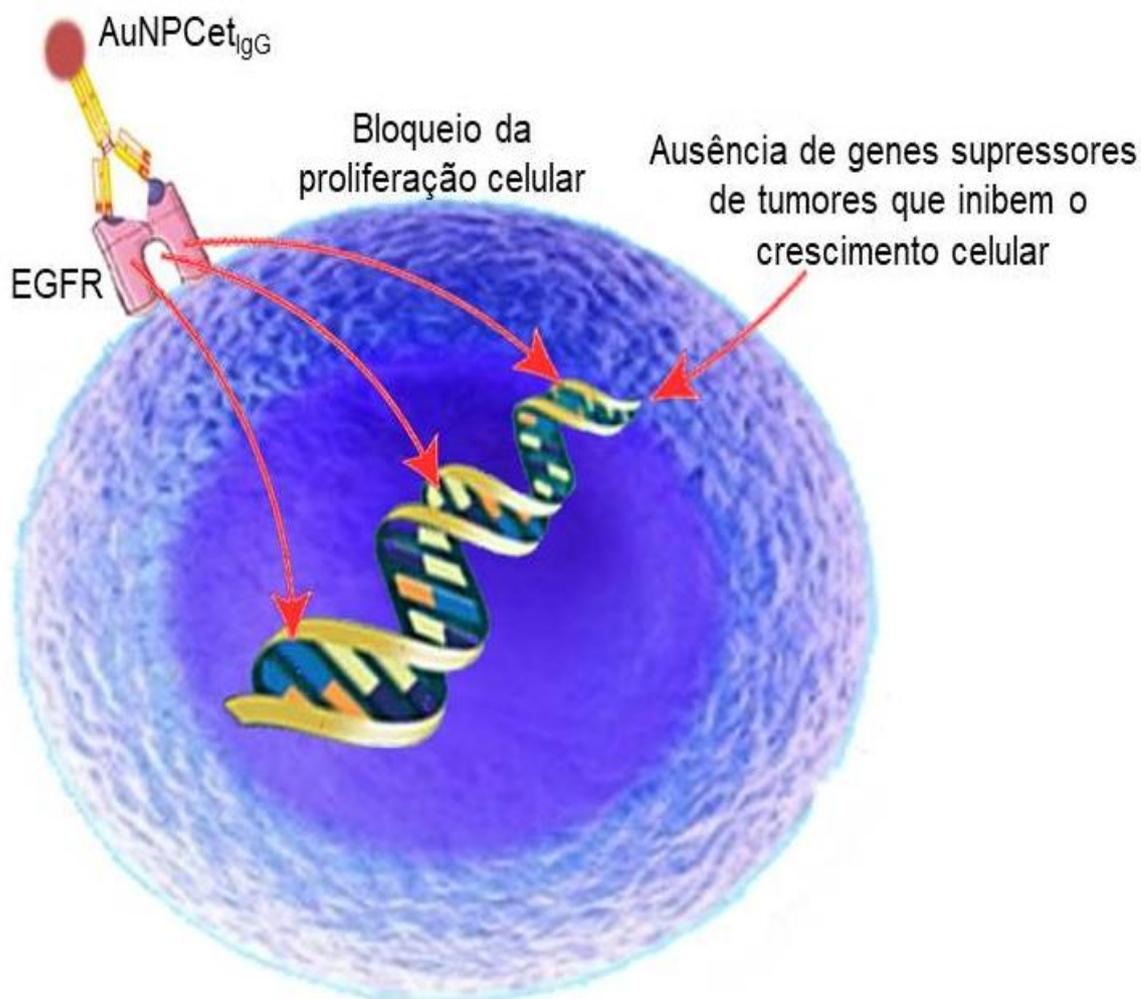


Legenda: Deslocamento das cargas das nanopartículas para região oposta a do campo eletromagnético. Fonte: OLSON *et al.*, 2015 .

2.4.4 Nanopartículas de ouro para aplicação em nanomedicina

Existe um elevado potencial de uso nas AuNPs em aplicações biomédicas tais como o melhorando da detecção do sinal em exames de imagens, aumentando a sensibilidade da captação dos sítios de ligação dos anticorpos, em imunoterapias preservando as células normais. Estas qualidades fazem da nanomedicina um novo campo a ser explorado na busca da melhoria da qualidade de vida e na redução dos efeitos colaterais dos fármacos utilizados em diversas terapias de uso contínuo ou em fase aguda de diversas patologias (Esquema 5) (GARCIA, 2014).

Esquema 5: Nanocomplexo AuNPCet_{IgG} com função teranóstica



Legenda: O nanocomplexo se liga ao receptor EGFR da A431 bloqueando a proliferação celular.
Fonte: Adaptado Instituto Vencer o Câncer

2.4.5 Estudos de Citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade do material utilizado durante as pesquisas biológicas é essencial para garantir sua segurança em aplicações clínicas ou cosméticas. A Organização Internacional de Normalização (ISO 10993-5) preconiza 3 testes para avaliação da citotoxicidade em testes biológicos. O teste de extração, o teste de contato direto e o teste de contato indireto (CSA, 2009). Utilizamos neste trabalho o teste de avaliação da viabilidade celular pela internalização do iodeto de propídeo.

2.4.5.1 Teste de citotoxicidade por contato indireto

A difusão em meio ágar foi empregada por Wallace L. Guess que propôs inicialmente o teste de citotoxicidade em meio líquido. Mas pela limitação da técnica que não apresentava eficiência para materiais com densidades e composições diferentes, ele realizou adaptações a fim de torna-la mais eficiente. Wallace L. Guess utilizou um meio sólido para aplicar o material em estudo, o qual apresentava maior estabilidade para diferentes tipos de materiais (GUESS *et al.*, 1965). Esta metodologia é semi-quantitativa e o grau de morte é medido pela formação do halo em volta do material em estudo, uma vez que as células mortas não internalizam o corante do meio.

2.4.5.2 Teste de citotoxicidade por extração

O ensaio de **MTT** (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), utilizado para avaliar a viabilidade de células em cultura. É um método colorimétrico que correlaciona a quantidade de cristal de formazan, resultante da redução do tetrazólio MTT ao número de células vivas na cultura. Esta redução é resultado da atividade mitocondrial, as células mortas não reagem a este sal (MOSMANN, 1983) (LI *et al.*, 2015).

2.4.5.3 Teste de citotoxicidade por contato direto

O ensaio de contato direto baseia-se na extração de produtos químicos lixiviáveis do material em estudo para o meio de cultura celular. A inibição do crescimento celular assim como a alteração da sua morfologia indica o grau de toxicidade do material (LI et al, 2015).

2.4.5.4 Teste de citotoxicidade pela internalização do iodeto de propídeo

O teste de viabilidade celular realizado com Iodeto de Propídeo (PI) é uma alternativa rápida e segura para quantificar o número de células viáveis e inviáveis no meio de cultura celular. Este método baseia-se na internalização do PI em células que apresentam danos na membrana celular em que o corante internalizado se liga às bases nitrogenadas (DARZYNKIEWICZ, Z. *et al.*, 1992).

Os testes de citotoxicidade devem ser realizados como teste piloto para avaliar a aplicabilidade do biomaterial proposto. É uma ferramenta que atesta principalmente a segurança do uso deste material *in vivo*.

2.4.6 Nanopartículas de ouro e estudos de citotoxicidade

A medicina tem grande interesse no uso das nanopartículas em terapias e diagnóstico, para isto é necessário que estes nanomateriais demonstrem alto grau de confiabilidade e segurança em sua administração. Diante disto a preocupação com o seu grau de toxicidade e biocompatibilidade destes nanocomplexos devem ser rigorosamente estudadas. Ensaio de citotoxicidade *in vitro* são uma metodologia relativamente simples e eficiente de se caracterizar o potencial tóxico do nanoconjugado em estudo (KENNEDY *et al.*, 2011).

3.1 Anticorpos

3.1.1 Primários: Cetuximabe e anti-CD44

O cetuximabe é um imunoterápico formado por um anticorpo monoclonal quimérico, *mouse anti-human*, este por sua vez, reconhece e se liga ao receptor do fator de crescimento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor* - EGFR) que é superexpressado em carcinomas epiteliais. A ligação deste anticorpo ao receptor de membrana faz com que as células tumorais parem de receber sinalização para proliferação impedindo sua disseminação (AGENCY, 2014). O anticorpo monoclonal anti-CD44 reconhece e se liga uma glicoproteína de membrana envolvida em interações célula-célula, adesão, migração celular e uma das suas funções celulares seria a ativação da metástase de tumores. Os anticorpos primários cetuximabe 0,5 mg / mL, (Erbix, Merck, Alemanha) e o anticorpo monoclonal anti-CD44 *purified mouse anti-human*, 1 mg / mL, (BD Horizon™) foram utilizados para a funcionalização das AuNPs.

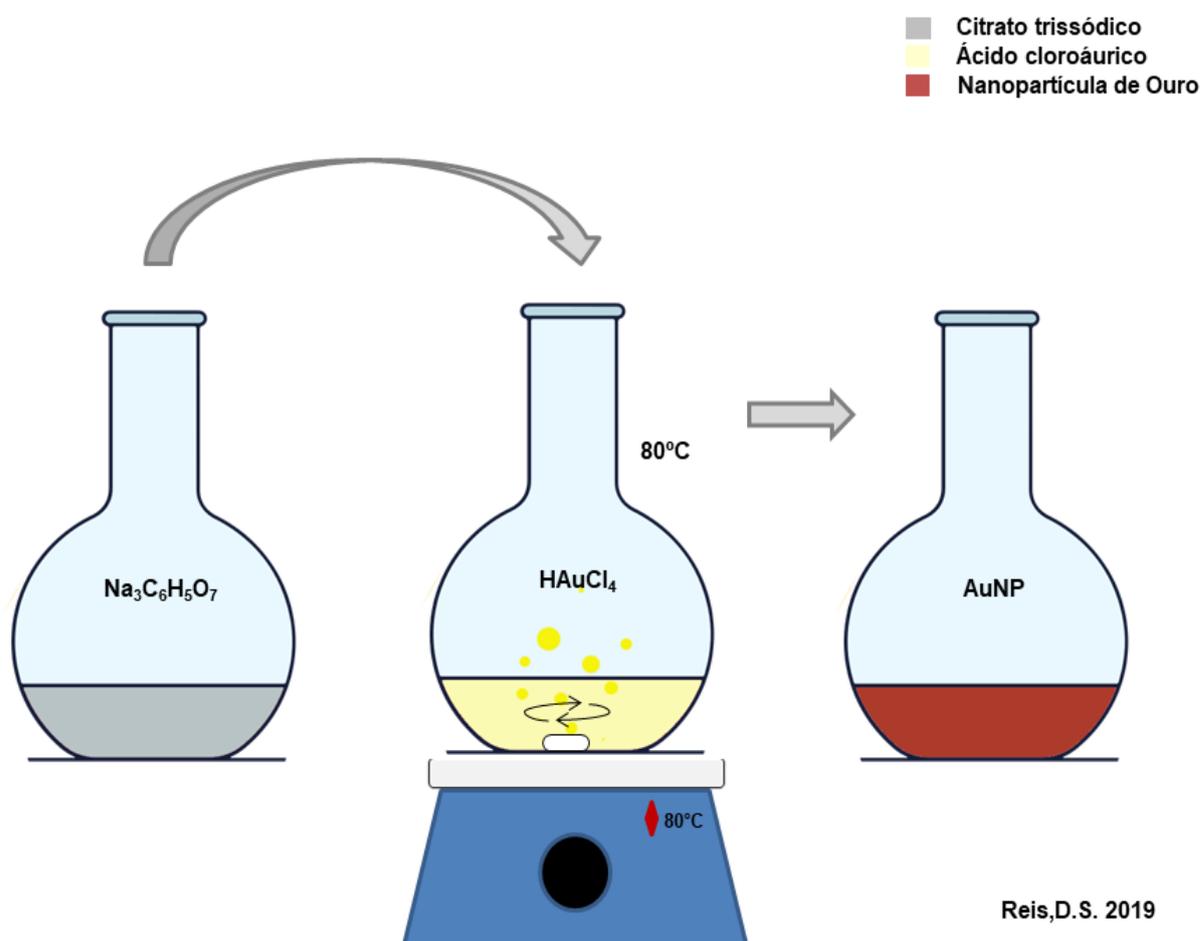
3.1.2 Secundários: Alexa fluor 488_{IgG} , Pe-CF594_{IgG} , Alexa fluor 647_{IgG} e Alexa fluor 555_{IgG}

Os anticorpos secundários se ligam diretamente aos anticorpos primários que encontra-se ligados ao antígeno alvo na célula. Para detecção da ligação do anticorpo primário Cet_{IgG} foi utilizado o anticorpo secundário Alexa Fluor®488 (AF488_{IgG}) *goat anti-human IgG H&L (Molecular Probes, USA)* e para detecção do CD44_{IgG} foi utilizado o Pe-CF594 (Pe-CF594_{IgG}) *Rat Anti-Mouse IgG₁ (BD Horizon™ 0.2mg/mL)* . Para o teste de especificidade de ligação utilizamos os anticorpos secundários anti-IgG₁ *Mouse Alexa Fluor 647 (AF 647) (Invitrogen)* e anti-IgG₁ *Mouse Alexa Fluor 555 (AF555) (Invitrogen)*.

3.2 Síntese das Nanopartículas de Ouro (AuNPs)

A metodologia utilizada para a síntese de nanopartículas foi previamente descrita com discretas modificações por TURKEVICH, em 1951 e FRENS, em 1973 usando solução de $2,5 \times 10^{-4}$ mol / L de ácido tetracloroaurico (HAuCl_4), preparado no Laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física da UFMG conforme o protocolo de MORITA et al.1972, por métodos químicos úmidos com citrato trissódico 1% (Sigma-Aldrich, EUA) como agente redutor e surfactante. Todas as vidrarias foram previamente ambientadas com água régia (1:3 ácido clorídrico e ácido nítrico) a fim de se prevenir qualquer tipo de contaminação. Posteriormente, foram acrescentados, de uma só vez, 5 mL de citrato trissódico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 1 % , 250 μL de HAuCl_4 500 μM à 50 mL água Mili-Q ultra filtrada aquecida, à 80°C mantida em agitação vigorosa e constante.

Esquema 6: Síntese das nanopartículas de ouro



Reis,D.S. 2019

Refinamento da metodologia de Turkevich 1951 e Frens 1973

Quando todo ouro da solução é reduzido observa-se a mudança de coloração de amarelo translúcida para cor vinho (Esquema 6). Neste momento, há formação das AuNPs e o aquecimento é cessado deixando-a esfriar a temperatura ambiente e armazenado em frasco âmbar a 4°C. A observância rigorosa do protocolo garante a síntese padrão com tamanho médio de nanopartículas entre 10 e 50 nm.

3.2.1 Absorbância por espectroscopia no ultravioleta visível

A espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Vis) foi utilizada para confirmar a formação das AuNPs. Para a obtenção dos dados de absorbância do material sintetizado foram utilizados os espectrofotômetros de leitor multimodal de varredura espectral Rayleigh Vis e Varioskan Flash (Thermo Scientific). A leitura foi realizada nos comprimentos de ondas compreendidos entre 200 a 800 nm, utilizando microplacas de quartzo de 96 poços Costar[®]. Os resultados foram apresentados por meio de Gráficos de absorbância por comprimento de onda (nm) gerado pelo software Origin 8.0.

3.2.2 Microscopia eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada para análise da forma, tamanho médio e dispersão das AuNPs. As amostras foram analisadas no Centro de Microscopia da UFMG (CM-UFMG), com o auxílio de um microscópio modelo Tecnai[™] G2 12 – SpiritBiotwin FEI em sua resolução máxima de 120kV. Para preparação das amostras 10 µL da suspensão de AuNPs puras foram instilados sobre a grade de cobre revestida com carbono do tipo *holey carbon films* (400 mesh) Pelco[®] e secas a temperatura ambiente. Para a análise da especificidade de ligação do nanocomplexo AuNPCet_{IgG} aos receptores de membrana do EGFR das células A431 utilizamos a MET Neste experimento utilizamos placas de 6 poços contendo 3x10⁵ células (A431) por poço, mantidas em estufa com umidade relativa de 90% a 37°C sob 5% de CO₂ deixadas crescer por 24h antes da adição do nanocomplexo. Em seguida foram adicionados 16 µg / mL do nanocomplexo AuNPCet_{IgG} e

permaneceram incubadas por 60 minutos mantidas em estufa com umidade relativa de 90% a 37°C sob 5% de CO₂.

Em seguida as células foram lavadas uma vez com 1 mL tampão fosfato salino (PBS) 1X, para remoção dos nanocomplexos não ligados aos receptores de membrana. As células foram centrifugadas a 1200 RPM por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado cuidadosamente. Após a lavagem 4 mL de glutaraldeído (2,5%) foram adicionados e incubados por 60 minutos em temperatura ambiente.

As células foram centrifugadas novamente, o sobrenadante contendo a solução fixadora foi retirado e adicionado 1 mL PBS 1X. Em seguida nova centrifugação foi realizada para sedimentação e formação do *pellet*. Este material foi encaminhado ao Centro de Microscopia da UFMG para preparo das amostras para MET. As amostras foram incluídas em parafina, os cortes realizados por microtomia e em seguida a sua contrastação. As amostras foram fixadas novamente com 1 % de tetróxido de ósmio em tampão cacodilato de sódio, lavadas com maleato e marcadas com 0,5 % de acetato de uranil em tampão de maleato. As amostras foram lavadas e em seguida as células foram desidratadas em uma série graduada de etanol (70, 80, 90 e 100%) por 30 minutos cada um. Após ressuspender o sedimento celular e inserido em resina EPON™ para microtomia. As secções de 200nm foram colocadas em grade de cobre revestida com carbono do tipo *holey Carbon Films* (400 mesh) Pelco®.

3.2.3 Espalhamento dinâmico de luz

A metodologia de espalhamento dinâmico de luz (DLS) proporciona determinação do diâmetro hidrodinâmico das partículas em suspensão pelo espalhamento de luz pelo movimento browniano das partículas em suspensão. Esta movimentação é resultado do choque das moléculas da solução com estas partículas resultando em no espalhamento da luz com intensidades diferentes. A oscilação dessas intensidades proporciona a caracterização do tamanho em razão da sua velocidade de movimentação no meio e pode ser calculado utilizando a relação Stokes-Einstein. O movimento browniano é dependente diretamente do tamanho da partícula, quanto

maior a agitação menor é o diâmetro e, sua densidade no meio e a temperatura, alteram a viscosidade do fluido alterando, também, o seu movimento (BROWN, 1828). Através desta metodologia também é possível determinar o índice de polidispersividade (Pdl) calculado pelas médias da intensidade do sinal de dispersão do tamanho e da largura das partículas presentes na suspensão (Malvern, 2004).

Utilizamos esta técnica por gerar resultados mais representativos para partículas esféricas e com alta concentração, fornecendo resultados de tamanho, concentração de partículas e se há agregação de partículas em uma mesma amostra. Assim como obter no mesmo equipamento o valor absoluto do potencial zeta.

3.2.4 Espectroscopia de absorção atômica

A espectroscopia de absorção atômica (EAA) é uma técnica que permite quantificar, com alta precisão, a concentração de partículas em uma amostra. Essa determinação é realizada, baseada na quantidade de luz que os átomos livres absorvem e os comparando com uma curva de padrões previamente conhecidos. Neste trabalho utilizamos a técnica EAA de forno de grafite (*Hitachi Atomic Absorption Spectrophotometer*, modelo 8200 (*Hitachi Japan*)), onde, a chama (de ar, acetileno ou óxido nítrico e acetileno) é substituída por um tubo de grafite aquecido eletromagneticamente (DCTECH, 2019).

3.2.5 Potencial Zeta (ζ)

A determinação do potencial zeta dos nanocomplexos AuNPCet_{IgG} e AuNPCD44_{IgG}, foi realizada, no equipamento Zetasizer Nano ZS90 – Malvern Panalytical sob o ângulo de dispersão de 173° à temperatura ambiente, laser padrão vermelho de excitação He-Ne, 4.0mV, 633 nm foi usado para determinar a mobilidade eletroforética das partículas utilizando os princípios do espalhamento dinâmico de luz. O analisador Zetasizer calcula o valor do potencial zeta (também chamado Dzeta) do movimento de partículas com superfícies carregadas, em relação a um líquido estacionário, por efeito de campo elétrico estacionário conhecido como mobilidade eletroforética, usando a equação de Smoluchowski, ou seja,

$$\xi = \mu\eta / \varepsilon$$

onde:

ξ é o potencial zeta, μ é a mobilidade eletroforética, η é a viscosidade absoluta da solução e ε é a constante dielétrica do solvente. O potencial zeta das nanopartículas foram estimados três vezes simultaneamente e em triplicata de amostras.

3.3 Bioconjugação e Caracterização das nanopartículas de ouro com os anticorpos primários cetuximabe e o anti-CD44

3.3.1 Bioconjugação das nanopartículas de ouro com anticorpos primários

A estratégia utilizada neste trabalho para bioconjugação ou funcionalização das nanopartículas foi a adsorção iônica que ocorre em um pH de complexação próximo ao ponto isoelétrico do anticorpo e a carga das AuNPs. O pH da solução das AuNPs foi ajustado para o pH de complexação de aproximadamente 8,5 que é o ponto isoelétrico do anticorpo cetuximabe, usando K_3CO_3 1M. Em seguida as AuNPs foram funcionalizadas. O nanocomplexo baseado em AuNPs e cetuximabe foi obtido adicionando-se 20 μ L de cetuximabe que corresponde a concentração de 50 μ g em 2 mL de AuNPs (16 μ g / mL). A obtenção do nanocomplexo formado pelo anticorpo monoclonal anti-CD44_{IgG}. O pH foi ajustado para 10 que é o ponto isoelétrico da molécula. Foi adicionado 1 μ L de anti-CD44 que corresponde a 1 μ g de anticorpo em 500 μ L de solução de AuNPs (16 μ g / mL).

Após a obtenção dos nanocomplexos AuNPCet_{IgG} e AuNPCD44_{IgG}, foi adicionado às soluções, albumina de soro bovino (BSA) (Milipore, EUA), a uma concentração final de 1% (v/v) sob homogeneização contínua à temperatura ambiente durante 30 minutos com o propósito de se bloquear os anticorpos que não foram ligados às nanopartículas. Em seguida, a solução foi centrifugada no equipamento Eppendorf AG- 5430, a 15000 RPM durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em água ultrapura estéril e realizada a caracterização físico-

química do material por UV-Vis, potencial zeta e fluorimetria. As amostras foram mantidas a 4°C em frascos âmbar

3.4 Fluorimetria

A fluorimetria é um método que determina, quantitativa e qualitativamente, a fluorescência emitida por um material. A determinação da emissão de fluorescência das suspensões de AuNPs 16 µg / mL, nanocomplexos AuNPCet_{IgG} (nanopartículas de ouro 16 µg / mL + anticorpo primário cetuximabe 50 µg / mL, AuNPAF488_{IgG}: nanopartículas de ouro 16 µg / mL + anticorpo secundário AF488_{IgG} diluição 1 : 400 µL, AuNPCet_{IgG}AF488_{IgG} (nanopartículas de ouro 16 µg / mL + anticorpo primário cetuximabe 50 µg / mL + anticorpo secundário AF488_{IgG} (1:2000 µL)), AuNPCD44_{IgG} (nanopartículas de ouro 16 µg / mL funcionalizadas com o anticorpo primário anti-CD44 1 µg (1 : 500 µL)), AuNPPe-CF594_{IgG} (nanopartículas de ouro 16 µg / mL funcionalizadas com o anticorpo secundário PeCF594_{IgG} 0,1 µg (1 : 2000 µL)) e o nanocomplexo AuNPCD44_{IgG}Pe-CF594_{IgG} (nanopartículas de ouro 16 µg / mL funcionalizadas com o anticorpo primário anti-CD44 1 µg (1 : 500 µL) e marcadas com o anticorpo secundário Pe-CF594_{IgG} 0,1 µg (1 : 2000 µL)).

