UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

PATRÍCIA ARAÚJO DOS SANTOS

Interações Moleculares na Adesão Celular em Suportes Sólidos e o Efeito de Fotossensibilizadores Porfirínicos

Versão Corrigida da Tese Defendida

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQUSP

São Paulo

14/02/2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Santos, Patrícia Araújo dos
S237i Interações moleculares na adesão celular em suportes sólidos e o efeito de fotossensibilizadores porfirínicos / Patrícia Araújo dos Santos. - São Paulo, 2013.
220p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Baptista, Maurício da Silva
Co-orientador: Marques, Carlos

1. Membrana : Célula : Adesão : Biologia 2. Fotobiologia I. T. II. Baptista, Maurício da Silva, orientador. III. Marques, Carlos, co-orientador.

574.875 CDD

PATRÍCIA ARAÚJO DOS SANTOS

Interações Moleculares na Adesão Celular em Suportes Sólidos e o Efeito de Fotossensibilizadores Porfirínicos

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientador

Prof. Dr. Maurício S. Baptista

Instituto de Química da USP - Brasil

Co-orientador

Prof. Dr. Carlos Marques

Instituto Charles Sadron - França

São Paulo

2013

À meus pais Eunides e Claudio,

à minha irmã Priscila

e aos meus sobrinhos Matheus e Murilo.

There is one purpose to life and one only: to bear witness to and understand as much as possible of the complexity of the world - its beauty, its mysteries, its riddles. (*Servant of the Bones, Anne Rice*)

Agradecimentos

Agradecimentos especiais a todos os meus amigos que tentaram me reconfortar quando as coisas davam errado, que comemoraram comigo as minhas conquistas e que vez ou outra ainda arregaçaram as mangas para me ajudar. Amigos de antes do IQ, do IQ, de Strasbourg e da República dos Apertados. Sem vocês tudo teria sido muito mais difícil e mais chato.

Agradecimentos mais do que especiais aos meus pais Eunides e Claúdio e aos meus orientadores (tanto os oficiais Maurício e Carlos, quanto o extra-oficial André) pelas oportunidades, apoio e incentivo que me deram e pelas lições que me ensinaram.

Não poderia deixar de fora os funcionários do IQ e do ICS pela ajuda que me deram em diversas situações.

Agradeço também ao CNPq, à CAPES e ao programa USP-COFECUB pelo financiamento recebido para o desenvolvimento desta tese.

Conteúdo

1 Introdução **24**

1.1 Adesão celular: perspectiva bioquímica 26

1.2 Adesão celular: perspectiva biofísica 34

1.3 Estudo da adesão celular por técnicas de microscopia 39

1.3.1 Microscopia de contraste de interferência da reflexão: RICM 43

1.4 Estresse oxidativo e adesão celular 47

1.4.1 O impacto da terapia fotodinâmica na adesão celular . 58

1.5 Fotossensibilizadores porfirínicos 61

2 Objetivos **70**

3 Materiais e Métodos **71**

3.1 Reagentes 71

3.2 Equipamentos 72

3.3 Métodos 73

3.3.1 Cultura celular 73

3.3.2 Fotossensibilizadores 74

3.3.3 Irradiação 76
3.3.4 Funcionalização das superfícies 76
3.3.5 Perfil de integrinas expressas na superfície celular . . . 77
3.3.6 Migração celular - Ensaio de ferida 77
3.3.7 Inibição do remodelamento de matriz extracelular . . . 78
3.3.8 RICM 79
3.3.9 Incorporação dos fotossensibilizadores em células . . . 85
3.3.10 Mecanismo de endocitose 86
3.3.11 Citolocalização 86
3.3.12 Dosagem de proteína total 87
3.3.13 Dosagem de proteínas carboniladas 87
3.3.14 SDS-PAGE das proteínas carboniladas 88
3.3.15 Efeito da BSA na fluorescência dos fotossensibilizadores 88
3.3.16 Detecção do estado triplete dos fotossensibilizadores . . 89
3.3.17 Eficiência de geração de oxigênio singlete 89
3.3.18 Análise estatística 90

4 Resultados e Discussões 91

4.1 Estudo da adesão e espalhamento celular por RICM 94
4.1.1 Aspectos gerais e estudos cinéticos 94
4.1.2 Efeito da funcionalização da superfície 104
4.1.3 Efeito do remodelamento de matriz extracelular 119
4.2 Síntese e caracterização da protoporfirina IX conjugada à poli-L-lisina 126

4.3 Estudo da adesão celular em função do tempo de incubação e da estrutura molecular dos fotossensibilizadores 134
4.3.1 No escuro 135
4.3.2 Após irradiação 149
4.3.3 Interação dos fotossensibilizadores com células 157
4.4 Efeito da fotossensibilização do soro fetal bovino na adesão celular 165

5 Conclusões e Perspectivas **185**

Lista de Figuras

1.1 Interação integrina-ligante (domínio RGD) 29
1.2 Estados conformacionais das integrinas 30
1.3 Esquema dos arranjos do citoesqueleto de actina em uma célula 32
1.4 Agregação dos receptores formando as zonas de fraca e forte adesão 35
1.5 Grau de deformação da célula 45
1.6 Natureza química das principais espécies reativas 47
1.7 Mecanismos tipos I e II de fotossensibilização 49
1.8 Reações do oxigênio singlete 51
1.9 Formação de ligações cruzadas em proteínas 54
1.10 Reações de redução do ácido sulfênico a tiol 56
1.11 Estrutura básica de um núcleo tetrapirrol mostrando a numerao das posições do anel segundo a IUPAC 62
1.12 Espectro de absorção de uma porfirina e seu complexo metálico 63
1.13 Fórmulas estruturais, nomes e siglas das porfirinas comerciais utilizadas nesta tese 66
1.14 Esquema geral das rotas de síntese de derivados da PpIX . . . 67

1.15 Esquema geral da rota sintética das meso-tetra aril/aquil porfirinas 68
1.16 Representação esquemática dos estados agregados 69

3.1 Fórmula estrutural da cicloheximida 78
3.2 Interfaces reflectivas importantes na formação de imagens de RICM de uma célula aderindo a uma lamínula 80
3.3 Gráfico da intensidade de luz refletida em função da distância em relação ao substrato. Influência do índice de refração do citoplasma 82
3.4 Curva real da intensidade de luz refletida em função da distância em relação ao substrato. Correspondência entre a curva e alguns dos padrões observados em micrografias de RICM 83
3.5 Imagens de RICM de vesículas com diferentes graus de adesão a uma superfície 85

4.1 Imagens de RICM de filopódios e lamelipódios 94
4.2 Imagens obtidas por microscopia ótica convencional x imagens obtidas por RICM 95
4.3 Evolução temporal da expansão e retração de lamelipódios . . 97
4.4 Evolução temporal da zona de adesão de uma célula individual 99
4.5 Evolução temporal da posição do centro de massa da zona de adesão 100
4.6 Evolução temporal do valor médio da zona de adesão de uma população de células 102

4.7 Histogramas da distribuição de tamanho das zonas de adesão 1h após plaqueamento 105
4.8 Histogramas da distribuição de tamanho das zonas de adesão 2h após plaqueamento 106
4.9 Histogramas da distribuição de tamanho das zonas de adesão 3h após plaqueamento 107
4.10 Evolução temporal da zona de adesão durante as três primeiras horas após plaqueamento em vidro, vidro funcionalizado com PLL e vidro funcionalizado com vitronectina 110
4.11 Micrografias de RICM de diferentes células plaqueadas em superfície de vidro na presença de FBS, mostrando a evolução da zona de adesão durante um ciclo celular 113
4.12 Micrografias de RICM de diferentes células plaqueadas, na presença de FBS, em superfície de vidro funcionalizado com PLL mostrando a evolução da zona de adesão durante um ciclo celular 115
4.13 Micrografias de RICM de diferentes células plaqueadas em superfície de vidro funcionalizada com vitronectina 117
4.14 Efeito da inibição do remodelamento de matriz pela inibição da síntese proteica no tamanho da zona de adesão 120
4.15 Imagens de RICM de células HeLa tratadas com cicloheximida 90 minutos após plaqueamento em vidro e vidro funcionalizado com PLL 124
4.16 Rota de funcionalização da PpIX com poli-L-lisina 127

4.17 Espectro de RMN ^{1}H da protoporfirina IX dimetil éster em $CDCl_3$ 128
4.18 Espectro de RMN ^{1}H da Poli-L-Lisina em DMSO 129
4.19 Espectro de RMN ^{1}H da PLLPpIX em DMSO 130
4.20 Imagens de RICM de células HeLa aderindo a uma superfície após incubação com PpIX e PLLPpIX por 1 minuto ou 3h . . 136
4.21 Imagens de RICM de células HeLa aderindo a uma superfície após incubação por 1 minuto com TMPyP, ZnTMPyP, TSPP, CPpI e PpIX 139
4.22 Esquema mostrando a interação com bicamadas lipídicas de diferentes porfirinas em função da carga e da simetria do fotossensibilizador 141
4.23 Interferência dos fotossensibilizadores na migração celular . . . 144
4.24 Perfil de integrinas expressas na superfície de células HeLa aderindo a TCPS na ausência e presença de fotossensibilizadores. 146
4.25 Imagens de RICM de células HeLa aderindo em uma superfície após incubação com PLLPpIX e PpIX por 1 minuto ou 3h seguida de irradiação 150
4.26 Micrografias de transmissão de células HeLa incubadas com PLLPpIX por 3h e irradiadas por 1 minuto 154
4.27 Taxa de incorporação dos fotossensibilizadores PpIX e PLLPpIX em células HeLa após incubação por 1 minuto e 3h 157
4.28 Taxa de incorporação da PpIX em células HeLa após inibição das vias de endocitose 160

4.29 Análise da citolocalização dos fotossensibilizadores após 1 minuto de incubação 161
4.30 Análise da citolocalização dos fotossensibilizadores após 3h de incubação 163
4.31 Micrografias de RICM durante a adesão de células a uma superfície de vidro na presença de FBS não tratado e após fotossensibilização mediada por PpIX e PLLPpIX 166
4.32 Micrografias de RICM de células HeLa aderindo à uma superfície de vidro após fotossensibilização mediada por PLLPpIX 167
4.33 Dosagem de proteína carbonilada gerada por fotossensibilização mediada por PLLPpIX e PpIX 169
4.34 Perfil de fluorescência da sonda FTC ligada a grupos carbonilas em função da distância percorrida no gel pelas proteínas do FBS 171
4.35 Micrografias de RICM de células HeLa aderindo em vidro funcionalizado com vitronectina não oxidada e vitronectina previamente fotossensibilizada com PpIX e PLLPpIX 172
4.36 Espectros de emissão de fluorescência de PpIX e PLLPpIX na presença de BSA 176
4.37 Espectros de absorção da PLLPpIX na ausência e na presença de BSA 178
4.38 Supressão da geração de $^1O_2$ pela PpIX na presença de BSA . 179
4.39 Curvas de decaimento do estado triplete da PLLPpIX na ausência e na presença de BSA 181

4.40 Curvas de decaimento do estado triplete da PpIX na ausência e na presença de albumina 183
4.41 Modelo proposto da interação fotossensibilizadores-BSA 184

Lista de Tabelas

1.1 Comprimentos de onda dos máximos de absorção e de emissão e rendimento quântico de $^1O_2$ das porfirinas comerciais utilizadas na tese 64

4.1 Valor médio e mediana da zona de adesão durante as três primeiras horas após plaqueamento em vidro, em vidro funcionalizado com PLL e em vidro funcionalizado com vitronectina 108

4.2 Tamanho da zona de adesão de células tratadas com cicloheximida após plaqueamento em vidro e vidro funcionalizado com PLL 123

4.3 Eficiências de geração e tempo de vida de $^1O_2$ em etanol da PpIX e da PLLPpIX 132

4.4 Média, mediana e valor máximo da distribuição de tamanhos da zona de adesão em função do tempo de incubação para células não irradiadas 137

4.5 Tamanho das zonas de adesão de células HeLa incubadas por 1 minuto com TMPyP, ZnTMPyP, TSPP, CPpI e PpIX. . . . 140

4.6 Média, mediana e valor máximo da distribuição de tamanhos da zona de adesão em função do tempo de incubação para células irradiadas 151
4.7 Índices de colocalização fotossensibilizador/Mitotracker em função do tempo de incubação 162
4.8 Tamanho médio da zona de adesão em FBS irradiado na ausência e na presença de fotossensibilizador 168
4.9 Tempo de vida do estado triplete da PLLPpIX na presença e na ausência de BSA 182

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

$^1O_2$	*Oxigênio singlete*
Φ_Δ	*Rendimento quântico de oxigênio singlete*
BSA	*Albumina sérica bovina*
CPpI	*Coproporfirina I*
DMEM	*Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco*
DMSO	*Dimetil sulfóxido*
ECM	*Matriz extracelular*
FLIC	*Microscopia de contraste de interferência da fluorescência*
FRET	*Transferência de energia por ressonância de fluorescência*
FSB	*Soro fetal bovino*
FTC	*Fluoresceína 5-tiosemicarbazida*
HSA	*Albumina sérica humana*
PAGE	*Eletroforese em gel de poliacrilamida*
PBS	*Tampão fosfato 100mM pH 7,4*
PDT	*Terapia fotodinâmica*
PLL	*Poli-L-lisina*
PpIX	*Protoporfirina IX sal de sódio*
PLLPpIX	*Protoporfirina IX conjugada à poli-L-lisina*

RGD	*Arginina-Glicina-Aspartato*
RICM	*Microscopia de contraste de interferência da reflexão*
RMN de ^{1}H	*Ressonância magnética nuclear de Hidrogênio*
SDS	*Dodecil sulfato de sódio*
SNOM	*Microscopia ótica de varredura em campo próximo*
SPR	*Ressonância plasmônica de superfície*
TCPS	*Poliestireno padrão cultura de tecidos*
TIRF	*Microscopia de fluorescência por reflexão interna total*
TMPyP	*Meso tetra (4-metil-N-piridil) porfirina*
TSPP	*Meso tetra (4-sulfonatofenil) porfirina*
UV	*Ultravioleta*
VN	*Vitronectina*

Resumo

Santos, P.A. **Interações Moleculares na Adesão Celular em Suportes Sólidos e o Efeito de Fotossensibilizadores Porfirínicos.** 2013. 220p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

A adesão celular está ligada à formação e disseminação de metástases, a principal causa de óbito de pacientes diagnosticados com câncer. O objetivo deste trabalho foi investigar *in vitro* o efeito de fotossensibilizadores na adesão celular. Foram utilizadas porfirinas comerciais (PpIX, CPpI, TSPP, TMPyP e Zn(II)TMPyP) e um fotossensibilizador sintetizado através da ligação de poli-L-lisina à protoporfirina IX (PLLPpIX). A adesão celular foi estudada por RICM, técnica que permite quantificar a área de contato de uma célula com um substrato por binarização das imagens digitais utilizando limiares apropriados. A técnica foi padronizada e revelou dois regimes de adesão celular: um limitado e outro não limitado pela quantidade de proteína de adesão adsorvida na superfície. Neste foi observada lise celular. Todos os fotossensibilizadores estudados foram capazes de aumentar a adesão celular na ausência de irradiação comparados ao controle sem fotossensibilizador, o que não havia sido observado nos ensaios de resistência à tripsinização normalmente utilizados para estudar o efeito de fotossensibilizadores na adesão celular. Quanto maior a anfifilicidade do fotossensibilizador, maior foi o efeito na adesão, o que é explicado pela capacidade das moléculas em se interca-

larem na membrana, mudando a sua rigidez. Este aumento da adesão no escuro correlaciona com a diminuição da migração segundo ensaios de ferida. A análise do padrão de expressão de integrinas na superfície celular revela que o aumento da adesão correlaciona com o aumento na expressão de αV. Quando os fotossensibilizadores estão concentrados na região perimembranar (1 minuto de incubação) e as células são irradiadas, há um aumento da adesão em relação ao controle sem fotossensibilizador, mas uma diminuição em relação ao controle tratado com o fotossensibilizador e não irradiado, o que implica que a PDT leva a uma diminuição da adesão celular e não a um aumento como reportado na literatura. Com 3h de incubação, PLLPpIX impede a adesão celular, enquanto PpIX praticamente não muda a adesão comparado ao controle não irradiado. Esta ausência do efeito da irradiação sugere que a PpIX afeta a adesão celular principalmente devido a sua intercalação na membrana e não devido à formação de espécies reativas. Com 3h de incubação os fotossensibilizadores não se encontram na membrana e, portanto, o efeito na adesão celular é indireto e também não está relacionado à diferenças na eficiência de internalização. O comportamento observado deve ter relação com diferenças de citolocalização. Outro processo que pode alterar a adesão celular é a oxidação das proteínas do soro fetal bovino. Como foi observado nos estudos de fotossensibilização de células, PLLPpIX foi capaz de impedir a adesão celular, diferentemente da PpIX. A maior eficiência da PLLPpIX foi associada a presença do polímero, o qual força por questões estéricas que a interação da PLLPpIX com a albumina, o componente majoritário do soro, fique restrita à superfície da proteína, deixando o fotossensibilizador disponível para interagir com o oxigênio molecular e gerar oxigênio

singlete. Assim, a funcionalização com um polímero tornou a PpIX capaz de modular a adesão celular tanto agindo dentro da célula quanto na matriz extracelular.

Palavras-Chave: adesão celular, terapia fotodinâmica, RICM, estresse oxidativo, porfirinas, fotoxidação

Abstract

Santos, P.A. **Molecular Interactions in Cell Adhesion on Solid Substrates and the Effect of Porphyrinic Photosensitizers.** 2013. 220p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Cell adhesion is associated to the formation and spread of metastasis, the leading cause of death in cancer patients. The aim of this study was to investigate, in vitro, the effect of photosensitizers in cell adhesion. Five commercial porphyrins (PpIX, CPpI, TSPP, TMPyP e Zn(II)TMPyP) and Protoporphyrin IX covalently tethered to poli-L-lysine (PLLPpIX) were used. Cell adhesion was mainly studied by RICM, a technique that allows quantifying the contact area between a cell and a substrate for binarization of digital images using appropriate thresholds. The technique was standardized and disclosed two systems for cell adhesion: a system limited by the amount of adhesion protein adsorbed on the surface and another one no limited, in which cell lysis was observed. All photosensitizers were able to enhance cell adhesion in the absence of irradiation compared to control without photosensitizer, which had not been observed in the trypsinization resistance tests usually used to study the effect of photosensitizers in cell adhesion. The greater the amphiphilicity of the photosensitizer, the greater was the effect on cell adhesion. This is explained by the ability of molecules to fit in the membrane, changing its tension. This increased adhesion correlates with the

decrease in migration according to wound healing assays. Analysis of the integrin expression pattern on cell surface reveals that increased adhesion correlates with increased expression of alpha V. When photosensitizers are concentrated in the perimembranar region (1 minute incubation) and cells are irradiated, there is an increase in adhesion when compared to control without photosensitizer, but a decrease relative to controls treated with the photosensitizer without irradiation, implying that PDT leads to a reduction of cell adhesion and not to an increase as reported in the literature. With 3h incubation PLLPpIX prevents cell adhesion, while PpIX practically does not change the adhesion compared to dark control. This lack of effect of irradiation suggests that PpIX affects cell adhesion primarily because of its intercalation into the membrane and not due to the formation of reactive species. With 3h incubation the photosensitizers are not on the membrane and therefore the effect on cell adhesion is indirect and is not also related to differences in uptake efficiency. The observed behavior must be related to differences in subcellular localization arising from differences in molecular structure. Another process that can alter the cell adhesion is serum protein oxidation. As noted in the studies with cells, photosensitization of serum with PLLPpIX (but not with PpIX) was capable of preventing cell adhesion. The greater efficiency of PLLPpIX was associated with the presence of the polymer, which, by the steric hindrance, forces that interaction of PLLPpIX with albumin, the major serum component, is restricted to the protein surface, leaving the photosensitizer available to interact with molecular oxygen and generate singlet oxygen. Thus, the functionalization of a polymer has turned PpIX capable of modulating cell adhesion by acting both within and

outside (in extracellular matrix) the cell.

Keywords: cell adhesion, photodynamic therapy, RICM, oxidative stress, porphyrins, photo-oxidation

Capítulo 1

Introdução

A adesão celular é um processo complexo, cujo entendimento envolve conceitos de várias disciplinas tais como biologia, química e física. Sua complexidade pode ser verificada pelo número de componentes e interações nela envolvidos: são 156 componentes distintos[1] (151 proteínas, 4 lipídios e Ca^{2+}) ligados via 690 interações. [1] O enorme interesse neste campo de pesquisa é exemplificado pelos mais de 100.000 artigos publicados sobre o tema nos últimos cinco anos[2], o que pode ser explicado pelo envolvimento da adesão celular em numerosos processos tanto vitais quanto patológicos, tais como o desenvolvimento embrionário, a resposta imunológica, a cicatrização e a invasão tumoral. [2] Dada a importância da adesão celular na formação e disseminação de metástases, nosso objetivo neste trabalho é descrever o efeito da terapia fotodinâmica (PDT, do inglês, *Photodynamic Therapy*), uma modalidade clínica de tratamento do câncer, no processo de adesão celular.

[1] Incluindo membros apenas transientemente associados
[2] PUBMED; palavra-chave: cell adhesion

Esta introdução está dividida em cinco seções. A seção 1.1 apresentará a adesão celular sob o ponto de vista bioquímico e a seção 1.2 sob o ponto de vista biofísico. A seção 1.3 tratará do uso de técnicas de microscopia no estudo da adesão celular, com ênfase em RICM (do inglês, *Reflection Interference Contrast Microscopy*). A seção 1.4 avaliará o que se conhece do impacto do estresse oxidativo na adesão celular, com ênfase nos trabalhos publicados em PDT. Por fim, a seção 1.5 dará uma visão geral das características dos fotossensibilizadores porfirínicos, as moléculas-modelo estudadas nesta tese.

1.1 Adesão celular: perspectiva bioquímica

O comportamento funcional de uma célula é determinado pelas interações químicas e físicas que esta estabelece com outras células e com o ambiente. Estas interações podem ser tanto específicas (do tipo receptor-ligante) quanto inespecíficas (por exemplo, interações eletrostáticas com superfícies). O processo através do qual as células interagem e se ligam a outras células ou a uma superfície inanimada é chamado de adesão celular. As células podem aderir permanentemente, como necessário para a formação da pele, ou de maneira transiente, como no caso da interação entre linfócitos e células infectadas. [3]

No processo de adesão, as células inicialmente testam a superfície através da extensão e retração de projeções de membrana conhecidas como filopódios. Se uma tensão adequada não é criada, por exemplo, porque o substrato não é rígido o suficiente [4], ou se a composição do meio extracelular não é apropriada, rapidamente as células entram em processo apoptótico (*anoikis*). Resistência à *anoikis* é um pré-requisito para a disseminação metastática de um tumor, a qual pode ser alcançada, por exemplo, pela ativação constitutiva de vias responsáveis pela sobrevivência celular ou através da perda de E-caderina (proteína que medeia a adesão célula-célula em células epiteliais). [5–7]

Em um tecido, o meio extracelular é conhecido como matriz extracelular e é composto por uma rede de proteínas, a qual é secretada e remodelada pelas células. Diferentes tecidos têm diferentes composições de matriz extra-

celular: a pele, por exemplo, é rica em colágenos tipos I e III, enquanto a cartilagem é rica em colágeno tipo II [8]; esta composição também varia com o estado fisiológico (normal x canceroso) [9].