Todas as amostras foram homogeneizadas, continuamente, a temperatura ambiente ao abrigo da luz, por 30 minutos. As amostras foram medidas no determinação dos resultados foi realizada no espectrofotômetro Varioskan™ Lux Reader (Thermo Fisher Scientific) leitor multimodal de varredura espectral, faixas dos comprimentos de ondas selecionadas 490 - 612 nm.

3.5 Experimentos *in vitro*

3.5.1 Linhagem celular

A amostra celular utilizada durante os experimentos foi a linhagem celular de carcinoma de células escamosas humano imortalizadas (A431). Essas células foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC).

3.5.2 Manutenção da linhagem celular

Para os testes de especificidade de reconhecimento do nanocomplexo AuNPCet_{IgG} ao receptor transmembrana EGFR, foi utilizado na cultura o meio sintético com altas concentrações de aminoácidos e vitaminas. Este meio é conhecido como *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) alta glicose, contendo 1mM de piruvato de sódio da Gibco (Grand Island, NY), suplementado com 5% de soro fetal bovino (v/v) da Biotecnologia LGC (Cotia, SP, Brasil). As células foram cultivadas em frasco de cultura modelo T25 e as placas de 96 poços foram adquiridas da empresa Kasvi (São José dos Pinhais, PR, Brasil) e mantidas em incubadora com umidade relativa de 90% a 37°C sob 5% de CO₂.

3.5.3 Tripsinização das células

As células A431 possuem característica de serem aderentes. Dessa forma, há necessidade de utilizar uma solução enzimática que, por hidrólise, rompe as ligações peptídicas formadas entre as células e a superfície do frasco de cultura. Antes da tripsinização todo meio de cultura foi removido e as células lavadas com 5 mL de PBS 1X. Em seguida 0,5 mL de tripsina (Tripsina 0,25% Gibco® NY, EUA) foram adicionados. As células foram incubadas por 15 minutos na incubadora a 37°C e 5%CO₂. Após o tempo de pausa o frasco foi levado ao microscópio de contraste de fase invertida (Leica DMIL), para avaliar se as células foram devidamente desaderidas, a fim de neutralizar a ação da tripsina foram adicionados 5 mL de meio DMEM completo.

3.5.4 Citometria de Fluxo

3.5.4.1 Ensaio de Viabilidade

O Iodeto de Propídeo (PI) é uma sonda fluorescente que tem afinidade por ácidos nucleicos. O dano na membrana favorece a entrada do corante PI intercalando-se entre as bases nucleotídicas Adenina-Timina. A preparação das amostras para o

teste de viabilidade consistiu em adicionar 1 μ L de PI (50 mg / mL) a 1 mL de solução PBS 1X contendo uma concentração celular ajustada para 100 mil células / mL por 5 minutos. Posteriormente, a aquisição dos dados foi realizado no citômetro de fluxo FACScanTM BD Biosciences, EUA, laser Argônio 15 mW, 488 nm excitação e emissão em 564 a 606 nm. O total de eventos armazenados foram 10 mil células dentro da população total de A431. Os ajustes dos controles negativos foram realizados com células não estimuladas, previamente, com AuNPs e marcadas com o PI. O painel construído para aquisição dos dados foi a partir de um gráfico *FSC x SSC*. Em seguida foram delimitadas as populações de interesse a partir deste gráfico, armazenados 10 mil eventos para cada amostra. Para ajuste do equipamento as células não marcadas foram utilizadas como controle negativo. As células A431 não incubadas com AuNPs e marcadas com PI foram utilizadas como amostras controles. Para a interpretação dos dados foi utilizado o software FlowJo 10.0 para determinar as populações positivas e negativas para cada marcação e o nível de expressão de cada molécula em análise.

3.5.4.2 Ensaio de Ciclo Celular

As células coletadas foram ressuspendidas em 1 mL de solução DMEM e sua concentração foi ajustada para 100 mil células / mL. Em seguida a solução foi centrifugada por 10 minutos a 1200 RPM. O precipitado foi ressuspendido em 1 mL da solução fluorocrômica hipotônica (HFS), contendo 50 μ g / mL de iodeto de propídeo (PI) e 0,1% de Triton 1X-100 em citrato de sódio 0,1% e incubada a temperatura ambiente por 60 minutos ao abrigo da luz. Após o tempo de incubação, a leitura realizada no citômetro FACScanTM BD Biosciences, EUA, laser Argônio 15 mW, 488 nm excitação e emissão em 564 a 606 nm. Para interpretação dos dados foi utilizado o software Flowjo V10.0 Gráfico 13.

3.5.4.3 Imunofenotipagem

3.5.4.3.1 Detecção da amplificação do sinal de fluorescência

Depois de serem coletadas da cultura, as células A431 foram incubadas individualmente em tubo eppendorf por 60 minutos a 4°C com os anticorpos primários monoclonais reativos para moléculas de superfície Cet_{IgG} 5 mg / mL e com CD44_{IgG} 0,5 mg / mL. As AuNPs puras 16 µg / mL e os nanocomplexos AuNPCet_{IgG} 50 µg / mL e AuNPCD44_{IgG} 1 µg / mL, também foram incubados, isoladamente, por 60 minutos a 4°C. Após a incubação as células foram lavadas com PBS 1X. Em seguida, as células foram marcadas com os anticorpos secundários reativos para moléculas dos anticorpos primários ligados à membrana celular. As amostras contendo o cetuximabe foram marcadas com o anticorpo secundário AF488_{IgG} e as amostras marcadas com o anti-CD44 receberam a marcação do anticorpo secundário Pe-CF594_{IgG}. Para comparar o aumento de sinal de fluorescência duas diluições dos anticorpos secundários foram escolhidas: a indicada pelos fabricantes 1 : 400 µL e uma diluição de 1 : 2000 µL. Em seguida foram incubados por 30 minutos a 4°C e ao abrigo da luz.

Após o período de incubação as células foram lavadas com solução isotônica e centrifugadas a 1200 RPM e ressuspendidas em 200 µL de PBS1 X para aquisição no citômetro. As leituras das amostras foram realizadas no citômetro, FACSCanto II™ BD Biosciences, EUA, configuração 4-2-2, laser azul 488 nm, refrigerado a ar, estado sólido 20mW, laser vermelho 633 nm, HeNe 17Mw, filtro e o laser violeta 405 nm, 30mW, acoplado a um computador com o software *Diva*. O painel construído para aquisição dos dados foi a partir de um Gráfico gerado após a interceptação do laser na célula, a dispersão frontal (*Foward Scatter (FSC)*) caracterizando o seu tamanho e a dispersão lateral (*Sider Scatter (SSC)*) caracteriza a sua complexidade. Foram delimitadas as populações de interesse a partir deste gráfico, armazenados 20 mil eventos para cada amostra. Para ajuste do equipamento as células não marcadas foram utilizadas como controle negativo e os ajustes dos vazamentos de fluorescências foram cuidadosamente realizados antes das aquisições das amostras. A interpretação dos dados foi obtida no software FlowJo 10.0 para determinar as populações positivas e negativas, para cada marcação e o nível de expressão de cada molécula em análise.

3.5.4.4 Citometria por imagem

As células A431 foram tratadas seguindo o protocolo de imunofenotipagem descrito anteriormente e adquiridas no citômetro de fluxo Amnis[®] ImageStream^{®x} Mk II *Imaging Flow Cytometry* (Merck, Alemanha). O ImageStream^{®x} Mk apresenta as seguintes especificações, 3 lentes com capacidade de aumento 20X, 40X e 60x, 7 lasers de excitação, 375 nm, 405 nm, 488 nm, 561 nm, 592 nm, 642 nm e 785 nm este último é o laser utilizado para gerar o sinal de espalhamento lateral (SSC) (MERCK, 2016). Este equipamento é capaz de gerar 12 imagens simultâneas de uma mesma partícula. As aquisições foram realizadas utilizando laser Argônio azul 488 nm, filtro 530 / 30 nm para as amostras de marcadas com Cet_{IgG}AF488_{IgG} e para as amostras marcadas com o CD44_{IgG}Pe-CF594_{IgG}, foi utilizado o laser 568 nm, filtro 616/23 nm. As análises posteriores foram realizadas usando o software para citometria e imagem FCS 6 *Express Image Cytometry*.

3.5.4.4.1 Marcação nuclear para citometria de fluxo por imagem

- **4',6-diamidino-2-phenylindole – DAPI**

O DAPI (Molecular Probes[®]) é uma sonda fluorescente que permite avaliar o núcleo celular. O corante DAPI ao alcançar o núcleo celular, se intercala entre as bases nucleotídicas Adenina – Timina no ácido desoxirribonucléico (DNA) e em Adenina-Uracila no ácido ribonucléico (RNA) (CHAZOTTE, 2011).

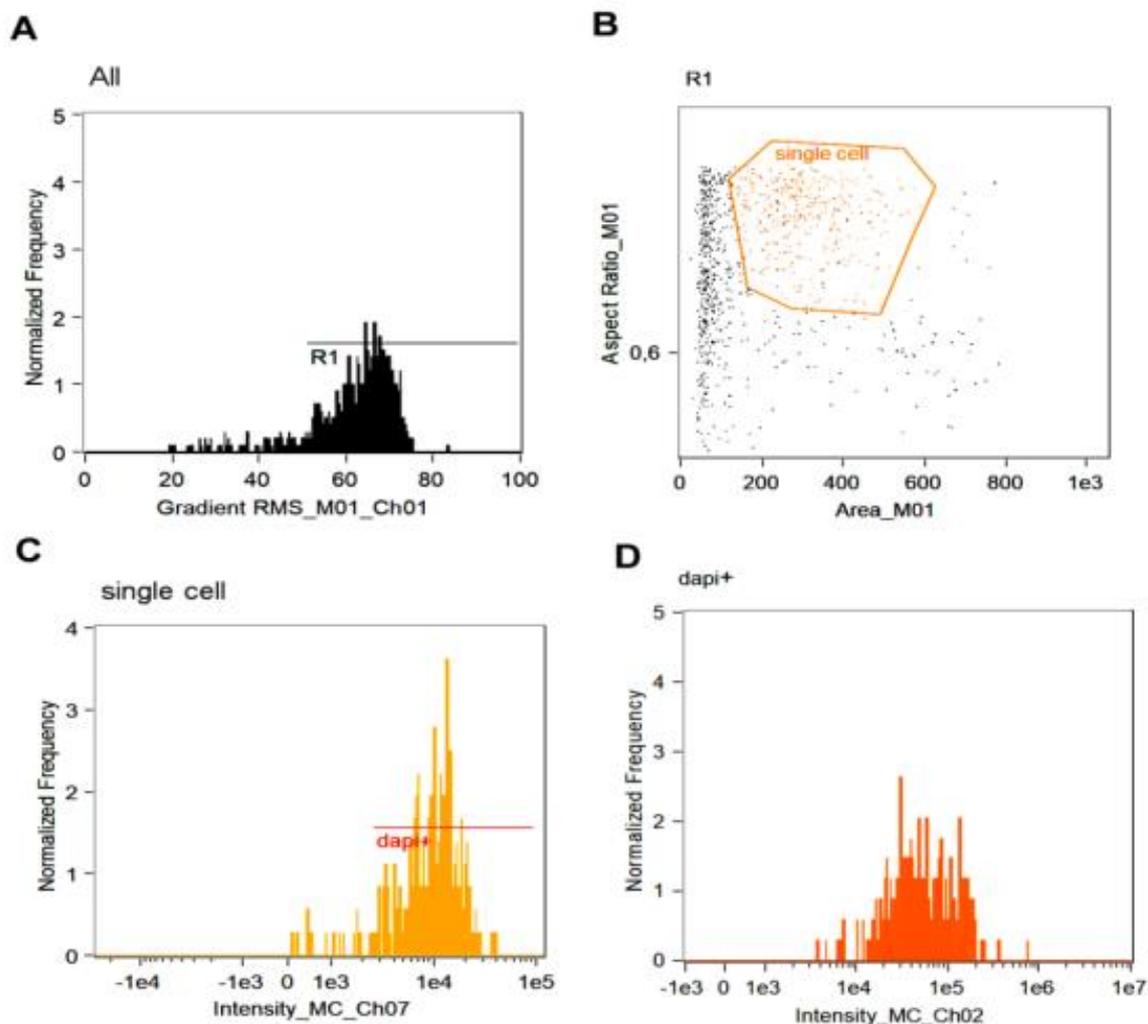
As células coletadas foram ressuspensas em 1 mL de solução DMEM e contadas tendo sua concentração ajustada para 100 mil células / mL. Em seguida a solução foi centrifugada por 5 minutos a 1200 RPM. O precipitado foi ressuspensado em 1 mL da solução de marcação PBS 1x com 0,5 µL de DAPI e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. E os dados foram adquiridos utilizando o no citômetro de Amnis[®] *Imaging Flow*, laser Argônio 405 nm, e emissão em 461 nm. As análises posteriores foram realizadas usando o software para citometria e imagem FCS 6 *Express Image Cytometry* (Gráfico 1).

- **Hoechst 33342**

O *Hoechst 33342* é uma sonda fluorescente que permite avaliar o núcleo celular e mitocôndrias (MIYAKE et al, 2011). As células coletadas foram ressuspensas em 1 mL de solução DMEM e contadas tendo sua concentração ajustada para 100 mil células / mL. Em seguida a solução foi centrifugada por 5 minutos a 1200 RPM. O precipitado foi ressuspensado em 1 mL da solução de marcação PBS1 X com 0.5 μ M de Hoechst 33342 e incubada por 45 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os dados foram adquiridos utilizando o citômetro de Amnis[®] *Imaging Flow*, laser Argônio 405 nm, e emissão em 461 nm. As análises posteriores foram realizadas usando o software para citometria e imagem FCS 6 *Express Image Cytometry* (Gráfico 1).

3.5.5 Estratégias para determinação das populações de interesse

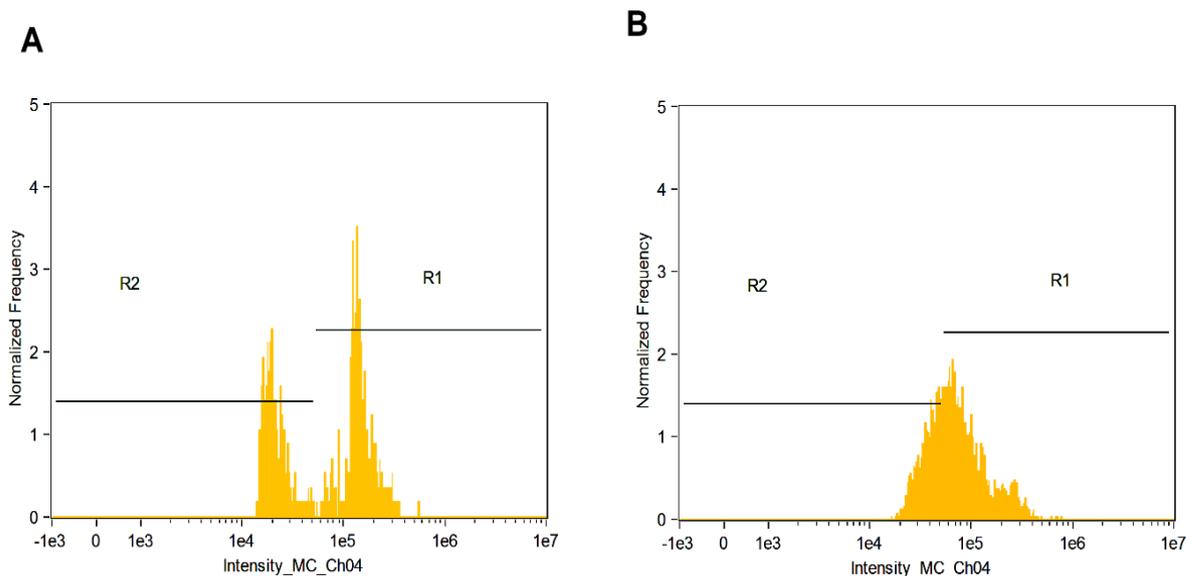
As células analisadas por CFI foram identificadas, inicialmente, realizando-se a seleção total da população em R1 como mostra o Gráfico 1A. Em seguida foi feita a seleção no Gráfico de Area-M01 x *Aspect Ratio* M-01 para selecionar as *singles cells* como mostra o Gráfico 1B e histogramas de intensidade média de (IMF) para células viáveis marcadas com DAPI como mostra o Gráfico 1D e o nanocomplexo AuNPCet_{IgG} AF488 marcadas com DAPI como mostra o Gráfico 1C.

Gráfico 1: Estratégia de *gate* para aquisição do nanocomplexo AuNPCetIgG AF488IgG por CFI.

Legenda: O painel A mostra a população total do estudo R1. O painel B mostra as células A431 analisadas dentro do *gate* indicando células individuais. O painel C mostra IMF das células A431 marcadas com nanocomplexo AuNPCet_{IgG} AF488_{IgG}; nanopartículas de ouro 16 µg / mL + anticorpo primário cetuximabe 50 µg / mL + anticorpo secundário AF488_{IgG} diluição 1:2000 µL e os núcleos marcados com DAPI e o painel D mostra a marcação nuclear das células A431 isoladamente. REIS, 2019.

As células analisadas por CFI foram identificadas, inicialmente, conforme descrito anteriormente. Em seguida foi feita a seleção no Gráfico de *Intensity MC X Normalized Frequency* para selecionar as populações não marcadas em R2, como mostra o Gráfico 2A e marcadas com CD44_{IgGPe}-CF594_{IgG} e Hoechst 33342 em R1, apresentado no Gráfico 2B.

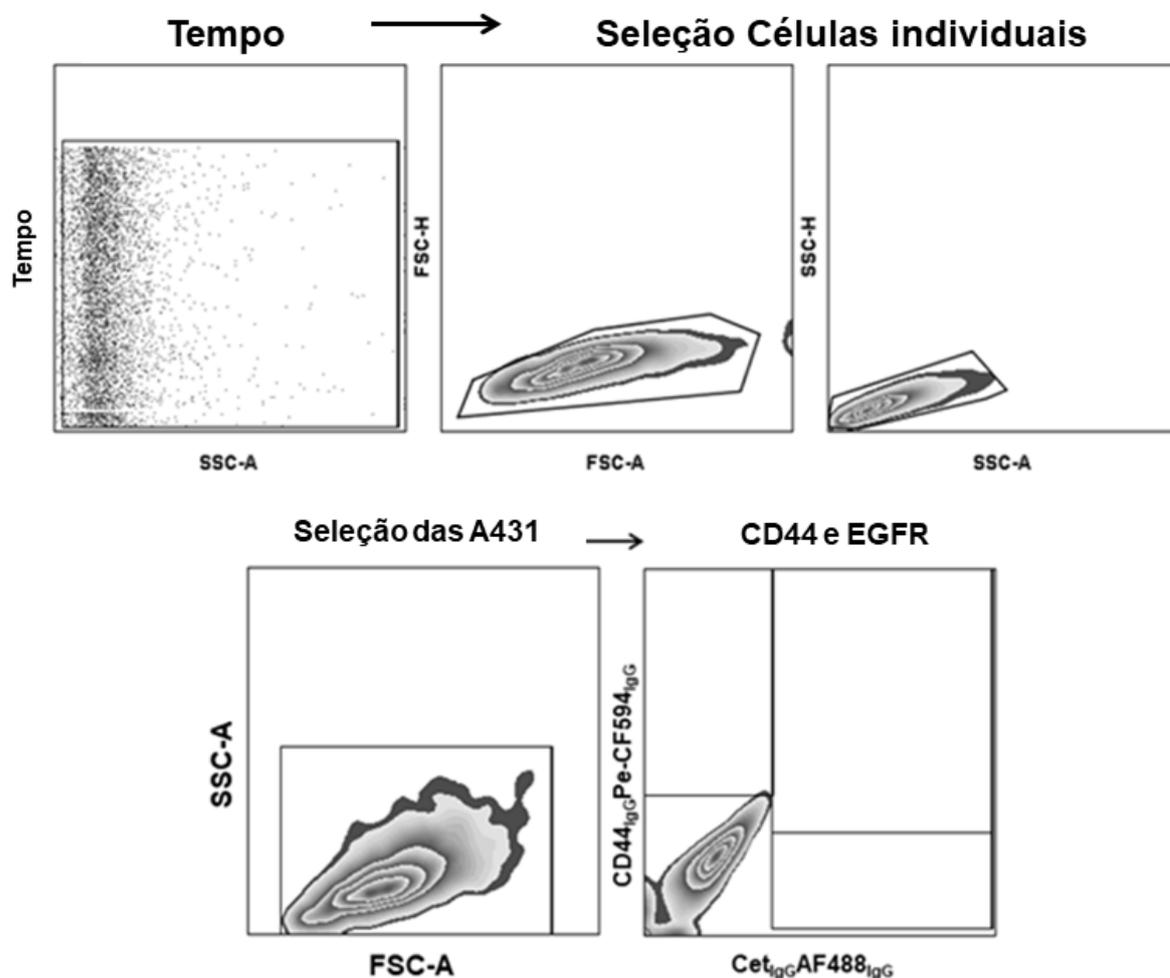
Gráfico 2: Configurações das imagens no nanocomplexo AuNPCD44_{IgG} Pe-CF594_{IgG} no equipamento de citometria de fluxo com microscopia de fluorescência acoplada



Legenda: O painel A mostra em R1 a população de células A431(R1) marcadas e em R2 a população de células A431 não marcadas. O painel B mostra a IMF das células marcadas com o nanocomplexo AuNPCD44_{IgG}Pe-CF594_{IgG} : AuNPCD44_{IgG}PeCF594_{IgG} 1 : 2000 μ L + Hoechst 33342: células A431 marcadas com o nanocomplexo AuNP 16 μ g / mL + anticorpo primário anti-CD44 1 μ g (1 : 500 μ L) + anticorpo secundário PeCF594_{IgG} 0,1 μ g (1 : 2000 μ L) e o núcleo marcado com o corante nuclear Hoechst 33342. Fonte: REIS, 2019.

Estratégias de análise para marcação das fluorescências dos fluoróforos AF488_{IgG} e Pe-CF594_{IgG}. As células analisadas no citômetro de fluxo FACSCantoll foram identificadas, inicialmente, em *time x* SSC-A para verificar se não houve oscilação na intensidade do laser durante a aquisição. A partir deste Gráfico foram construídos os Gráficos para exclusão dos agregados e dos fragmentos celulares (*gate* para *singlets*) na diagonal em SSC-A linear (lin) x SSC-H(lin). Em seguida o outro Gráfico FSC-A (lin) x FSC-H(lin) foi construído e, finalmente, o Gráfico biparamétrico de CET_{IgG}AF488_{IgG} X CD44_{IgG}Pe-CF594_{IgG} foi construído como demonstrado no Gráfico 3.

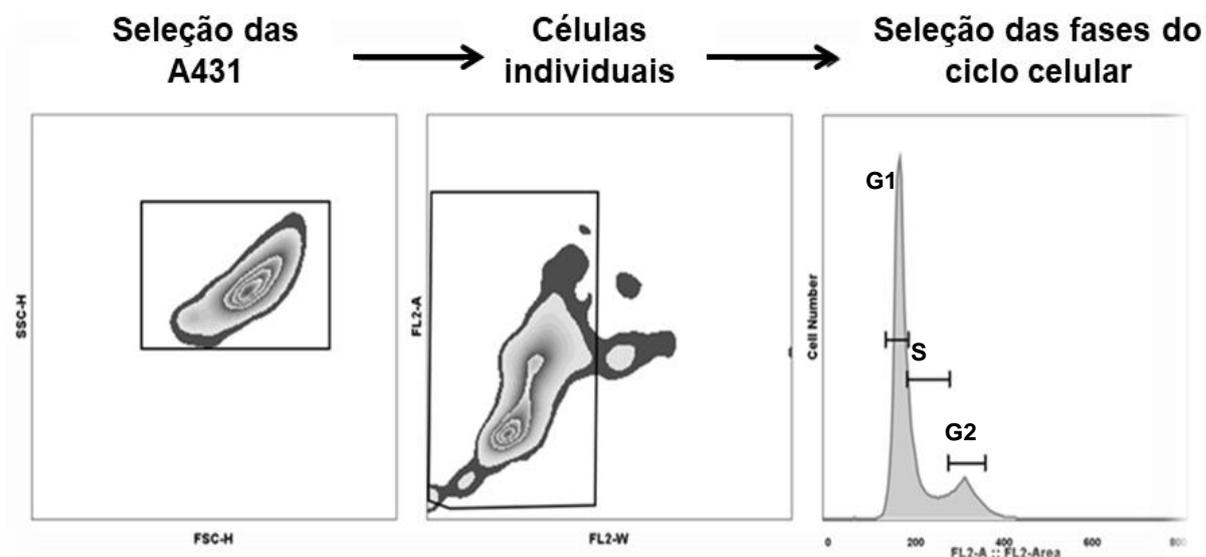
Gráfico 3: Estratégia de seleção das populações para análises das fluorescências de AF488_{IgG} e Pe-CF594_{IgG}



Fonte: REIS, 2019.

Estratégia de análise para marcação do ciclo celular. As células analisadas no citômetro de fluxo FACSCantoll foram identificadas, inicialmente, em *FSC x SSC*. A partir deste Gráfico foi construído o Gráfico para exclusão dos agregados e dos fragmentos celulares (gate para *singlets*). Feito na diagonal em *FL2-W x FL2-A*, em seguida construído o histograma em *FL2-A* como demonstrado no Gráfico 4.

Gráfico 4: Estratégia de seleção para purificação da população para o ciclo celular.



Fonte: REIS, 2019

3.6 Análises Estatísticas

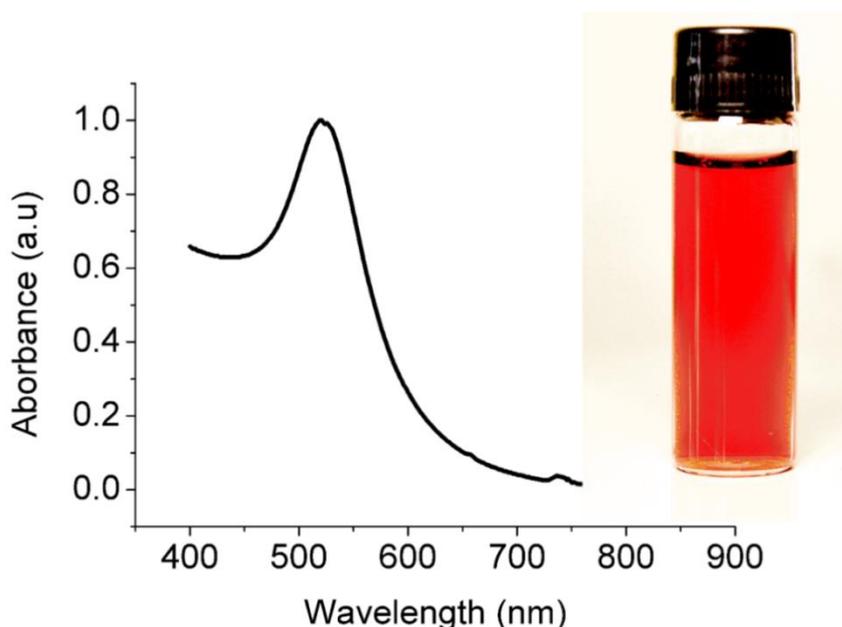
Os dados foram interpretados no software *GraphPadPrism* version 7.0, método de Análise de Variância one-way ANOVA, o método estatístico de Bonferroni. Foi utilizado como contra-prova e foi escolhido o nível de significância estatística com o valor $p < 0,05$.

4.1 Síntese e caracterização espectroscópica e morfológica das AuNPs.

4.1.1 Absorbância por espectroscopia no ultravioleta visível

As AuNPs foram sintetizadas, neste trabalho, pela rota do citrato de sódio. Elas apresentam-se monodispersas e com diâmetro característico de nanopartículas esféricas entre 20 nm e 50 nm. Além disso, as nanopartículas esféricas possuem um pico de absorção em 520 nm, que é o pico característico destas nanoestruturas conferindo sua identidade espectroscópica como mostrado na Figura 14. Devido ao efeito da ressonância plasmônica de superfície (SPR) as AuNPs esféricas apresentam cor vermelha ao interagirem com a luz. O efeito óptico mostra diferentes tonalidades a depender do tamanho das nanopartículas (MANSUR et al., 2010).

Figura 14: Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível das AuNPs.

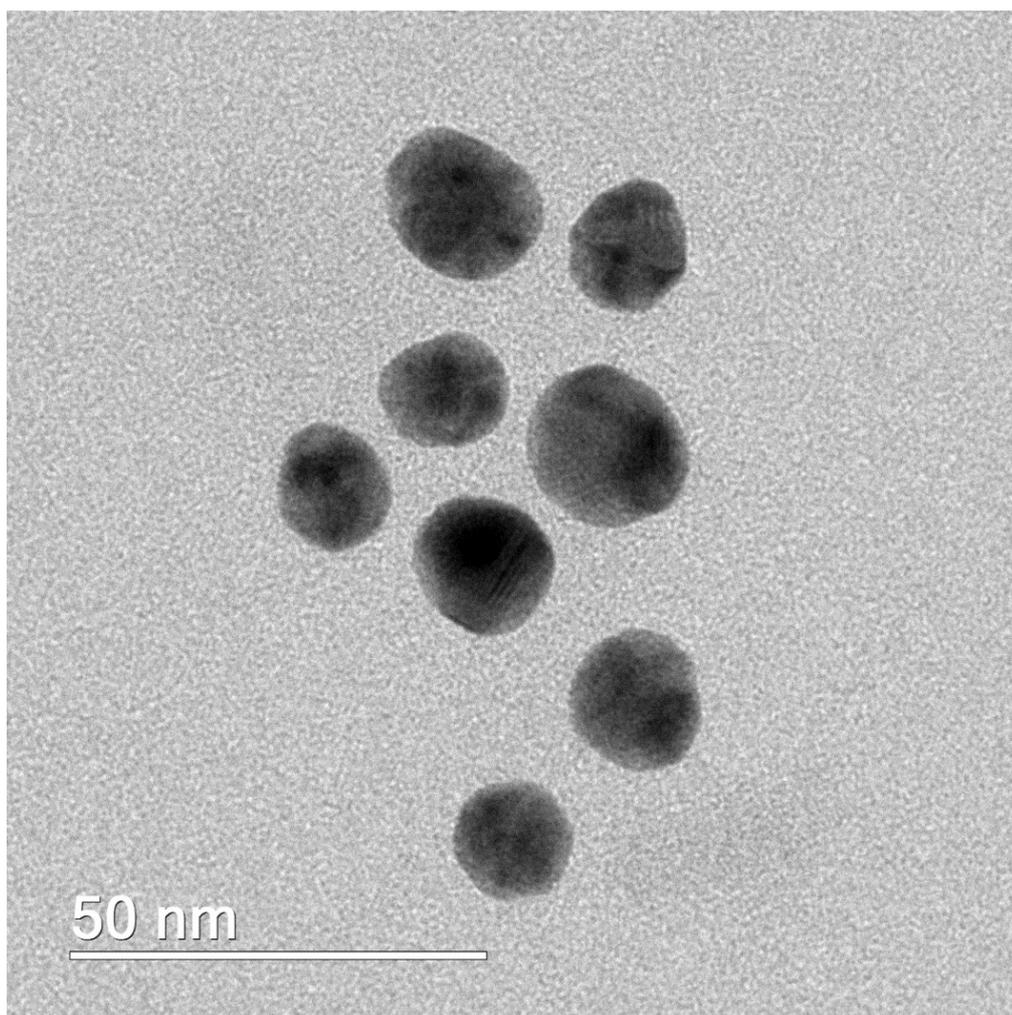


Legenda: Imagem mostra o pico de absorção em 520 nm, característico de AuNPs esféricas. Em detalhe solução coloidal de AuNPs na cor vermelho-vinho típico de nanopartículas entre 20nm e 50nm. Fonte: REIS,2019

4.1.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão permite analisar, detalhadamente, as características morfológicas e a distribuição de tamanhos das nanopartículas. Os resultados mostram a presença de AuNPs esféricas e com diâmetro médio de 20 nm (Figura 15).

Figura 15: Imagem representativa das AuNPs sintetizadas.

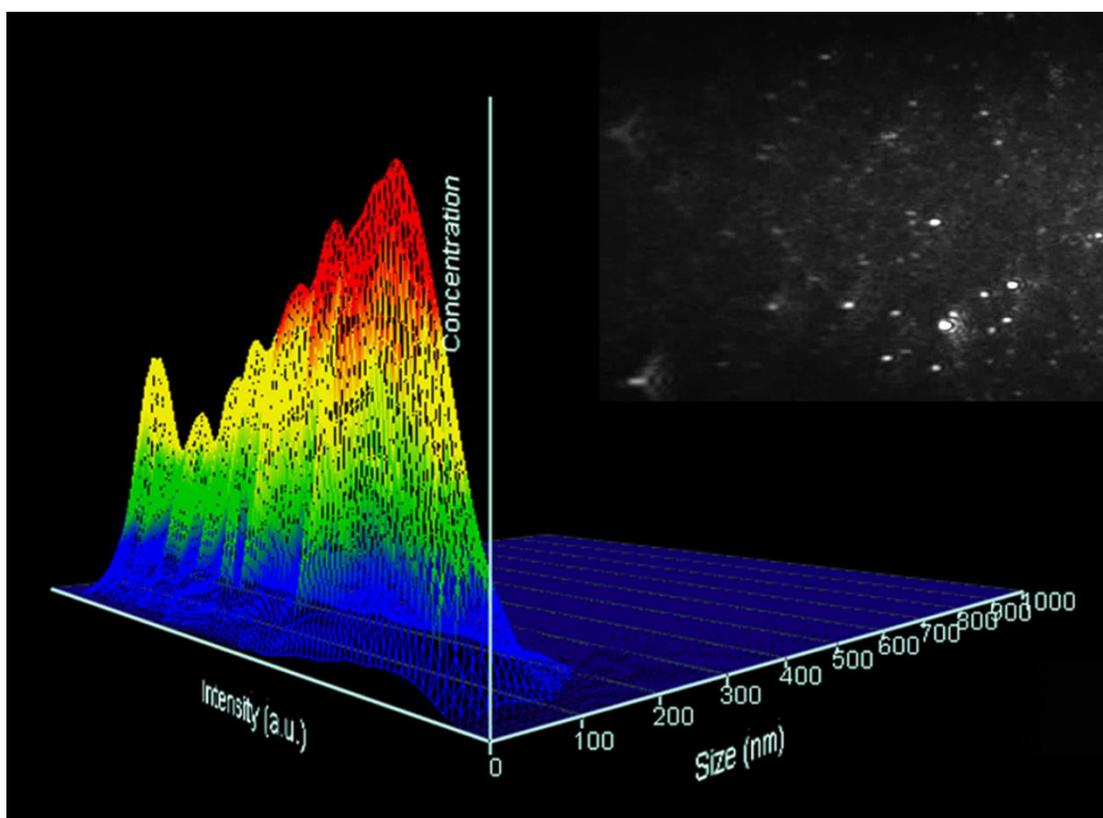


Legenda: A imagem de MET mostra a presença de AuNPs esféricas e monodispersas. Fonte: REIS, 2019.

4.1.3 Espalhamento dinâmico de Luz (DLS) – Raio hidrodinâmico das partículas

O espalhamento de luz dinâmica (DLS) baseia-se no movimento browniano, onde a colisão com as moléculas do diluente gera um movimento aleatório das partículas (EINSTEINS, 1906), e no espalhamento de luz das partículas em suspensão em meio líquido (STETEFELD et al., 2016). O tamanho, a concentração e a dispersão das nanopartículas também podem ser investigados pelo espalhamento dinâmico de luz, medindo o movimento browniano das nanopartículas. A Figura 16 mostra que as AuNPs usadas neste trabalho são monodispersas e estão na faixa de tamanho entre $47.5\text{nm} \pm 14.5\text{nm}$. A quantificação feita por esta técnica identificou $2.95 \times 10^9 \pm 7.11 \times 10^7$ partículas / mL

Figura 16: Dispersão das AuNPs.



Legenda: A imagem mostra a dispersão e a faixa de tamanho de um grupo de nanopartículas esféricas pela técnica nanoparticles tracking analysis (NTA) e em detalhe no canto superior direito imagem representativa do movimento browniano das nanopartículas. Fonte: REIS,2019.

4.1.4 Espectroscopia de absorção atômica

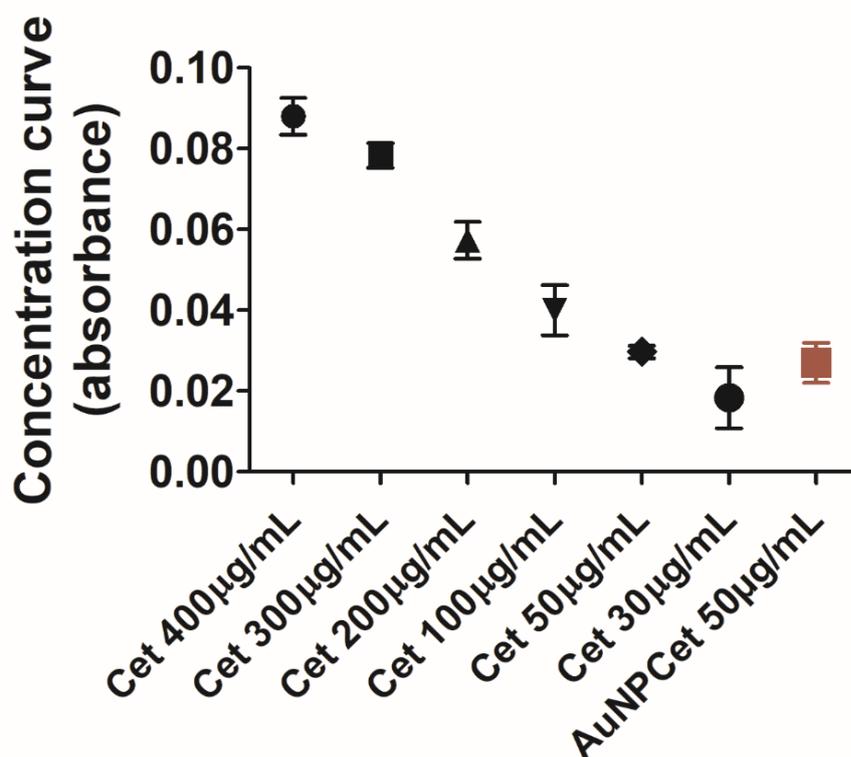
A quantificação da concentração das AuNPs foi feita usando espectroscopia de absorção atômica por forno de grafite, mostrando que a síntese rendeu 68.71×10^{-3} g / L.

4.2 Caracterização dos nanocomplexos AuNPCet_{IgG} e AuNPCD44_{IgG}

4.2.1 Curva de concentração do cetuximabe

A concentração de cetuximabe ligada ao nanocomplexo foi avaliada por absorbância comparada, à curva de concentração do cetuximabe em 280 nm, usando o espectrofotômetro Nanodrop 1000, como mostra o Gráfico 5.

Gráfico 5: Curva de concentração do cetuximabe ligado às AuNPs.

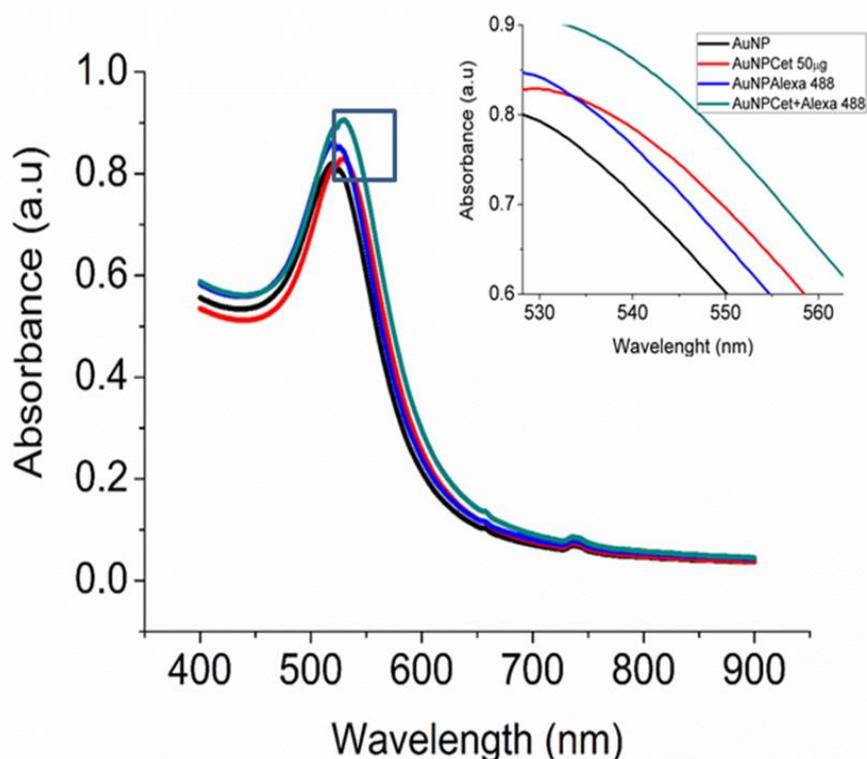


Legenda: A imagem sugere que o nanocomplexo formado apresenta uma concentração de cetuximabe bem próxima de 50 µg , indicando a formação do nanocomplexo. Fonte: REIS, 2019.

4.2.2 Espectroscopia UV-VIS dos nanocomplexos AuNPCet_{IgG} e AuNPCD44_{IgG}

A análise de UV-Vis foi realizada no espectrofotômetro Varioskan. As amostras de AuNPs não marcadas, conjugadas somente com o anticorpo AF488_{IgG} e o nanocomplexo AuNPCet_{IgG}AF488_{IgG} marcado, respectivamente, com os fluoróforos usando um fator de diluição 1 : 2000 μ L, incubado à temperatura ambiente em agitação constante e protegido da luz por 60min. Para confirmar a formação do nanocomplexo ele foi marcado com o fluoróforo AF488_{IgG} (1 : 400 μ L) que reconhece o cetuximabe. O Gráfico 6 mostra o deslocamento de absorção do AuNPCet_{IgG} marcado, e não marcado, em relação ao pico das AuNPs sugerindo o sucesso da bioconjugação.

Gráfico 6: Espectroscopia de absorção na região do visível das AuNPCet_{IgG}.

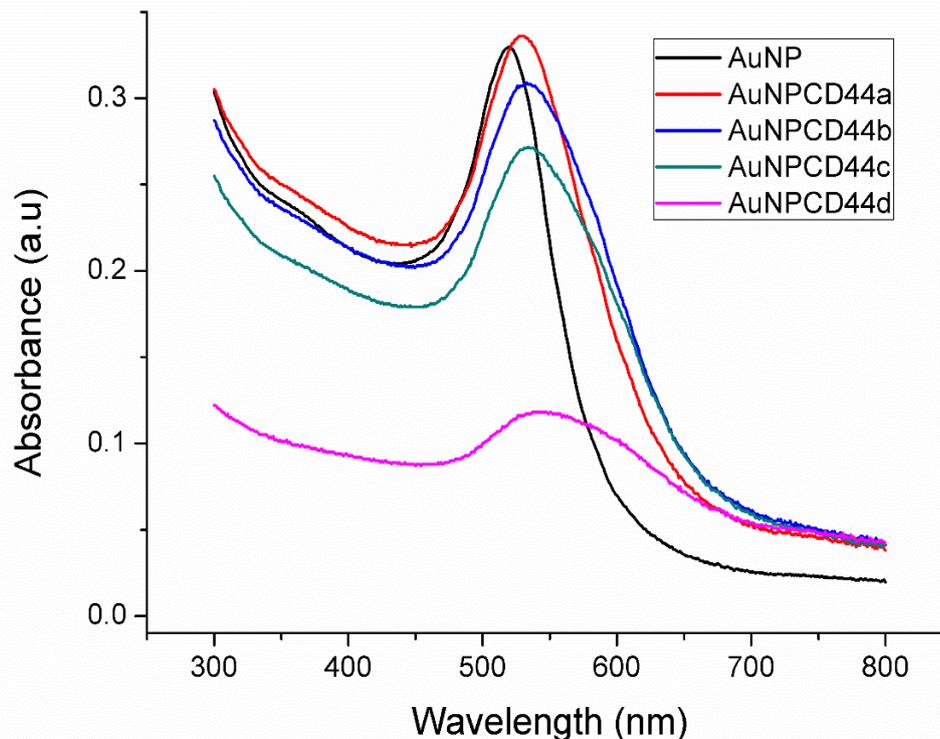


Reis,D.S, 2019

Legenda: A imagem mostra, que houve um deslocamento do pico de absorbância para além do pico característico de AuNPs em 520 nm indicando mudança do ambiente químico local com a formação do nanocomplexo Cetumabe AuNPs. Fonte:REIS, 2019.