A matriz extracelular (ECM) em mamíferos é composta por cerca de 300 proteínas (1 % - 1,5 % do proteoma, sem considerar a contribuição de isoformas). [10] As proteínas que compõem a ECM podem ser divididas em proteínas estruturais e proteínas reguladoras. Dentre as proteínas estruturais pode-se citar glicoproteínas fibrosas tais como fibronectina, vitronectina e colágenos, além de glicosaminoglicanos e proteoglicanos tais como ácido hialurônico, heparam-sulfato, queratam-sulfato e condroitim-sulfato. [11] Na classe de proteínas reguladoras estão os fatores de crescimento e as proteínas matricelulares, tais como proteases, SPARC (*secreted protein acidic rich in cysteine*), tenascina e trombospondina. [12,13] A ECM fornece para as células suporte mecânico e um depósito de moléculas de sinalização, tais como fatores de crescimento e citocinas, controlando assim adesão/morfologia, migração, proliferação, diferenciação e sobrevivência das células. [10, 11] A importância da matriz extracelular pode ser ilustrada pela ampla gama de síndromes que surgem de anormalidades genéticas em proteínas da matriz extracelular, consequentemente, as moléculas da matriz extracelular são importantes alvos em farmacoterapia. [14]

A interação entre as células e o meio extracelular é principalmente mediada por receptores celulares chamados integrinas. Cada integrina consiste de duas

subunidades transmembrana tipo I[3], denominadas α e β, as quais contêm um grande domínio extracelular ($\sim 700 - 1000$ resíduos) e um pequeno domínio intracelular ($\sim 20 - 50$ resíduos)[4]. Em mamíferos, 18 subunidades α e 8 subunidades β associam-se não-covalentemente em várias combinações para formar 24 integrinas, a maior parte das quais é capaz de ligar a vários ligantes com diferentes afinidades. Esta sobreposição de especificidades fornece uma redundância de atividade e garante proteção contra falhas no controle da homeostase[5].

A maior parte das integrinas reconhece motivos RGD (Arg-Gly-Asp), o qual foi descoberto em fibronectina e depois encontrado em outras proteínas da matriz extracelular incluindo laminina, tenascina, vitronectina e trombospondina. A especificidade das integrinas é determinada em parte pelos aminoácidos ao redor da sequência RGD. Nesta unidade mínima de três resíduos de aminoácidos, a subunidade β liga-se ao resíduo ácido (Asp), enquanto a subunidade α liga-se ao resíduo básico (Arg), conforme mostrado na Figura 1.1. [15–18]

Há evidências científicas que indicam que as integrinas existem em um equilíbrio entre três estados conformacionais, os quais estão esquematizados na Figura 1.2. No estado de baixa afinidade (A), o domínio extracelular encontra-se dobrado e o domínio intracelular fechado. No estado de alta afinidade (C),

[3]Proteína que contém um único domínio transmembrana com o C-terminal orientado para o citoplasma e o N-terminal orientado para o meio extracelular ou para o lúmem de uma organela membranar.

[4]Exceção: β_4, cujo domínio citoplasmático possui ~ 1000 resíduos

[5]Por exemplo, fibronectina pode ser reconhecida por nove diferentes tipos de integrina.

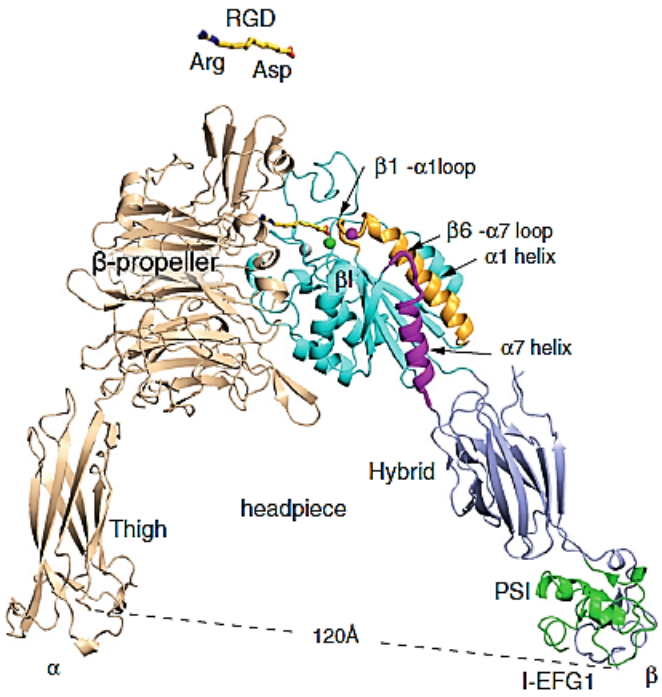


Figura 1.1: Desenho esquemático do domínio extracelular da integrina $\alpha_{bII}\beta_3$ cristalizada na presença de um peptídio contendo a sequência RGD. Adaptado de [19].

o domínio extracelular encontra-se estendido e separado e o domínio intracelular aberto. A terceira conformação, com o domínio extracelular estendido e não separado, seria de afinidade intermediária (B). Diferentes cátions divalentes regulam a afinidade das integrinas por seus ligantes, ao formarem um complexo ternário com o resíduo ácido da sequência RGD. Este processo é conhecido como sinalização de fora para dentro. Reciprocamente, sinais intracelulares, como a ligação da proteína talina à subunidade β, podem induzir mudanças na conformação das integrinas, alterando sua afinidade pelos componentes da matriz extracelular em um processo conhecido como sinalização de dentro para fora. [15, 16, 20] Muitas integrinas também podem ser

ativadas por alterações conformacionais induzidas pela ligação de anticorpos monoclonais [21] e pela acidificação do meio extracelular [22].

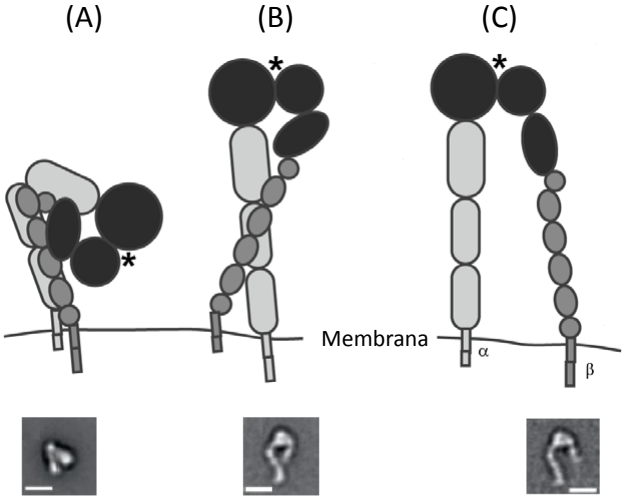


Figura 1.2: Esquema dos estados conformacionais das integrinas: estado de baixa afinidade (A), estado de afinidade intermediária (B) e estado de alta afinidade (C). O sítio de ligação está assinalado com um asterisco. Adaptado de [22]. Embaixo dos esquemas são mostradas imagens de microscopia eletrônica da integrina $\alpha_V\beta_3$ nos três estados conformacionais supracitados. Adaptado de [19].

Integrinas são receptores de membrana não usuais na medida em que transmitem sinais tanto mecânicos quanto químicos bidirecionalmente, apesar de não possuírem atividade enzimática intrínseca. As conexões entre a matriz extracelular e as integrinas determinam a organização do citoesqueleto e a ativação de vias de sinalização. A ligação do domínio citoplasmático ao citoesqueleto e a quinases e fosfatases permite que a célula acople forças mecânicas induzidas pela adesão a processos de sinalização. A sinalização mediada por integrinas envolve principalmente proteínas tirosina quinases da família Src,

além da quinase de adesão focal FAK[6]. Estas levam a ativação das vias de ERK/MAPK, JUN, NFκB e Akt. [2, 5, 23–26]

A adesão celular pode ser dividida em três estágios: adesão, espalhamento e formação das fibras de estresse. Subjacente a cada etapa há um conjunto específico de proteínas que são recrutadas/ativadas. O primeiro estágio envolve a interação inicial entre as integrinas e seus substratos na matriz extracelular, formando os chamados complexos focais, que são estruturas pontuais e periféricas ricas em talina, paxilina, vinculina, proteínas tirosina-fosforiladas e $\alpha_V\beta_3$ integrinas. No segundo, as células aumentam sua área de contato com a superfície e os contatos focais se desenvolvem a partir dos complexos focais pelo recrutamento de zixina e $\alpha_5\beta_1$. No último estágio, o citoesqueleto se reorganiza direcionando-se centripetalmente e os contatos fibrilares se desenvolvem a partir dos contatos focais pela translocação de $\alpha_5\beta_1$, formando estruturas ricas em tensina e pobres em proteínas tirosina-fosforiladas[7]. [2, 27–29]

A maturação das zonas de adesão é sujeita a estrito controle espacial e temporal, sendo fortemente influenciada pela transmissão de força através do citoesqueleto de actina: complexos focais se tornam contatos focais sobre

[6] A família Src possui nove membros, três dos quais são expressos ubiquamente: *Src*, *Fyn* e *Yes*. Eles possuem um domínio N-terminal que pode sofrer miristoilação, um domínio SH2 de ligação a proteínas fosforiladas, um domínio SH3 de ligação a proteínas associadas ao citoesqueleto, um domínio tirosina quinase e um elemento regulatório negativo na porção C-terminal. FAK contém na porção N-terminal um domínio FERM de interação com a subunidade β das integrinas, um domínio tirosina quinase, regiões rica em prolina e na porção C-terminal um domínio FAT de interação com proteínas associadas ao citoesqueleto.

[7] Em culturas 3D, células desenvolvem contatos que lembram os contatos fibrilares, tanto em suas dimensões quanto pela presença de $\alpha_5\beta_1$, mas contrariamente estes contatos são ricos em proteínas fosforiladas.

aplicação de força e força mecânica estimula o crescimento dos contatos focais. Além disso, diferente dos contatos focais, a translocação, mas não a manutenção dos contatos fibrilares é dependente da contratilidade do sistema actina/miosina. [30–32] A Figura 1.3 mostra um esquema dos arranjos do citoesqueleto de actina em uma célula.

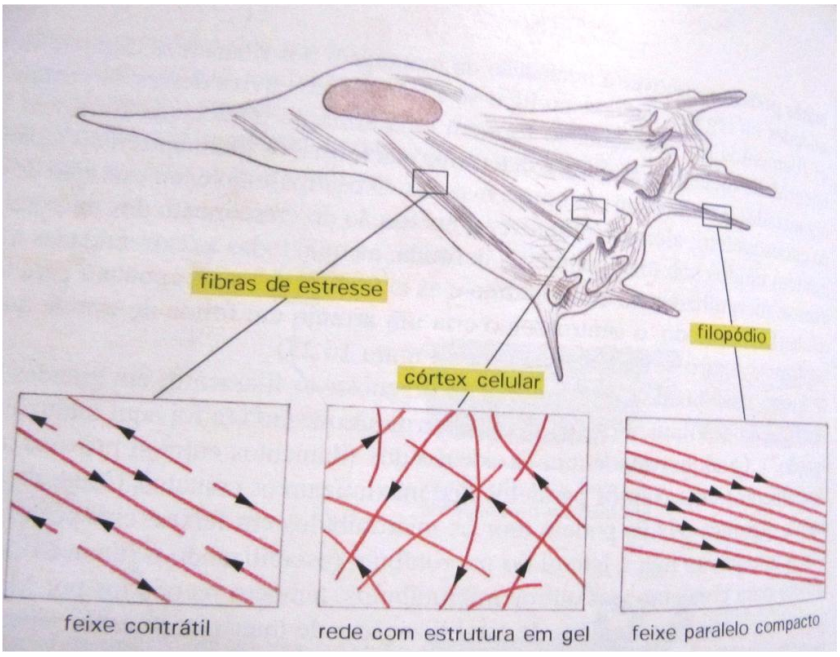


Figura 1.3: Esquema dos arranjos do citoesqueleto de actina em uma célula: feixe contrátil (fibras de estresse), estrutura em rede (córtex celular) e feixe paralelo compacto (filopódio). As flechas apontam na direção das extremidades mais, *que são as extremidades de crescimento mais rápido. Adaptado de [3].*

A dinâmica de montagem e desmontagem do citoesqueleto de actina é controlada pelas GTPases RhoA (responsável pela formação de fibras de estresse), Rac (responsável pela formação de lamelipódios) e cdc42 (responsável pela formação de filopódios). GTPases são ativas quando ligadas a GTP e inativas

quando ligadas a GDP. A ativação é catalisada por GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*), enquanto a inativação é promovida por GAPs (*GTPases activating proteins*), as quais estimulam a atividade intrínseca de GTPases das proteínas. A ativação das integrinas ativa proteínas tirosina quinases que fosforilam GEFs os quais ativam Rac e Cdc42 e inativam RhoA. [33] Rac, através da proteína WAVE, e cdc42, através da proteína WASP, regulam a ativação do complexo Arp2/3 o qual estimula a polimerização de actina nos filopódios e a acumulação de filamentos de actina densamente ramificados nos lamelipódios. Em contraste, Rho limita a protusão da membrana. Através de ROCK, Rho estimula profilina, proteína polimerizante de actina e inibe cofilina, proteína despolimerizante de actina. ROCK também eleva o nível de fosforilação da cadeia leve da miosina. [28, 34] Além da manutenção dos contatos fibrilares, o sistema actina-miosina também é responsável pela translocação de vesículas contendo integrinas sendo importante para o crescimento das zonas de adesão. [35]

1.2 Adesão celular: perspectiva biofísica

A modelagem biofísica da adesão celular envolve a identificação e quantificação das principais características celulares que desempenham um papel neste processo tanto na escala micrométrica (controle da forma da célula), quanto submicrométrica (organização dos componentes da interface célula-substrato), quanto molecular. Ela é normalmente realizada com o auxílio de sistemas modelos simplificados que compartilham algumas características com os sistemas biológicos. [36]

No início do processo de adesão ocorre a agregação das integrinas. Pode-se inicialmente pensar que este fenômeno é dirigido pelo citoesqueleto ou por sinalização intracelular. No entanto, estudos com sistemas biomiméticos mostraram que a adesão produzida por baixas concentrações de pares receptor/ligante em competição com a repulsão estérica gerada por polímeros funcionando como glicocálice, leva à segregação espontânea da zona de adesão em regiões de fraca e forte adesão. [37–39] Estudos com monócitos tratados com citocalasina D, um inibidor de polimerização de actina, também observaram a formação de zonas de fraca e forte adesão. [40]

Consequentemente, a formação de domínios de adesão não é devida ao citoesqueleto ou à sinalização intracelular, mas sim consequência da competição entre forças atrativas (reconhecimento molecular) de curta distância ($\sim$15 nm), interações repulsivas de médio alcance ($\sim$50 nm) geradas pelo glicocálice e forças elásticas associadas à membrana. O alcance diferente entre as forças

de atração e de repulsão tem uma importante consequência: a formação do par receptor-ligante forçando uma distância de equilíbrio de ∼15 nm é associada com uma deformação local da membrana, uma vez que o glicocálice tenta manter a distância de ∼50 nm. Esta deformação local se estende por uma distância da ordem do comprimento de persistência da membrana (∼50 nm)[13], o que gera uma força elástica atrativa entre dois pares receptor-ligante, fornecendo uma força dirigente para a agregação dos receptores (Figura 1.4). O ganho em energia elástica é parcialmente compensado pela redução da entropia translacional dos pares receptor-ligante. [41]

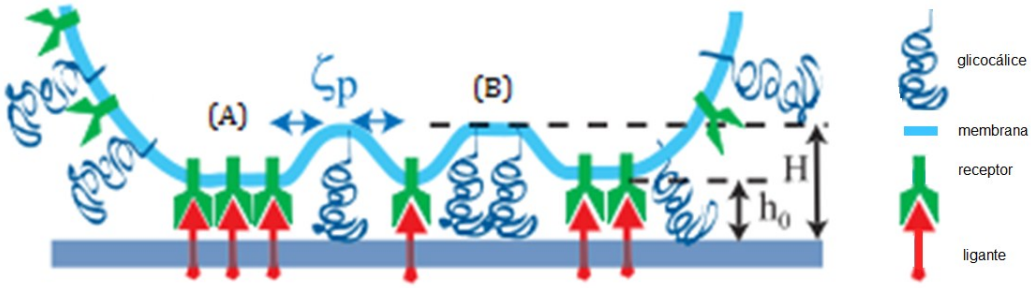


Figura 1.4: Esquema ilustrando a agregação dos receptores transmembrana integrinas induzida pela deformação local da membrana formando as zonas de forte (A) e fraca (B) adesão. ζ_p é o comprimento de persistência da membrana. h_0 e H são as distâncias membrana-substrato nas zonas de forte e fraca adesão, respectivamente. Adaptado de [41].

De fato, são justamente o custo em entropia translacional e a tensão da membrana que limitam o tamanho das zonas de forte adesão. Estudos com

[13]O comprimento de persistência (ζ_p) é uma medida da extensão lateral de uma deformação evocada por uma força local, a qual depende da flexibilidade do material.

células mostraram que a adesão celular é maior, quanto maior é a mobilidade dos receptores [42] e a deformabilidade da célula. [40] A tensão da membrana também influencia a escala de tempo da nucleação dos receptores: o tempo de nucleação difere de cerca de um fator de 15 entre duas vesículas diferindo em tensão por um fator de 2. [43]

Utilizando-se o conceito de energia, pode afirmar que a adesão é determinada por um poço duplo de potencial com mínimos a curta ($\sim$15 nm) e a longa distância ($\sim$50 nm). Uma vez que os dois mínimos são separados por uma barreira de ativação, a transição entre estados de fraca e forte adesão é de primeira ordem[8] e um típico processo de nucleação e crescimento. Consequentemente, a formação dos domínios de adesão pode ocorrer em densidades muito pequenas de receptores, o que tem muitas vantagens. A força da adesão, por exemplo, pode ser rapidamente adaptada seja pela variação das densidades relativas de moléculas repelentes e receptores (através de endocitose/exocitose dos receptores) ou pela disponibilidade de ligantes (pela ação de proteases ou antagonistas). [41, 45] Em termos cinéticos, o que tem sido observado, tanto em sistemas biomiméticos quanto em células, é uma dependência da difusão dos receptores em sistemas com baixas concen-

[8] As transições podem ser classificadas em duas categorias, tomando-se como base o comportamento de certas funções de estado termodinâmicas em função da temperatura ou pressão. As derivadas primeiras da energia livre de Gibbs em relação à temperatura ou pressão definem a entalpia, a entropia e o volume, que poderão ser funções contínuas ou descontínuas da temperatura. Se forem descontínuas, diz-se que a transição é de primeira ordem. Caso estas funções sejam contínuas, mas as derivadas segundas das mesmas sejam descontínuas, diz-se que a transição é de segunda ordem. Transições de fase de primeira ordem são as mais frequentemente observadas (um exemplo de transição de fase de segunda ordem é a modificação da simetria da estrutura cristalina de um sólido) e se manifestam pelo fato de que a transição ocorrerá com variações na entalpia, na entropia ou no volume. [44]

trações de pares receptor-ligante e uma dependência da taxa de associação dos pares receptor-ligante em sistemas com alta densidade de pares receptor-ligante. [46–49]

Vale a pena ilustrar o equilíbrio entre as forças atrativas geradas por reconhecimento molecular e as forças repulsivas geradas pelo glicocálice utilizando os valores aproximados das energias envolvidas no processo de adesão. Para energias de ligação por par receptor-ligante da ordem de *10* $k_B T$[9] (típico valor para integrinas) e uma densidade numérica de receptores da ordem de $5.10^4/\mu\mathrm{m}^2$, o trabalho (ou energia livre) de adesão seria da ordem de $w \sim 2.10^{-4}$ J/m^2 enquanto os valores experimentais são três ordens de magnitude menor ($W \sim 10^{-7}$ J/m^2). A razão desta discrepância é que as regiões de forte adesão estão em equilíbrio termodinâmico com a porção da membrana não aderida. As moléculas do glicocálice (de concentração C_{gc}) expelidas dos domínios de forte adesão exercem então uma pressão osmótica e o trabalho de adesão passa a ser da ordem de $W \sim w - k_B T \mathrm{C}_{gc}$. A redução da força da adesão pelas moléculas do glicocálice é essencial para a estabilidade mecânica das vesículas ou células: na ausência de glicocálice as vesículas frequentemente colapsam se w excede a resistência à tração da bicamada lipídica (10^{-3} N/m). [38, 41, 45]

O segundo fator genérico que controla a força da adesão é a elasticidade da membrana. Em membranas muito flexíveis, as ondulações produzidas por

[9] k_B é a constante de Boltzmann. Seu valor é $1{,}38.10^{-23}$ J.K^{-1}. Ela pode ser definida como a constante de proporcionalidade entre temperatura (T) e energia (E). [44]

efeito térmico dificultam a adesão uma vez que a adesão da membrana ao substrato suprime o movimento browniano e isto corresponde a uma diminuição da entropia. Em células o acoplamento da membrana ao citoesqueleto de actina suprime estas ondulações. Assim, o módulo de deformação de uma membrana flexível é da ordem de $\kappa \sim 25\ k_B T$ e de uma célula normal é da ordem de $\kappa \sim 1000\ k_B T$. Em uma célula *knock out* para talina, proteína adaptadora entre o citoesqueleto de actina e os receptores de adesão na superfície da célula, o módulo de deformação é reduzido para $\kappa \sim 25\ k_B T$, o que leva a uma redução do trabalho de adesão de aproximadamente uma ordem de magnitude. [41, 45] Observou-se que em sistemas biomiméticos forças na faixa de pN são suficientes para remover as zonas de adesão, enquanto fibroblastos são capazes de aplicar uma força de 10 nN em um substrato devido à ação do citoesqueleto. [37]

Assim, para que um contato estável célula-célula ou célula-ECM se estabeleça, deve-se levar em consideração (1) que os receptores estão frequentemente encobertos por várias dezenas de nanômetros de glicocálice - portanto, é necessária a expulsão dessas moléculas repelentes da zona de adesão; (2) a formação dos domínios de adesão pela segregação lateral dos receptores, então distribuídos aleatoriamente pela membrana plasmática (um processo controlado pela difusão) e (3) as modulações associadas à sinalização intracelular induzida pela adesão como, por exemplo, a reorganização do citoesqueleto de actina. [45]

1.3 Estudo da adesão celular por técnicas de microscopia

O estudo da adesão e do espalhamento celular é normalmente realizado através da contagem do número de células e do cálculo da área das células aderidas após estas terem sido fixadas e coradas com um corante ou fluoróforo. [50, 51] Entretanto, adesão e espalhamento são processos dinâmicos, que envolvem inúmeras etapas como descrito na seção 1.1, cuja análise em tempo real não pode ser realizada através deste tipo de ensaio e um estudo cinético torna-se laborioso. Microscopia de células vivas pode ser utilizada para superar estas limitações, entretanto, a resolução limitada por difração[10] da microscopia ótica - $\lambda/2 \approx 250$ nm, onde λ é o comprimento de onda - representa um desafio à visualização detalhada dos contatos de adesão. A adesão celular também pode ser estudada usando um outro tipo de microscópio: além da sua capacidade de tirar imagens, o microscópio de força atômica (AFM) também é capaz de medir a força necessária para destacar uma célula de uma superfície [52] ou para romper a interação entre duas moléculas [53]. Entretanto, a complexidade da instrumentação limita sua execução a alguns poucos centros de pesquisa.

Historicamente, a única maneira de alcançar resolução da ordem de dezenas de nanômetros tem sido a microscopia eletrônica, que embora também seja limitada por difração, utiliza elétrons, cujos comprimentos de onda são

[10] Difração é um fenômeno que ocorre com as ondas quando elas passam por um orifício ou aresta de um objeto cuja dimensão é da mesma ordem de grandeza que o seu comprimento de onda.

cerca de 100.000 vezes menores do que os da luz visível[11]. Entretanto, esta técnica é cara e o preparo das amostras é demorado e pode induzir a artefatos, além de não permitir o estudo de células vivas. Felizmente, as últimas décadas viram o desenvolvimento de uma variedade de ferramentas que permitem transcender o limite de difração. Não se trata de uma violação das leis da ótica e sim que estas técnicas são capazes de explorar interações que são dependentes da distância entre sondas e o ambiente numa faixa de até $\sim$ 100 nm. [56, 57] Algumas destas técnicas são: FRET (*fluorescence resonance energy transfer*), SNOM (*scanning near-field optical microscopy*), TIRF (*total internal reflection fluorescence*), SPRM (*surface plasmon resonance microscopy*), FLIC (*fluorescence interference contrast microscopy*) e RICM (*reflection interference contrast microscopy*), as quais serão brevemente descritas a seguir.

FRET faz uso da transferência não radiativa entre dois conjuntos de fluoróforos: uma molécula doadora excitada ao invés de emitir luz, transfere sua energia para uma molécula aceptora excitando-a, a qual então emite luz. A taxa de transferência de energia entre as moléculas doadora e aceptora cai como a sexta potência da separação entre elas ($k \propto 1/r^6$), permitindo explorar fenômenos que ocorrem em até $\sim$ 10 nm de distância. Assim, é possível detectar, a princípio, a ligação entre uma molécula na célula e uma molécula no substrato. [58]

[11]Um exemplo de estudo da adesão celular utilizando Scanning Electron Microscopy pode ser encontrado na referência. [54] Um exemplo de estudo da adesão celular utilizando Transmission Electron Microscopy pode ser encontrado na referência [55].