Como proposta de melhoramento da detecção de fluorescência pela ligação de anticorpos às AuNPs, a eficiência de ligação e a intensidade de fluorescência, também foi testada usando o anticorpo anti-CD44 como anticorpo primário. Primeiro, o ponto isoelétrico que favorece a bioconjugação entre as AuNPs e o anti-CD44 foi detectado por variação de pH. Foi testado uma faixa de pHs variando entre 4 a 10. O ponto isoelétrico que favorece a ligação entre as AuNPs e o anticorpo primário anti-CD44 foi encontrado em pH 10 (AuNPCD44a) onde não há sinal de aglomeração das nanopartículas. O fabricante sugere que para uma marcação eficiente é preciso usar 10 μg de anticorpo em uma diluição de 1 μL de anticorpo em 50 μL de água deionizada. Na formação deste nanocomplexo foi diluição de 1 μL de anticorpo em 500 μL de água deionizada, obtendo-se um eficiente nanocomplexo AuNPCD44_{IgG}, contendo uma concentração de 1 μg de anticorpo ligado às nanopartículas. Os perfis espectroscópicos dos diferentes pHs aplicados para se encontrar o ponto isoelétrico do CD44_{IgG} são apresentados no Gráfico 7.

Gráfico 7: Mudança do perfil espectroscópico na região do visível do nanocomplexo AuNPCD44_{IgG}.

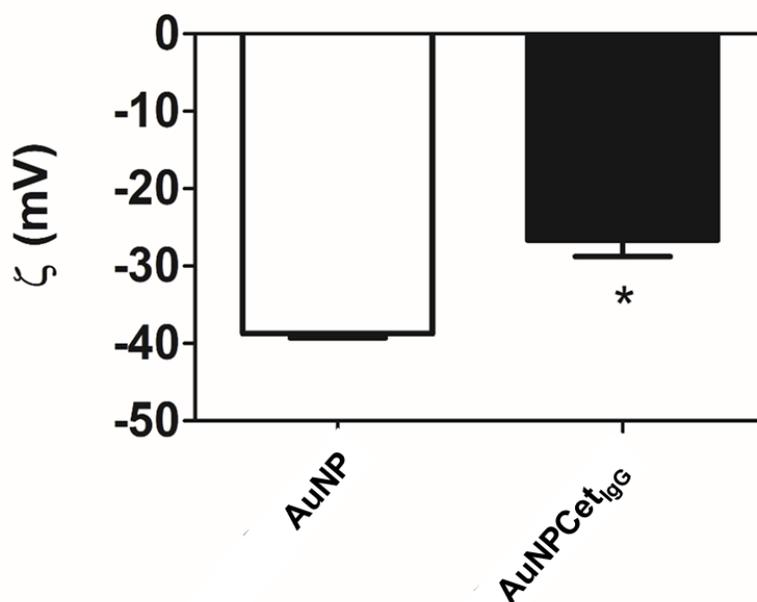


Hem 520 nm, indicando mudança do ambiente químico local com a formação do nanocomplexo AuNPCD44_{IgG}. O nanocomplexo AuNPCD44_{IgG}a mostra *shift* plasmônico, enquanto os demais mostram alongamento da curva indicando aglomeração das nanopartículas. AuNP: nanopartículas de ouro; AuNPCD44_{IgG} a: pH 10; AuNPCD44_{IgG} b: pH 6; AuNPCD44_{IgG} c: pH 5 e AuNPCD44_{IgG} d: pH 4. Fonte: REIS, 2019.

4.2.3 Potencial Zeta (ζ)

O potencial zeta ζ prediz a estabilidade de dispersão de suspensões ou emulsões coloidais. Nanopartículas em solução apresentam estabilidade quando seus valores apresentam positivos ou negativos acima de -25mV de potencial zeta segundo TURKEVICH 1951; LU et al., 2006, pois as partículas carregadas se repelem impedindo a agregação naturalmente. Entretanto este valor de referência varia conforme o autor. Neste trabalho, o potencial zeta das AuNPs puras se mostrou negativo -40mV , devido ao capeamento pelos íons de citrato de sódio, impedido a sua agregação. Após a funcionalização com os anticorpos primários Cet_{IgG} e CD44_{IgG}, houve a redução do potencial zeta em cada nanocomplexo indicado a modificação química da superfície das AuNPs puras permanecendo o valor absoluto negativo. Este valor é propício para conservação do estado disperso do nanocomplexo.

Gráfico 8: Análise do valor absoluto do potencial zeta das superfície das AuNPs com a formação do nanocomplexo AuNPCet_{IgG}.

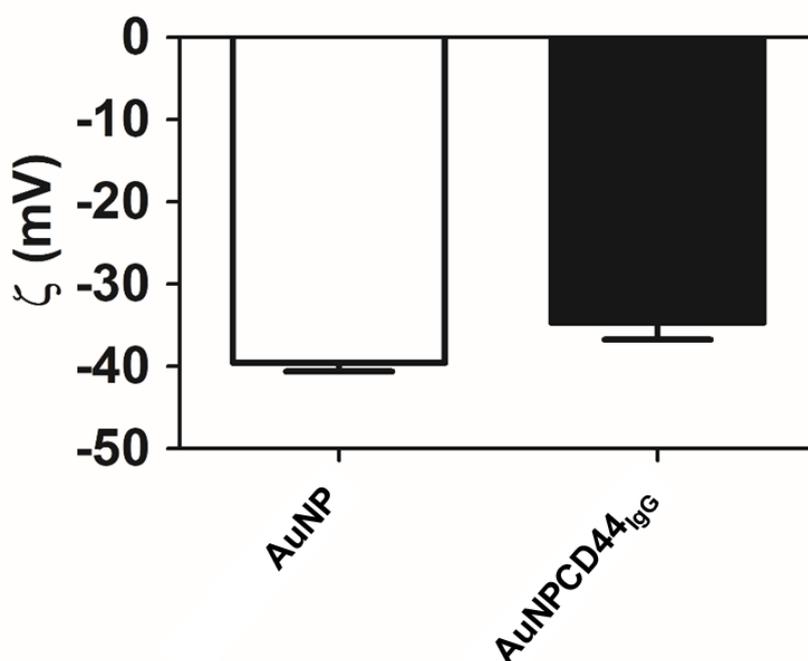


Legenda: O valor absoluto variou de -40mV para -30mV após a funcionalização, indicando, a modificação química da superfície das AuNPs. AuNP: nanopartículas puras na concentração $16\ \mu\text{g} / \text{mL}$; AuNPCet_{IgG}: nanopartículas de ouro $16\ \mu\text{g} / \text{mL}$ + anticorpo primário cetuximabe $50\ \mu\text{g} / \text{mL}$. Fonte: REIS, 2019.

O valor do potencial Zeta de superfície das AuNPs puras foi de -40mV, o que demonstra que a superfície destas nanopartículas está carregada negativamente (Gráfico 8). Após a funcionalização com cetuximabe esse valor ficou bem próximo ao da amostra pura, de -30mV, indicando que o anticorpo primário recobriu a superfície das AuNPs. O potencial zeta foi obtido de 3 amostras distintas pelo equipamento Zetasizer Nano ZS90 – Malvern, sob o ângulo de dispersão de 173° à temperatura ambiente e o laser de excitação 633nm.

Novamente, para confirmarmos a formação do nanocomplexo, desta vez com o anticorpo primário CD44_{IgG}, realizamos a medida do potencial zeta do nanocomplexo AuNPCD44_{IgG}. Observamos a mudança do valor absoluto do potencial zeta das superfícies das AuNPs puras de -39mV para -34mV confirmando o resultado do UV-Vis (Gráfico 9).

Gráfico 9: Análise do valor absoluto do potencial zeta das superfícies das AuNPs com a formação do nanocomplexo AuNPCD44_{IgG}.

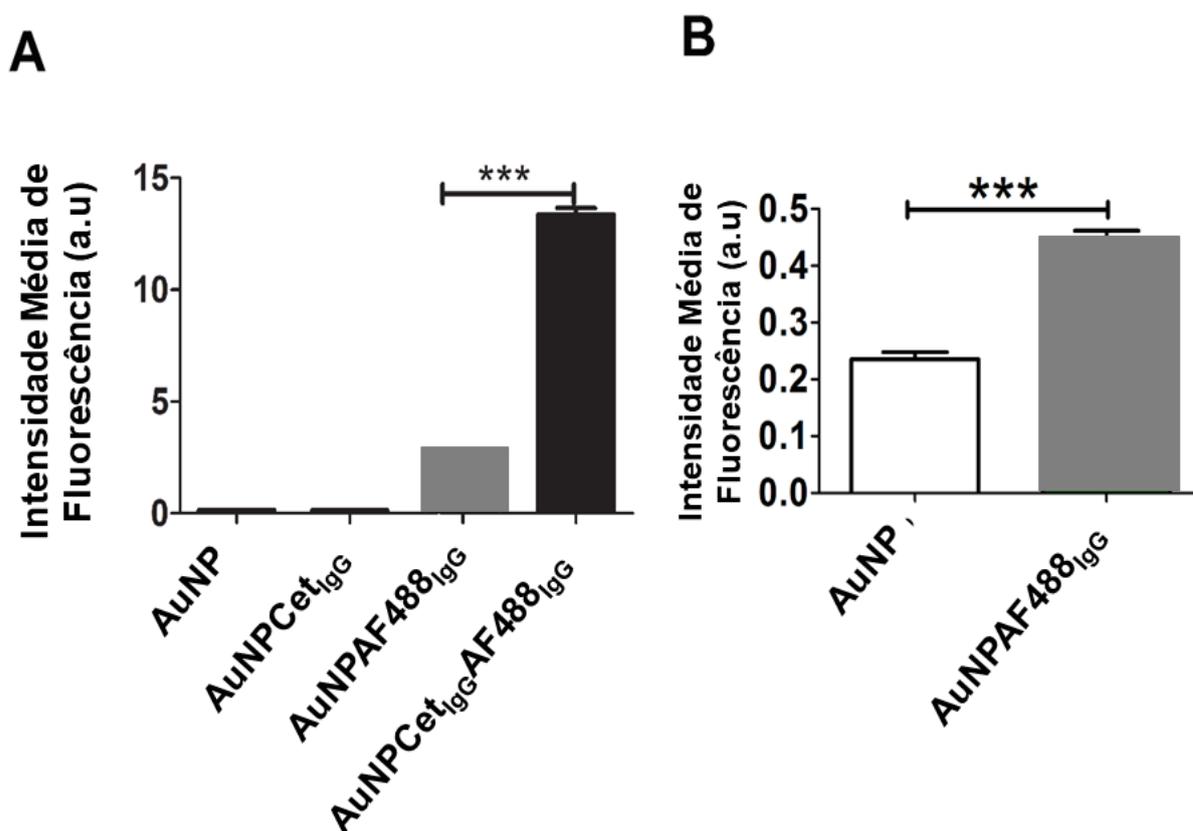


Legenda: O valor absoluto variou de -39mV para -34mV após a funcionalização, indicando, a modificação química da superfície das AuNPs. AuNP: nanopartículas puras na concentração 16 µg / mL; AuNPCD44_{IgG}: nanopartículas de ouro 16 µg / mL funcionalizadas com o anticorpo primário anti-CD44 1 µg (1 : 500 µL). Fonte: REIS, 2019.

4.2.4 Fluorimetria

A fluorimetria confirmou que o nanocomplexo foi formado, pois a intensa fluorescência observada mostra a ligação do fluoróforo no nanocomplexo usando 495 nm de excitação e 519 nm de emissão como mostra o Gráfico 10A. A ligação do fluoróforo às AuNPs também foram observadas em ambos os ensaios. Nenhuma fluorescência foi detectada para AuNPs não marcadas. O Gráfico 10B mostra a ligação do AF488_{IgG} na nanopartícula de ouro.

Gráfico 10: Formação do nanocomplexo AuNPCet_{IgG} e AF488_{IgG} por fluorimetria.

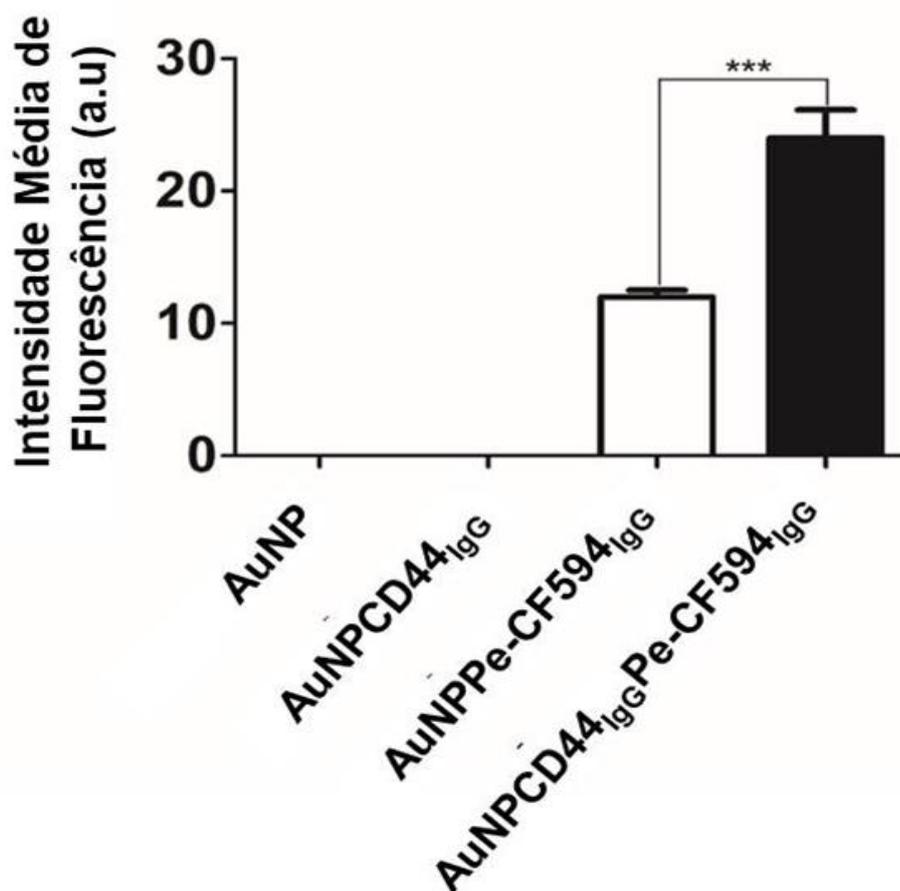


Legenda: A imagem A mostra a IMF, obtida do fluorímetro Varioskan com 495_{exc} e 519_{emi} comprovando a eficiência da marcação AuNPCet_{IgG}. A imagem B mostra uma fraca ligação do AF488_{IgG} na superfície das AuNPs. (Média \pm desvio padrão: *** $p < 0.001$). AuNP: nanopartículas puras na concentração 16 $\mu\text{g} / \text{mL}$; AuNPCet_{IgG}: nanopartículas de ouro 16 $\mu\text{g} / \text{mL}$ + anticorpo primário cetuximabe 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$; AuNPAF488_{IgG}: nanopartículas de ouro 16 $\mu\text{g} / \text{mL}$ + anticorpo secundário AF488_{IgG} diluição 1 : 400 μL ; AuNPCet_{IgG}-AF488_{IgG}: nanopartículas de ouro 16 $\mu\text{g} / \text{mL}$ + anticorpo primário cetuximabe 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ + anticorpo secundário AF488_{IgG} diluição 1:2000 μL . Fonte: REIS, 2019.

O mesmo teste foi realizado para o anti-CD44. O resultado da fluorimetria confirmou a formação do nanocomplexo AuNPCD44_{IgG}-Pe-CF594_{IgG}. A intensidade média da

fluorescência mostrou a ligação do fluoróforo ao nanocomplexo por meio do equipamento Varioskan, com laser 532 nm de excitação e filtros 616 nm de detecção. A fluorescência das AuNPs puras foi indetectável após o processo de funcionalização com o anticorpo primário anti-CD44 confirmando novamente que as AuNPs não emitem sinal de fluorescência (Gráfico 11).

Gráfico 11: Formação dos nanocomplexos AuNPCD44_{IgG} e AuNPPe-CF594_{IgG} por fluorimetria.



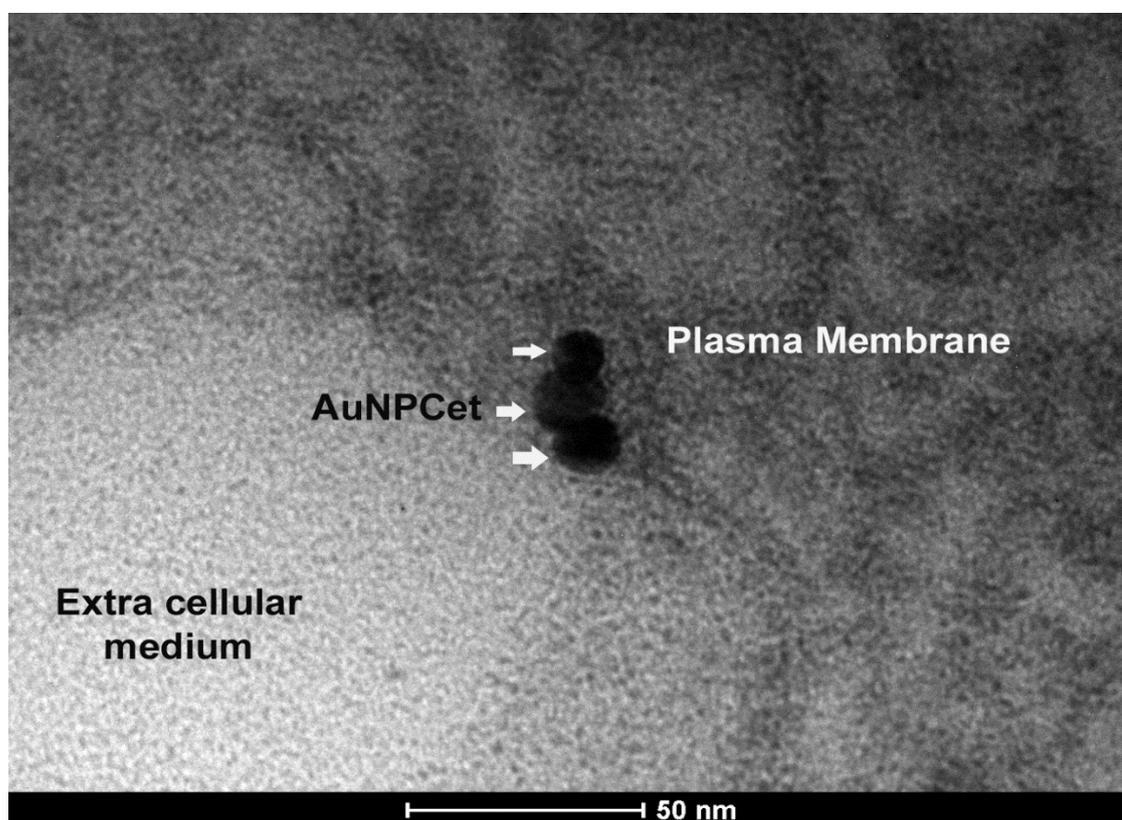
Legenda: As nanopartículas puras e funcionalizadas com o CD44_{IgG} não apresentaram detecção de fluorescência. As nanopartículas funcionalizadas com o anticorpo secundário Pe-CF594_{IgG} foi possível observar a detecção do sinal fluorescente, e logo após a conjugação do anticorpo secundário Pe-CF594_{IgG} ao nanocomplexo AuNPCD44_{IgG} observou-se maior emissão do sinal de fluorescência. A imagem mostra a IMF do nanocomplexo AuNPCD44_{IgG}Pe-CF594_{IgG}. (Média \pm desvio padrão: *** $p < 0.001$). AuNPs: AuNP: nanopartículas de ouro puras na concentração 16 $\mu\text{g} / \text{mL}$; AuNPCD44_{IgG}: nanopartículas de ouro 16 $\mu\text{g} / \text{mL}$ funcionalizadas com o anticorpo primário anti-CD44 1 μg (1 : 500 μL); AuNPs Pe-CF594_{IgG}: nanopartículas de ouro 16 $\mu\text{g} / \text{mL}$ funcionalizadas com o anticorpo secundário PeCF594_{IgG} 0,1 μg (1 : 2000 μL); AuNPCD44_{IgG}Pe-CF594_{IgG}: nanopartículas de ouro 16 $\mu\text{g} / \text{mL}$ funcionalizadas com o anticorpo primário anti-CD44 1 μg (1 : 500 μL) e marcadas com o anticorpo secundário Pe-CF594_{IgG} 0,1 μg (1 : 2000 μL). Fonte: REIS, 2019.

4.2.5 Microscopia eletrônica de transmissão

4.2.5.1 O nanocomplexo AuNPCet_{IgG} se liga ao receptor do EGFR das células A431 de forma eficiente.

A formação de um nanocomplexo com o cetuximabe deve preservar a afinidade de ligação como a do imunoterápico sozinho. Neste estudo foi escolhido como modelo *in vitro* a linhagem celular humana A431, carcinoma de células escamosas, que superexpressa EGFR. A Figura 17 mostra a presença do AuNPCet_{IgG} na membrana plasmática das células A431 sugerindo o reconhecimento do nanocomplexo ao receptor EGFR.

Figura 17: Imagem representativa do nanocomplexo AuNPCet_{IgG} por MET.



Legenda: A imagem de MET mostra um grupo de nanopartículas esféricas complexadas com cetuximabe em contato com os receptores de EGF na membrana plasmática das células A431 e iniciando um processo de endocitose. Fonte: REIS, 2019.