SNOM, TIRF e SPRM são técnicas baseadas na geração de ondas evanescentes. Estas são detectavéis apenas quando elas interagem com um objeto capaz de absorvê-las ou difratá-las. Sua energia decai exponencialmente com a distância permitindo explorar fenômenos que ocorrem até $\sim$ 100 nm distante da superfície [59]. SNOM e TIRF baseiam-se na excitação de fluoróforos pela onda evanescente. Em SNOM, a onda evanescente é gerada pelo confinamento da luz em uma fibra ótica contendo uma apertura subnanométrica [60]; em TIRF, a onda evanescente é gerada por reflexão total interna da luz. [61] Nos dois casos, quanto mais próxima da interface é a localização do fluoróforo, mais intensa é a fluorescência observada. Em SPRM, plasmons de superfície[12] são excitados pelo acoplamento a uma onda evanescente gerada também por reflexão total interna. A extensão deste acoplamento, a qual é afetada pelo índice de refração do meio dielétrico em contato com o filme metálico, pode ser medida pela queda na intensidade da luz refletida: dependendo da distância local célula-substrato, uma intensidade de luz refletida característica é obtida. [62]

FLIC e RICM são métodos baseados na interferência entre os vários caminhos óticos que a luz oriunda de um objeto pode tomar. Interfência maximamente construtiva e destrutiva são separadas por uma distância de $\lambda/4n \approx 100$ nm, onde n é o índice de refração do meio. [57] FLIC pode determinar a distância entre um fluoróforo (nos lipídios ou proteínas de membrana) e uma superfície plana reflectiva. [63] Já em RICM é possível determinar a distância entre a

[12]Plasmons de superfície são elétrons livres que se propagam ao longo da superfície de um filme metálico.

membrana de uma célula e uma superfície plana reflectiva sem necessidade de marcação da membrana. A técnica RICM, que foi utilizada nesta tese, será detalhada na seção seguinte.

1.3.1 Microscopia de contraste de interferência da reflexão: RICM - Reflection Interference Contrast Microscopy

Na técnica RICM, um objeto localizado muito próximo a uma superfície plana transparente é iluminado através desta superfície. Os raios refletidos pelo objeto e pelo substrato sofrem interferência, gerando um padrão de intensidade que é o resultado da diferença no comprimento dos caminhos óticos entre as ondas refletidas a partir das diferentes interfaces óticas do sistema estudado. Este padrão de intensidades pode ser registrado em função da posição e do tempo. As vantagens desta técnica são: (1) não há necessidade de qualquer marcação da amostra, (2) ela pode ser acoplada a transdutores de força como pinças óticas ou magnéticas [64] e (3) sua facilidade de implementação.

Um microscópio de epi-fluorescência pode ser convertido em um equipamento de RICM substituindo-se um dos divisores de feixe dicróico por um divisor de feixe neutro. Outros requerimentos são uma câmera de vídeo bastante sensível e uma objetiva com grande abertura númerica e magnificação. Grande abertura númerica melhora a resolução lateral, uma vez que quanto maior é o ângulo de iluminação, menor é a profundidade de foco[13]. Além disso, objetivas com uma grande abertura numérica podem evitar os problemas que surgem a partir de reflexões oriundas da membrana superior em

[13]Uma menor profundidade de foco significa que a luz torna-se incoerente antes de haver viajado longe para dentro do meio.

uma projeção de membrana muito fina. [59, 65, 66]

Apesar das vantagens supracitadas, há relativamente poucos trabalhos publicados utilizando RICM para estudar adesão celular. O primeiro estudo foi publicado em 1964 [67], com o nome de IRM (do inglês *interference reflection microscopy*), quando o método antiflex ainda não havia surgido. O método antiflex foi desenvolvido em 1975 [68] e utiliza polarizadores cruzados e uma placa de um quarto de onda para eliminar reflexões devidas aos componentes do microscópio[14] e assim aumentar o contraste consideravelmente, passando a técnica a ser chamada RICM.

Na segunda metade da década de 70 estudos de imunocitoquímica confirmaram que as áreas mais escuras que o segundo plano vistas por RICM colocalizam com os contatos de adesão focal. [69] Desde então, esta técnica tem sido principalmente utilizada para estudar o papel do citoesqueleto [40, 46, 70–75] e o efeito da funcionalização de superfícies com polímeros e proteínas da matriz extracelular (especialmente fibronectina e colágeno) na adesão celular [76–86]. Fibroblastos foram o tipo celular mais estudado [67, 69, 76–78, 80–83, 87–91]. Dentre as células tumorais já estudadas utilizando esta técnica estão HepG2 − carcinoma hepatocelular [70,80,85], F9 − carcinoma embrionário [73], OVCAR−4 − carcinoma ovariano [86], S180

[14]Primeiro, a luz incidente é linearmente polarizada e então circularmente polarizada pela placa de um quarto de onda. A interface água/membrana reverte o sentido da polarização circular. A luz refletida é de novo linearmente polarizada pela passagem através da placa de um quarto de onda, mas agora tem polarização ortogonal a polarização linear original. Um polarizador, com seu eixo cruzado com respeito ao polarizador original, permite que a luz refletida pela amostra passe, mas bloqueia a luz refletida pelas partes internas do microscópio, cuja polarização permanece no sentido original.

− sarcoma e HeLa − adenocarcinoma de cervix [46]. Apesar de alguns estudos não deixarem explícito por quanto tempo após o plaqueamento as células foram visualizadas, a maioria concentra-se na análise da adesão em um intervalo de até 2h30 após o plaqueamento [40,46,70,71,74,76,77,81–85,87,92].

Em estudos qualitativos muitas vezes os resultados de RICM são comparados com os resultados obtidos com outras técnicas de microscopia. [62,88,91] Em estudos quantitativos, a principal análise realizada é o grau de deformação da célula (α) em função do tempo e/ou do tipo de superfície. O grau de deformação é obtido pela razão entre o raio da zona de adesão (obtido por RICM) e o raio do plano médio da célula (obtido por contraste de fase) (Figura 1.5). Como α também é o seno do ângulo de contato (θ) entre a célula e a superfície, ele pode ser utilizado para obter a energia de adesão, a qual é calculada conhecendo-se θ, o módulo de elasticidade da célula e a espessura da membrana. [70, 76–78, 80–83, 85, 92]

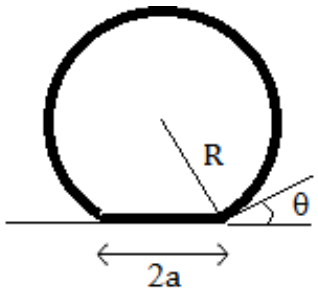


Figura 1.5: Geometria de uma célula aderindo a um substrato não deformável modelada como uma esfera truncada, onde R é obtido por microscopia de contraste de fase e a por RICM. A relação sen θ = (a/R) fornece o grau de deformação da célula (α).

Na teoria por trás do cálculo do grau de deformação, tanto a zona de adesão quanto a morfologia da célula são modeladas como uma esfera. Entretanto, na fase mais tardia do espalhamento e no caso de células com espalhamento anisotrópico, como os neutrófilos, tanto a célula quanto a zona de adesão deixam de ter esta geometria. Nesta tese, é proposta uma metodologia de análise dos dados que pode ser aplicada a estes casos. Esta metodologia se baseia na análise da evolução temporal exclusivamente da zona de adesão e permite a elaboração de modelos matemáticos que descrevem a cinética de adesão. Após ser desenvolvida, esta metodologia foi utilizada para estudar o efeito de fotossensibilizadores porfirínicos na adesão de células HeLa a suportes sólidos funcionalizados com FBS e vitronectina.

1.4 Estresse oxidativo e adesão celular

O desbalanço redox, também conhecido como estresse oxidativo, ocorre quando a formação de espécies reativas sobrepõe a capacidade de remoção destas espécies pela célula e resulta em danos diretos ou indiretos de ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e carboidratos, podendo levar à morte celular. A Figura 1.6 traz um resumo da natureza química das principais espécies reativas conhecidas.

ERO	ERN	ERS	ERC
$O_2^{\bullet -}$	$NO^{\bullet}$	$RS^{\bullet}$	$RC^{\bullet}$
$^1O_2$	$ONOO^-$		
O_3	$NO_2^{\bullet}$		
$^{\bullet}OH$	NO_2Cl		
H_2O_2	N_2O_2		
HOCl			
$RO^{\bullet}$			
$ROO^{\bullet}$			
ROOH			

Figura 1.6: Natureza química das principais espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), de enxofre (ERS) e de carbono (ERC). Adaptado de [93].

Há três linhas de defesa contra estresse oxidativo: (1) inibição da formação de espécies reativas. Por exemplo, pela captura de íons ferro pela transferrina evitando assim a ocorrência de processos fenton[15]; (2) remoção ou inativação das espécies reativas formadas. Por exemplo, através de enzimas tais como SOD, catalase e peroxidases ou moléculas de baixo peso molecular tais como tocoferol, ascorbato e glutationa; (3) remoção das moléculas

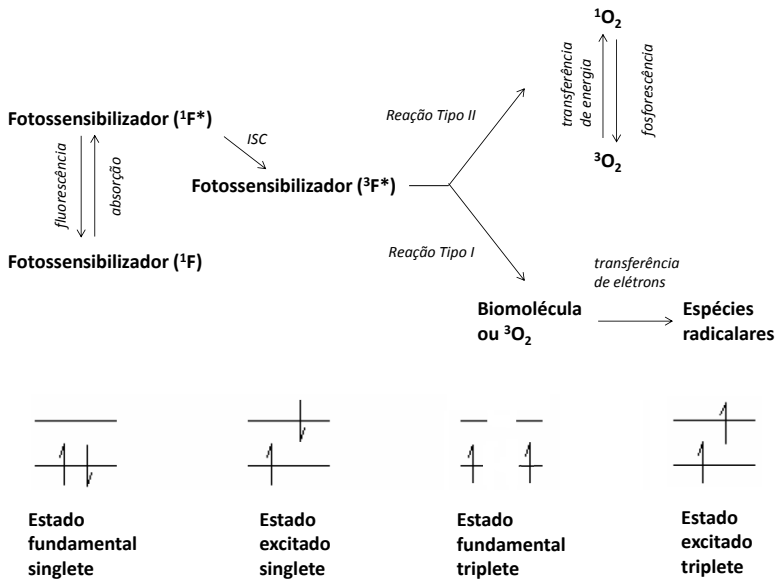
[15]Reações de oxidação induzidas pelo sistema Fe(II)/H_2O_2.

danificadas. Por exemplo, pela ação das enzimas da via de reparo do DNA por excisão de bases. Diferente do interior das células, o compartimento extracelular da maioria dos tecidos é bem menos protegido contra o estresse oxidativo, tanto em termos da presença de agentes anti-oxidantes quanto das enzimas de reparo e detoxificação. [94]

A geração de espécies reativas pode ocorrer tanto nos processos fisiológicos, como por exemplo, através do vazamento de elétrons na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial [95], quanto nos processos não fisiológicos. Nesta última categoria, o desbalanço redox pode ser gerado através da interação entre um fotossensibilizador e luz, em um processo conhecido como fotossensibilização. Reações de fotossensibilização são responsáveis, por exemplo, pelos danos na pele causados após exposição aos raios solares [96, 97] e também são a base de uma modalidade clínica de tratamento do câncer [98] e infecções [99], que é conhecida como Terapia Fotodinâmica (PDT).

Fotossensibilizadores são moléculas cujo estado eletronicamente excitado tem um tempo de vida longo o suficiente para sofrer reações fotoquímicas ou cruzamento intersistemas (mudança de spin) [100]. O dano oxidativo fotoinduzido pode ocorrer por dois mecanismos distintos conhecidos como tipo I e tipo II (Figura 1.7). No mecanismo tipo I, o estado excitado do fotossensibilizador doa ou recebe um elétron ou átomo de hidrogênio para/de uma biomolécula. O par radical formado pode subsequentemente reagir com o oxigênio molecular dissolvido e produzir uma variedade de espécies reativas de oxigênio tais como radicais superóxido, peroxil e hidroxil. No me-

canismo tipo II, o fotossensibilizador no estado excitado triplete transfere energia para o oxigênio molecular no estado fundamental (triplete) gerando oxigênio singlete ($^1O_2$). [101] Oxigênio molecular no estado triplete reage preferencialmente com espécies radicalares, isto é, moléculas que têm elétrons desemparelhados. Reações diretas do oxigênio molecular no estado triplete com moléculas que têm elétrons emparelhados, como por exemplo, os ácidos graxos, não tendem a ocorrer.



IeII.pdf

Figura 1.7: Diagrama de Jablonski simplificado mostrando a formação de espécies reativas durante a irradiação do fotossensibilizador pelos mecanismos tipo I e tipo II. A emissão do oxigênio singlete quando este retorna ao estado fundamental (λ_{max} = 1270 nm) fornece uma maneira conveniente de monitorar a presença deste espécie excitada. Também é mostrada a configuração dos estados fundamental e excitado singlete e triplete. ^1F = fotossensibilizador no estado fundamental singlete; $^1F*$ = fotossensibilizador no estado excitado singlete; $^3F*$ = fotossensibilizador no estado excitado triplete; $^3O_2$ = oxigênio molecular no estado fundamental triplete; $^1O_2*$ = oxigênio molecular no estado excitado singlete; ISC = cruzamento inter-sistema.

Diferentemente de outras espécies reativas que continuam ativas até que elas reajam com uma biomolécula ou sejam destruídas por uma enzima antioxidante, o tempo de vida do $^1O_2$ tem um limite superior inerente, uma vez que, sendo uma espécie excitada, ele somente pode existir por um curto período de tempo. O tempo de vida do $^1O_2$ depende fortemente do ambiente em que ele se encontra, por causa da transferência de energia para moléculas do solvente levando ao decaimento não radiativo. Uma vez que a transição $^1O_2$ –> $^3O_2$ ocorre no mesmo nível energético que as transições vibracionais das ligações O-H, o tempo de vida do $^1O_2$ em água é ~ 4 μs, enquanto em água deuterada ele é ~ 68 μs. [102]

A combinação do tempo de vida com o coeficiente de difusão define uma esfera espacialmente resolvida na qual a atividade do $^1O_2$ é confinada[16]. Em sistemas biológicos, por exemplo, estima-se que seu tempo de vida seja de $\sim$ 40 ns. Portanto, nestes sistemas, o raio de ação do $^1O_2$ estará confinado às vizinhanças do local onde ele é gerado ($\sim$ 20 nm). Para se ter uma idéia, células típicas tem diâmetros entre 10 e 30 μm, mitocôndrias $\sim$ 500 nm e a espessura da membrana plasmática é menor que 10 nm.

Vale lembrar que enquanto outras espécies reativas podem ser prontamente interconvertidas em meio biológico, tornando difícil discernir qual espécie reativa é responsável por uma resposta celular particular, $^1O_2$ não é interconvertido em outras espécies reativas, embora produtos de reações do $^1O_2$,

[16] A distância de difusão é definida como a raiz quadrada do produto entre o coeficiente de difusão e o tempo de vida da espécie. Para o $^1O_2$, ela é cerca de 125 nm em água.

tais como peróxidos, possam agir como precursores de espécies reativas secundárias. [103]

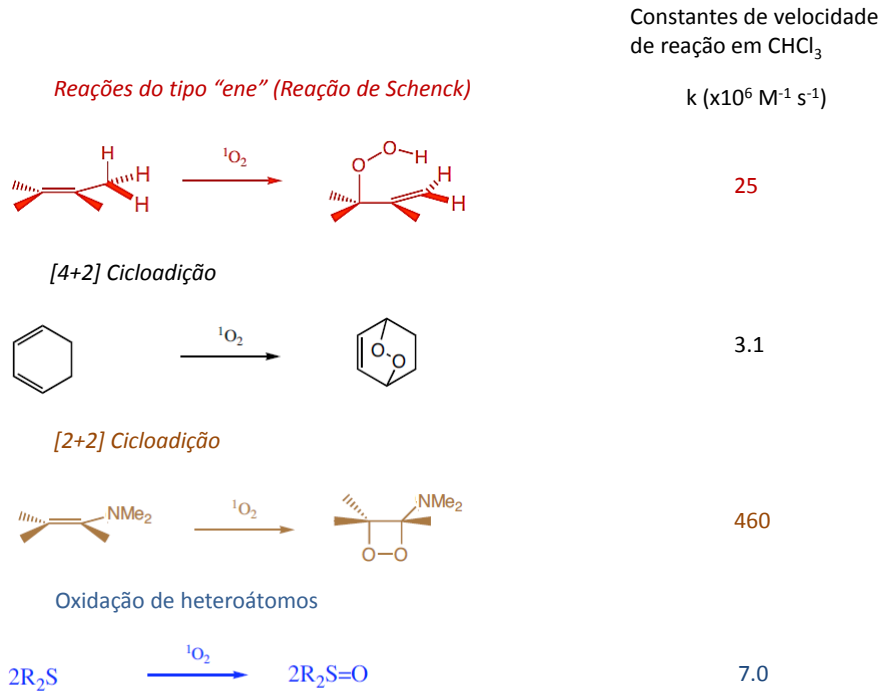


Figura 1.8: Esquema das reações do oxigênio singlete e constantes de velocidade de reação em clorofórmio com os compostos-modelo apresentados. Adaptado de [104].

O $^1O_2$ pode interagir com outras moléculas através de transferência de energia (supressão física), como no caso da sua desativação pela água, ou através de reações químicas. As principais reações do $^1O_2$ são adição à dupla ligação e oxi-redução (Figura 1.8). A reatividade intrínseca do $^1O_2$ com lipídios é pequena (constante bimolecular da ordem de $k_t \sim 10^4 M^{-1}s^{-1}$) quando comparada a outras biomoléculas (DNA $k_t \sim 10^4 - 10^6 M^{-1}s^{-1}$ e proteínas $k_t \sim 10^7 M^{-1}s^{-1}$) [105], mas a grande tendência de acumulação dos fotossen-

sibilizadores em membranas tornam os lipídios um importante alvo em PDT. Além disso, como o tempo de vida do $^1O_2$ é maior em meio hidrofóbico do que em meio hidrofílico (26 μs em benzeno x 4 μs em água [102]), aumentando seu raio de difusão, lipídios e proteínas de membrana são alvos particularmente susceptíveis à PDT. Estas reações podem afetar particularmente a adesão celular como será descrito a seguir em maiores detalhes.

Danos aos lipídios ocorrem via peroxidação de cadeias insaturadas, podendo levar a formação de adutos com proteínas, além de alterações nas propriedades das membranas celulares como aumento da área por lipídio, o que modifica a permeabilidade, a fluidez e o empacotamento das membranas [106]; até mesmo levando ao seu rompimento. [107] Esses tipos de alterações podem afetar, por exemplo, a ativação e a nucleação das integrinas, que é a etapa inicial do processo de adesão celular.

No caso do dano oxidativo induzido em proteínas, uma vez que as constantes para a reação química do $^1O_2$ variam dependendo da cadeia lateral dos aminoácidos, ocorre um dano seletivo a certos resíduos (Trp, Hys, Tyr, Met, Cys). [105] Tanto integrinas quanto muitas das proteínas da matriz extracelular possuem resíduos de cisteína que são cruciais para a sua estabilidade estrutural e/ou atividade. [13, 108, 109]

Além da oxidação direta das cadeias laterais dos aminoácidos, quebras e ligações cruzadas das cadeias da proteína também podem ocorrer. [110] Por exemplo, foi demonstrado que o $^1O_2$ oxida seletivamente os resíduos de his-

tidina do colágeno, com formação de novas ligações cruzadas aberrantes e perturbação da função do colágeno na derme, podendo até mesmo levar à destruição do mesmo [111]. Também foi observado extensivo *crosslinkg* de proteínas de membrana de eritrócitos por fotossensibilização [112] e das proteínas do citoesqueleto de células HeLa [113]. A Figura 1.9 ilustra diversos mecanismos de formação de ligações cruzadas em proteínas, os quais incluem interação direta entre dois radicais centrados em carbono, interação de dois radicais tirosina, oxidação de resíduos de cisteína, interação de grupos carbonil com grupos amino de resíduos de lisina ou arginina e interação de grupos aldeídos com resíduos de lisina.

Uma vez que a estrutura e a função das proteínas estão intimamente relacionadas, as alterações estruturais induzidas por reações de oxidação podem ter diversas consequências. Por exemplo, no caso de enzimas pode haver perda de atividade; no caso de receptores, geração de um estado constantemente ativado; no caso dos ligantes, perda da capacidade de reconhecimento pelo seu receptor; no caso de proteínas multiméricas, alterações na capacidade de associação entre as subunidades. [114–117] A adesão celular pode ser afetada por todos estes exemplos de alterações funcionais.

Oxidação de carboidratos mediada por $^1O_2$ gera radicais peroxil, que rapidamente podem eliminar $HO_2^{\cdot}$ gerando grupos carbonila. Oxidação mediada por radicais ocorre primariamente via abstração de um átomo de hidrogênio no grande número de ligações C-H de glicosaminoglicanos gerando radicais α-hidróxialquil [$^{\cdot}C(OH)RR'$]. Estes radicais sofrem reações de rearranjo por

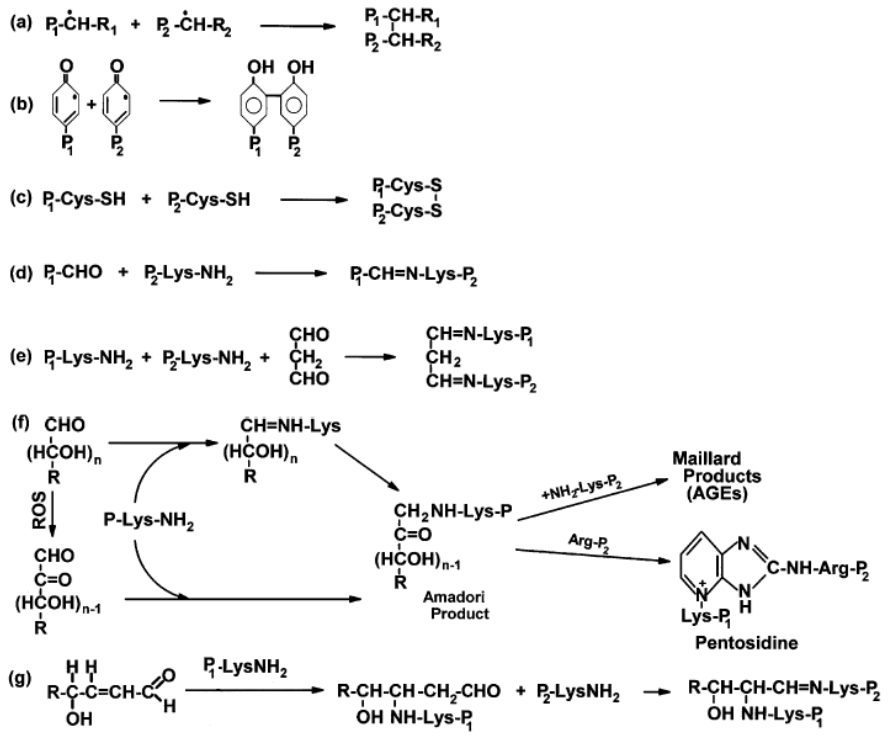


Figura 1.9: Mecanismos de formação de ligações cruzadas em proteínas. Interação entre radicais centrados em carbono (a). Interação entre radicais tirosina (b). Oxidação de resíduos de cisteína (c). Interação de grupos carbonil em proteínas oxidadas com resíduos de lisina (d). Interação de grupos aldeídos de malondialdeído com resíduos de lisina (e). Interação de grupos carbonila em proteínas (derivados de reações de glicação/glico-oxidação) com resíduos de lisina ou arginina (f). Interação de grupos aldeído em proteínas (obtidos por adição de Michael com produtos de lipoperoxidação) com resíduos de lisina (g). Adaptado de [110].

catálise ácido-base quando há ligações C-OH e C-OR adjacentes, esta última podendo resultar na quebra da ligação glicosídica. Estas reações competem com O_2 para dar $ROO^{\cdot}$, o qual pode eliminar $HO_2^{\cdot}$ levando a geração de grupos carbonila. [94] A formação de adutos de proteínas com açúcares oxidados é especialmente importante no caso da oxidação da matriz extracelular, cujos principais constituintes são glicoproteínas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos. [10]

O dano ao DNA induzido por espécies reativas gera uma gama de produtos oriundos de alterações químicas tanto das bases nitrogenadas quanto da porção glícidica do DNA, além de ligações cruzadas DNA-proteína. Enquanto o radical hidroxil reage eficientemente com as quatro bases do DNA e com a cadeia de açúcar, $^1O_2$ só é capaz de oxidar guanina (a base nitrogenada com o menor potencial de ionização) e, consequentemente, o dano direto de $^1O_2$ não gera quantidades significativas de quebras de fita no DNA. [118] Os principais produtos gerados por fotossensibilização utilizando os fotossensibilizadores riboflavina (Tipo I) e azul de metileno (Tipo II) são $8-$hidróxi$-$guanina ($8-$OH$-$Gua) e $2,6-$diamino$-4-$hidróxi$-5-$formamidopirimidina (Fapy-Gua). Estas lesões são mutagênicas pois pareiam erroneamente com adenina, resultando em transversões G:C para T:A, o que pode levar à formação de uma proteína com propriedades alteradas ou à perda completa da expressão do gene. [119]

Espécies reativas também podem afetar a adesão celular através de seu papel na regulação de vias de sinalização. A ativação de integrinas e re-

ceptores de fatores de crescimento leva à ativação da cascata da fosfoinositídio 3-quinase (PI3K). Nesta cascata de sinalização, são recrutadas para a membrana proteínas contendo o domínio de homologia a plecstrina, entre elas a pequena GTPase Rac1, a qual induz a produção de espécies reativas. Proteínas tirosina fosfatases possuem um resíduo de Cys em seu sítio ativo, cuja oxidação leva à inativação da proteína resultando em sustentada ativação das vias de sinalização. Esta inativação pode ser irreversível ou não, dependendo da concentração de espécies reativas: a oxidação de resíduos de Cys (-SH) a ácido sulfênico (-SOH), tanto quanto a formação de pontes dissulfeto, pode ser revertida pela ação de ascorbato, glutationa e tioredoxina, conforme equações mostradas na Figura 1.10, mas a oxidação a ácido sulfínico ($-SO_2H$) e sulfônico ($-SO_3H$) não. [120, 121]

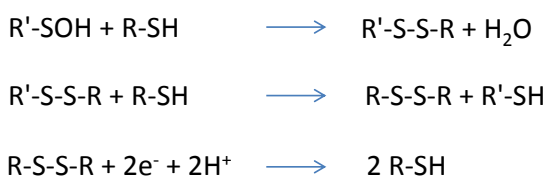


Figura 1.10: Reações de redução do ácido sulfênico a tiol.