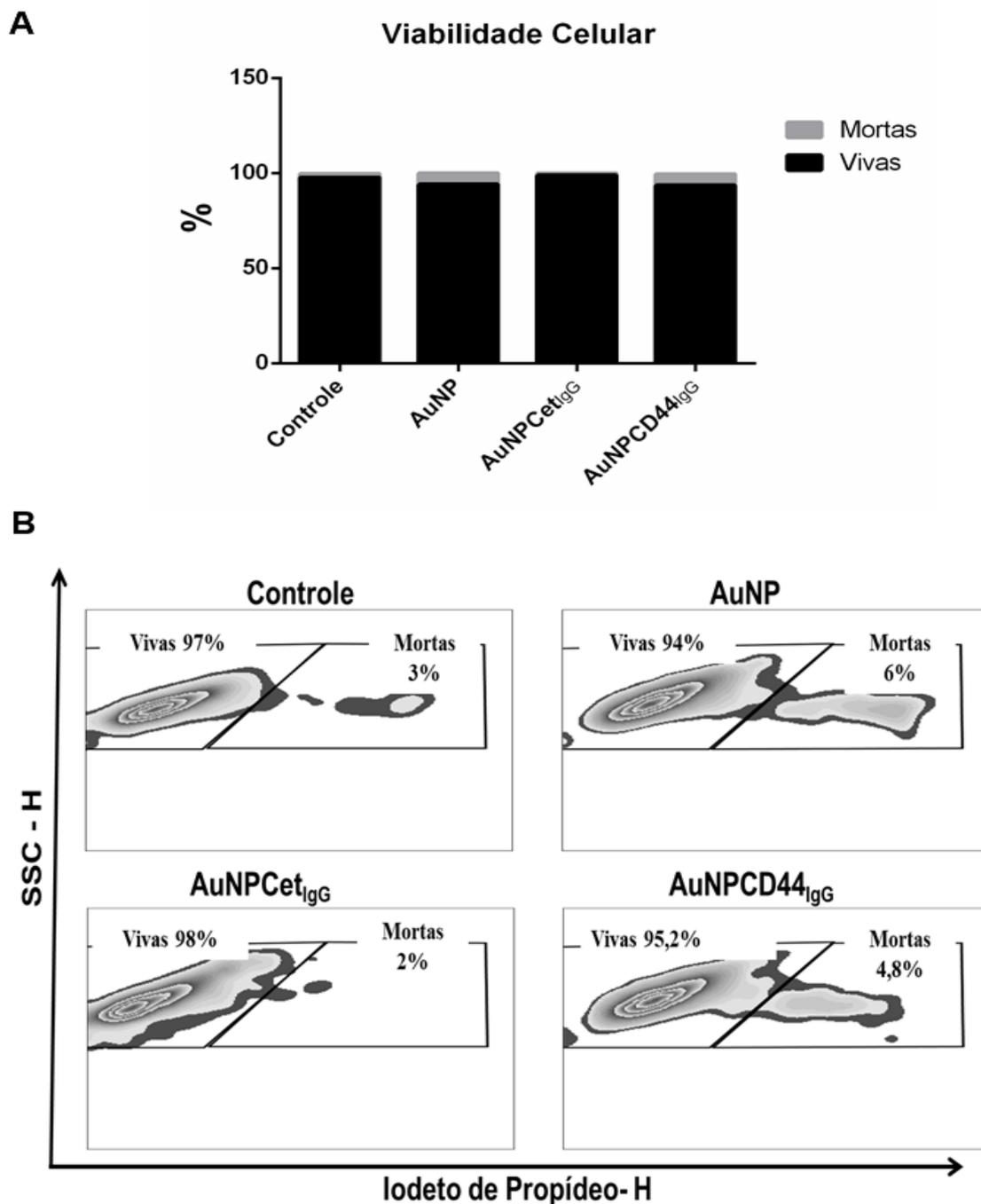
4.2.6 Citometria de Fluxo

4.2.6.1 Avaliação da viabilidade das células A431 na presença das AuNPs e dos nanocomplexos AuNPCet_{IgG} e AuNPCD44_{IgG}

Para avaliar a toxicidade das AuNPs em células A431 após 60 minutos de incubação, foi realizado o estudo de viabilidade celular com iodeto de propídeo. Essa marcação possibilita a classificação das células viáveis, as quais, não internalizaram o corante demonstrando integridade da membrana plasmática (FERRAZ, 2014). As células mortas são aquelas que apresentaram os seus núcleos marcados com PI pela perda da integridade das membranas (Gráficos 12A e 12B). Os resultados demonstram que houve alta taxa de viabilidade celular em todos os grupos testados.

A presença de AuNPs 16 µg / mL não afeta a viabilidade celular em nenhuma das condições experimentais executadas neste estudo, indicando que os anticorpos nanocomplexados apresentam segurança de uso, não causando morte celular significativa em comparação a amostra não incubada com as AuNPs. O Gráfico 12 mostra a alta taxa de viabilidade das células A431 quando marcadas com os nanocomplexos AuNPCet_{IgG} e AuNPCD44_{IgG} sem, diferença significativa (Média ± desvio padrão: p= 0,6187) na indução de morte durante a incubação com os nanocomplexos.

Gráfico 12: Ensaio de viabilidade celular e citotoxicidade.

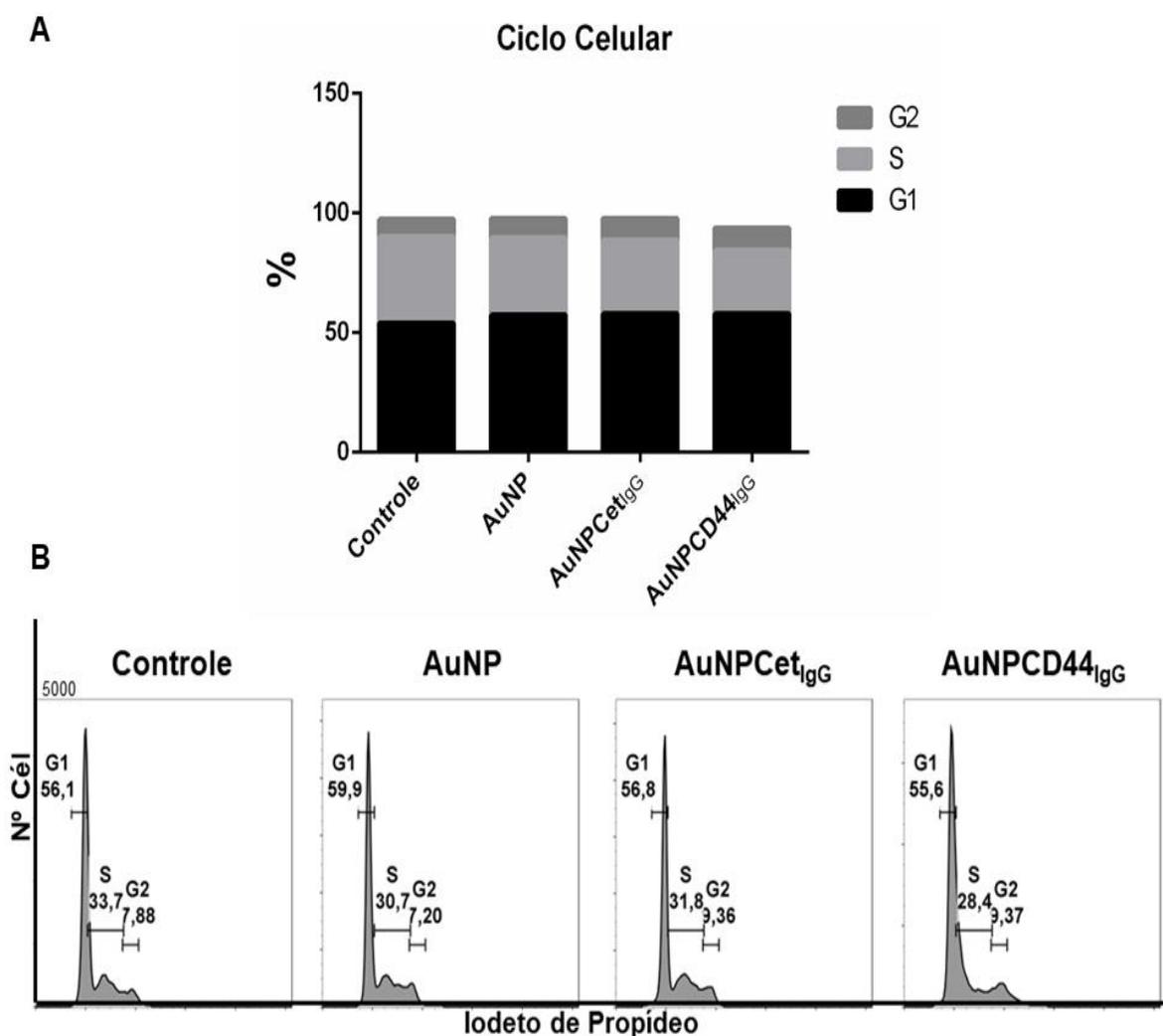


Legenda: As células A431 foram marcadas com os nanocomplexos AuNPCet_{1gG} e AuNPCD44_{1gG}. A Figura (A) mostra o alto percentual de viabilidade celular nas condições experimentais e a Figura (B) mostra *dot plot* representativo da seleção das populações de células vivas não coradas pelo PI e as mortas que não apresentam marcação nuclear pelo corante. (Média \pm desvio padrão: $p = 0,6187$). Controle: células A431 não marcadas; AuNP: células A431 incubadas com nanopartículas puras na concentração 16 $\mu\text{g} / \text{mL}$; AuNPCet_{1gG}: células A431 marcadas com o nanocomplexo formado por AuNPs 16 $\mu\text{g} / \text{mL}$ + anticorpo primário cetuximabe 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$; AuNPCD44_{1gG}: marcadas com o nanocomplexo formado por AuNPs 16 $\mu\text{g} / \text{mL}$ + anticorpo primário anti-CD44 1 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Fonte: REIS, 2019.

4.2.6.2 Avaliação do perfil do ciclo celular das células A431 na presença das AuNPs e dos nanocomplexos AuNPCet_{IgG} e AuNPCD44_{IgG}

A citometria de fluxo foi utilizada para avaliar se houve interferência dos nanocomplexos em algum ponto das fases do ciclo celular, após 60 minutos de incubação com as AuNPs e dos nanocomplexos. Os resultados do teste de ciclo celular estão expostos no Gráfico 13. Eles demonstraram que a frequência das células em cada fase do ciclo celular G1, S e G2 dos nanocomplexos AuNP, AuNPCet_{IgG} e AuNPCD44_{IgG}, permanecem inalteradas em todas as amostras quando comparadas com a amostra não incubada AuNPs (Controle) (Gráficos 13A e 13B). As AuNPs não interfere no ciclo celular das células A431.

Gráfico 13: Avaliação do ciclo celular das células A431 quando expostas às AuNPs e aos nanocomplexos AuNPCet_{IgG} e AuNPCD44_{IgG}.



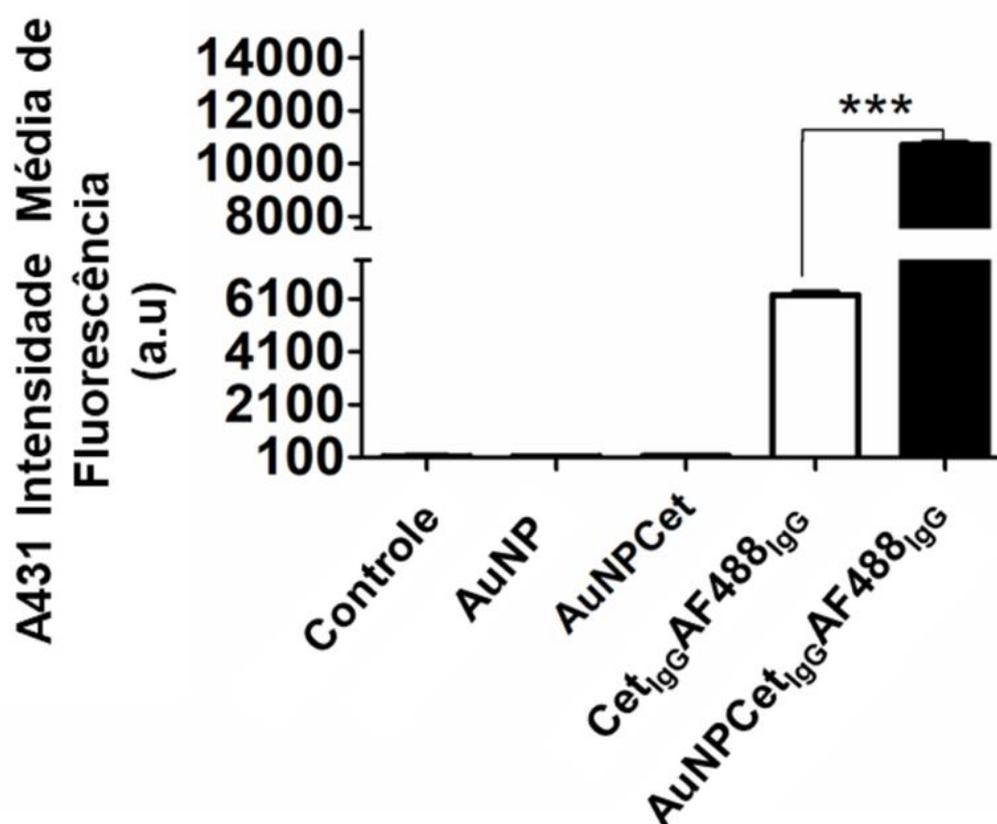
Legenda: Não houve diferença significativa entre as amostras. (Média \pm desvio padrão: $p=0,1089$). Controle: células A431 não marcadas; AuNP: células A431 incubadas com nanopartículas puras na concentração 16 $\mu\text{g} / \text{mL}$; AuNPCet_{IgG}: células A431 marcadas com o nanocomplexo formado por AuNPs 16 $\mu\text{g} / \text{mL}$ + anticorpo primário cetuximabe 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$; AuNPCD44_{IgG}: marcadas com o nanocomplexo formado por AuNPs 16 $\mu\text{g} / \text{mL}$ + anticorpo primário anti-CD44 1 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Fonte: REIS, 2019.

4.2.6.3 Imunofenotipagem dos nanocomplexos AuNPCet_{IgG} e AuNPCD44_{IgG}

As células A431 foram incubadas com as AuNPs puras (16 $\mu\text{g} / \text{mL}$), com o anticorpo primário Cet_{IgG} (5 mg / mL) e com o nanocomplexo AuNPCe_{tIgG} (AuNPs (16 $\mu\text{g} / \text{mL}$ + anticorpo primário cetuximabe 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$). O nanocomplexo AuNPCet_{IgG} foi marcado com o anticorpo AF488_{IgG} (1 : 400 μL) e o reconhecimento

do nanocomplexo ao receptor de EGF das células A431 foi identificado por citometria de fluxo usando o equipamento FACSCanto II. O controle não marcado, as AuNPs e o AuNPCet_{IgG}. Como esperado as amostras de células A431 controle, A431 incubadas com AuNPs puras e A431 incubadas com o nanocomplexo AuNPCet_{IgG} não emitiram sinal fluorescência. A eficiência de reconhecimento mostra que a IMF é significativamente ($p < 0.001$) maior para o nanocomplexo quando comparado com Cet_{IgG} AF488_{IgG} sozinho como mostrado no Gráfico 14.

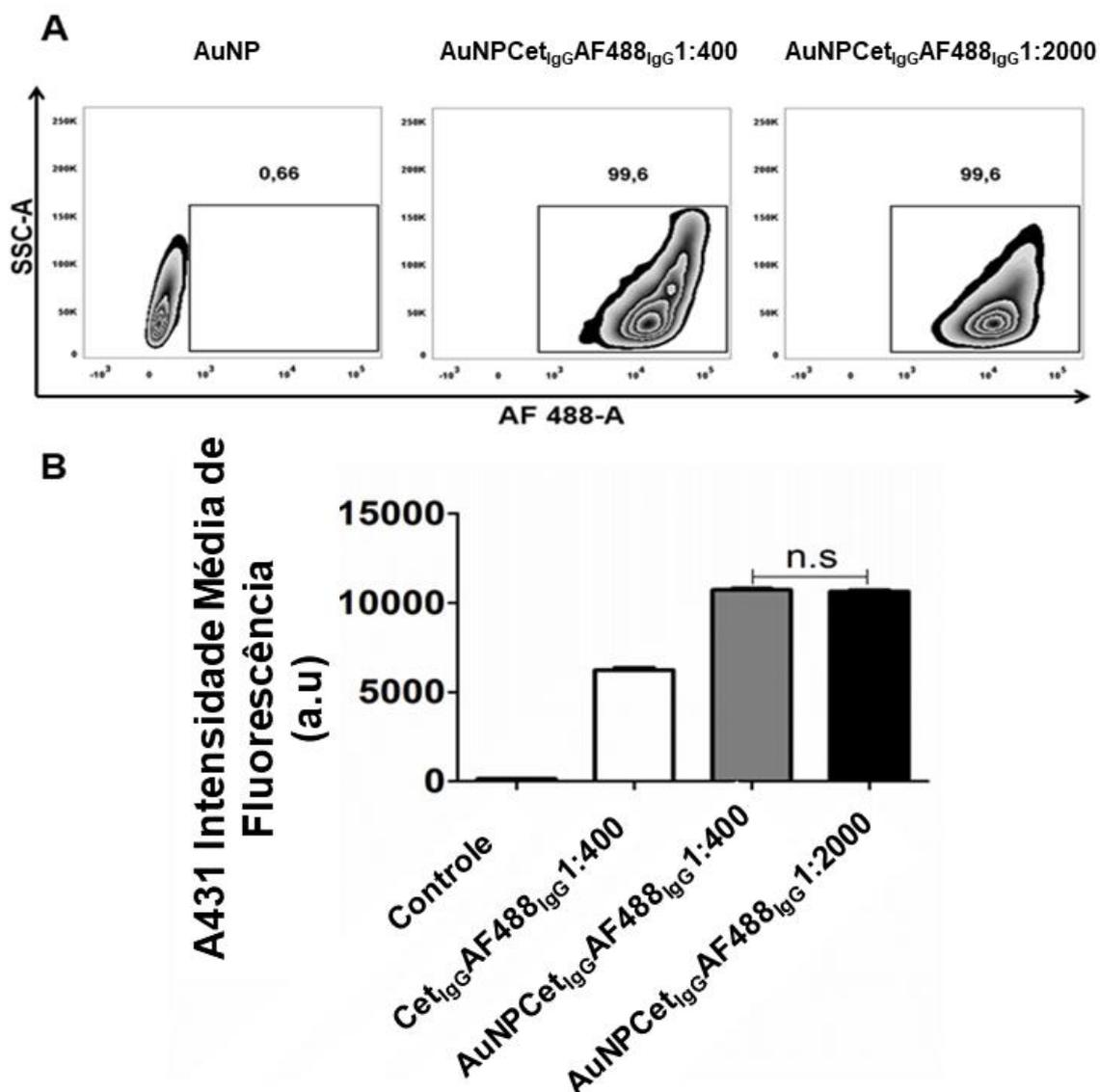
Gráfico 14: Intensidade média de fluorescência do AuNPCet_{IgG} AF488.



Legenda: O resultado mostra que nanocomplexo AuNPCet_{IgG} reconheceu de forma eficiente o receptor de EGF das células A431, mostrando que não há diferença na capacidade de ligação ao receptor entre as amostras e, sim, que o nanocomplexo apresentou uma IMF maior. (Média \pm desvio padrão: *** $p < 0.001$). Controle: células A431 não marcadas; AuNPs: células A431 incubadas com nanopartículas puras na concentração 16 $\mu\text{g} / \text{mL}$; AuNPCet_{IgG}: células A431 marcadas com o nanocomplexo formado por AuNPs 16 $\mu\text{g} / \text{mL}$ + anticorpo primário cetuximabe 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$; Cet_{IgG}AF488_{IgG}: Cet_{IgG}AF488_{IgG} 1 : 400 μL : células A431 marcadas com Cet_{IgG} 5 mg / mL e AF488 diluição (1 : 400 μL); AuNPCet_{IgG}AF488_{IgG}: células A431 marcadas com o nanocomplexo formado por AuNPs 16 $\mu\text{g} / \text{mL}$ + anticorpo primário cetuximabe 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ e o anticorpo secundário AF488 na diluição 1 : 400 μL . Fonte: REIS, 2019.

4.3 As AuNPs aumentam a eficiência de detecção dos anticorpos primários e secundários usando baixas concentrações

A bioconjugação de cetuximabe às AuNPs aumentou a eficiência evidenciado pelo aumento da IMF, como mostrado no Gráfico 14. Uma quantidade bem menor de cetuximabe (50 μg) foi necessária para formar o nanocomplexo e se ligar ao seu receptor. Baseado neste achado, diluições do fluoróforo também foram testadas para identificar se o sinal ainda poderia ser detectado. Os resultados mostram que um sinal forte também foi encontrado quando o nanocomplexo foi marcado com AF488_{IgG} diluído em 1 : 2000 μL , o que mostra que o nanocomplexo AuNPCet_{IgG} reconheceu de forma eficiente os receptores de EGFR das células A431 mostrando ser mais eficiente quando comparado ao imunoterápico não complexado proporcionando economia de anticorpos (Gráfico 15).

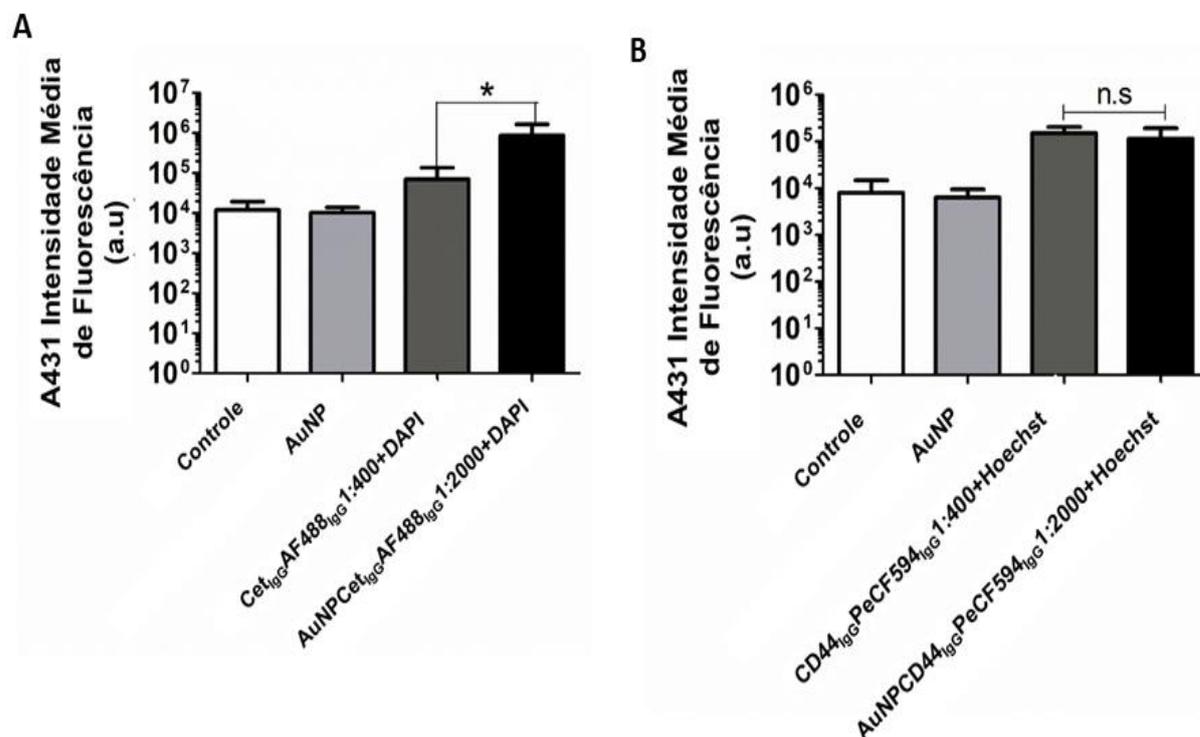
Gráfico 15: Aumento da IMF do AuNP_{Cet_{1gG}}AF488_{1gG} em baixas concentrações.

Legenda: (A) frequência das células expostas às AuNPs puras e marcadas, respectivamente, pelo nanocomplexo AuNP_{Cet_{1gG}}AF488_{1gG} nas diluições do anticorpo primário cetuximabe 50 µg / mL e secundário Alexa Fluor 488 (1 : 400 µL) e (1 : 2000 µL). (B) A imagem mostra que o nanocomplexo cetuximabe AuNPs reconheceu de forma eficiente o receptor de EGF das células A431, mostrando que não houve diferença de reconhecimento dos epítomos, mas sim, maior IMF. (Média ± desvio padrão: ***p<0.001). Controle: células A431 não marcadas; Cet_{1gG}AF488_{1gG} 1 : 400 µL: células A431 marcadas com Cet_{1gG} 5 mg / mL e AF488 diluição (1 : 400 µL); AuNP_{Cet_{1gG}}AF488_{1gG} 1 : 400 µL: células A431 marcadas com o nanocomplexo formado por AuNPs 16 µg / mL + anticorpo primário cetuximabe 50 µg / mL e o anticorpo secundário AF488 na diluição 1 : 400 µL; AuNP_{Cet_{1gG}}AF488_{1gG} 1 : 2000 µL: células A431 marcadas com o nanocomplexo formado por AuNPs 16 µg / mL + anticorpo primário cetuximabe 50 µg / mL e o anticorpo secundário AF488 na diluição 1 : 2000 µL. Fonte: REIS, 2019.

4.3.1 Citometria por imagem

As análises realizadas por CFI, demonstraram que as intensidades médias de fluorescências dos nanocomplexos AuNPCet_{IgG} 50 µg (1 : 400 µL) e AuNPCD44_{IgG} 1µg (1 : 500 µL), marcados respectivamente com os anticorpos secundários diluídos nas seguintes concentrações AF488_{IgG} 1 : 2000 µL e Pe-CF594_{IgG} 0,5 µg (1 : 2000 µL) apresentaram bons resultados. Principalmente quando o fluoróforo utilizado encontra-se na região de absorção das nanopartículas de ouro no caso o AF488 (Gráfico 16A). Isto porque quando há coincidência entre os picos de absorção das AuNPs e o fluoróforo, os nanomateriais promovem maior transferência de energia para o fluorocromo emitindo maior sinal de fluorescência dentro próprio espectro de emissão. Os testes utilizando o AF488 apresentaram resultados mais eficientes com a IMF mais significativa ($p < 0,005$) do que o fluoróforo Pe-CF594 o qual possui absorção, acima da região de absorção das AuNPs (Gráfico 16B).

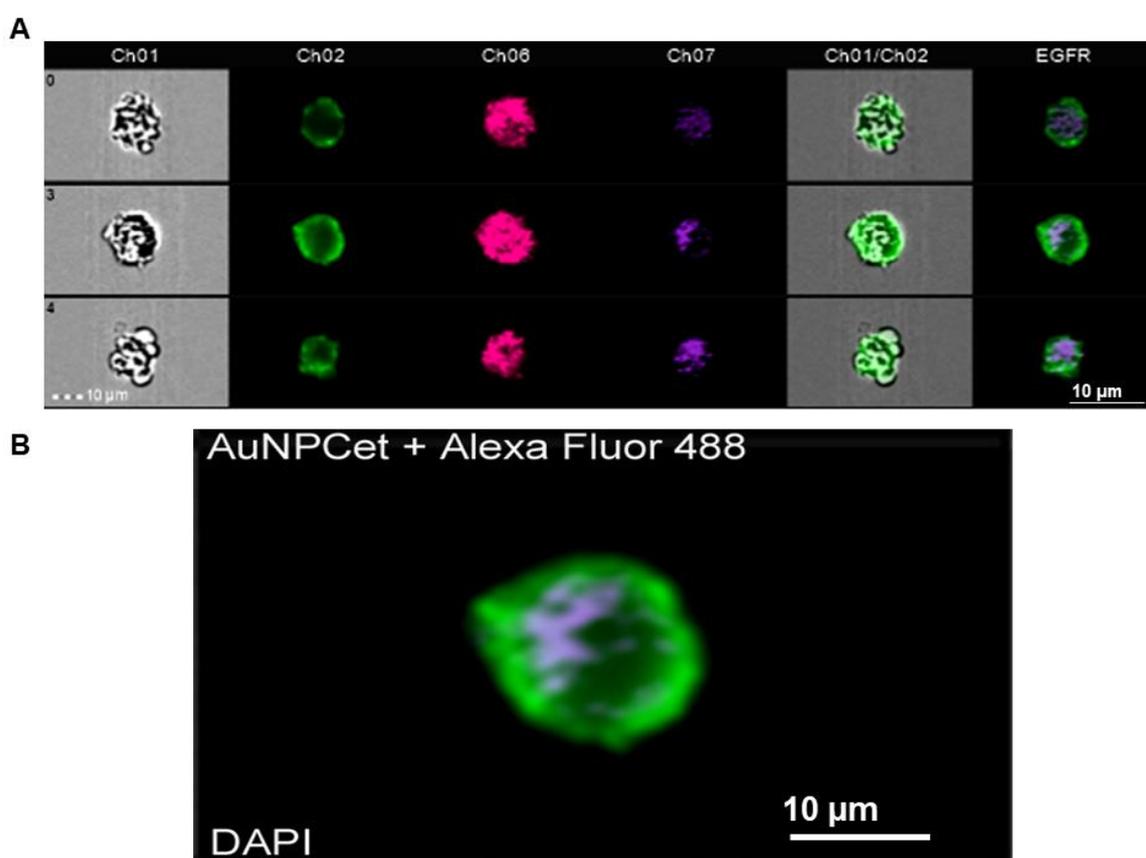
Gráfico 16: Intensidade média de fluorescência por CFI



Legenda: O Gráfico (A) mostra que o nanocomplexo AuNPCet_{1gG} marcado com AF488_{1gG} na diluição 1 : 2000 μ L apresenta uma IMF significativamente maior quando comparado ao anticorpo primário Cet_{1gG} marcado com o anticorpo secundário AF488_{1gG} na diluição 1 : 400 μ L. (Média \pm desvio padrão: * $p < 0.05$). (B) o Gráfico mostra que o nanocomplexo AuNPCD44_{1gG} marcado com o anticorpo secundário fluorescente Pe-CF594_{1gG}, na diluição 1 : 2000 μ L, apresenta uma IMF igual ao anticorpo primário anti-CD44 marcado com o anticorpo secundário fluorescente Pe-CF594_{1gG} na diluição 1 : 400 μ L. Os núcleos das células foram marcados com o marcador nuclear fluorescente Hoechst 33342 (n.s = não significativo). Controle: células A431 não marcadas; AuNPs: células A431 incubadas com nanopartículas puras na concentração 16 μ g / mL; Cet_{1gG}AF488_{1gG} 1 : 400 μ L + DAPI: células A431 marcadas com o anticorpo primário Cet_{1gG} 5 mg + anticorpo secundário AF488 diluição 1 : 400 μ L e o núcleo marcado com o corante nuclear DAPI; AuNPCet_{1gG}AF488_{1gG} 1 : 2000 μ L: células A431 marcadas com o nanocomplexo AuNP 16 μ g / mL + anticorpo primário Cetuximabe 50 μ g + anticorpo secundário AF488 diluição 1 : 2000 μ L e o núcleo marcado com o corante nuclear DAPI. CD44_{1gG}PeCF594_{1gG} 1 : 400 μ L + Hoechst 33342 : células A431 marcadas com o anticorpo primário anti-CD44 10 μ g (1 : 50 μ L) + anticorpo secundário PeCF594_{1gG} 0,5 (1 : 50 μ L) e o núcleo marcado com o corante nuclear Hoechst 33342; AuNPCD44_{1gG}PeCF594_{1gG} 1 : 2000 μ L + Hoechst 33342: células A431 marcadas com o nanocomplexo AuNP 16 μ g / mL + anticorpo primário anti-CD44 1 μ g (1 : 500 μ L) + anticorpo secundário PeCF594_{1gG} 0,1 μ g (1 : 2000 μ L) e o núcleo marcado com o corante nuclear Hoechst 33342. Fonte: REIS, 2019.

A CFI apresenta mais uma vantagem em relação a microscopia convencional, a análise e contagem individual de milhares de células por segundos, permitindo maior detalhamento da marcação, como mostram as Figuras 18 e 19. A maior IMF é explicada pelo fato deste equipamento ser mais sensível à detecção de fluorescência que os equipamentos convencionais de citometria de fluxo. A CFI permite, ainda, a visualização da marcação nuclear em conjunto com a marcação de superfície das células individuais em tempo real.

Figura 18: Imagens representativas de CFI de células A431 marcadas com AuNPCetIgGAF488IgG.

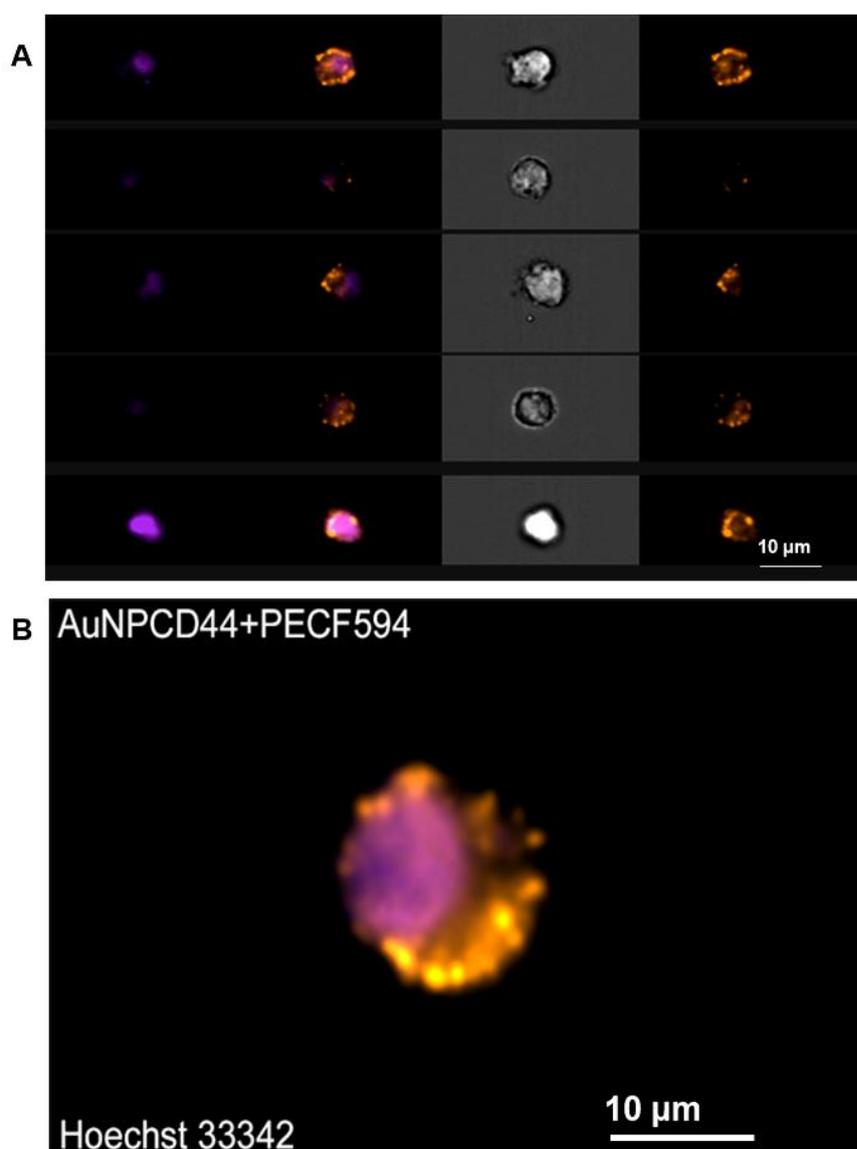


Legenda: O Gráfico (A) mostra a membrana celular marcada com o nanocomplexo AuNPCet_{IgG}AF488_{IgG} (verde), núcleo (roxo) e EGFR+ / Núcleos = imagens sobrepostas (merged). Nanocomplexo AuNPCet_{IgG}AF488_{IgG} (verde) ligado à membrana celular diluição 1 : 2000 µL e seus núcleos (roxo) marcados com DAPI. Barra de escala da imagem 10 µm. O Gráfico (B) destaca uma célula A431 por CFI escala de tamanho da célula 10 µm. Fonte: REIS, 2019.

Os dados sugerem que a presença das AuNPs também podem intensificar o sinal de DAPI e do Hoechst 33342, apresentado suas colorações mais intensas do que o esperado (Figuras 9B e 10B).

A alta capacidade de resolução do CFI nos forneceu imagens que deixam evidentes na amostra do nanocomplexo AuNPCD44_{IgG}Pe-CF594_{IgG} os epítomos da membrana celular. Este dado favorece a caracterização qualitativa e quantitativa das moléculas anti-CD44 apresentado na Figura 19.

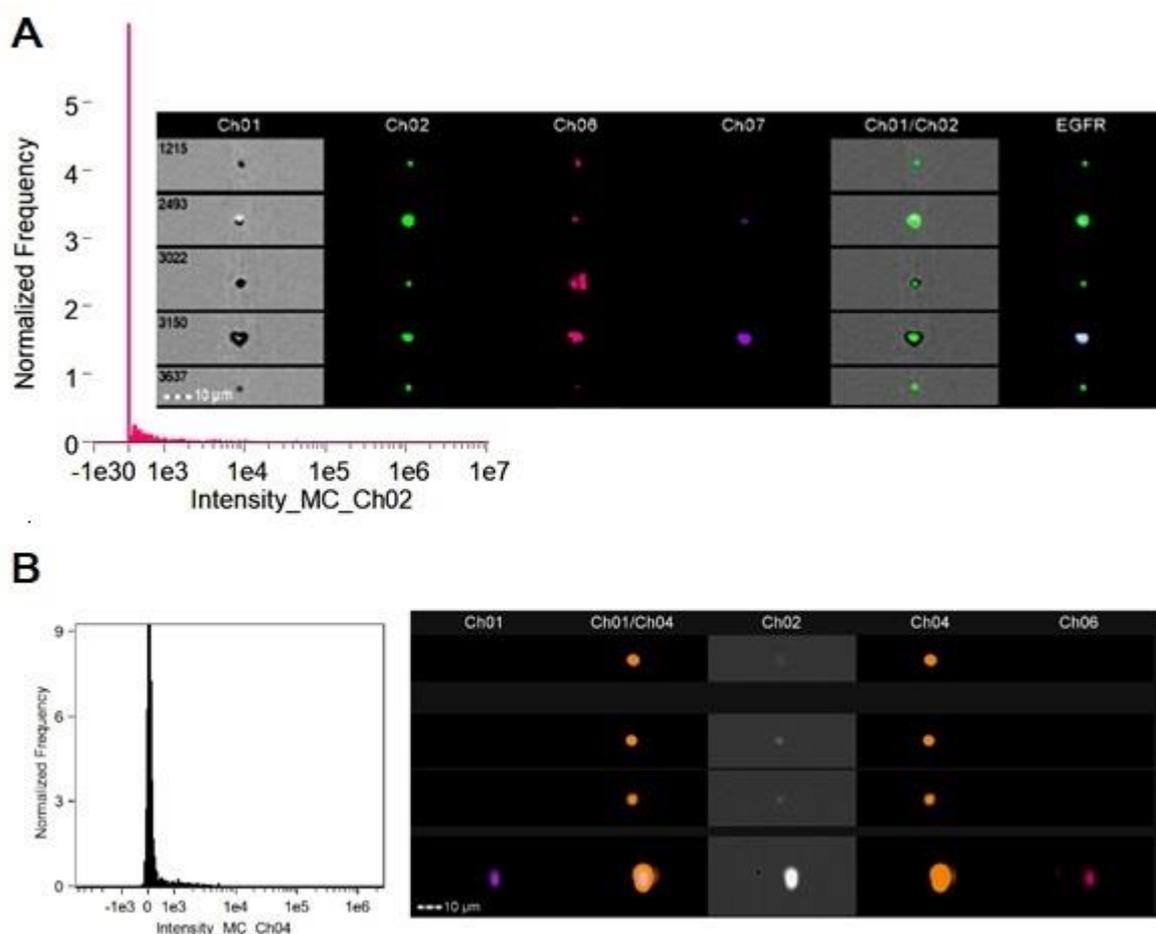
Figura 19: Imagens representativas de CFI de células A431 marcadas com AuNPCD44_{IgG} Pe-CF594_{IgG}.



Legenda: (A) Epítomo da glicoproteína CD44 (laranja), núcleo (roxo) e CD44+ / Núcleos = imagens sobrepostas (*merged*). Nanocomplexo AuNPCD44_{IgG} + Pe-CF594_{IgG} (laranja) ligado à membrana celular diluição 1 : 2000 µL e seus núcleos (roxo) marcados com Hoechst 33342. Barra de escala da imagem 10 µm. (B) Destaque de uma célula A431 por CFI escala de tamanho da célula 10 µm. Fonte: REIS, 2019.

Outra vantagem deste equipamento é a visualização de aglomerados dos nanocomplexos AuNPCet_{IgG}AF_{IgG} mais o DAPI e AuNPCD44_{IgG}Pe-CF594_{IgG} mais o Hoechst 33342 (Figuras 20A e 20B) uma vez que sua detecção possui a limitação para partículas menores de 200 nm. Esta sensibilidade do CFI proporciona maior possibilidade de discriminação do que é, realmente, ruído eletrônico para o evento real em estudo.

Figura 20: Imagens de CFI mostrando aglomerados dos nanocomplexos.

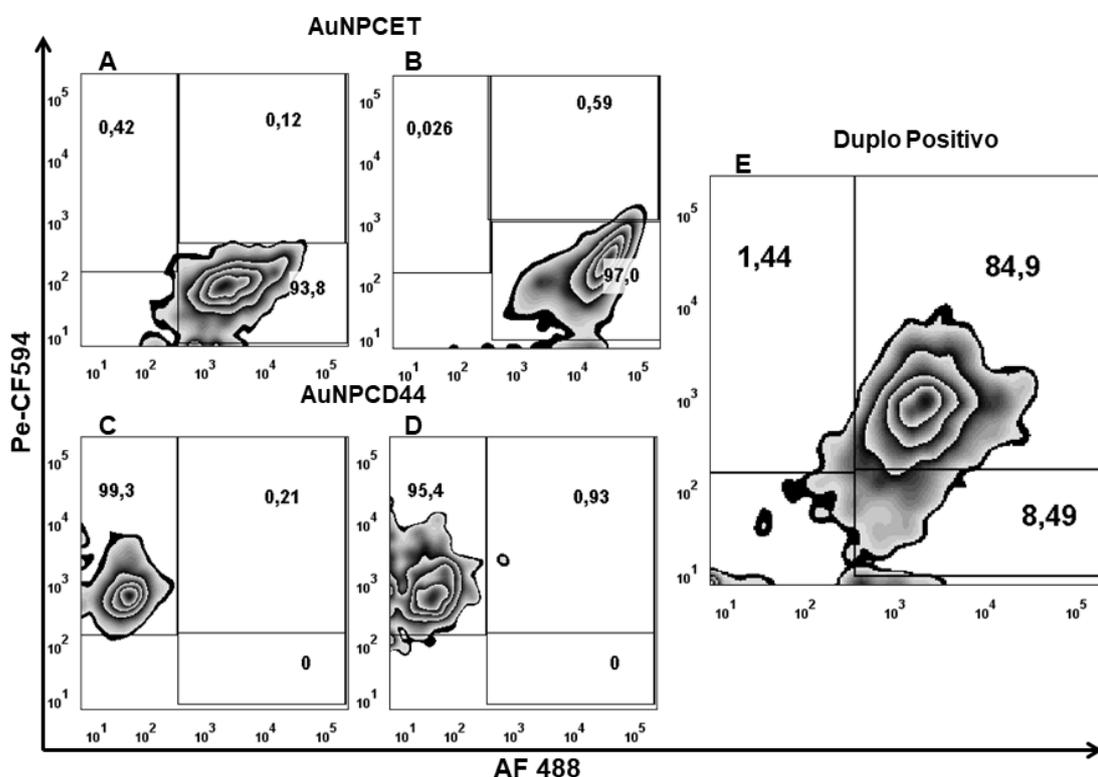


Legenda: A imagem (A) mostra AuNPCet_{IgG} marcada com AF488_{IgG} na diluição 1 : 2000 µL + DAPI. A imagem (B) mostra o nanocomplexo AuNPCD44_{IgG} marcado com Pe-CF594 na diluição 1 : 2000 µL + Hoechst 33342. O histograma mostra a intensidade de fluorescência detectada. Barra de escala da imagem 10 µm. Fonte: REIS, 2019.

4.3.2 Os nanocomplexos de AuNPCet_{IgG} e AuNPCD44_{IgG} não alteram a especificidade de ligação aos seus receptores quando marcados simultaneamente.

As células A431 foram marcadas individualmente e com ambos nanocomplexos, em um mesmo ensaio, para determinar a dupla marcação em células que co-expressam o EGFR e o anti-CD44. O Gráfico 17 mostra que o reconhecimento dos epítomos celulares, pelos anticorpos primários permanecem preservados após a biofuncionalização das AuNPs.

Gráfico 17: Perfil de detecção da expressão de EGFR e anti-CD44 por citometria de fluxo.

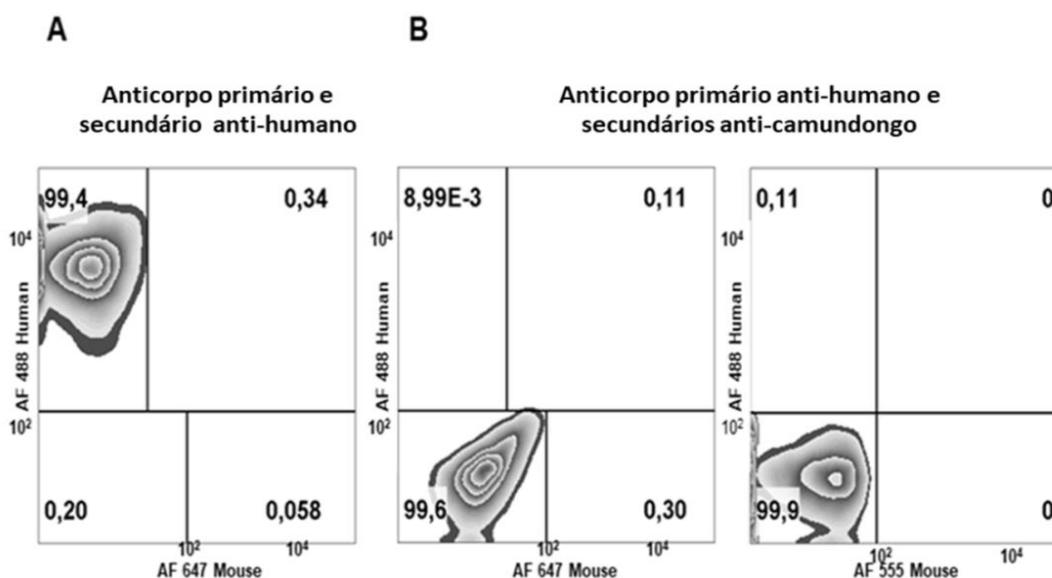


Legenda: As imagens A e C mostram a frequência das populações de células A431 marcadas, respectivamente, com o nanocomplexo AuNPCet_{IgG} (50 µg) + anticorpo secundário fluorescente Alexa Flúor488_{IgG} -AF488_{IgG} (1 : 400 µL) e AuNPCD44_{IgG} (1 µg) + anticorpo secundário fluorescente Pe-CF594_{IgG} (1 : 400 µL). As imagens B e D mostram os deslocamentos das intensidades de fluorescências das populações de células positivas, marcadas com o nanocomplexo AuNPCet_{IgG} (50 µg) + AF488_{IgG} (1 : 2000 µL) e AuNPCD44_{IgG} (1 µg) + Pe-CF594_{IgG} (1 : 2000 µL). (E) mostra a dupla marcação celular pelos nanocomplexos AuNPCet_{IgG} AF488 e AuNPCD44_{IgG}Pe-CF594_{IgG}, diferenciando a população de cada alvo. Fonte: REIS, 2019.