Deve-se, portanto, esperar que alterações na membrana plasmática, nas integrinas, nos componentes da matriz extracelular ou do citoesqueleto causadas por estresse oxidativo tenham consequências tais como morte, alteração na mobilidade, alteração na adesão e no espalhamento celular, seja através de efeitos a nível de superfície ou a nível de sinalização. Alterações na adesão e espalhamento são facilmente visualizadas por RICM, no entanto, não há relatos na literatura avaliando o impacto do estresse oxidativo na adesão celular

utilizando esta técnica.

1.4.1 O impacto da terapia fotodinâmica na adesão celular

A Terapia Fotodinâmica (PDT) tem sido utilizada como uma alternativa para o tratamento do cancer desde o começo da década de 80. Como na quimioterapia, os fármacos são preferencialmente acumulados nas células tumorais e, similarmente à radioterapia, o mecanismo de ação envolve o uso de radiação eletromagnética com o objetivo de gerar espécies reativas *in situ*. Entretanto, PDT é uma alternativa de tratamento com menor efeitos colaterais quando comparada com a quimio e a radioterapia, uma vez que os fotossensibilizadores são utilizados em concentrações atóxicas na ausência de luz e porque sua ativação ocorre especificamente no local de incidência da luz visível. [100]

Uma vez que a adesão celular é importante para a progressão tumoral e para a formação de metástases, como mencionado na seção 1.1, saber se e como a PDT interfere na adesão celular é importante na avaliação dos resultados obtidos por esta modalidade de tratamento e no entendimento dos mecanismos de ação envolvidos. Além disso, ser capaz de quantificar o efeito de um certo fotossensibilizador na adesão celular, e consequentemente poder comparar diversos fotossensibilizadores neste quesito, pode propiciar o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores mais eficientes.

Há alguns poucos relatos na literatura sobre o impacto da PDT na adesão celular. O ensaio mais comumente utilizado é a contagem do número de células que permanecem aderidas ao substrato após PDT e tripsinização. [122–126]

Em todos os casos, foi observada maior resistência à tripsinização após PDT, sem efeito dos fotossensibilizadores no escuro, sugerindo que a PDT pode aumentar a capacidade de adesão de diversas linhagens celulares *in vitro*. Várias foram as hipóteses levantadas para explicar este efeito, entre as quais encontram-se: danos aos componentes da membrana plasmática, disfunção mitocondrial, aumento do nível intracelular de Ca^{2+} e aumento da atividade de transglutaminase (uma enzima que catalisa ligações cruzadas em proteínas). No entanto, não há ainda explicação mecanística convincente para este fenômeno.

Um ensaio menos frequente é a contagem do número de células capazes de aderir a um substrato após PDT. [127–129] Neste caso, quando o substrato foi funcionalizado com uma proteína adesiva específica, observou-se diminuição do número de células aderidas, mas quando as células foram colocadas para aderir em um substrato não funcionalizado na presença de soro, observou-se aumento do número de células aderidas, com o fotossensibilizador no escuro e após irradiação. Em um destes estudos o padrão de integrinas expressas na superfície celular foi avaliado e nenhuma alteração foi observada na presença do fotossensibilizador (Verteporfin®) tanto no escuro quanto irradiado. [127] Uma vez que estas medidas foram realizadas por FACS, esta observação implica que não houve alteração estrutural significativa das integrinas a ponto de impedir a ligação dos anticorpos, indicando que o efeito dos fotossensibilizadores na modulação da adesão celular pode não estar relacionado à oxidação das integrinas. Novamente, neste tipo de experimento também não há um mecanismo aceito para explicar os resultados.

Outro tipo de ensaio, que é relacionado com a adesão celular, cujo impacto da PDT foi avaliado é a migração/invasão celular. Em todos os casos estudados, observou-se diminuição da capacidade de migração/invasão das células após PDT [126,130,131] e em um deles também se observou menor migração no escuro [131]. Uma das hipóteses levantadas para explicar este efeito foi a inibição da fosforilação de FAK e Src [130], entretanto, como mencionado na seção 1.1, nem todo tipo de contato de adesão apresenta proteínas fosforiladas. Outra possibilidade que foi aventada é a diminuição dos níveis de algumas metaloproteinases de matriz. [131]

Em conjunto, os trabalhos citados sugerem que a PDT afeta a adesão celular e este efeito depende do fotossensibilizador, mas não da linhagem celular. Entretanto, há relatos tanto de aumento quanto de diminuição da adesão dependendo do protocolo utilizado: os estudos de tripsinização indicam aumento da adesão celular enquanto os ensaios de adesão a um substrato mostram tanto aumento quanto diminuição da adesão. Também ainda não há um consenso sobre o mecanismo molecular através do qual os fotossensibilizadores afetam a adesão celular tanto no escuro quanto após irradiação. Neste sentido, a hipótese que foi colocada neste trabalho é que utilizando-se uma técnica sofisticada como RICM, informações mais detalhadas sobre o impacto dos fotossensibilizadores na adesão celular poderiam ser obtidas.

1.5 Fotossensibilizadores porfirínicos

A maioria dos fotossensibilizadores utilizados tanto na prática clínica da PDT[17] quanto em experimentos de laboratório são derivados de núcleos tetrapirróis aromáticos, encontrados em muitos pigmentos de ocorrência natural tais como a protoporfirina IX do grupo heme e a clorofila. [134] A estrutura básica de um núcleo tetrapirrol é mostrada na Figura 1.11. Esta estrutura apresenta apresenta 18 elétrons π ressonantes mais 4 elétrons π que podem ser reduzidos sem perda da aromaticidade do anel. Os tetrapirróis não reduzidos são conhecidos como porfirinas, os tetrapirróis com uma ligação dupla reduzida são conhecidos como clorinas e os tetrapirróis com duas ligações duplas reduzidas são conhecidos como bacterioclorinas. [135]

A ligação dupla em uma molécula orgânica contém dois tipos de orbitais moleculares: um orbital σ e um orbital π. A absorção em uma dupla ligação excita um elétron π para um orbital π antiligante (π^*), em uma transição designada $\pi \rightarrow \pi^*$. A energia de uma dupla ligação não conjugada é cerca de 7 eV, o que corresponde a uma absorção no UV (180 nm). Em sistemas contendo duplas ligações conjugadas, há um abaixamento do nível de energia do orbital π^* e como consequência, os máximos de absorção são deslocados para comprimentos de onda maiores quanto maior o número de ligações conjugadas. A presença de substituintes contendo pares de elétrons livres, também

[17] Photofrin®, uma mistura complexa de porfirinas, foi o primeiro fotossensibilizador aprovado para uso clínico pelo FDA (em 22 de dezembro de 1998), seguido pela aprovação do Levulan®, um precursor da protoporfirina IX (em 7 de dezembro de 1999), e do Visudyne®, uma benzoporfirina (em 12 de abril de 2000). [132] Uma lista atualizada dos fotossensibilizadores aprovados para uso clínico pode ser encontrada na referência [98]. No Brasil, azul de metileno também têm sido utilizado na prática clínica [133].

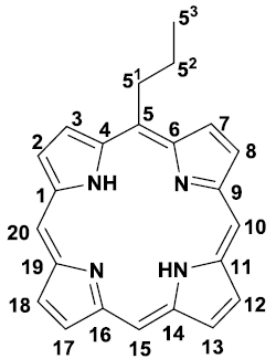


Figura 1.11: Estrutura básica de um núcleo tetrapirrol mostrando a numeração das posições do anel segundo a IUPAC. Os carbonos do macrociclo são numerados sequencialmente de 1 a 20 e os carbonos externos são designados com índices.

contribui para este efeito. Os tetrapirróis normalmente tem uma banda de absorção relativamente intensa na região de 400 nm ($\epsilon \sim 10^5$), conhecida como banda *Soret*, e um conjunto de bandas progressivamente menos intensas em regiões de comprimentos de onda maiores, conhecidas como bandas Q. As intensidades e posições exatas destas bandas dependem do solvente, da concentração, como também da natureza dos substituintes no núcleo tetrapirrol. As bandas Q são menos intensas que a banda *Soret* porque são resultantes de transições proibidas por simetria[18]. [44, 134, 136]

Os tetrapirróis também podem estar coordenados a um metal, mas apenas metais diamagnéticos (por exemplo, Zn) permitem que seja mantida a

[18] As transições podem ocorrer com alta (permitidas) ou baixa (proibidas) probabilidade. Para que uma transição ocorra o momento de dipolo da transição deve ser diferente de zero. Assim, para que uma transição ocorra com alta probabilidade os estados inicial e final devem ter em comum (1) a mesma multiplicidade de spin e (2) propriedades de simetria compatíveis com as do vetor dipolo elétrico. As restrições de multiplicidade de spin, que determinam, por exemplo, que transições do estado singlete para o estado triplete são proibidas, são mais severas que as transições proibidas por simetria.

eficiência fotofísica da molécula, porque metais paramagnéticos (por exemplo, Fe e Cu) aumentam a probabilidade de decaimento não radiativo do estado triplete. A coordenação a um íon metálico aumenta a simetria do anel e assim as quatro bandas Q do espectro de absorção da molécula são convertidas em duas. [134, 135, 137] Os espectros de uma porfirina livre e de uma porfirina coordenada a um metal são mostrados na Figura 1.12.

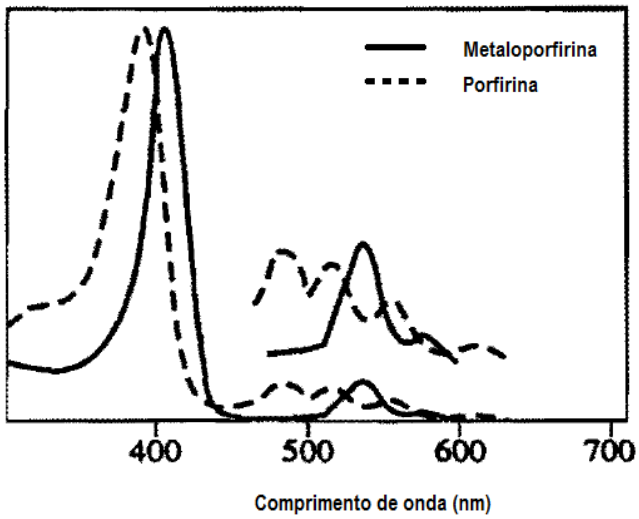


Figura 1.12: Espectro de absorção de uma porfirina e seu complexo metálico. Adaptado de [135].

As porfirinas variam no número e no tipo de grupos substituintes. A introdução de substituintes periféricos leva a diferentes propriedades físico-químicas, tais como solubilidade, estabilidade química, coeficiente de extinção molar etc. e também influencia a biodistribuição do fotossensibilizador, isto é, sua citolocalização, distribuição nos tecidos e farmacocinética. [100, 137] Este efeito nas propriedades físico-químicas é ilustrado na Tabela 1.1 onde são mostrados os comprimentos de onda do máximo de absorção

e emissão das porfirinas comerciais utilizadas nesta tese, cujas estruturas químicas são mostradas na Figura 1.13. Com este conjunto de moléculas foi possível avaliar o efeito na adesão celular de características estruturais dos fotossensibilizadores tais como carga, simetria e presença de metal coordenado. O efeito na interação com células será apresentado e discutido na seção 4.3.

As propriedades fotoquímicas intrínsecas das moléculas são determinadas pela magnitude de dois parâmetros relacionados: as constantes de velocidade de formação e desativação dos estados excitados e os consequentes rendimentos quânticos. A natureza dos substituintes do anel porfirínico também exerce um efeito sobre estas propriedades, como mostrado na Tabela 1.1 para o rendimento quântico de oxigênio singlete (ϕ_Δ).

Tabela 1.1: Comprimentos de onda dos máximos de absorção e de emissão das porfirinas comerciais utilizadas nesta tese. O rendimento quântico de geração de oxigênio singlete também é mostrado. Os máximos de absorção e de emissão foram obtidos em metanol. Os rendimentos quântico de geração de oxigênio singlete foram obtidos em H_2O, exceto no caso da PpIX, o qual foi obtido em etanol.

Fotossensibilizador	**PpIX**	**CPpI**	**TSPP**	**TMPyP**	**ZnTMPyP**
Soret (nm)	398[a]	393	414	424[b]	440[b]
Emissão (nm)	634[a]	622	650	654[b]	635[b]
ϕ_Δ	0,70	0,60[c]	0,62[c]	0,74[c]	0,88[c]

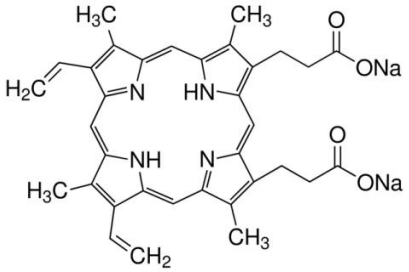
[a] [138], [b] [139], [c] [140]

A análise da Tabela 1.1 mostra que as bandas *Soret* e o máximo de emissão de fluorescência das porfirinas com substituintes fenil (grupos doadores de

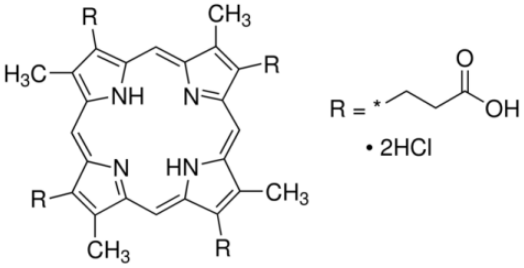
elétrons) nas posições meso (TMPyP e TSPP) aparecem em comprimentos de onda maiores que a das porfirinas com substituintes alifáticos nas posições β (PpIX e CPpI). Também se observa que a coordenação a Zn^{2+} desloca a banda *Soret* para o vermelho e o máximo de emissão para o azul. Entre as β substituídas, a mais simétrica (CPpI) apresenta a banda *Soret* e o máximo de emissão deslocados para o azul.

A geração de oxigênio singlete compete com a desativação do estado excitado do fotossensibilizador por outros processos (Figura 1.7). Assim, o rendimento quântico de oxigênio singlete só pode ser apropriadamente medido, por exemplo, na ausência de agregação das moléculas, fenômeno que será discutido adiante. Tomando como exemplo o caso da PpIX em H_2O, situação na qual a molécula está agregada, o valor medido é 0,16. Em uma mistura de D_2O e etanol, onde o nível de agregação é menor, este valor sobe para 0,49. [140] Em etanol, onde não há agregação, o real valor do rendimento quântico de oxigênio singletepode ser medido e é similar ao das outras porfirinas mostradas.

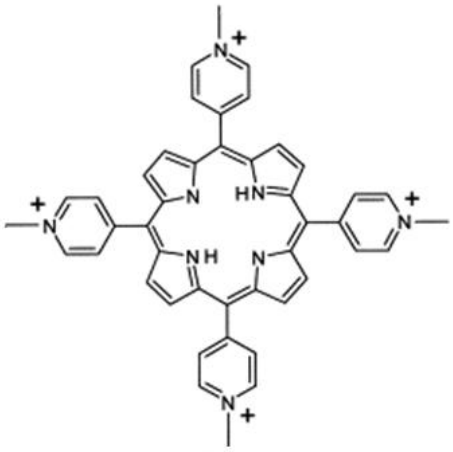
Hematoporfirina e PpIX são disponíveis a partir de fontes naturais em grandes quantidades e suas porções ácido propiônico, vinil e hidróximetil são facilmente funcionalizadas. As unidades de ácido propiônico podem ser esterificadas, convertidas em amidas ou tioésteres. Nesta tese será discutida a síntese de um composto polimérico onde PpIX foi ligada covalentemente à poli-L-lisina (seção 4.2). Um segundo nível de funcionalização pode ser obtido por hidrobromação do grupo vinílico seguida pela substituição do haleto



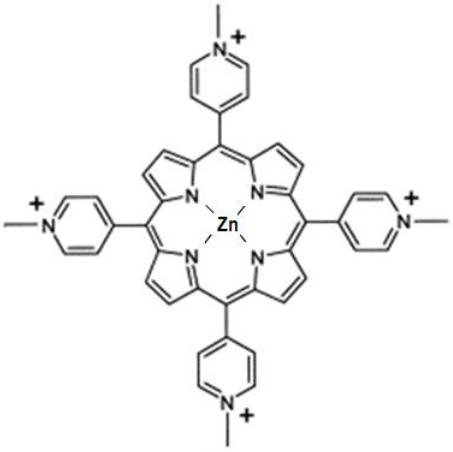
Protoporfirina IX
(PpIX)



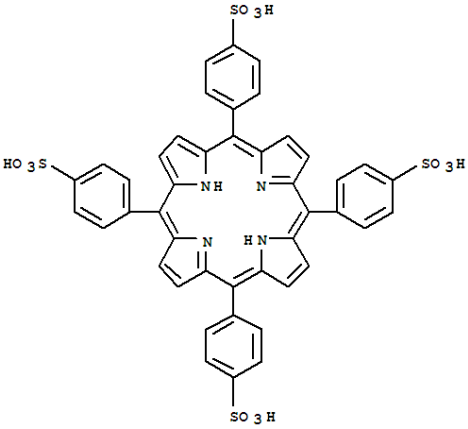
Coproporfirina I
(CPpI)



Meso tetra(N-metil-4-piridil) porfirina
(TMPyP)



Zn(II) Meso tetra(N-metil-4-piridil) porfirina
(ZnTMPyP)



Meso tetra(p-sulfonatofenil) porfirina
(TSPP)

Figura 1.13: Fórmulas estruturais, nomes e siglas das porfirinas comerciais utilizadas nesta tese.

com um nucleófilo (Figura 1.14). Sob tais condições tióis, aminas e álcoois têm sido incorporados. A grande variedade de compostos disponíveis por meio destes dois passos incluem derivados lipofílicos, hidrofílicos, catiônicos ou aniônicos. [135]

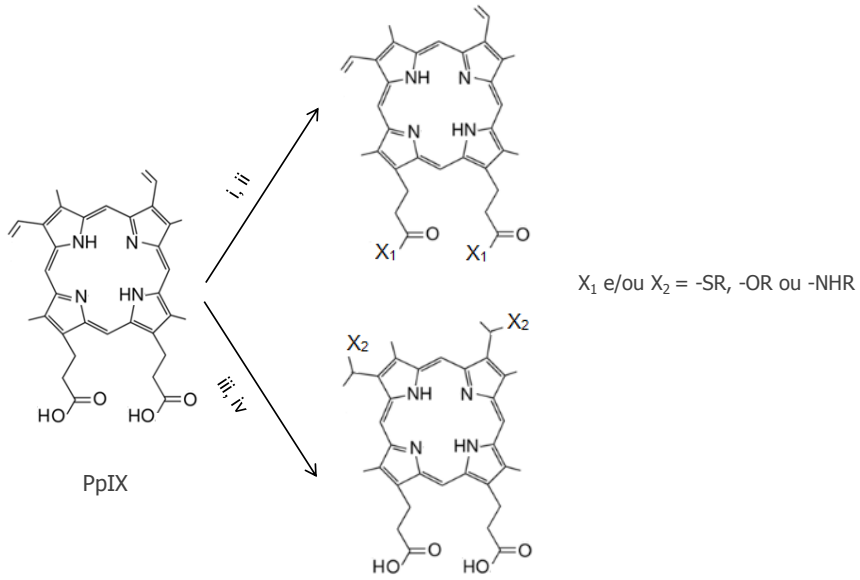


Figura 1.14: Esquema geral das rotas de síntese de derivados da PpIX. Condições das reações: i = $SOCl_2$; ii = X_1; iii = HBr; iv = X_2. Adaptado de [135].

A síntese de meso-tetraaril e meso-tetraalquil porfirinas é realizada através da condensação de pirrol e o aldeído de interesse. A reação é feita em duas etapas. Primeiro forma-se porfirinogênio, que é então oxidado para formar a porfirina (Figura 1.15). [141] As porfirinas TMPyP e TSPP, por exemplo, são sintetizadas por esta rota.

Um fenômeno muito comum que envolve os tetrapirróis em solução é a

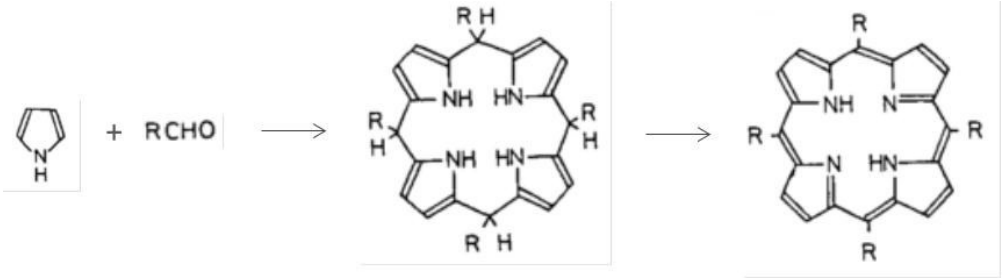


Figura 1.15: Esquema geral da rota sintética das meso-tetra aril/alquil porfirinas. Adaptado de [141].

agregação. Estados agregados são formados quando as interações soluto-soluto são energeticamente mais favoráveis que as interações soluto-solvente. Dependendo da extensão do fenômeno pode até ocorrer a precipitação das moléculas. As forças intermoleculares envolvidas neste processo podem ser pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas. O tipo de força envolvida vai depender da estrutura do composto. As interações da nuvem π são as que apresentam a maior contribuição para a auto-agregação dos tetrapirróis. A formação dos estados agregados é um processo reversível cujo equilíbrio é afetado por alguns fatores físicos tais como temperatura e concentração: o aumento da temperatura desloca o equilíbrio no sentido do monômero, enquanto o aumento da concentração desloca o equilíbrio no sentido do agregado. O efeito da interação com macromoléculas na agregação/desagregação dos fotossensibilizadores será discutido na seção 4.4. A Figura 1.16 mostra uma representação esquemática dos possíveis estados agregados. Em tetrapirróis a forma mais comum é aquela em que os anéis apresentam faces paralelas deslocadas (D). [142]

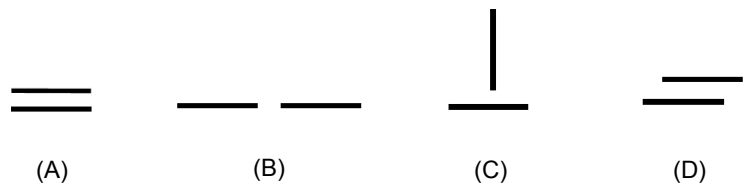


Figura 1.16: Representação esquemática dos estados agregados. (A) Faces paralelas. (B) Entre laterais. (C) Face-lateral. (D) Faces paralelas deslocadas. O agregado representado em (A) é conhecido como agregado tipo H e o agregado representado em (B) é conhecido como tipo J.

O fenômeno da agregação interfere nas propriedades físico-químicas, fotofísicas e fotoquímicas dos fotossensibilizadores. Em particular, a formação de agregados muda sua solubilidade, seus espectros de absorção, tempo de vida dos estados excitados e as eficiências relativas de geração de espécies oxidantes e desativação não radiativa. Por exemplo, no caso dos espectros de absorção, a formação de agregados leva ao alargamento das bandas, redução do coeficiente de extinção molar e deslocamento do comprimento de onda da banda *Soret*. [143–149].

Muito trabalho tem sido realizado no desenvolvimento de novos fotossensibilizadores mais eficientes. [139, 150–153] No entanto, para poder escolher os fotossensibilizadores mais adequados é preciso compreender como estes interagem com sistemas biológicos. Estes estudos têm sido realizados tanto com sistemas biomiméticos, como com cultura de células. [106, 107, 143, 154, 155]. Esta tese pretende aumentar a nossa compreensão nestas questões mecanísticas relacionadas a eficiência de diversos fotossensibilizadores em induzir alterações no processo de adesão celular.

Capítulo 2

Objetivos

O objetivo geral do presente trabalho foi estudar o efeito dos fotossensibilizadores na adesão celular, uma vez que este processo está intimamente ligado à formação e disseminação de metástases, a principal causa de morte de pacientes diagnosticados com câncer.

Os objetivos específicos foram:

- Estudar as interações moleculares que afetam a adesão celular em suportes sólidos funcionalizados;
- Desenvolver metodologia para quantificar a adesão celular utilizando a técnica de RICM;
- Avaliar as alterações na adesão celular causadas por fotossensibilizadores porfirínicos em doses sub-letais no escuro e após irradiação.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Reagentes

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma, exceto: etanol, uréia e glicerina que foram adquiridos da Synth, Fluoresceína-5-tiosemicarbazida e MitoTracker Green, que foram adquiridos da Invitrogen; SDS, azul de Coomassie G-250 e os padrões de peso molecular, que foram adquiridos da Bio-Rad; Meso-tetra(4-sulfonatofenil) porfirina, Meso-tetra(N-metil-4-piridil) porfirina e Zn(II)-Meso-tetra(N-metil-4-piridil) porfirina, que foram adquiridas da Frontier Scientific. A Poli-L-Lisina (Sigma) utilizada tinha peso molecular entre 70000 e 150000. Os reagentes foram utilizados sem purificação adicional.A dosagem total de proteínas foi realizada com o *Total Protein Kit, Micro Lowry, Onish & Barr Modification* da Sigma. A detecção de integrinas expressas na superfície celular foi realizada com o kit *Alpha Integrin-Mediated Cell Adhesion Array* da Millipore.

3.2 Equipamentos

Todos os espectros de fluorescência foram obtidos utilizando o espectrofluorímetro Fluorolog 1681 da Spex, controlado pelo software DM3000-F, com as fendas em 2 mm e detecção em ângulo reto. Todas as medidas de absorbância foram obtidas no espectrofotômetro UV-Vis UV-2401PC da Shimadzu. A medida do tempo de vida do estado triplete foi realizada usando um aparato de fotólise por pulso de laser composto por um laser Nd:YAG emitindo em 355 nm, lâmpada pulsada de Xe de 150 W, sistemas de controle eletrônico da Applied Photophysics e osciloscópio Hewlett Packard 54510B. A fosforescência do oxigênio singlete foi medida em um espectrofluorímetro no infravermelho próximo F900 da Edinburgh Analytical Instruments, equipado com um laser Nd:YAG (Continuum Surelite III; 10 Hz, 5 ns/pulso, 5 mJ/pulso) operado como fonte de excitação e uma fotomultiplicadora resfriada a $-80\,^{\circ}$C (R5509) da Hamamatsu. A eletroforese das proteínas foi conduzida no Hoefer miniVE da GE. A leitora de placas foi a Infinite da Tecan e o scanner de géis foi o Typhoon Trio da GE. As garrafas e placas de cultura celular foram obtidas da Corning, as microplacas para medida de fluorescência (96 poços, flat) da Greiner e as câmaras de cultura sobre lamínula (LabTek, 8 poços) da Nunc. As células foram manuseadas em um cabine de segurança biológica classe II A1 equipada com lâmpada germicida (254 nm, 30 W). Os microscópios invertidos utilizados foram: (1) TE-2000 da Nikon (França), equipado com uma lâmpada de mercúrio de 130 W e uma câmera EM-CCD ImagEM (512x512 pixels, 16 bits, 32 FPS, 40 nm/pixel) da Hamamatsu e (2) Axiovert200 da Zeiss (Brasil), equipado com uma lâmpada

de mercúrio de 100 W e uma câmera digital PowerShot G10 (14.7 MP) da Canon. Microscopia Confocal foi realizada em um Axiovert200M da Zeiss, controlado pelo software LSM510. As imagens foram processadas utilizando o software *ImageJ*, no caso dos experimentos de microscopia confocal, ou o software *NewMagneto* desenvolvido pelo Dr. André Schroder (Institut Charles Sadron - França), no caso dos experimentos de RICM.

3.3 Métodos

3.3.1 Cultura celular

Células HeLa foram cultivadas em DMEM (baixa glicose) suplementado com 10% (v/v) de FBS (soro fetal bovino) e 0,5% de solução de Penicilina/Estreptomicina e mantidas a 37 °C em uma incubadora humidificada na presença de 5% de CO_2. Subculturas foram realizadas a cada 2 dias utilizando solução de tripsina-EDTA 250 mg % em contato com as células por 5 minutos a 37 °C. Para avaliação da integridade das membranas celulares e contagem das células viáveis foi utilizado o corante de exclusão azul de tripan (solução a 0,4 %). No caso de plaqueamento em superfícies funcionalizadas com proteínas de adesão, após tripsinização as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, ressuspendidas em PBS, centrifugadas novamente a 1500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente e finalmente ressuspendidas em DMEM sem FBS.

3.3.2 Fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores estudados foram PpIX (sal de sódio), Coproporfirina I, Meso-tetra (4-sulfonatofenil) porfirina, Meso-tetra (N-metil-4-piridil) porfirina, Zn(II) Meso-tetra (N-metil-4-piridil) porfirina (Figura 1.13) e PpIX conjugada à Poli-L-Lisina (PLLPpIX), a qual foi sintetizada segundo metodologia descrita em [152]. Brevemente, 50 mg de PpIX foram mantidos sob agitação magnética por 60 minutos em atmosfera de N_2 com 2 mL de cloreto de tionila recém destilado. Ao resíduo púrpura obtido após vaporização do excesso de cloreto de tionila foram adicionados 100 mg de Poli-L-Lisina (peso molecular: 70000-150000) em DMF. O sistema foi mantido em atmosfera de N_2 sob agitação por 12 h. Ao final o solvente foi evaporado e o filme púrpura obtido foi purificado por partição em $CHCl_3/H_2O$. A fração hidrossolúvel, contendo o produto (PLLPpIX), foi concentrada no rotavapor e o solvente residual foi eliminado por sucção a pressão reduzida, mantido em dessecador por 12 h e estocado a 4 °C ao abrigo da luz. Para a aquisição do espectro de RMN ^{1}H a amostra foi solubilizada em DMSO D_6.

Composto: RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500.13 MHz) δ (ppm): -2.42 (br s, 2H, H-21 e H-23), 3.27 (t, 4H, J = 7.0 Hz, H-13^2 e H-17^2); 3.60; 3.61; 3.68 e 3.69(4s, 12H, H-2; H-7, H-12 e H-18); 3.66 (s, 6H, H-13^4 e 17^4); 4.39(t, 4H, J = 7.0 Hz, H-13^1 e H-17^1); 6.17 (dd, 1H, J = 11.5 e 1.1 Hz, H-3^{2a} e H-8^{2a}), 6.36 (dd, 1H, J = 17.5 e 1.1 Hz, H-3^{2b} e H-8^{2b}); 8.27(dd, 1H, J = 17.5 and 11.5 Hz, H-3^1 e H-8^1) 10.00; 10.04; 10.14 e 10.18(4s, 4H, H-5; H-10; H-15 e H-20).

Composto: RMN ^{1}H (DMSO D_6, 500.13 MHz) δ (ppm): 1,34 - 1,64 (m, H-C, H-D e H-E); 2,77 (m, H-F); 3,0 - 4,0 (m, H-G e H_2O); 4,27 (m, H-B); 8,04 (m, H-A).

Composto: RMN ^{1}H (DMSO D_6, 500.13 MHz) δ (ppm): -2.31 (s, banda larga, 2H, H-21 e H-23), 1,3 - 1,7 (m, H-C, H-D e H-E); 2,77 (m, H-F); 3.44 (t, J = 7.0 Hz, H-13^2 e H-17^2); 3.60; 3.62; 3.72 e 3.74(4s, 12H, H-2; H-7, H-12 e H-18); 3,0 - 4,0 (m, H-G e H_2O); 4,25 (m, H-B); 4.32 (t, 4H, J = 7.0 Hz, H-13^1 e H-17^1); 6.22 (d, 1H, J = 18, H-3^{2a} e H-8^{2a}), 6.45 (dd, 1H, J = 12 e 5.5 Hz, H-3^{2b} e H-8^{2b}); 8,05 (m, H-A); 8.27(m, H-3^1 e H-8^1) 10.24 (s, banda larga, 4H, H-5; H-10; H-15 e H-20).

Por conta da característica polimérica da PLLPpIX (não sabemos exatamente o peso molecular do produto), os fotossensibilizadores foram avaliados em função do máximo de absorbância de suas bandas Soret, levando em conta que, segundo a Lei de Beer, em soluções diluídas a magnitude da luz absorvida pelas moléculas é diretamente proporcional às suas respectivas concentrações analíticas [136]. A maioria dos ensaios foram realizados com soluções de absorbância 0,12 ou 0,06. Sabendo que o coeficiente de absortividade molar é de 120000 $M^{-1}cm^{-1}$ para a PpIX (Sigma-Aldrich), uma solução de PpIX com absorbância 0,12 tem concentração de 1 μM. Para manter a mesma quantidade de energia absorvida utilizou-se também soluções de absorância 0,12 para a PLLPpIX.

3.3.3 Irradiação

A irradiação das amostras foi realizada por 1 minuto (ou 5 minutos, no caso do experimento de eletroforese) utilizando como fonte irradiadora um microscópio invertido (Nikon, nos experimentos de RICM e Zeiss, nos experimentos de proteína carbonilada) equipado com um filtro de interferência (FITC 470/40 nm - Nikon e DAPI 365/50 nm - Zeiss). As amostras foram irradiadas em uma câmara de cultura sobre lamínula nos experimentos de RICM e em uma microplaca própria para medidas de fluorescência nos experimentos de proteína carbonilada. As células foram incubadas por 1 minuto ou 3h no escuro com os fotossensibilizadores dissolvidos em DMEM sem vermelho de fenol e sem FBS, lavadas com PBS 2X e irradiadas em PBS por 1 minuto. A integridade das membranas celulares foi checada com azul de tripan imediatamente após irradiação. A quantidade de fotossensibilizador foi definida através do seu máximo de absorbância, como descrito na seção 3.3.2.

3.3.4 Funcionalização das superfícies

Substratos previamente esterilizados com luz UV por 25 minutos foram incubados com PLL (0.01% em água por 15 minutos a temperatura ambiente e secos ao ar) e Vitronectina (3,5 μg/mL em PBS por 30 minutos a 37 °C). Os substratos contendo proteínas de adesão foram mantidos sempre em ambiente úmido.

3.3.5 Perfil de integrinas expressas na superfície celular

A identificação das integrinas expressas na superfície celular foi realizada com um kit comercial para detecção fluorimétrica de subunidades α, seguindo-se as instruções do fabricante. Células foram mantidas por 24h em frascos standard de cultura celular ou em frascos de cultura funcionalizados com PLL como descrito na seção 3.3.4 antes do ensaio. No caso da avaliação do impacto das porfirinas na perfil de integrinas, células cultivadas em frascos de cultura celular standard foram incubadas com PpIX e TMPyP (absorbância 0,06) por 3h no escuro a 37 °C. A integridade das membranas celulares foi checada com azul de tripan após o final do período de incubação com os fotossensibilizadores. O experimento foi realizado em triplicata.

3.3.6 Migração celular - Ensaio de ferida

Células foram plaqueadas em densidade de confluência em placas de 12 poços e permitidas aderir *overnight*. As células foram lavadas com PBS (3 mL) e incubadas em meio livre de FBS (3 mL) contendo ou não porfirinas (absorbância 0,06) por 3h no escuro a 37 °C. Após o período de incubação as células foram lavadas com PBS para remoção das porfirinas e uma área livre de células foi criada na monocamada utilizando uma ponteira de 10 μL. Após os poços terem sido lavados com PBS (para remoção das células destacadas), as células foram mantidas na incubadora em DMEM suplementado com 1% de FBS (2 mL), para limitar a proliferação celular. Micrografias de campo claro (100X) foram obtidas imediatamente após a criação da área livre de

células e a cada 24h até que a ferida fosse completamente fechada. O meio de cultura foi trocado a cada 24h imediatamente antes das fotografias serem tiradas. O experimento foi realizado em duplicata.

3.3.7 Inibição do remodelamento de matriz extracelular

A inibição do remodelamento da camada de proteína adsorvida ao substrato foi realizada através do tratamento das células com cicloheximida (Figura 3.1) 100 μg/mL em meio de cultura suplementado com 10% FBS a 37 °C 30 minutos. Após lavagem, as células foram tripsinizadas e plaqueadas em (1) vidro, (2) vidro funcionalizado com PLL ou (3) vidro funcionalizado com a proteína de adesão vitronectina.

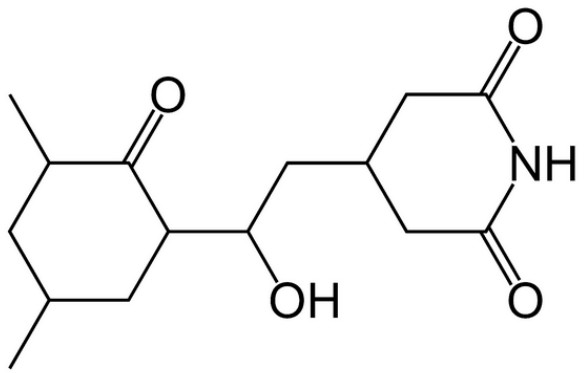


Figura 3.1: Fórmula estrutural da cicloheximida.

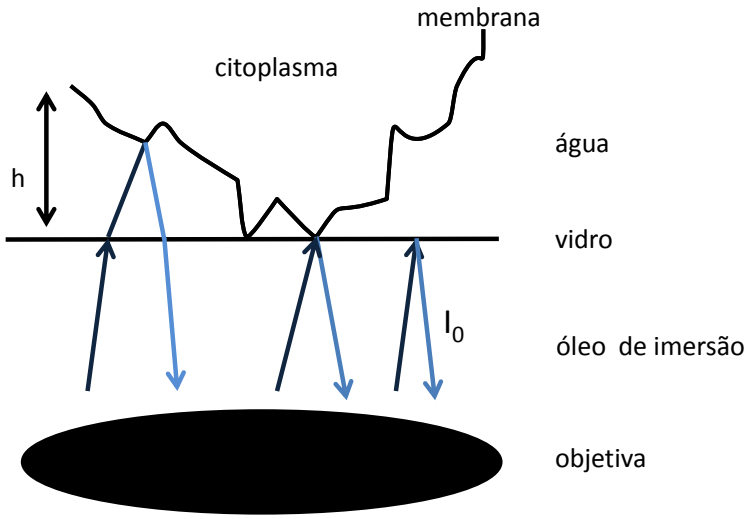
3.3.8 RICM

As micrografias de RICM foram obtidas em um microscópio invertido (Nikon) equipado com uma objetiva de imersão a óleo 100X/1,3 (Leica) e um filtro de interferência ($\lambda = 546$ nm, BW = 10 nm). As imagens foram adquiridas a temperatura ambiente com as células em câmaras de cultura sobre lamínula por no máximo 30 minutos a diferentes intervalos de tempo após o plaqueamento. Os domínios de adesão foram definidos como sendo as regiões mais escuras que a luminosidade de fundo, após correção para eliminar desigualdades na iluminação. Nas etapas iniciais do processo de adesão, a visualização foi realizada com a ajuda de uma lente de aumento complementar (2,8X) colocada entre a objetiva e a câmera. A conversão de número de pixels para tamanho em micrômetros foi realizada a partir da imagem de uma régua micrometrada gravada no mesmo set-up dos experimentos com células.

Formação e análise das imagens

Em um sistema onde uma célula adere a uma lamínula, três são as interfaces reflectivas de maior importância quando objetivas de imersão a óleo são utilizadas: vidro/célula, vidro/meio de cultura, meio de cultura/célula (Figura 3.2).

A intensidade relativa (R) da luz refletida (I_r) na interface entre dois meios semi-infinitos como uma função da intensidade da luz incidente (I) é obtida a partir dos índices de refração n_1 e n_2:



RICM.pdf

Figura 3.2: Esquema das interfaces reflectivas que formam as imagens de RICM de uma célula aderindo a uma lamínula.

$$R = I_r/I = [(n_2 - n_1)/(n_2 + n_1)]^2 \tag{3.1}$$

Tomando-se os índices de refração do vidro, do meio de cultura e do meio intracelular como sendo, respectivamente, 1.515, 1.337 e 1.370, então a maior diferença nos índices de refração ocorre na interface vidro/meio de cultura. Calculando-se os valores relativos de refletividade das diferentes interfaces de acordo com a equação 3.1, é possível demonstrar que as áreas livres de

células (vidro/meio de cultura) representam as zonas mais claras. Portanto, nas imagens de RICM, as intensidades luminosas que são maiores (áreas mais claras) ou menores (áreas mais escuras) do que a intensidade refletida pela interface vidro/meio de cultura devem ser devidas a interferência. Sendo assim, em uma imagem composta de raios refletidos modulados por interferência, as áreas livres de células podem ser utilizadas como referência para o cálculo das intensidades das outras regiões por uma simples operação de subtração da luminosidade de fundo. [156]

A relação entre a intensidade do raio resultante (I) a partir da interferência entre dois raios refletidos (I_1 e I_2) em diferentes interfaces e a distância entre estas duas interfaces (h) num determinado ponto (x) é dada pela equação [65]:

$$I = I_1 + I_2 + 2(I_1.I_2)^{1/2}cos[2kh(x) + \phi] \tag{3.2}$$

onde k = $2\pi n_1/\lambda$ e ϕ a mudança de fase.

Se os índices de refração (n) não mudam, então a intensidade do raio resultante só depende da distância (h) entre as interfaces. Em um sistema complexo como o meio intracelular, o índice de refração pode não ser homogêneo. A Figura 3.3 mostra a influência do índice de refração na intensi-

dade da luz refletida em função da distância. Devido à não coerência da fonte de luz utilizada nos experimentos, a curva real vai sendo atenuada ao longo da distância (Figura 3.4), de maneira que para grandes distância torna-se impossível distinguir variações na intensidade da luz refletida. Como no caso de uma célula aderindo a uma lamínula há mais de uma interface refletiva, nas curvas apresentadas nas Figuras 3.3 e 3.4 o primeiro mínimo de intensidade não aparece em h = 0 e a variação nos índices de refração modifica a altura em que este primeiro mínimo aparece.

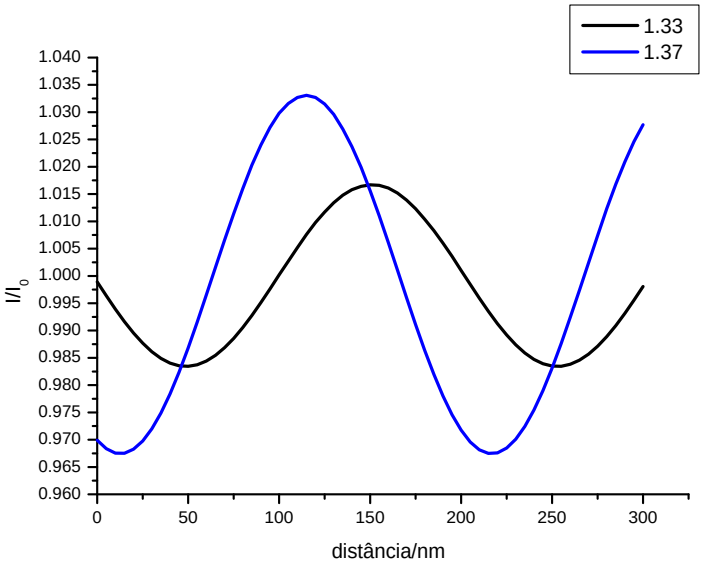


Figura 3.3: Curva teórica da intensidade de luz refletida em função da distância (λ = 543 nm) para o sistema descrito na Figura 3.2, mostrando a influência do índice de refração do citoplasma. I_0 é a intensidade do background.

Considerando-se o índice de refração do citoplasma como sendo 1.37, o primeiro mínimo aparece em 15 nm. A partir deste ponto, a intensidade da luz

refletida resultante aumenta com a distância até 115 nm. Sendo assim, se a separação entre a célula e a lamínula for de 15 nm, a imagem de RICM formada aparecerá em preto. Se a separação for de 115 nm, a imagem aparecerá em branco. Por fim, se a separação for entre 15 e 115 nm, as imagens aparecerão como tons de cinza. Portanto, as zonas mais escuras nas imagens de RICM correspondem as regiões onde a célula é mais próxima do substrato.

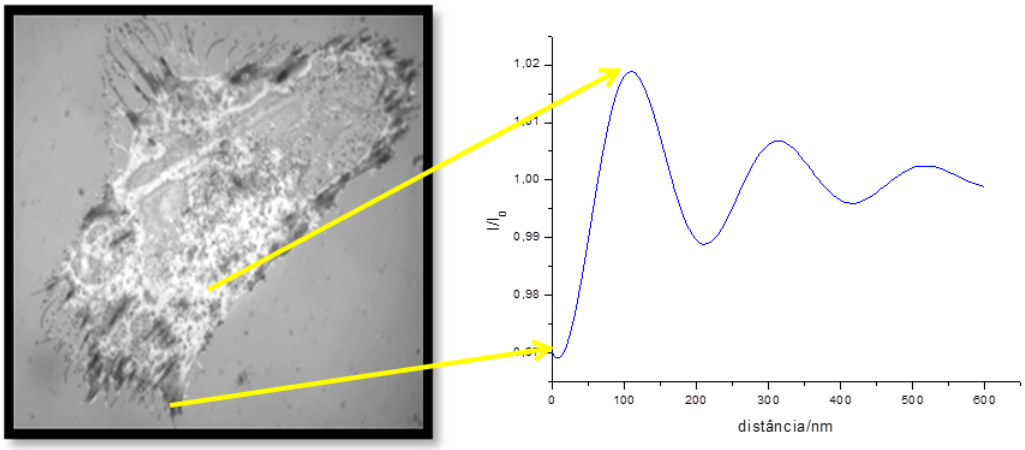


Figura 3.4: Curva real da intensidade de luz refletida em função da distância em relação ao substrato. É mostrada a correspondência entre a curva e alguns dos padrões observados em micrografias de RICM. Célula HeLa 24h após plaqueamento em uma lamínula na presença de soro fetal bovino.