4.3.3 O nanocomplexo cetuximabe AuNPs aumenta a intensidade média de fluorescência sem causar ligações inespecíficas.

A avaliação da ligação dos anticorpos primários e secundários aos seus alvos específicos é de grande importância para evitar resultados falso-positivos. O nanocomplexo AuNPCet_{IgG} ao, se ligar ao receptor EGFR, na superfície da membrana celular, deixa disponível parte da sua fração IgG para ligação do anticorpo secundário. O anticorpo secundário AF488_{IgG} na, diluição 1 : 2000 μ L, demonstrou alta especificidade de ligação com o deslocamento da população na escala log à 10^4 . Para confirmar a especificidade de ligação dos nanocomplexos, utilizamos anticorpos secundários anti-IgG₁ *Mouse* AF 647 e anti-IgG₁ *Mouse* AF 555 ambos na diluição 1 : 2000 μ L. Os resultados mostraram que as AuNPs não promoveram ou evidenciaram ligações inespecíficas, caracterizadas pela permanência da população abaixo de 10^2 na escala log como mostrado no Gráfico 18.

Gráfico 18: Especificidade de ligação dos anticorpos secundários ao IgG do imunoterápico cetuximabe.



Legenda: (A) mostra que o nanocomplexo AuNPCetIgG foi reconhecido, eficientemente, pelo anticorpo secundário Alexa Fluor 488 anti humano. (B) mostra que não houve reconhecimento do IgG do cetuximabe pelos anticorpos Alexa Fluor 647 anti *mouse* e Alexa Fluor 555 anti *mouse*. Diluição do anticorpo primário 1 : 400 μ L e os secundários 1 : 2000 μ L. Fonte: REIS, 2019.

A tabela 1 apresenta, resumidamente, todos os resultados obtidos neste trabalho.

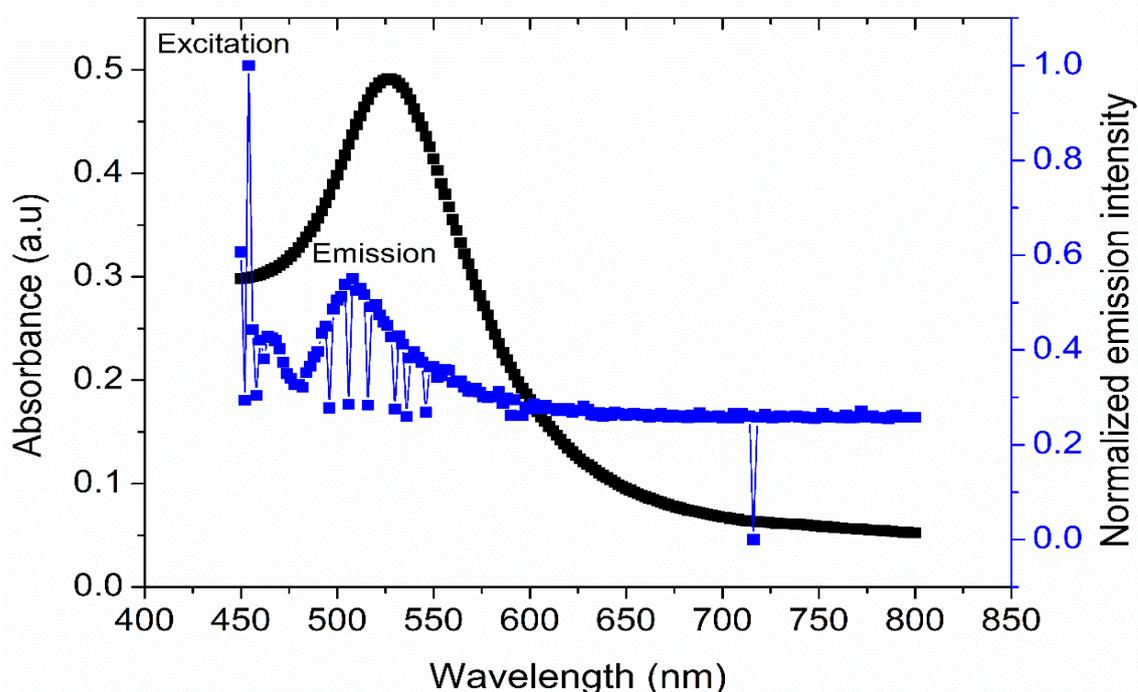
Tabela 1: Resumo dos resultados obtidos por citometria de fluxo

Anticorpo	Reatividade	Titulação	Incubação	Sinal
Cet_{IgG}	Anti-humano EGFR Quimera	5 mg	60 min t.a	+
AF488_{IgG}	Anti-humano produzido em camundongo	1 : 400 µL	30 min t.a	
AuNPs Cet_{IgG}	Anti-humano EGFR Quimera	50 µg	60 min t.a	++
AF488_{IgG}	Anti-humano produzido em camundongo	1 : 400 µL	30 min t.a	
AuNPs Cet_{IgG}	Anti-humano EGFR Quimera	50 µg	60 min t.a	++
AF488_{IgG}	Anti-humano produzido em camundongo	1 : 2000 µL	30 min t.a	
CD44_{IgG}	Anti-humano produzido em camundongo	10 µg (1 : 50 µL)	60 min t.a	+
Pe-CF594_{IgG}		0,5 µg (1 : 400 µL)	30 min t.a	
AuNPs CD44_{IgG}	Anti-humano produzido em camundongo	1 µg (1 : 500 µL)	60 min t.a	++
Pe-CF594_{IgG}		0,5 µg (1 : 400 µL)	30 min t.a	
AuNPs CD44_{IgG}	Anti-humano produzido em camundongo	1 µg (1 : 500 µL)	60 min t.a	++
Pe-CF594_{IgG}		0,1 µg (1 : 2000 µL)	30 min t.a	
AuNPs Cet_{IgG}	Anti-humano EGFR Quimera	50 µg	60 min t.a	-
AF555_{IgG}	Anti-camundongo produzido em cabra	1 : 400 µL	30 min t.a	
AuNPs Cet_{IgG}	Anti-humano EGFR - Quimera	50 µg	60 min t.a	-
AF647_{IgG}	Anti-camundongo produzido em cabra	1 : 400 µL	30 min t.a	

(+) boa emissão do sinal de fluorescência; (++) aumento da emissão do sinal de fluorescência; (-) não detectado. Fonte: REIS, 2019.

A hipótese para a amplificação das fluorescências dos anticorpos secundários é a de que existe uma proximidade entre o coeficiente de extinção das AuNPs e os picos de emissão dos fluoróforos. Para comprovar essa hipótese, uma varredura da fluorescência usando o equipamento Varioskan com as nanopartículas revestidas com AF488_{IgG} e Pe-CF594_{IgG}, fixando-se a excitação em 450 nm e fazendo a varredura da emissão entre 460 nm e 800 nm. Esses dados de fluorescência foram comparados com o coeficiente de extinção das AuNPs em 520 nm. O Gráfico 19 mostra que o pico de absorvância das AuNPs e o pico de emissão das fluorescência são bastante próximos, o que pode gerar um efeito de incremento na fluorescência, mesmo em concentrações bem mais baixas que as preconizadas pelos fabricantes. Esse fenômeno foi mais pronunciado para o fluoróforo AF488, cujo pico de emissão é 519 nm.

Gráfico 19: Espectro de absorvância e fluorescência das AuNPs funcionalizadas com AF488_{IgG} e Pe-CF594_{IgG}.



Legenda: O Gráfico mostra a intensidade de fluorescência detectada no pico de emissão está bastante próxima do pico de absorção das nanopartículas, acompanhando a sua curva de absorvância.

O desenvolvimento de uma metodologia para nanoconjugação de anticorpos primários e secundários de forma rápida e eficiente é de grande relevância para a evolução da área da medicina teranóstica (BARRETO *et al.*, 2011). A citometria de fluxo é uma ferramenta muito utilizada na área de imunodiagnóstico. Entretanto, a necessidade de realizar múltiplas marcações é prejudicada pela proximidade de emissões de fluorescências dos fluoróforos, levando a sobreposições entre elas. Outro problema é a eficiência na detecção de moléculas pouco expressas, como exemplo, a identificação da hemácia de adultos com hemoglobina fetal quando estas encontram-se em baixas concentrações, gerando sinais de difícil detecção (SANDES *et al.*, 2012).

Diante disto, neste trabalho, concentramos na investigação da possibilidade do melhoramento da emissão de sinal de fluorescência conjugando nanopartículas de ouro aos anticorpos de detecção. Comparamos imunofenotipagem padrão, onde há a ligação direta entre anticorpos primários e secundários aos receptores de superfície celular, com os nanocomplexos AuNPCet_{IgG}AF488_{IgG} e AuNPCD44_{IgG}Pe-CF594_{IgG} em concentrações significativamente menores que as utilizadas convencionalmente.

Inicialmente, sintetizamos as AuNPs pela rota do citrato de sódio seguindo o protocolo de J. TURKEVICH, 1951 e FRENS, 1973, com algumas modificações. Nossos resultados demonstram que o processo foi eficiente na construção de AuNPs com morfologia, dimensão, dispersão e concentração características dos materiais coloidais. A Figura 14 apresenta o resultado da síntese de nanopartículas esféricas evidentes pelo deslocamento da curva de espectroscopia na região do visível com o pico de absorção em 520 nm e base estreitada abaixo de 600 nm.

Na observação macroscópica a coloração vermelho-vinho é uma característica marcante da solução de AuNPs esféricas com tamanhos variando entre 20 e 50nm, esta aparência também sugere a ausência de agregação de nanopartículas, o que pode ser confirmado pela MET Figura15

A síntese de AuNPs por redução química com citrato de sódio, resulta em nanopartículas carregadas negativamente e estabilizadas por repulsão eletrostática

(LIN *et al.*, 2004). Utilizamos desta propriedade para estabelecermos a funcionalização das AuNPs aos anticorpos cetuximabe e anti-CD44. Observamos que as ligações permaneceram estáveis, sem formação de agregados, quando funcionalizamos as AuNPs com 50 µg de cetuximabe e 1 µg de anti-CD44, dez vezes mais diluídos do que o recomendado pelos fabricantes. A evidência da funcionalização pode ser comprovada pelos deslocamentos das curvas das AuNPs puras e dos nanocomplexos com os anticorpos primários, apresentados pelos **Gráficos 6 e 7**. A mudança do valor absoluto do potencial zeta confirma a modificação da superfície das AuNPs pelos anticorpos primários cetuximabe e anti-CD44 apresentados nos pelos resultados dos Gráficos 8 e 9.

Outro resultado marcante, indicando a formação dos nanocomplexos AuNPCet_{IgG} e AuNPCD44_{IgG} foi, a detecção, por fluorimetria, da emissão do sinal de fluorescência. Os nanocomplexos apresentaram maior intensidade de sinal quando comparados com as amostras não marcadas e não nanocomplexadas. A estabilidade do nanocomplexo é um fator de grande relevância para uso nos protocolos de marcação celular, onde os anticorpos são geralmente armazenados por longos períodos, o que poderia levar a sua deterioração (PATEL *et al.*, 1997). O nanocomplexo desenvolvido demonstrou ser estável em solução, podendo ser armazenado por longos períodos. Uma alternativa seria em sua forma liofilizada como foi demonstrado por ANDRADE *et al.*, 2019.

O cuidado que se deve ter na construção de nanocomplexos, para uso em terapia e diagnóstico, é a garantia da preservação da capacidade do reconhecimento de seu receptor celular. A Figura 17 da MET mostrou nanopartículas aderidas à membrana de uma célula A431. As células marcadas pelo nanocomplexo apresentaram maior IMF, tanto em suspensão, quanto aderida à membrana celular. A fim de verificar a possibilidade de realizar a dupla marcação utilizando os nanocomplexos AuNPCet_{IgG}AF488_{IgG} e AuNPCD44_{IgG}Pe-CF594_{IgG}, realizamos o ensaio marcando as células de linhagem A431 e levamos aos citômetros de fluxo. Os testes apresentaram emissão de fluorescência para o canal de Alexa Fluor 488 superior ao de Pe-CF594. Este fato ocorreu em razão do pico de absorção máxima de energia da AuNPs ser próxima ao espectro de excitação do AF488. Uma possível explicação

para esse aumento pode ser a transferência de maior quantidade de energia para o fluoróforo.

O nanocomplexo de formado pelo Pe-CF594 nanocomplexo de formado pelo Pe-CF594 não apresenta seu pico de emissão coincidente com o pico de absorção das AuNPs usadas neste estudo, alcançando, apenas, a descida da curva de absorção, por isso, apesar de ter tido seu sinal aumentado, este não ocorreu de forma tão intensa, quanto para o Alexa Fluor 488, sinal que pode vir a ser melhorado com a funcionalização dele a nanopartículas de ouro com pico de absorção em torno de 600nm.

Um fator limitante que não favoreceu o maior deslocamento da população A431, marcadas com o Pe-CF594 no FACSCantoll foi, a ausência do laser 568 nm, e o laser 488nm não atingir o ponto máximo de excitação deste fluoróforo. Portanto, não houve prejuízo da amplificação do sinal de fluorescência em baixa concentração, sua emissão manteve-se semelhante ao fluoróforo na diluição 1:500, demonstrado no Gráfico 16. O ensaio de dupla marcação mostrou que não houve perda da especificidade na presença de nenhum dos nanocomplexos como mostra o Gráfico 17, possibilitando a realização de testes de co-expressão das moléculas de superfície.

Outra preocupação foi demonstrar que não há indução de reconhecimento inespecífico dos anticorpos secundários pelas AuNPs. Para isto, usamos anticorpos secundários Alexa Fluor 647 e Alexa Fluor 555 com afinidade para receptores de IgG1 camundongos usados para se ligar ao nanocomplexo AuNPCet_{IgG}. Foi demonstrado, como esperado, não haver reconhecimento das imunoglobulinas humanas pelos anticorpos de secundários, pela ausência da detecção das suas fluorescências mostrada no Gráfico 18. Resultado fundamental para confiabilidade em relação a utilização dos nanocomplexos nos testes CF e, conseqüentemente, em outras técnicas de imunofluorescência.

A garantia da viabilidade celular é de grande importância nos testes em que, estruturas ou materiais podem alcançar o meio intracelular e interferir na preservação da integridade da célula. As AuNPs demonstraram serem seguras por não atravessarem a membrana celular em protocolos de marcação com tempo de

incubação de 60 minutos e não estimularem o processo de morte. Para verificar se não houve dano celular e alteração do ciclo, testes foram. O ciclo celular ocorre de maneira ritmada e constante em nosso organismo (HUNT et al., 2011). Para que haja a divisão celular existe uma sucessão de eventos característicos: G1 onde há o crescimento celular, S síntese e duplicação do DNA e G2 onde ocorre a divisão celular.

A fase onde a célula é mais sensível à alteração do ambiente celular, interferindo diretamente em seu processo de duplicação (BRUCE et al., 2002). Nossos resultados demonstraram alto percentual de células vivas, acima de 90%, em todas as amostras após 60 minutos de incubação (Gráfico 12). O ciclo celular também não sofreu interferência dos nanocomplexos (Gráfico 13). Nossos resultados estão de acordo com resultados dos ensaios realizados por (HANŽIĆ et al., 2018) onde demonstraram que as AuNPs não alteram o perfil do ciclo celular.

No trabalho aqui apresentado, demonstramos que as AuNPs são eficientes no uso para amplificação da emissão do sinal de fluorescência pela técnica de citometria de fluxo. Baixas concentrações de anticorpos primários e secundários não limitaram a detecção de fluorescência quanto à resolução das imagens quando funcionalizados com AuNPs. Acreditamos que o aumento do sinal ocorre devido a ressonância plasmônica de superfície localizada (BOISSELIER et al., 2009; LIZ-MARZA, 2006) que a nanopartícula absorve a energia do laser do citômetro próximo ao seu coeficiente de extinção e transfere com alta intensidade para o fluoróforo conjugado (TOMA, 2016) Gráfico 19. Acreditamos que esta amplificação é melhorada pela somatória da transferência de energia entre as AuNPs que envolvem o fluoróforo. O melhoramento da capacidade de absorção de energia pelos fluoróforos faz com que sejam geradas curvas de emissões de fluorescências mais estreitas, o que pode levar a redução da sobreposição dos espectros quando utilizados múltiplos marcadores facilitando o processo de compensação e fidelidade dos resultados gerados.

A síntese das AuNPs pela rota do citrato de sódio apresentou boa estabilidade para aplicações em pesquisas biotecnológicas. Nossos resultados mostram, que, a funcionalização das AuNPs com baixas concentrações de anticorpos primários proporciona o uso de anticorpos secundários ainda mais diluídos, preservando ou amplificando o sinal de fluorescência. Esta sensibilidade foi proporcionada para todas as metodologias de detecção de fluorescências neste estudo. O melhoramento da detecção do sinal de fluorescência foi possível em virtude do fenômeno da ressonância plasmônica de superfície localizada das AuNPs. Isso porque as AuNPs, após serem interceptadas pelo laser absorvem um grande quantidade de energia e parecem transferir maior energia para excitação dos fluoróforos. E a possibilidade de síntese de nanopartículas com o pico de absorção coincidente com o pico de emissão de cada tipo de fluoróforo, nos forneceria resultados mais sensíveis e confiáveis. O controle do processo da síntese, sendo este realizado no próprio laboratório, o processo de biofuncionalização ser relativamente simples, a não toxicidade para as células e o alto desempenho nos testes faz desta metodologia um padrão ouro para uso em laboratórios de diagnósticos. E como maior benefício da capacidade de detecção de fluorescência, em baixas concentrações de anticorpos, seria a redução dos custos na utilização da citometria em imunodiagnóstico.

REFERÊNCIAS

AGENCY, E. M. *Erbix*. Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/>>. Acesso em: 30 out. 2019.

ALBERT BRUCE, JOHNSON ALEXANDER, LEWIS JULIAN, RAFF MARTIN, ROBERTS KEITH, AND W. P. ET AL. *Molecular Biology of the Cell*. 4 ed. ed. New York: [s.n.], 2002.

ALTMAN, M. *Morre o microbiologista Anton van Leeuwenhoek*. Disponível em: <<https://operamundi.uol.com.br/historia/23918/hoje-na-historia-1723-morre-o-microbiologista-anton-van-leeuwenhoek>>. Acesso em: 18 jul. 2019.

ANDERSON, M. T. *et al.* Simultaneous fluorescence-activated cell sorter analysis of two distinct transcriptional elements within a single cell using engineered green fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 16, p. 8508–8511, 1996.

ANDRADE, L. *et al.* The physicochemical and biological characterization of a 24-month-stored nanocomplex based on gold nanoparticles conjugated with Cetuximab demonstrated long-term stability, EGFR affinity and cancer cell death due to apoptosis. *Materials Science & Engineering C*, 2019.

ASSOCIATION, C. S. International Organization for Standardization. ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. *International Organization*, p. 24, 2009.

BARRETO, J. A. *et al.* Nanomaterials: Applications in cancer imaging and therapy. *Advanced Materials*, v. 23, n. 12, 2011.

BASIJI, DAVID; ORTYN, W. *Imaging And Analyzing Parameters Of Small Moving Objects Such As Cells*. . United States of America: [s.n.], 2001

BD BIOSCIENCES. Bd Facscanto II. *History*, n. 32, 2016. Disponível em: <<http://www.bdbiosciences.com/eu/instruments/research/cell-analyzers/bd-facscanto-ii/m/744810/overview?WT.srch=1&gclid=CNax74bxg8wCFYTGGwody0oI-A>>.

Acesso em: 30 out. 2019

BECTON, D. AND C. *BD FACSCANTO II Flow Cytometer Reference Manual*. [S.l: s.n.], 2006.

BIOMETRICA, U. *COPAS™ BIOSORT INSTRUMENT - Automated Analysis, sorting, and Dispensing of small model organisms, beads, and particles*. . United States: [s.n.], 2005a. Disponível em: <www.unionbio.com>.

BIOMETRICA, U. COPASTM BIOSORT INSTRUMENT Automated Analysis, Sorting, and Dispensing of small model organisms, beads, and particles. . EUA: [s.n.], 2005b.

BOISSELIER, E.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: Preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chemical Society Reviews*, v. 38, n. 6, p. 1759–1782, 2009.

BOKOWSKAJA, D. P. *Zur Methodik der Goldsolbereitung. Ztschr. f. Imraunitatsforsch. u. exper. Therap.* . [S.l: s.n.] . , 1934

BRASIL, A. N. *Hidráulica Básicane Máquina de Fluxo.* . [S.l: s.n.] . , 2013

BROWN, R. XXVII. A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies . *The Philosophical Magazine*, v. 4, n. 21, p. 161–173, 1828.

BRUCHEZ JR., M. Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels. *Science*, v. 281, n. 5386, p. 2013–2016, 1998.

CANCINO, J.; MARANGONI, V. S. Nanotecnologia em Medicina: Aspectos Fundamentais e Principais Preocupações. *Química Nova*, v. 37, n. 3, p. 521–526, 2014.

CAO, Y. W. C.; JIN, R.; MIRKIN, C. A. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science*, v. 297, n. 5586, p. 1536–1540, 2002.

CARLOS AUGUSTO DE PROENÇA ROSA. *História da Ciência- O Pensamento Científico e a Ciência no Século XIX.* 2^a ed. Brasília: [s.n.], 2012. v. II.

CHALFIE MARTIN, P. D. *Uses of green-fluorescent protein.* . United States: [s.n.] . , 1996

CHANG, W. S. *et al.* Radiative and nonradiative properties of single plasmonic nanoparticles and their assemblies. *Accounts of Chemical Research*, v. 45, n. 11, p. 1936–1945, 2012.

CHAZOTTE, B. Labeling nuclear DNA using DAPI. *Cold Spring Harbor Protocols*, v. 6, n. 1, 2011.

CHO, K. *et al.* Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research*, v. 14, n. 5, p. 1310–1316, 2008.

COONS, A. .; MELVIN, K. LOCALIZATION OF ANTIGEN IN TISSUE CELLS II. IMPROVEMENTS IN A METHOD FOR THE DETECTION OF ANTIGEN

BY MEANS OF FLUORESCENT ANTIBOD. *J. Immunol.*, v. 45, n. 1, p. 159–170, 1942.

COONS, A. H.; CREECH, H. J.; JONES, R. N. Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Experimental Biology and Medicine*, v. 47, n. 2, p. 200–202, 2013.

CORPORATION, A. *ImageStream System Software User's Manual*. . Washington: [s.n.], 2006.