Entretanto, distâncias absolutas não podem ser medidas a partir da técnica RICM convencional, porque a informação sobre as fases absolutas dos raios refletidos pelas várias interfaces não é conhecida. Este obstáculo pode ser superado através da comparação entre os interferogramas obtidos simultaneamente com dois comprimentos de onda diferentes, uma técnica conhecida como DW-RICM (*dual-wavelength reflection interference contrast mi-*

croscopy). [157]

A Figura 3.5 mostra as imagens de RICM de uma vesícula que está próxima da superfície mas não aderida a ela (A), de uma vesícula fracamente aderida a uma superfície (B) e de uma vesícula fortemente aderida a uma superfície (C). Em (A) e (B), é possível observar os anéis de Newton, os quais indicam que a membrana da vesícula na borda da adesão tem uma curvatura suave e o ângulo de contato, segundo a convenção da Figura 1.5, é pequeno. Quando os anéis de interferência não são visíveis, significa que o ângulo de contato é grande. [158] A forma da zona de adesão muda conforme o número de pares receptor-ligante formados. Em um regime de baixa densidade de pares receptor-ligante, a zona de adesão é irregular e inomogênea, enquanto que em um regime de alta densidade de pares receptor-ligante, a zona de adesão é circular e homogênea.

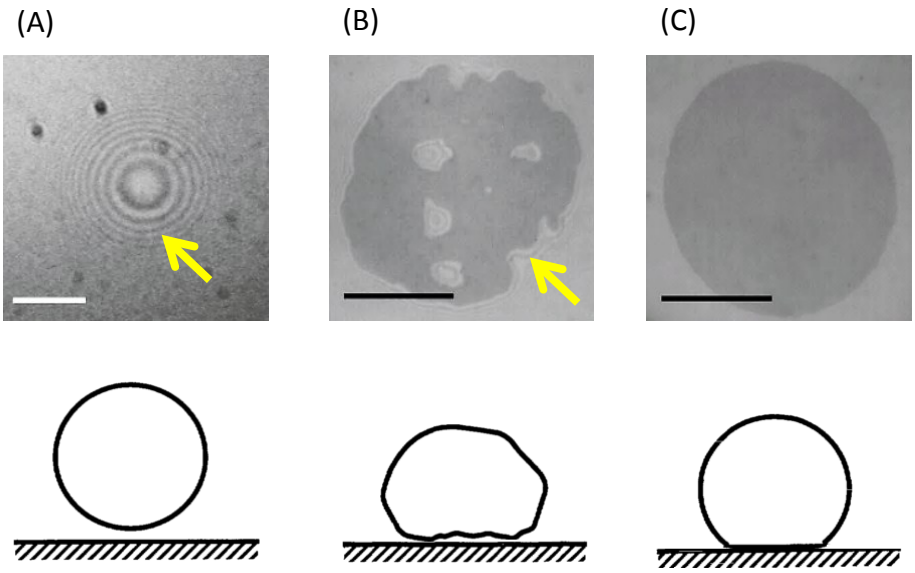


Figura 3.5: Imagens de RICM de uma vesícula não aderida (A), de uma vesícula fracamente aderida (B) e de uma vesícula fortemente aderida (C). As setas indicam os anéis de Newton.

3.3.9 Incorporação dos fotossensibilizadores em células

O ensaio foi realizado conforme metodologia descrita em [154]. Brevemente, os fotossensibilizadores PpIX e PLLPpIX foram dissolvidos em DMEM sem vermelho de fenol + 10% FBS por sonicação e filtrados em membrana PES 0,2 μm (absorbância $0,12$). Entre 18h e 24h após o plaqueamento de 3x10^5 células/poço, as células foram incubadas com os fotossensibilizadores por 1 minuto (temperatura ambiente), 10 minutos e 3 horas (37 °C) no escuro. Uma alíquota de 500 μL do sobrenadante foi reservada, a qual foi adicionado o mesmo volume de SDS 100 mM, e o restante do sobrenadante foi descartado. As células foram lavadas com PBS gelado seguido da adição de 1 mL de SDS 50 mM. A taxa de incorporação foi determinada em triplicata pela medida da intensidade de fluorescência em 631 nm (com excitação em 380 nm) entre

o sobrenadante e o lisado de células.

3.3.10 Mecanismo de endocitose

O mecanismo de endocitose da PpIX foi avaliado através de uma série de experimentos de inibição das vias endocíticas. (1) As células foram incubadas com o fotossensibilizador a 4 °C com o objetivo de inibir o transporte ativo. (2) As células foram pré-tratadas com sacarose 0,45 M em PBS por 30 minutos a 37 °C para impedir a formação de vesículas recobertas por clatrina. (3) As células foram pré-tratadas com β-ciclodextrina 100 μM em PBS por 30 minutos a 37 °C, para depleção de colesterol e inibição da via mediada por balsas lipídicas [159–161]. Os controles foram incubados com DMEM suplementado com 10% FBS. Em todos os experimentos foram utilizadas 3x10^5 células/poço e um tempo de incubação do fotossensibilizador de 10 minutos (absorbância $0,12$). A taxa de incorporação foi determinada conforme descrito na seção 3.3.9.

3.3.11 Citolocalização

10^4 células/poço foram plaqueadas em lamínulas e 18h após foram incubadas com o marcador fluorescente de mitocôndrias MitoTracker (Green) 50 nM em PBS por 30 minutos e com os fotossensibilizadores (absorbância $0,12$) por 1 minuto ou 3h no escuro a 37 °C. Após incubação, as células foram lavadas com PBS gelado e montadas sobre uma lâmina para visualização no microscópio confocal utilizando uma objetiva C-Apochromat 40X/1,2 WI. Os filtros utilizados foram (1) Mitotracker: Ex 488 nm e Em 505-530 nm;

(2) Fotossensibilizadores: Ex 364nm, Em 629-704 nm (PpIX e PLLPpIX) e 435-485 nm (TMPyP). Para determinar a localização subcelular, as imagens de transmissão, de fluorescência do fotossensibilizador e de fluorescência do marcador de mitocôndrias foram sobrepostas e quantificadas utilizando o coeficiente de Manders.

3.3.12 Dosagem de proteína total

A dosagem foi realizada com um kit comercial, conforme instruções do fabricante. A medida foi realizada em uma leitora de placas após diluição de 10X do meio de cultura suplementado com 10% FBS na ausência e na presença dos fotossensibilizadores PpIX e PLLPpIX (absorbância $0,12$). O experimento foi realizado em quadruplicata.

3.3.13 Dosagem de proteínas carboniladas

A quantidade total de proteínas carboniladas foi quantificada por derivatização com FTC (fluoresceína-5-tiosemicarbazida) após irradiação do meio de cultura suplementado com 10% de FBS na presença de PpIX e PLLPpIX (absorbância $0,12$). A emissão de fluorescência do produto formado entre a FTC e os grupos carbonila foi detectada em uma leitora de placas utilizando o filtro Ex 485 nm/Em 535 nm. O método de preparo das amostras foi aquele descrito na referência [162] com modificações mínimas.

3.3.14 SDS-PAGE das proteínas carboniladas

O método de preparo das amostras foi adaptado da referência [163], como descrito a seguir. Após irradiação do meio de cultura suplementado com 10% de FBS na presença de PpIX e PLLPpIX (absorbância $0,12$), as amostras foram incubadas overnight com FTC 1 mM. As proteínas foram então precipitadas com igual volume de ácido tricloroacético 20% após incubação no gelo por 20 minuitos e centrifugadas a 16000g por 10 minutos a 4 °C. Em seguida foram lavadas 2X por vortexação com etanol/acetato de etila (1:1) e centrifugadas a 16000g por 10 minutos a 4 °C após cada lavagem. Ressuspendidas por vortexação em tampão de tratamento de amostra (uréia 8 M; SDS 2%; glicerina 10% v/v, azul de bromofenol 0,01%, Tris-Cl 62,5 mM pH 6,8), as amostras (7 μL/canaleta) foram aplicadas em um gel 4-7,5%. A corrida foi realizada a 200 V e, ao final, o gel foi colorido com azul de Coomassie G-250, conforme instruções do fabricante. Tanto a corrida do gel quanto sua coloração foram realizadas no escuro. Para visualizar a marcação com FTC o gel foi escaneado usando os filtros Em 488 nm/Ex 520 nm. Os dados foram normalizados pela intensidade da coloração por azul de Coomassie.

3.3.15 Efeito da BSA na fluorescência dos fotossensibilizadores

Amostras dos fotossensibilizadores PpIX e PLLPpIX (1 μM) preparadas em PBS $0,1$ M pH $7,4$ foram tituladas com BSA (concentração final entre 0,3 μM e 6 μM) de maneira que houvesse menos 10% de diluição da solução dos fotossensibilizadores. Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos

entre 575 nm e 725 nm sob excitação a 395 nm à temperatura ambiente.

3.3.16 Detecção do estado triplete dos fotossensibilizadores

A cinética de decaimento foi medida no máximo de emissão dos tripletes dos fotossensibilizadores (396 nm) à temperatura ambiente. A absorbância dos fotossensibilizadores PpIX e PLLPpIX neste comprimento de onda foi de cerca de $0,15$ e as soluções foram saturadas com Argônio por 20-30 minutos antes da medida. A concentração final de BSA foi de 4 mg/mL. Os tempos de vida foram obtidos pelo ajuste das curvas para decaimento exponencial de primeira ordem.

3.3.17 Eficiência de geração de oxigênio singlete

O rendimento quântico de geração de oxigênio singlete (Φ_Δ) e seu tempo de vida foram determinados a partir das curvas de decaimento de fosforescência em 1270 nm após excitação em 355 nm dos fotossensibilizadores PpIX e PLLPpIX dissolvidos em etanol. O Φ_Δ foi calculado utilizando a equação:

$$\Phi_\Delta = \Phi_\Delta^P.(I/I^P).(A^P/A) \tag{3.3}$$

Onde o índice P refere-se ao padrão (Hematoporfirina), I é a intensidade de

emissão de fosforescência ($I^P = 0{,}53$) e A é a absorbância a 355 nm.

Os tempos de vida foram obtidos pelo ajuste das curvas para decaimento exponencial de primeira ordem.

A influência da presença de BSA na eficiência de geração de oxigênio singlete foi avaliada com as amostras dissolvidas em 150 mM de NaCl em D_2O e a fonte de excitação em 532 nm.

3.3.18 Análise estatística

Testes *t-Student* foram realizados para estimar a significância dos resultados, utilizando o software Origin 6.0, com $p < 0{,}05$ sendo considerado significante. Os resultados são indicados como média ± desvio-padrão.

Capítulo 4

Resultados e Discussões

Como a motivação final deste trabalho era estudar o impacto de fotossensibilizadores na adesão celular, o modelo experimental escolhido foi a linhagem humana tumoral HeLa. Um estudo inicial foi realizado, no qual foram estabelecidas algumas correlações entre propriedades físico-químicas das superfícies e a eficiência de adesão, viabilidade e proliferação de células HeLa comparadas com fibroblastos humanos normais. Estes resultados foram submetidos à publicação e o manuscrito pode ser encontrado no Anexo 1. Resumidamente, ambas as linhagens foram incapazes de aderir em superfícies hidrofóbicas. Fibroblastos foram capazes de aderir, espalhar e proliferar em todas as outras superfícies testadas. Em contraste, superfícies altamente hidrofílicas não foram biocompatíveis com células HeLa. Nas outras superfícies, mesmo apresentando altas taxas de viabilidade ($\geq$ 90%), as taxas de proliferação diferiram de $\sim$ 50% entre as superfícies com ângulo de contato na faixa de 20 ° (superfícies funcionalizadas com grupos carboxilato e sulfonato) e as superfícies com ângulo de contato na faixa de 45 ° (superfícies funcionalizadas

com grupos amida e amina). Superfícies funcionalizadas com aldeídos não seguiram esta tendência, pois apresentaram ângulo de contato na faixa de $20\,^{\circ}$ e taxa de proliferação cerca de 50% menor que as outras superfícies com ângulo de contato nesta faixa. Este fenômeno pode estar associado a formação de ligações cruzadas com as proteínas do soro. Medidas realizadas por SPRi (Surface Plasmon Resonance Imaging) mostram que superfícies com ângulo de contato de $\sim 20\,^{\circ}$ foram as que mais favoreceram a adsorção das proteínas provenientes do soro.

No corpo da tese apresentamos resultados que demonstram a aplicação da técnica de microscopia conhecida como RICM no estudo da adesão e espalhamento celular durante todas as suas fases e em diversas situações experimentais, com ênfase no efeito dos fotossensibilizadores na adesão celular em função de suas estruturas moleculares. Como substrato-modelo foi utilizado vidro, porque RICM é restrita a substratos transparentes. Diferente do que é normalmente realizado, a análise das imagens foi focada na zona de adesão e não no grau de deformação das células, por ser uma metodologia de análise mais abrangente. Este capítulo foi dividido em quatro seções. Na seção 4.1, aspectos gerais da adesão de células eucarióticas visualizados por RICM e sua aplicação em estudos cinéticos são discutidos. Três tipos de superfícies são comparadas: vidro, vidro funcionalizado com PLL (ambos na presença de soro fetal bovino) e vidro funcionalizado com a proteína de adesão vitronectina. Duas situações são estudadas: com e sem inibição do remodelamento de matriz. Na seção 4.2, a síntese e a caracterização do fotossensibilizador protoporfirina IX conjugada à poli-L-lisina (PLLPpIX) são

apresentadas. Na seção 4.3, o efeito na adesão celular dos fotossensibilizadores no escuro e após irradiação é avaliado, comparando-se citolocalização, incorporação e estrutura das moléculas. Na seção 4.4, o impacto na adesão celular da fotossensibilização das proteínas do soro fetal bovino é avaliado comparando-se a eficiência da PpIX e da PLLPpIX em função de suas estruturas moleculares.

4.1 Estudo da adesão e espalhamento celular por RICM

4.1.1 Aspectos gerais e estudos cinéticos

Adesão e espalhamento de células em substratos sólidos são processos dinâmicos que envolvem inúmeras etapas. Células HeLa em suspensão apresentam uma morfologia arredondada, a qual evolui para uma forma poliédrica após estarem completamente aderidas. O processo de adesão celular começa com a emissão de finas e dinâmicas projeções de membrana chamadas filopódios. Em seguida, ocorre o chamado espalhamento, no qual as células vão gradativamente perdendo a morfologia arredondada em um processo que pode levar algumas horas. O espalhamento evolui com a formação de projeções amplas e dinâmicas chamadas lamelipódios. Tanto filopódios quanto lamelipódios podem ser observados por RICM (Figura 4.1).

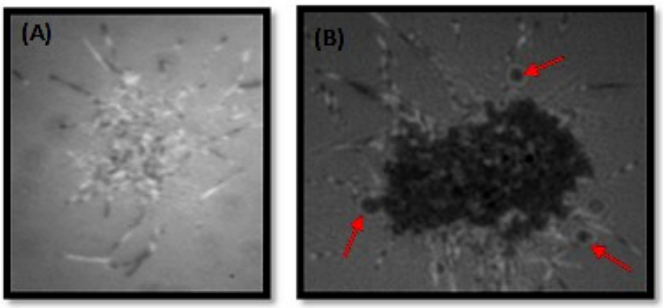


Figura 4.1: RICM de células HeLa evidenciando o contato inicial com a superfície mediado filopódios (A) e o aumento da zona de adesão através da emissão de lamelipódios (setas em B). A zona de adesão é definida como as áreas mais escuras que a luminosidade de fundo. Superfície: Vidro + FBS.

Além disso, enquanto as células ainda apresentam uma morfologia arredondada, quando visualizadas por microscopia ótica convencional (Figura 4.2 A), a zona de adesão, visualizada por RICM, apresenta formatos variados como pode ser visualizado na Figura 4.2 B. Ou seja, a morfologia da célula visualizada por microscopia ótica convencional não necessariamente correlaciona com as alterações na zona de adesão visualizadas por RICM. Assim, RICM fornece informação mais detalhada sobre a evolução do processo de adesão e espalhamento celular.

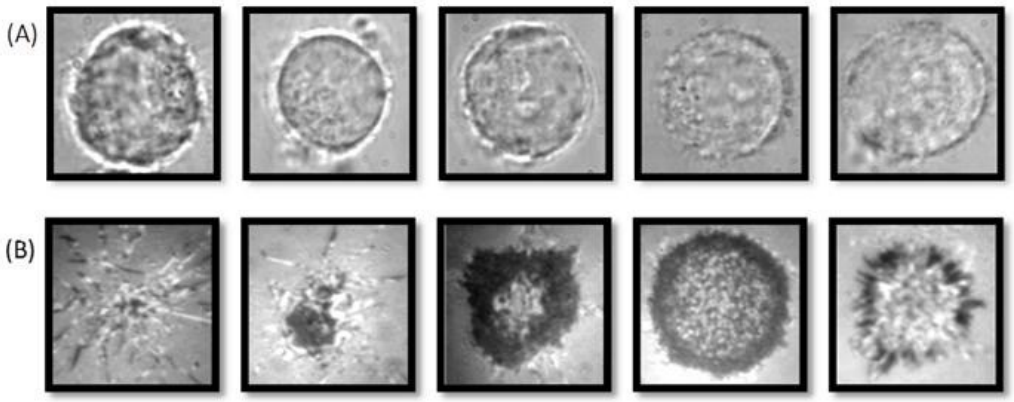


Figura 4.2: (A) Imagens obtidas por microscopia ótica convencional de diferentes células HeLa. (B) Imagens obtidas por RICM destas mesmas células. As células foram visualizadas 1h após plaqueamento em superfície de vidro na presena de FBS. A zona de adesão é definida como as áreas mais escuras que a luminosidade de fundo.

Além da visualização direta da zona de adesão, RICM também permite avaliar a cinética do processo de adesão graficando-se a evolução do número de pixels correspondentes à zona de adesão (número de pixels mais escuros que a luminosidade de fundo) em função do tempo. Pode-se, por exemplo, ca-

racterizar a evolução temporal da extensão e a retração das três projeções de membrana apontadas na Figura 4.1 B (Figura 4.3). Em vidro na presença de soro fetal bovino, observa-se que a extensão e a retração das projeções de membrana não ocorrem à mesma velocidade: o processo de extensão é muito mais rápido que o de retração. Em células HeLa, a extensão pode levar até 37 segundos (Figura 4.3 C) e a retração total até 130 segundos (Figura 4.3 A). Observa-se que na expansão a área da projeção de membrana aumenta linearmente com o tempo, enquanto na etapa de retração ela decresce exponencialmente com o tempo. Nota-se também que nem todas as extensões de membrana retraem totalmente, o que implica na formação de novos sítios de adesão (Figura 4.3 B e C). Também, nem as velocidades de extensão, nem as de retração e nem o tamanho máximo dos lamelipódios são iguais para diferentes projeções provenientes de uma mesma célula, não sendo possível estabelecer uma correlação entre o tamanho máximo alcançado pela projeção de membrana e a sua velocidade de extensão ou retração. Como a adesão neste caso ocorreu na presença de FBS, é possível que a heterogeneidade na dinâmica das três projeções de membrana seja um reflexo da heterogeneidade da funcionalização da superfície com proteínas adesivas.

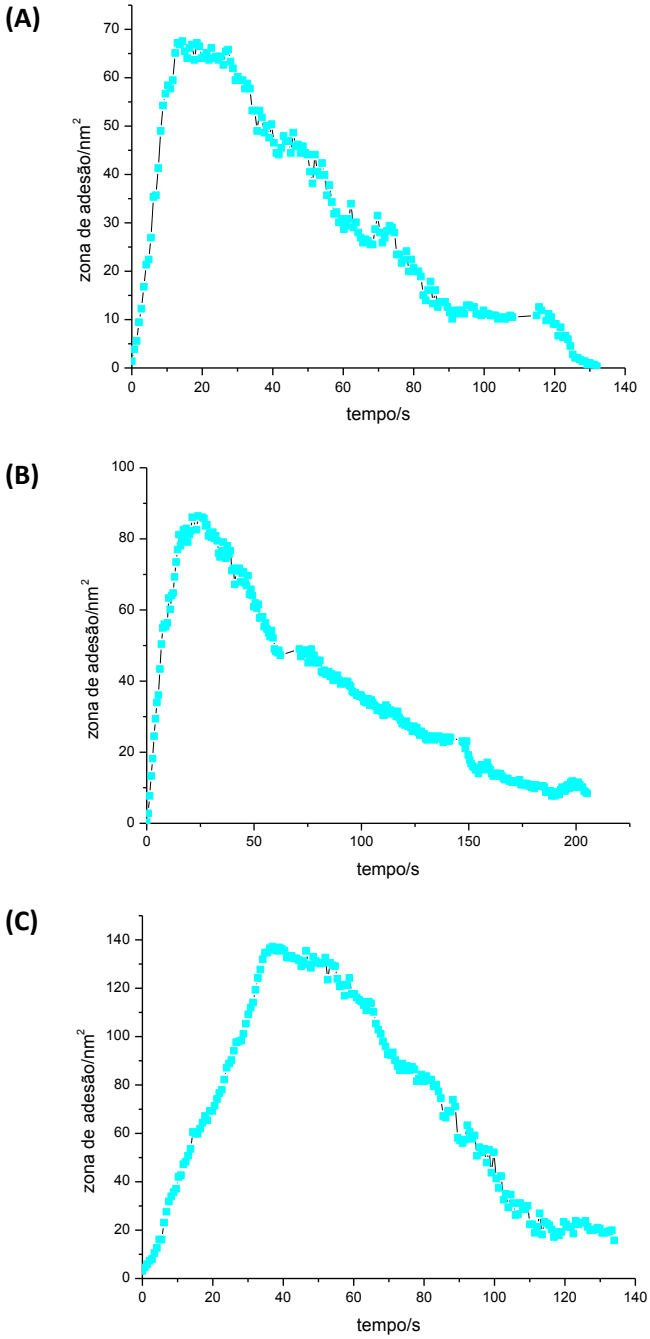


Figura 4.3: Evolução temporal da expansão e retração das três projeções de membrana, mostradas na Figura 4.1.1B, emitidas por uma célula HeLa plaqueada em superfície de vidro na presença de FBS.

Analisando as projeções de membrana de fibroblastos aderindo em vidro funcionalizado com fibronectina, Ryzhkov e colaboradores [87] também observaram que o processo de extensão dos lamelipódios é muito mais rápido que o de retração. Entretanto, a velocidade de extensão e retração destas projeções é maior do que no caso de células HeLa em vidro funcionalizado com soro fetal bovino, onde a superfície não está saturada com proteínas adesivas. No caso das cinco projeções analisadas em fibroblastos, a extensão levou no máximo cinco segundos e as retrações no máximo 70 segundos. Esses valores são bem menores do que aqueles observados para HeLa (2 a 7 vezes menores). Essa diferença pode ser devida ao tipo celular ou à diferença de funcionalização da superfície (fibronectina x FBS). O efeito da diferença de funcionalização da superfície na adesão e espalhamento celular será mais adiante nesta seção.

Além de estudar a cinética das projeções de membrana emitidas pelas células, é possível também avaliar a cinética de adesão e espalhamento de células individuais a partir das imagens de RICM. A Figura 4.4 mostra a evolução temporal da área total da zona de adesão de uma célula HeLa aderindo em vidro na presença de FBS durante os 10 primeiros minutos do processo de adesão. A zona de adesão aumenta de forma aproximadamente linear com o tempo com uma taxa de crescimento de 0,03 μm^2.s^{-1}.

Pode-se também observar para células individuais como varia o centro de massa da zona de adesão e assim determinar se esta se move em relação ao ponto inicial de adesão à medida que a zona de adesão cresce. A Figura 4.5

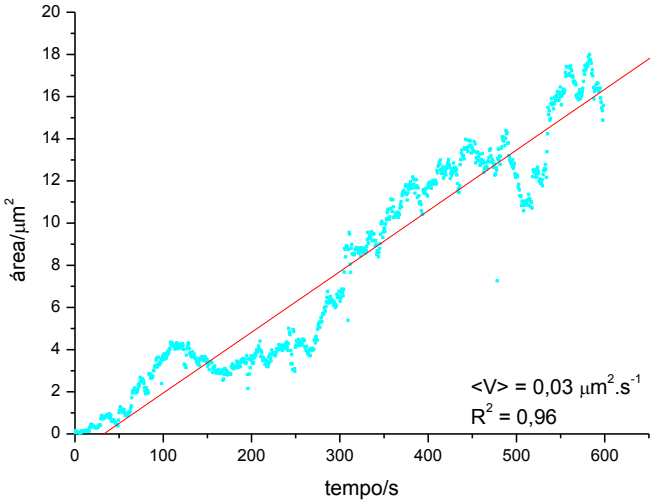


Figura 4.4: Evolução temporal da zona de adesão de uma célula HeLa aderindo em vidro na presença de FBS durante os 10 primeiros minutos do processo de adesão. A inclinação da reta do obtida por ajuste linear dos dados fornece a velocidade média de aumento da zona de adesão.

mostra a evolução temporal da posição do centro de massa $[(x^2 + y^2)^{\frac{1}{2}}]$ (B) de uma célula HeLa aderindo em vidro na presença de FBS durante o intervalo de 10 minutos (A). Note que a posição do centro de massa varia muito pouco ao longo do tempo, como demostrado pelo pequeno desvio-padrão da posição média do centro de massa (44,0 ± 2,8).

Também é possível avaliar o perfil da evolução temporal do tamanho médio da zona de adesão de uma população de células. Na literatura, este estudo é realizado utilizando-se o grau de deformação da célula (raio da zona de adesão dividido pelo raio do plano médio da célula) e não puramente pela análise da zona de adesão. No entanto, como o cálculo do grau de deformação modela a área da célula para uma esfera, consequentemente esta metodologia

de análise só pode ser aplicada para estudar o início do processo de adesão.

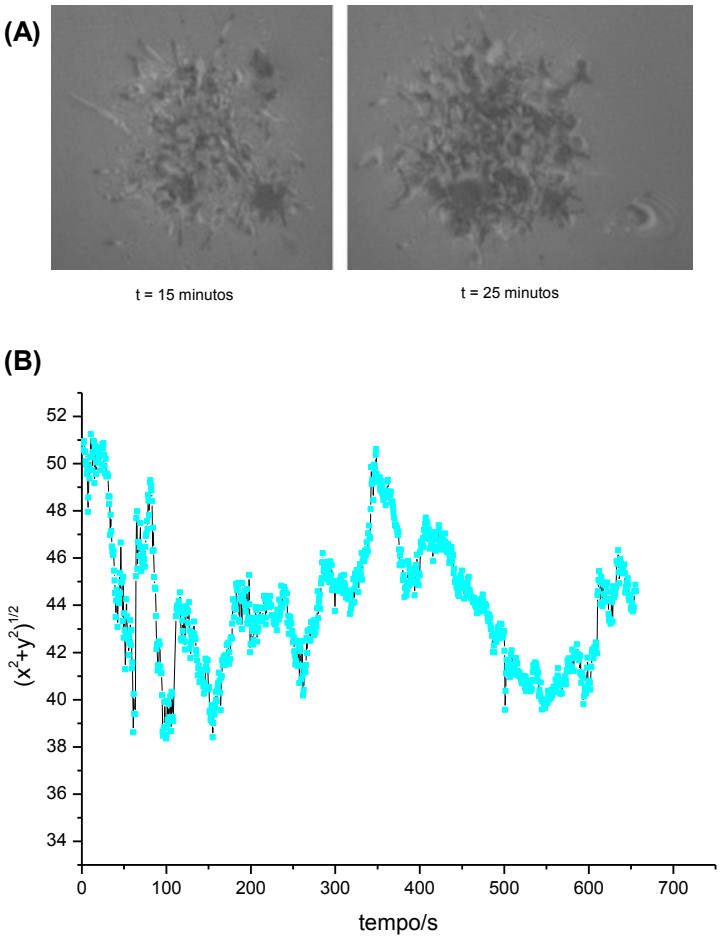


Figura 4.5: (A) Imagens de RICM de uma mesma célula HeLa obtidas 15 e 25 minutos após o plaqueamento em superfície de vidro na presença de FBS. (B) Evolução temporal típica da posição do centro de massa da zona de adesão da célula mostrada em (A). A posição média do centro de massa é 44,0 ± 2,8.

Através da análise puramente da zona de adesão, foi possível obter o perfil da evolução temporal do tamanho médio da zona de adesão para células HeLa aderindo a uma superfície de vidro na presença de FBS ao longo de 24h (Figura 4.6). Observa-se que a zona de adesão aumenta de duas ordens de grandeza durante este período. O padrão observado durante o período correspondente a um ciclo celular difere daquele observado quando se analisa o processo somente durante algumas dezenas de minutos (Figura 4.4), onde a evolução temporal segue um padrão linear. Durante o intervalo de 24h, o valor médio da zona de adesão de células HeLa evolui com o tempo num padrão sigmoidal. Os dados podem ser ajustados (R^2 = 0,95) pelo modelo sigmoidal de Boltzmann (Equação 4.1.1), um modelo bastante empregado em biologia [164].

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x - x_0)/dx}} + A_2 \tag{4.1}$$

onde os parâmetros A_1, A_2, x_0 e dx representam, respectivamente, assíntota inferior, assíntota superior, ponto de inflexão e fator de inclinação da curva. A equação de Boltzmann foi originalmente proposta para descrever a distribuição de possibilidades de estados diferentes em um conjunto em termodinâmica estatística [44]. Aqui ela é empregada por causa da sua habilidade em descrever bem o estágio exponencial de uma curva sigmóide com parâmetros mais significativos do que outros modelos matemáticos possíveis.

A função sigmóide apresenta três fases distintas: uma fase de crescimento lento, seguida por uma fase de crescimento acelerado e por fim outra fase de crescimento lento. Assim, no início o ganho em área aderida é lento, entre 3h e 4h após o plaqueamento há um acentuado aumento na velocidade de adesão, que posteriormente volta a evoluir lentamente.

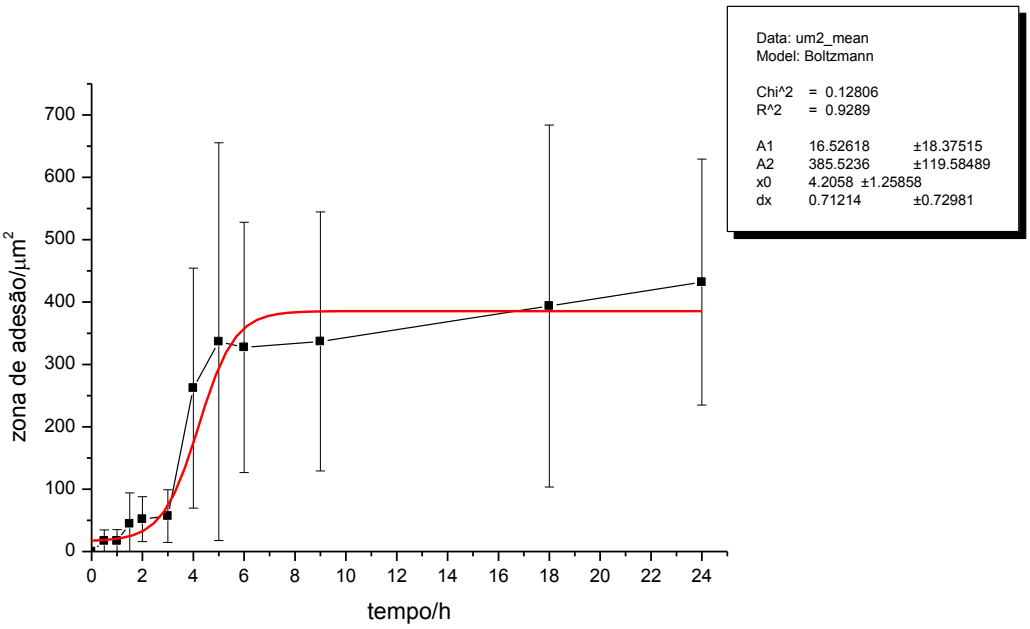


Figura 4.6: Gráfico do valor médio da zona de adesão em função do tempo de células HeLa aderindo na presença de FBS em uma superfície de vidro. Os dados foram ajustados para o modelo de Boltzmann (curva vermelha), onde os parâmetros A_1, A_2, x_0 e dx representam, respectivamente, assíntota inferior, assíntota superior, ponto de inflexão e fator de inclinação da curva.

Os desvios-padrão do gráfico expressam a dispersividade no tamanho das zonas de adesão, que ocorre em qualquer tempo após o plaqueamento. Ao

menos em parte, esta dispersividade pode ser explicada no início do processo de adesão com base nos diferentes volumes celulares que implicam em diferentes velocidades de difusão da solução até a superfície, e posteriormente pela não sincronia no ciclo celular.

4.1.2 Efeito da funcionalização da superfície

Para avaliar o efeito da funcionaliza ção da superfície no tamanho da zona de adesão, três superfícies foram estudadas: vidro na presença de FBS, vidro funcionalizado com PLL na presença de FBS e vidro funcionalizado com vitronectina (VN),sem FBS adicionado. Vitronectina é a principal proteína de adesão do FBS.

Para se ter uma visão panorâmica de como varia o tamanho da zona de adesão em função do tempo nas três superfícies estudadas, optou-se por utilizar histogramas pela capacidade deste tipo de gráfico de organizar os dados em categorias e assim resumir a análise de grandes quantidades de dados. Neste caso, os histogramas classificam as células em determinados intervalos de tamanho da zona de adesão. As Figuras 4.7, 4.8 e 4.9 apresentam a distribuição dos tamanhos das zonas de adesão nas superfícies de vidro, PLL e vitronectina 1h, 2h e 3h após o plaqueamento, respectivamente. Para comparar as três superfícies, os histogramas foram gerados mantendo-se fixo o número de intervalos de tamanho (n = 9) e utilizou-se o coeficiente de assimetria de Pearson (A_s)[1], o qual foi calculado com os valores apresentados na Tabela 4.1. Os valores de A_s estão apresentados acima dos respectivos histogramas.

[1] $A_s = 3\frac{(\tilde{x}-\bar{x})}{sd}$

onde $\tilde{x}$ é a média, $\bar{x}$ é a mediana e sd é o desvio-padrão.

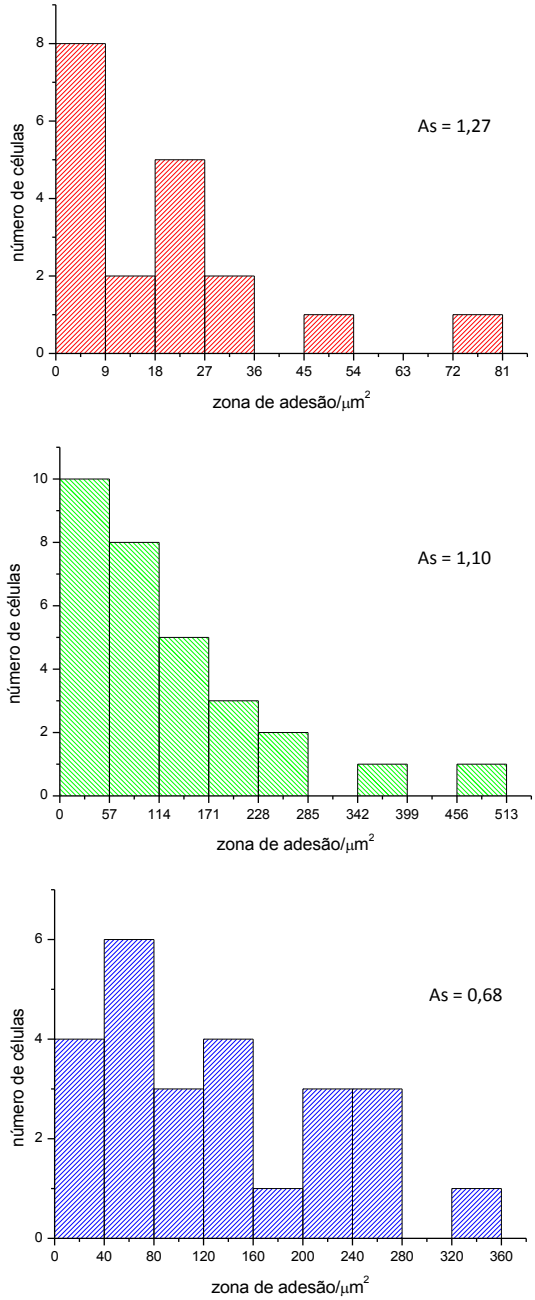


Figura 4.7: Histogramas da distribuição de tamanho das zonas de adesão de células HeLa 1h após plaqueamento em uma superfície de vidro (vermelho) + FBS, vidro funcionalizado com PLL (verde) + FBS e vidro funcionalizado com vitronectina (azul). A_s é o coeficiente de assimetria de Pearson.

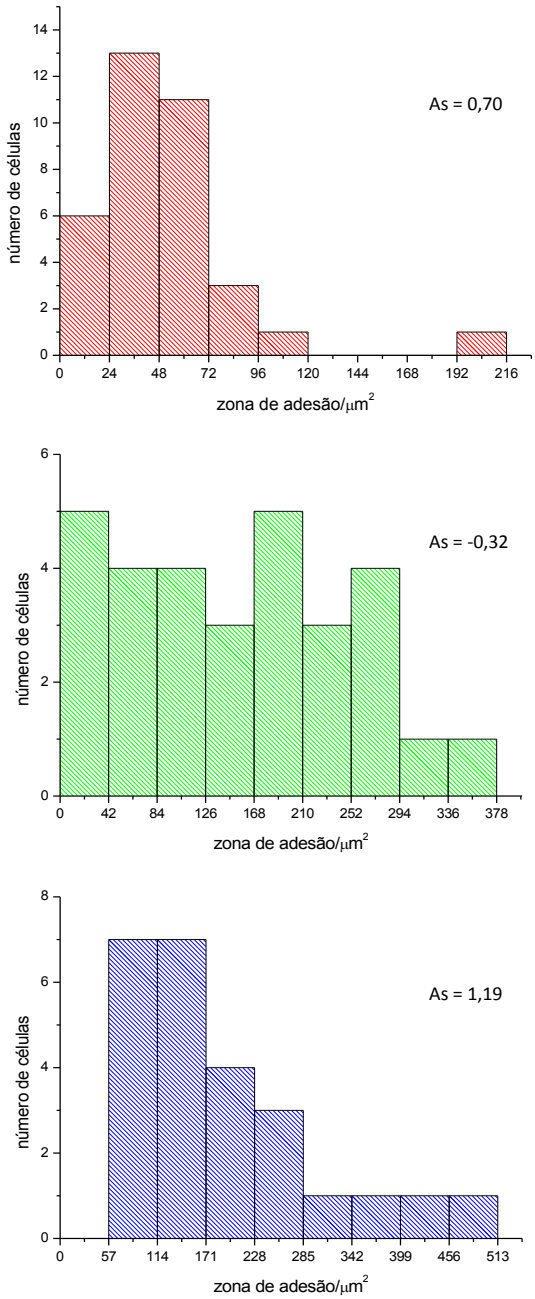


Figura 4.8: Histogramas da distribuição de tamanho das zonas de adesão de células HeLa 2h após plaqueamento em uma superfície de vidro (vermelho) + FBS, vidro funcionalizado com PLL (verde) + FBS e vidro funcionalizado com vitronectina (azul). A_s é o coeficiente de assimetria de Pearson.

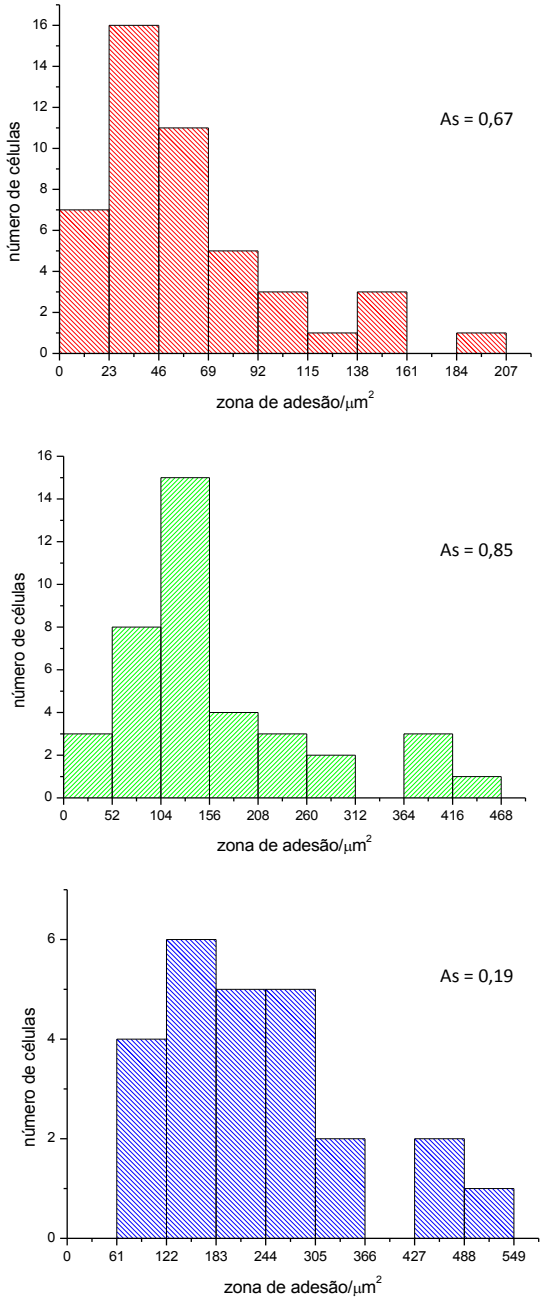


Figura 4.9: Histogramas da distribuição de tamanho das zonas de adesão de células HeLa 3h após plaqueamento em uma superfície de vidro (vermelho) + FBS, vidro funcionalizado com PLL (verde) + FBS e vidro funcionalizado com vitronectina (azul). A_s é o coeficiente de assimetria de Pearson.

Note que os histogramas apresentam uma distribuição de tamanho das zonas de adesão assimétrica, sendo esta assimetria menos pronunciada no caso da superfície funcionalizada com vitronectina, provavelmente um reflexo da maior homogeneidade desta superfície comparada as outras. Nota-se uma tendência de diminuição da assimetria ao longo do tempo nas três superfícies: os coeficientes de Pearson para 3h após o plaqueamento são menores que os coeficientes para 1h após o plaqueamento. Para o caso das superfícies de vidro e vidro funcionalizado com PLL observa-se que os dados inicialmente seguem uma distribuição exponencial, a qual reflete os tempos decorridos entre a chegada das células à superfície.

Tabela 4.1: Valor médio e mediana, em μm^2, da zona de adesão de células HeLa durante as três primeiras horas após plaqueamento em vidro, vidro funcionalizado com PLL e vidro funcionalizado com vitronectina. Estes valores foram utilizados para calcular o coeficiente de assimetria de Pearson dos histogramas apresentados nas Figuras 4.1.2, 4.1.2 e 4.1.2.

	Vidro + FBS		**PLL + FBS**		**VN**	
	média + sd	*mediana*	*média + sd*	*mediana*	*média + sd*	*mediana*
1h	18,8 ± 19,9	19,4	122,2 ± 113,4	77,2	132,7 ± 90,3	112,4
2h	51,9 ± 36,0	43,6	150,5 ± 99,5	161,1	186,8 ± 114,8	141,4
3h	56,9 ± 42,2	47,4	159,3 ± 103,3	130,0	240,9 ± 114,2	233,8

Para as três superfícies, observou-se um aumento do tamanho médio da zona de adesão em função do tempo (Tabela 4.1). No entanto, esta observação não ocorre sempre. Por exemplo, no caso das células HepG2, derivadas de um carcinoma hepatocelular, foi mostrado que a zona de adesão permanece constante a partir de 30 minutos após o plaqueamento em vidro funcionalizado

com colágeno e a partir de 3,5h após plaqueamento em vidro funcionalizado com fibronectina [80].

A análise da Tabela 4.1 também mostra que o tamanho médio da zona de adesão segue a tendência Vidro < PLL < VN, sendo a superfície funcionalizada com VN a mais eficiente em promover a adesão celular. Isto já era esperado, pois nesta superfície há um número maior de proteínas de adesão do que nas outras duas, uma vez que o componente majoritário do soro é albumina e não proteínas adesivas [165].

Já foi observado que o grau de espalhamento correlaciona com a densidade de proteínas adesivas na superfície [166]. Neste sentido, a maior adesão no vidro funcionalizado com PLL, em relação ao vidro não funcionalizado, poderia ser explicada por uma afinidade diferente das proteínas de adesão presentes no FBS por esta superfície, o que implicaria em maior número de sítios de ligação para as integrinas.

Para avaliar se há diferença na tendência de evolução do tamanho médio da zona de adesão em função do tempo para as três superfícies, os dados foram plotados em um mesmo gráfico (Figura 4.10). Nota-se que as curvas das superfícies contendo FBS tendem a saturação, enquanto a curva da superfície funcionalizada com vitronectina não. O padrão observado revela dois regimes de crescimento da zona de adesão em função do tempo, controlados pela quantidade de proteína adesiva disponível na superfície: (1) um regime no qual a quantidade de proteína adesiva é fator limitante (superfícies con-

tendo FBS) e (2) outro no qual a quantidade de proteína adesiva não é fator limitante (superfície funcionalizada com vitronectina).

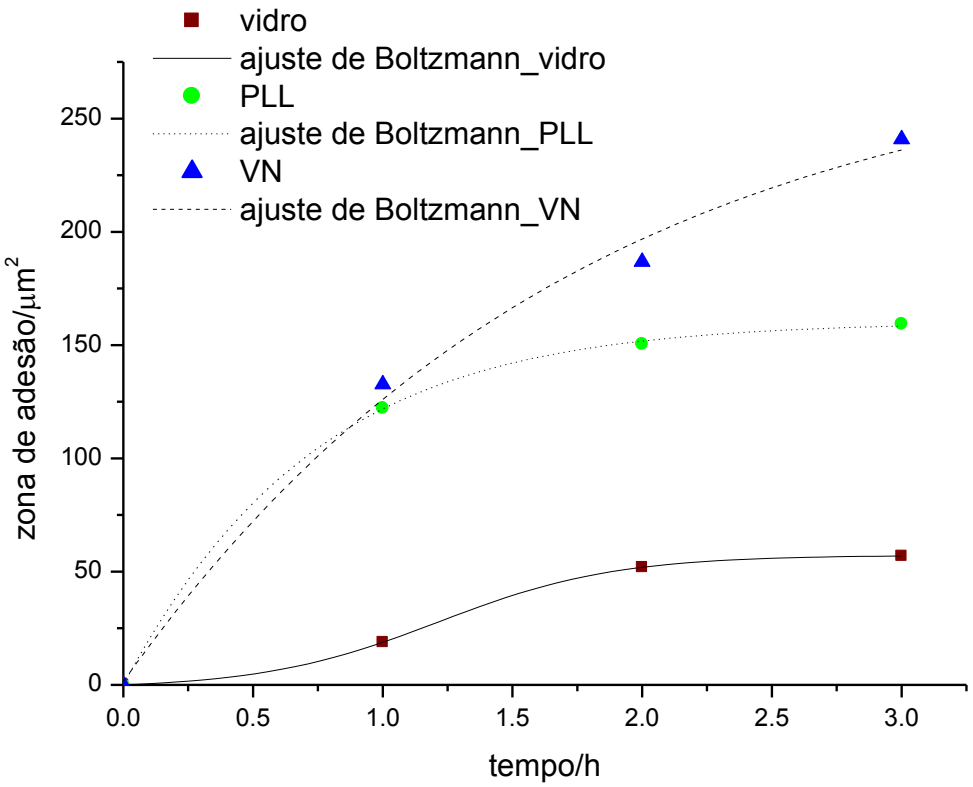


Figura 4.10: Evolução temporal da zona de adesão obtida a partir da análise das imagens de RICM durante as três primeiras horas após plaqueamento de células HeLa em: vidro e vidro funcionalizado com PLL (PLL), ambos na presença de FBS, e vidro funcionalizado com vitronectina (VN), na ausência de FBS.