COULTER, W. *Coulter Counter Model A Cell Counter*. Disponível em: <<https://digital.sciencehistory.org/works/f1881m41k>>. Acesso em: 25 set. 2019.

COULTER, W. *Coulter Counter Model B Cell Counter*. Disponível em: <<https://digital.sciencehistory.org/works/z890rt694>>. Acesso em: 25 jul. 2019.

COULTER, W. H. *Means for Counting Particles in a Suspended Fluid*. . United States: [s.n.], 1949

CRICK, F.; WATSON, J. A Device for Counting Small Particles suspend in a fluid Through a Tube. *Nature Publishing Group*, v. 171, p. 37–38, 1953.

CRISSMAN;, H. A.; TOBEY, R. A. Cell-Cycle Analysis in 20 Minutes. *Science*, v. 184, n. 4143, p. 1297–1299, 1974.

CURBELO, R. *et al. A generalized machine for automated flow cytology system design. Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. [S.l: s.n.], 1976

DANGL, J. L.; LANIER, L. L. Founding father of FACS: Professor Leonard A. Herzenberg (1931-2013). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 52, p. 20848–20849, 2013.

DARZYNKIEWICZ, Z. *et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. Cytometry*, v. 13, n. 8, p. 795–808, 1992.

DARZYNKIEWICZ, ZBIGNIEW *et al. Cell Cycle-related Changes in Nuclear Chromatin of Stimulated Lymphocytes as Measured by Flow Cytometry. Cancer Research*, v. 37, n. 12, p. 4635–4640, 1977.

DCTECH LABORATORY TECHNOLOGIES. *Espectroscopia de Absorção Atômica - Detalhamento de técnicas de atomização*. Disponível em: <<https://www.dctech.com.br/espectroscopia-de-absorcao-atmica-detalhamento-de-tecnicas-atomizadores/>>. Acesso em: 20 dez. 2019.

DE ROSA, S. C. *et al. 11-color, 13-parameter flow cytometry: Identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. Nature Medicine*, v. 7, n. 2, p. 245–248, 2001.

E. ORTYN, W.; BASIJI, D. *Imaging and analyzing parameters of small moving objects such as cells*. . United States Patent: [s.n.] , 2005

EDUARDO BAIOSCHI, LUIZ CAMANO, J. O. B. Evaluation of fetomaternal hemorrhage in postpartum patients with indication for administration of anti-D immunoglobulin. *Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública*, v. 21, n. 5, p. 1357–1365, 2005.

EINSTEINS, A. Zur Theorie der Brownschen Bewegung. *Annalen Der Physik*, v. 324, p. 371–381, 1906.

ELLISON, J. R.; MARINO, R.; ARONS, E. Fluorescent feulgen staining of fungal nuclei. *Experimental Cell Research*, v. 96, n. 2, p. 367–373, 1975.

FARADAY, M. The Bakerian Lecture : Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light Author (s): Michael Faraday Source : Philosophical Transactions of the Royal Society of London , Vol . 147 , No . (1857) , pp . 145-181 Published by : The Royal Society. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, v. 147, n. 1857, p. 145–181, 1857.

FERRAZ, R. *Citometria de Fluxo Cell Sorting fundamentos e aplicações*. . [S.l.]: Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/picf/PROD_LITERAT/Apostilas/ApostilaCMFprincipios_sorting.pdf>. , 2014. Acesso em: 30 out. 2019

FEYNMAN, R. P. There ' s Plenty of Room at the Bottom The Nanometer Scalescale. *Caltech's Engineering and Science*, p. 1–11, 1959. Disponível em: <<http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html>>.

FRENS, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature Physical Science*, v. 241, n. 105, p. 20–22, 1973. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/physci241020a0.pdf>>.

FULWYLER, M. J. *Particle Separator*. . United States of America: [s.n.] , 1968

FULWYLER MJ. Electronic separation of biological cells by volume. *Science*, v. 150, p. 910–911, 1965.

GABOR, F. *et al*. The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, n. 4, p. 459–480, 2004.

GALBRAITH D.W. Flow Cytometry and Cell Sorting. In: RADBRUCH, A. (Org.). . *Flow cytometry and cell sorting*. [S.l.]: Springer, Berlin, Heidelberg, 1992. p.

189–204. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-662-02785-1_21>.

GARC, L. Introducing gold nanoparticle bioconjugates within the biological machinery. *Thèse*, p. 235, 2013.

GARCIA, F. DE M. Nanomedicine and therapy of lung diseases. *Einstein (São Paulo)*, v. 12, n. 4, p. 531–533, 2014.

GEORGES KÖHLER, C. P. M. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature Publishing Group*, v. 256, n. Mopc 21, p. 495–497, 1975.

GIVAN, A. L. *Flow Cytometry: First Principles*. Second Edition. New York . Chichester . Weinheim . Brisbane . Singapore . Toronto: Wiley-Liss, Inc, 2001. v. 2.

GOLDSTEIN, N. I.; SALDANHA, J. W. *Humanized Anti-EGFR Receptor Monoclonal Antibody*. . United States: US 7,060,808 B1. , 2006

GRAY, J. W. *et al.* Chromosome measurement and sorting by flow systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 72, n. 4, p. 1231–1234, 1975.

GU, F. X. *et al.* Targeted nanoparticles for cancer therapy. *Nano Today*. [S.l: s.n.]. , 2007

GUCKER, F. T. *et al.* A Photoelectronic Counter for Colloidal Particles. *Journal of the American Chemical Society*, v. 69, n. 10, p. 2422–2431, 1947.

GUESS, W. L. *et al.* Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 54, n. 10, p. 1545–1547, 1965.

H. R. HULETT, W. A. BONNER, JANET BARRETT, L. A. H. Cell Sorting: Automated Separation of Mammalian Cells as a Function of Intracellular Fluorescence. *Science*, v. 166, p. 747–749, 1969.

HANNS-CHRISTIAN MAHLER, R. M. *Pharmaceutical preparation comprising an antibody against the EGF receptor*. . Germany: US20050175611A1. , 2005

HANŽIĆ, N. *et al.* Syntheses of gold nanoparticles and their impact on the cell cycle in breast cancer cells subjected to megavoltage X-ray irradiation. *Materials Science and Engineering C*, v. 91, p. 486–495, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.066>>.

HEADQUARTERS, L. S. D. *History of Flow Cytometry*. Disponível em: <<https://www.beckman.com/resources/fundamentals/history-of-flow-cytometry>>.

Acesso em: 25 jul. 2019.

HEDLEY, D. W. *et al.* Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 31, n. 11, p. 1333–1335, 1983.

HERZENBERG, L. A.; SWEET, R. G.; HERZENBERG, L. A. Fluorescence-activated Cell Sorting. *SCIENTIFIC AMERICAN, INC*, v. 234, p. 108–118, 1976. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/24950310>%0APage Count: 11>.

HILDEBRAND, H. F. *et al.* Surface coatings for biological activation and functionalization of medical devices. *Surface and Coatings Technology*, v. 200, n. 22-23 SPEC. ISS., p. 6318–6324, 2006.

HUDSON, B. *et al.* The Use of an Ethidium Analogue in the Dye-Buoyant Density Procedure for the Isolation of Closed Circular Dna: the Variation of the Superhelix Density of Mitochondrial Dna. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 62, n. 3, p. 813–820, 1969. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.62.3.813>>.

HUNT, T.; NASMYTH, K.; NOVÁK, B. The cell cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 366, n. 1584, p. 3494–3497, 2011.

INGALE, A. G.; CHAUDHARI, A. N. Biogenic synthesis of nanoparticles and potential applications: An eco-friendly approach. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*, v. 4, n. 2, p. 7, 2013.

J. TURKEVICH, P. S. a Study of the Nucleation and Growth Processes I N the Synthesis of. *Journal Homepage*, v. 55, n. c, 1951.

JAMES C. PARKER, W. R. H. *DEVICE FOR AUTOMATICALLY COUNTING BLOOD CELLS.* . [S.l: s.n.]. , 1957

JAMES C. PARKER, W. R. H. *METHOD OF SIMULTANEOUSLY COUNTING RED AND WHITE BLOOD CELLS.* . [S.l: s.n.]. , 1959

JAMES L CAMBIER, DAVID B. KAY, AND LEON L. WHEELLESS, J. A Multidimensional Slit-Scan Flow System. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 27, p. 321–324, 1979.

JOHN L. SCHENK, FORT CLLINS, C. (US). *SPERM SUSPENSIONS FOR SORTING INTO XOR Y CHROMOSOME-BEARNG ENRICHED POPULATIONS.* . [S.l: s.n.]. , 2007

JOHN MENDELSON, TOMOYUKI KAWAMOTO, GORDON SATO, J. D. S. *Hybrid cell lines that produce monoclonal antibodies to epidermal growth factor receptor*. . United States: US4943533. , 1990

JORG KREUTER, P. P. S. *Biological Materials*. . United States: [s.n.] , 1981

KAMENSKY, L. A., MELAMED, M. R., & DERMAN, H. *Spectrophotometer New Instrument for Ultrarapid Cell Analysis.pdf*. . [S.l: s.n.] , 1965

KAMENSKY, L. A., MELAMED, M. R., & D. Cytofluorograph. n. February, p. 1974, 1974.

KANTHA, S. S. A Centennial Review; the 1890 Tetanus Antitoxin Paper of von Behring and Kitasato and Related Developments. *Zeitschrift für Hygiene*, v. 7, n. 1, p. 225–234, 1991.

KARLA M.S. BRAGA, VANESSA S. CR. PIMENTA, FERNANDA A. RODRIGUES, T. P. S. CITOMETRIA DE FLUXO: HISTÓRICO, PRINCÍPIOS BÁSICOS E APLICAÇÕES EM PESQUISA. *Enciclopédia Biosfera*, v. 13, n. 23, p. 1–6, 2016.

KENNEDY, L. C. *et al.* A new era for cancer treatment: Gold-nanoparticle-mediated thermal therapies. *Small*, v. 7, n. 2, p. 169–183, 2011.

KGAA, M. *Amnis Imaging Flow Cytometers Microscopy in Flow*. . Germany: [s.n.], 2016. Disponível em: <<https://www.luminexcorp.com/imaging-flow-cytometry/>>. Acesso em: 3 mar. 2019.

KLAR, T. *et al.* Surface-plasmon resonances in single metallic nanoparticles. *Physical Review Letters*, v. 80, n. 19, p. 4249–4252, 1998.

KÖHLER G, M. C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, v. 256, p. 495–497, 1975.

KOSAKA, T. *Apparatus for imaging particles in a liquid flow*. . [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.google.ch/patents/US5272354>>. , 1992

KREUTER, J. Nanoparticles as adjuvants for vaccines. *Pharmaceutical biotechnology*, v. 6, p. 463–472, 1995.

KREUTER, JÖRG. Nanoparticles-a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 331, n. 1, p. 1–10, 2007.

LANSDORP, P. M. *et al.* Single laser three color immunofluorescence staining procedures based on energy transfer between phycoerythrin and cyanine 5.

Cytometry, v. 12, n. 8, p. 723–730, 1991.

LAWSON, I. Crafting the microworld: how Robert Hooke constructed knowledge about small things. *The Royal Society Publishing*, n. December 2015, p. 23–44, 2016.

LI, W.; ZHOU, J.; XU, Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical Reports*, v. 3, n. 5, p. 617–620, 2015.

LILLIE, R. D. Romanowsky-Malachowski stains the so-called Romanowsky stain: Malachowski's 1891 use of alkali polychromed methylene blue for malaria plasmodia. *Biotechnic and Histochemistry*, v. 53, n. 1, p. 23–28, 1978.

LIN, S. Y. *et al.* Two-step functionalization of neutral and positively charged thiols onto citrate-stabilized Au nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 108, n. 7, p. 2134–2139, 2004.

LIZ-MARZA, L. M. Tailoring Surface Plasmons through the Morphology and Assembly of Metal Nanoparticles. *Langmuir*, v. 22, n. 22, p. 32–41, 2006.

LU, K.; KESSLER, C. Colloidal dispersion and rheology study of nanoparticles. *Journal of Materials Science*, v. 41, n. 17, p. 5613–5618, 2006.

LUBERT STRYER, S. A. N. G. *PHYCOBILIPROTEIN FLUORESCENT CONJUGATES*. . E.U.A: [s.n.], 1985

M. A. VAN DILLA, T. T. TRUIULLO, P. F. MULLANEY, J. R. C. Cell microfluorometry a method for rapid fluorescence measurement. *Science*, v. 163, n. 3872, p. 1213–1214, 1969.

M. ANDREEFF, Z. DARZYNKIEWICZ, T. K. SHARPLESS, B. D. CLARKSON, AND M. R. M. Discrimination of Human Leukemia Subtypes by Flow Cytometric Analysis of Cellular DNA and RNA. *American Society of Hematology*, v. 55, n. 2, p. 282–293, 1980.

MALVERN. *Zetasizer Nano Series User Manual*. . England: [s.n.]. Disponível em: <https://www.google.com/search?q=Zetasizer+Nano+Series+User+Manual&rlz=1C1EJFC_enBR864BR864&oq=Zetasizer+Nano+Series+User+Manual&aqs=chrome..69i57j0l4.1015j1j4&sourceid=chrome&ie=UTF-8>. , 2004. Acesso em: 30 out. 2019

MANSUR, H. S.; MANSUR, A. A. P. CdSe quantum dots stabilized by carboxylic-functionalized PVA: Synthesis and UV-vis spectroscopy characterization. *Materials Chemistry and Physics*, v. 125, n. 3, p. 709–717, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2010.09.068>>.

MCTIC. Portaria MCT nº 252, de 16.05.2003. *DOU*, BRASIL, 16 maio 2003. , p. 6, SEÇÃO 2Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/portarias/migracao/Portaria_MCT_n_252_de_16052003.html>.

MCTIC. Portaria Nº3.459, de 26 de Julho de 2019. *08/08/2019*, BRASIL, 8 ago. 2019. , p. 1–2Disponível em: <<http://www.in.gov.br/web/dou/-/portaria-n-3.459-de-26-de-julho-de-2019-209514505>>.

MELLORS, R. C.; SILVER, R. *A microfluorometric scanner for the differential detection of cells: Application to exfoliative cytology*. *Science*. [S.l: s.n.], 1951

MICHAEL R. LOKEN, D. R. P. A. L. A. H. Two-color immunofluorescence using a fluorescence-activated cell sorter_.pdf. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 25, n. 7, p. 899–907, 1977.

MIYAKE, T.; MCDERMOTT, J. C.; GRAMOLINI, A. O. A method for the direct identification of differentiating muscle cells by a fluorescent mitochondrial dye. *PLoS ONE*, v. 6, n. 12, 2011.

MOLDOVAN, A. Photoelectric Technique For The Counting of Microscopical Cells. *Science*, v. 80, n. 2069, p. 188–189, 1934.

MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. Imunologia. In: CRUZ, E. P. DE S. J. V. O. (Org.). . *Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde*. Rio de Janeiro: [s.n.], 2009. p. 19–124.

MORITA, TOKIO; ASSUMPÇÃO, R. M. V. Manual de Soluções, Reagentes e Solventes. In: LTDA, E. E. B. (Org.). . *Manual de Soluções, Reagentes e Solventes*. 2ª ed. São Paulo: [s.n.], 1972. p. 336.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MUDRY, A. The history of the microscope for use in ear surgery. *The American journal of otology*, v. 21, n. 6, p. 877–86, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11078079>>.

MURPHY, R. F.; CHUSED, T. M. A proposal for a flow cytometric data file standard. *Cytometry*, v. 5, n. 5, p. 553–555, 1984.

NARENDRA KUMAR, S. K. *Essentials in Nanoscience and*

Nanotechnology. 1. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2016.

NÉLSON EDUARDO DURÁN CABALLERO, M. M. M. DE A. *NANOPARTÍCULA POLIMÉRICA INCORPORANDO UM COMPOSTO COM PROPRIEDADES FARMACÊUTICAS OU COSMÉTICAS, SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO E COMPOSIÇÃO COSMÉTICA OU FARMACÊUTICA CONTENDO AS NANOPARTICULAS POLIMÉRICAS.* . Brasil: PI 0404306-5 A. , 2006

NICHOLSON, P. . *Nuclear Eletrônics*. 1st. ed. Norwich: John Wiley & Sons, Inc., 1974.

O'NEILL, K. *et al.* Flow Cytometry Bioinformatics. *PLoS Computational Biology*, v. 9, n. 12, 2013.

OI, V. T.; GLAZER, A. N.; STRYER, L. Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. *Journal of Cell Biology*, v. 93, n. 3, p. 981–986, 1982.

OLSON, J. *et al.* Optical characterization of single plasmonic nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, v. 44, n. 1, p. 40–57, 2015.

PARKS, D. R. *et al.* Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 76, n. 4, p. 1962–1966, 1979.

PARTENSKY, F. *et al.* Vertical structure of picophytoplankton at different trophic sites of the tropical northeastern Atlantic Ocean. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, v. 43, n. 8, p. 1191–1213, 1996.

PATEL, N. *et al.* Immobilization of protein molecules onto homogeneous and mixed carboxylate-terminated self-assembled monolayers. *Langmuir*, v. 13, n. 24, p. 6485–6490, 1997.

PEPPAS, N. A. Intelligent therapeutics: Biomimetic systems and nanotechnology in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, n. 11, p. 1529–1531, 2004.

PLENTZ, F.; FAZZIO, A. Considerações sobre o Programa Brasileiro de Nanotecnologia. *Ciência e Cultura*, v. 65, n. 3, p. 23–27, 2013.

QIAN, Z. M. Targeted Drug Delivery via the Transferrin Receptor-Mediated Endocytosis Pathway. *Pharmacological Reviews*, v. 54, n. 4, p. 561–587, 2003.

RATNAKAR B. MUJUMDAR, LAUREN A. ERNST, SWATI R. MUJUMDAR, CHRISTOPHER J. LEWIS, A.; WAGGONER, A. S. Cyanine Dye Labeling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters. *Chemistry*, v. 4, n. 2, p.

105–111, 1993.

ROBERTS, M. P. J. *The Use of Fluorescent Antibody and Isolated Chromosomes in the Study of Lupus Erythematosus Serum*. 1957. Yale University, 1957. Disponível em: <<http://elischolar.library.yale.edu/ymtdl/3076>>.

ROBINSON, J. P. “E ALL’ottavo, Dio Creò La Citometria ... and ont the 8th Day, Gos Created Cytometry”. *Springer Nature Singapore Pte Ltd*. 2017, p. 1–24, 2017.

ROEDERER, M. *et al.* 8 Color, 10-parameter flow cytometry to elucidate complex leukocyte heterogeneity. *Cytometry*, v. 29, n. 4, p. 328–339, 1997.

ROEDERER, M. *et al.* Cy7PE and Cy7APC: Bright New Probes for Immunofluorescence. *Cytometry*, v. 24, n. 3, p. 191–197, 1996.

ROHRER, G. B. H. *Scanning Tunneling Microscope*. . EUA: [s.n.], 1982

ROITT, I. M. ET AL. *Fundamentos de Imunologia*. São Paulo: [s.n.], 2018.

ROSALY, V. *et al.* Aplicações terapêuticas dos anticorpos monoclonais Monoclonal antibodies therapeutic applications. *Rev. bras. alerg. imunopatol.*, v. Vol. 29, n. Nº 2, p. 77–85, 2006.

ROTMAN, B.; PAPERMASTER, B. W. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 55, n. 1, p. 134–141, 1966.

SAADEH, YAMAAN; VYAS, D. Nanorobotic Applications in Medicine: Current Proposals and Designs. *American Journal of Robotic Surgery*, v. 1, p. 4–11, 2014.

SANDES, AF; MAEKAWA, Y; TAMASHIRO, N; TAKAO, TT; RITTER, EC; SILVA, ACT; SOUSA, FA; RIZZATTI, EG. Citometria de fluxo mostra-se mais precisa para a detecção de hemorragia feto-materna. *Revista Médica*, Belo Horizonte, 25 out. 2012. , p. 1Disponível em: <<https://www.fleury.com.br/medico/artigos-cientificos/citometria-de-fluxo-mostra-se-mais-precisa-para-a-deteccao-de-hemorragia-feto-materna-revista-medica-ed-7-2012>>. Acesso em: 30 out. 2019.

SHAHRIARI, E.; YUNUS, W. M.; SAION, E. Effect of particle size on nonlinear refractive index of Au nanoparticle in PVA solution. *Brazilian Journal of Physics*, v. 40, n. 2, p. 256–260, 2010.

SHAPIRO, HOWARD M. *The evolution of cytometers*. *Cytometry*. [S.l: s.n.], 2004

SHAPIRO, HOWARD MAURICE. *PRACTICAL FLOW CYTOMETRY*. 4th.

ed. Hoboken, New Jersey.: John Wiley & Sons, Inc., 2003.

SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F. H.; SAIGA, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent. *Journal of cellular and comparative physiology*, v. 59, n. 165, p. 223–239, 1962.

SOUTHWICK, P. L. *et al.* Cyanine Dye Labeling Reagents-Carboxymethylindocyanine Succinimidyl Esters. *Cytometry*, v. 430, n. 3, p. 418–430, 1990.

STETEFELD, J.; MCKENNA, S. A.; PATEL, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, v. 8, n. 4, p. 409–427, 2016.

SWEET, R. G. *Fluid Droplet Recorder*. . United States: [s.n.]. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US3596275A/en>>. , 1964

TANSEY, E. M.; CATTERALL, P. P. Technology transfer in Britain: The case of monoclonal antibodies 1 . *Contemporary Record*, v. 9, n. 2, p. 409–444, 1995.

THOMPSON, N. L. *et al.* The Cytofluorograf Systems 30 / 50. *Science*, v. 41, n. 2, p. 1–3, 2008.

TOMA, H. E. *Nanotecnologia Molecular - Materiais e Dispositivos*. 6^a ed. São Paulo: Coleção de Química Conceitual, 2016.

VISSER JW, JONGELING AA, T. H. Intracellular pH-Determination by Fluorescence Measurements. *THE JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY*, v. 27, n. 1, p. 32–35, 1979.

WANG, H. *et al.* A flow cytometric assay technology based on quantum dots-encoded beads. *Analytica Chimica Acta*, v. 580, n. 1, p. 18–23, 2006.

WELLER LAWRENCE A., W. L. L. EMOSS: An epiillumination microscope objective slit scan flow system. *Cytometry*, v. 3, n. 1, p. 15–18, 1982.

WOLFGANG DITTRICH, W. G. *Automatic Measuring and Counting Device for Particles in a Dispersion*. . Germany: [s.n.]. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=GB&NR=1300585A&KC=A&FT=D&ND=3&date=19721220&DB=EPODOC&locale=en_EP>. , 1972. Acesso em: 30 out. 2019.

XIA, J. *et al.* Linear optical properties of gold colloid. *Medziagotyra*, v. 21, n. 4, p. 607–611, 2015.

Y.X., Z. *et al.* Biosynthesis of gold nanoparticles using chloroplasts.

International journal of nanomedicine, v. 6, p. 2899–2906, 2011. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L560070778>>.

ZHANG, X. Gold Nanoparticles: Recent Advances in the Biomedical Applications. *Cell Biochemistry and Biophysics*, v. 72, n. 3, p. 771–775, 2015.