Utilizando o ajuste sigmoidal de Bolztmann (equação 4.1.1) obtêm-se para o parâmetro dx, o qual indica o grau de aumento da zona de adesão em função do tempo, os valores 0,34 e 0,65 para vidro e vidro funcionalizado com PLL,

respectivamente. Assim, em superfícies funcionalizadas com PLL a zona de adesão aumenta com uma velocidade 1,9 vezes maior.

Em superfícies funcionalizadas com VN o aumento da zona de adesão em função do tempo (dx = 1,47) é mais de 4 vezes maior do que em vidro. Isto pode ter consequências na evolução do processo de adesão e espalhamento celular, conforme será discutido adiante. Uma cinética de adesão mais rápida em superfícies funcionalizadas com proteínas de adesão comparada a superfícies com FBS também foi observada para fibroblastos. Neste caso, as cinéticas foram avaliadas usando o grau de deformação das células ao longo de 2h, fornecendo curvas hiperbólicas para ambos os casos. Interessantemente, as cinéticas observadas não foram as mesmas para duas proteínas de adesão diferentes (fibronectina e colágeno), demonstrando o papel central da identidade dos pares integrina-proteína de matriz formados em controlar a cinética da adesão. [76]

Enquanto em 1h após o plaqueamento a diferença de tamanho da zona de adesão no vidro comparado com o vidro funcionalizado com PLL é de 6,4; em 2h ela é de 2,9 e em 3h de 2,8. Esta queda para um valor constante poderia ser um reflexo do remodelamento de matriz, atividade na qual as células modificam a camada de proteína inicialmente adsorvida na superfície de maneira a tornar o meio ambiente mais adequado às suas necessidades [167].

Apesar da heterogeneidade no tamanho das zonas de adesão, conforme mostram os grandes desvios-padrão apresentados na Tabela 4.1, um padrão de

evolução da área de adesão pode ser inferido a partir da análise das imagens de RICM para as três superfícies estudadas.

Em vidro na presença de FBS (Figura 4.11), a partir dos filopódios e lamelipódios (A e B), a zona de adesão aumenta progressivamente até certo ponto (C), a partir do qual ela migra para as extremidades da célula (D-H), finalizando por concentrarem-se nas extremidades do eixo maior da célula (I). Este padrão concorda com os estágios da adesão celular descritos na introdução: adesão, espalhamento e formação das fibras de estresse. O primeiro estágio envolve a interação inicial entre as integrinas e a matriz extracelular, com a formação dos complexos focais (A). No segundo, as células aumentam a sua área de contato através da formação dos contatos focais (B e C). No terceiro, o citoesqueleto se reorganiza direcionando-se centripetalmente (D-H) culminando com a formação das fibras de estresse e dos contatos fibrilares (I). Os complexos focais são estruturas pontuais localizadas nas extremidades da célula, os contatos focais são estruturas largas localizadas tanto na periferia quanto na região central da célula e os contatos fibrilares são estruturas alongadas na direção do centro da célula associadas às extremidades das fibras de estresse. [2, 29, 30, 168]

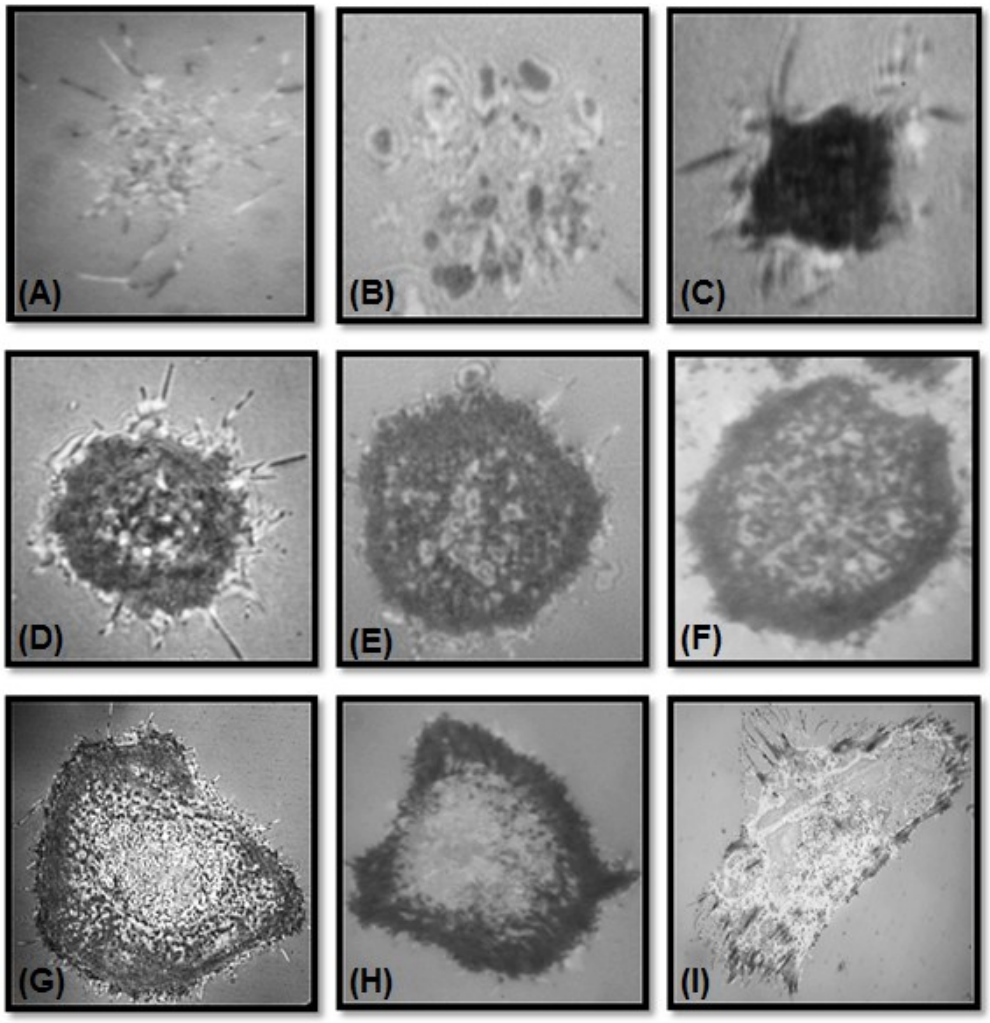


Figura 4.11: Micrografias de RICM de diferentes células HeLa após plaqueamento em superfície de vidro na presença de FBS, mostrando a evolução da zona de adesão durante um ciclo celular. A zona de adesão é definida como a região que aparece mais escura que a luminosidade de fundo. Os contatos fibrilares são as estruturas alongadas na direção do centro da célula que podem ser observadas nas extremidades da zona de contato (I).

A funcionalização da superfície de vidro com PLL gera um padrão de evolução das zonas de adesão (Figura 4.12) similar ao observado para vidro não funcionalizado (Figura 4.11) (ambos na presença de FBS), concordando com o padrão similar de evolução temporal observado na Figura 4.10. A única diferença é a ausência do último estágio (Figura 4.1.2 I), formação de fibras de estresse e contatos de adesão fibrilar, no vidro funcionalizado com PLL. A não formação de contatos fibrilares em células aderidas a superfícies funcionalizadas com grupos amino, no caso alquilsilanos e não PLL, também foi reportada para fibroblastos, na presença de fibronectina sem FBS, utilizando imunofluorescência. Este efeito foi associado à incapacidade das células em remodelarem em estruturas fibrilares a fibronectina adsorvida. O mecanismo proposto envolve a ausência de tensão normalmente exercida pelas integrinas através das fibras de estresse, que expõem os sítios crípticos necessários para a polimerização das moléculas de fibronectina. [169]

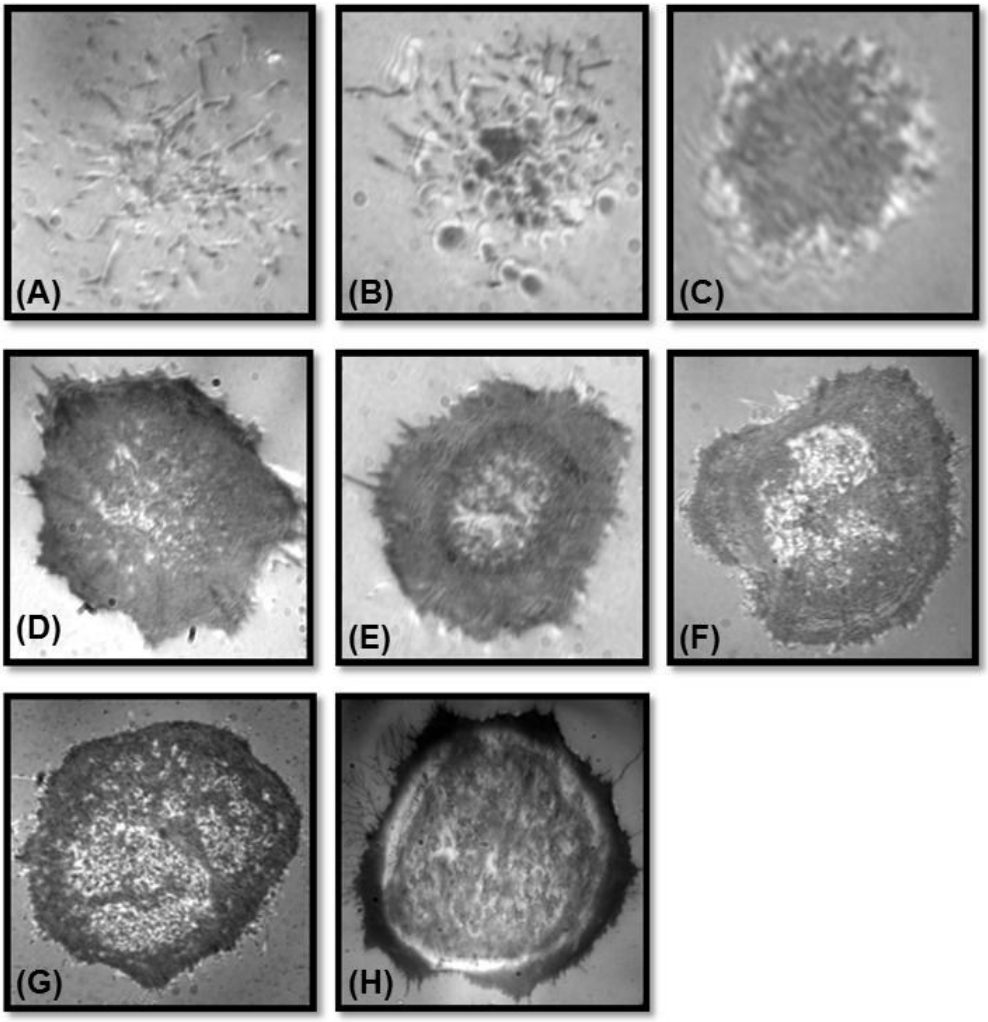


Figura 4.12: Micrografias de RICM de diferentes células HeLa após plaqueamento na presença de FBS em superfície de vidro funcionalizado com PLL mostrando a evolução da zona de adesão durante um ciclo celular. A zona de adesão é definida como a região que aparece mais escura que a luminosidade de fundo.

Na superfície funcionalizada com a proteína adesiva vitronectina (VN) em meio livre de FSB (Figura 4.13), as células começam estabelecendo o mesmo padrão de evolução da zona de adesão observado na presença de FBS (Figuras 4.11 e 4.12), ou seja, a partir dos filopódios e lamelipódios a zona de adesão aumenta progressivamente até certo ponto (A-D). As células então começam a realizar a migração das zonas de adesão para periferia (E-G), mas acabam se rompendo (H) antes de completar o processo.Uma característica marcante das células plaqueadas em superfície funcionalizada com vitronectina é o elevado número de filopódios emitidos pelas células durante todo o processo. Isto poderia estar associado a uma tentativa das células em encontrar uma região com menor concentração de proteínas adesivas. Também a comparação com as micrografias apresentadas nas Figuras 4.11 e 4.12 revela uma maior homogeneidade na zona de adesão de células plaqueadas na superfície funcionalizada com vitronectina. Isto seria um reflexo da maior homogeneidade da camada de proteína adsorvida nesta superfície comparada as superfícies funcionalizadas com FBS.

A lise celular observada pode ser devida a incapacidade das células em realizar este processo de migração das zonas de adesão devido à ausência de regiões livres de proteínas de adesão. A funcionalização de uma superfície com 100% de proteína adesiva na ausência de FBS é mais eficiente em promover o processo inicial de adesão de células HeLa quando comparada a funcionalização com FBS (Tabela 4.1 e Figura 4.10), entretanto, ela não é adequada para promover o processo de espalhamento, pois leva a lise celular. Lise celular devido a grande tensão na membrana gerada por forte adesão

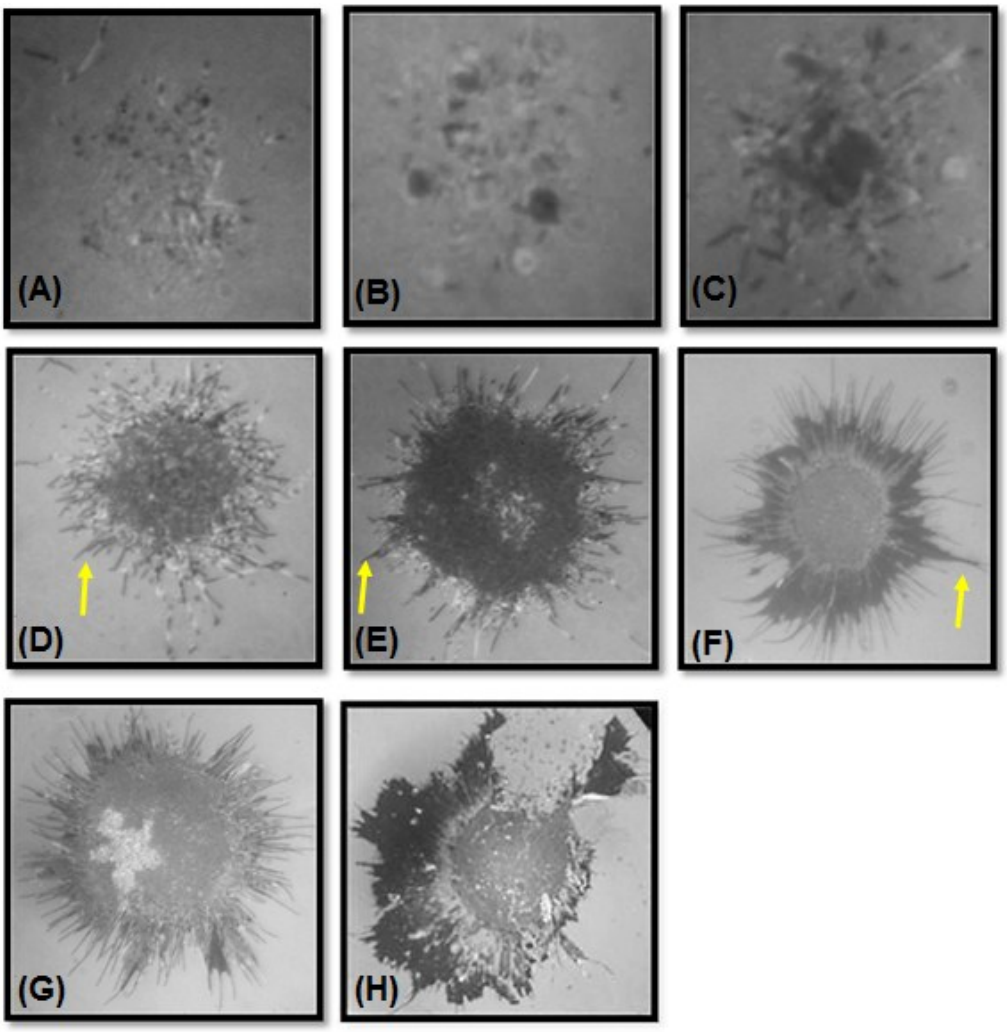


Figura 4.13: Micrografias de RICM de diferentes células HeLa em superfície de vidro funcionalizada com vitronectina, na ausência de FBS. As setas indicam filopódios. Em (H) é possível observar sinais de lise celular na região indicada pelo asterisco, a qual ocorre mais significativamente 4h após plaqueamento.

já foi reportada para glóbulos vermelhos em superfície funcionalizada com 10 mg/mL de PLL [84]. A lise celular foi observada de maneira mais significativa 4h após o plaqueamento. Interessantemente, a análise da cinética de aumento da zona de adesão de uma população de células ao longo de um ciclo celular (Figura 4.6) revelou que o aumento mais rápido da zona de adesão ocorre justamente entre 3h e 4h após o plaqueamento. Isto poderia ser um indício de que esta transição esteja relacionada à migração das zonas de adesão para periferia da zona de contato.

4.1.3 Efeito do remodelamento de matriz extracelular

O conceito de remodelamento esta relacionado à capacidade das células em modificarem a matriz extracelular de maneira a ajustá-la às suas necessidades. A matriz extracelular pode ser remodelada por vários processos incluindo síntese e degradação proteica. A degradação é realizada por proteases tanto secretadas quanto ancoradas à membrana celular, o que implica na possibilidade do remodelamento começar logo no início do processo de adesão. [167, 170]

A síntese proteica é fortemente suprimida em células em suspensão e sua reativação ocorre rapidamente após contato com um substrato sólido [171]. Entretanto, há relatos contraditórios na literatura sobre o efeito da síntese proteica na adesão celular. Há artigos relatando que a inibição de síntese proteica aumenta a adesão celular [172] e outros que a inibe [173]. Esta controvérsia pode ser resultado da metodologia simplista normalmente empregada no estudo da adesão: a contagem do número de células aderidas em um determinado período após o plaqueamento. A técnica de RICM, cuja análise se concentra na evolução da zona de adesão, pode ajudar a esclarecer este efeito.

Utilizando como modelo experimental células HeLa aderindo a vidro na presença de FBS, o efeito da inibição do remodelamento de matriz pela inibição da síntese proteica foi analisado por RICM (Figura 4.14). Observa-se que a inibição do remodelamento faz a evolução temporal da zona de adesão

perder o seu perfil sigmóide característico (Figura 4.6), assumindo um perfil hiperbólico.

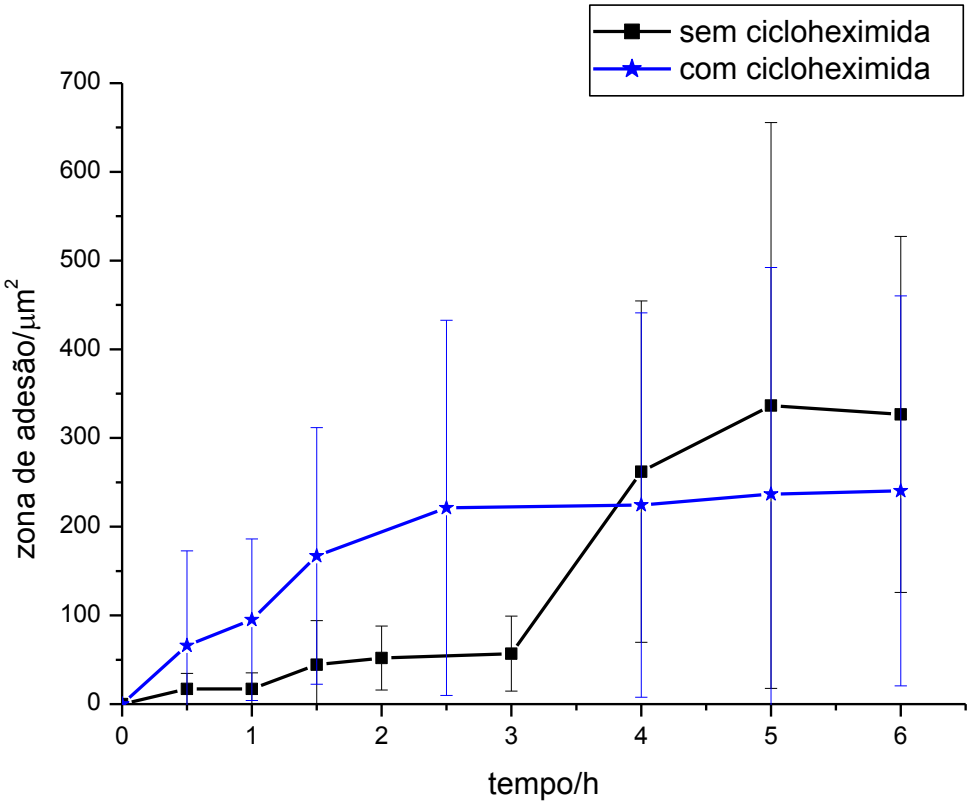


Figura 4.14: Efeito da inibição do remodelamento de matriz na evolução temporal do tamanho da zona de adesão. Após incubação com cicloheximida (inibidor de síntese proteica) por 30 minutos, as células foram lavadas, tripsinizadas e colocadas para aderir em vidro na presença de FBS.

As células foram capazes de aderir ao vidro na presença de FSB, mas apesar da área de contato ser inicialmente maior do que no controle, após 2h30 as células são incapazes de aumentá-la. Desta forma, a inibição da síntese

proteica afeta a adesão celular tanto no início quanto no fim do processo: a adesão é favorecida no começo e dificultada no final. Este resultado ajuda a entender porque os dados da literatura são tão controversos uma vez que o efeito observado depende de quanto tempo após o plaqueamento as células são analisadas. Vale mencionar que a análise do tamanho da zona de adesão é mais sensível à inibição da síntese proteica do que a contagem do número de células aderidas. O fato da zona de adesão não aumentar significativamente 2h30 após o plaqueamento indica que remodelamento através de síntese proteica é mais crítico para o espalhamento celular do que para o processo inicial de adesão.

A associação da cicloheximida com a membrana pode, a princípio, causar uma alteração na adesão celular, como já foi observado principalmente com moléculas anfifílicas tais como detergentes [190] ou fotossensibilizadores em certas condições (seção 4.3). No entanto, considerando a estrutura molecular da cicloheximida e o protocolo de tratamento utilizado (seção 3.3.7), acredita-se que este não seja o caso. Outra explicação para a maior área de contato inicialmente observada em células tratadas com cicloheximida seria a inibição da síntese de proteínas matricelulares. As proteínas matricelulares são conhecidas por interferirem na interação entre as integrinas e as proteínas adesivas, além de regularem a atividade das metaloproteinases de matriz e mediarem a internalização dos componentes da matriz pré-depositada degradada [12, 174–177].

Para compreender melhor os efeitos de diferentes superfícies na adesão ce-

lular, o efeito da inibição do remodelamento de matriz foi quantificado. A Tabela 4.2, mostra os valores médio e máximo da zona de adesão e a mediana da distribuição dos tamanhos da zona de adesão para células HeLa tratadas com cicloheximida e plaqueadas em vidro e em vidro funcionalizado com PLL 90 minutos após o plaqueamento. Tanto os valores médios, quanto as medianas e os valores máximos foram substancialmente diferentes nas duas superfícies, sendo, em média, 4,6 vezes maiores em vidro do que em vidro funcionalizado com PLL. O valor médio da zona de adesão no vidro quando o remodelamento é impedido é 3,7 vezes maior do que quando ele não o é (Tabela 4.1), enquanto o valor médio da zona de adesão no vidro funcionalizado com PLL é 3,3 vezes menor.

No caso de uma mistura de proteínas, como por exemplo, meio de cultura suplementado com FBS, a adsorção no substrato é competitiva de maneira que a constituição das proteínas adsorvidas dependerá das suas concentrações relativas na solução e das suas respectivas afinidades com a superfície. [178–180] Uuma vez que neste experimento as células foram impedidas de sintetizar uma nova matriz extracelular, os diferentes valores de zona de adesão obtidos entre as duas superfícies (vidro e PLL) indicariam que a camada de proteínas inicialmente adsorvida nestas superfícies não é a mesma.

Observou-se que quando o remodelamento é impedido pela inibição da síntese proteica, o vidro favorece mais a adesão celular do que o vidro funcionalizado com PLL. O inverso havia sido observado quando o remodelamento de matriz não está impedido (Tabela 4.1). Isto sugere que a matriz depositada no

vidro funcionalizado com PLL oriunda do FBS não é a mais adequada para a adesão de células vivas, mas seu remodelamento seria facilitado gerando uma matriz mais adequada para a adesão celular do que aquela em vidro não funcionalizado.

Tabela 4.2: Tamanho, em μm^2, da zona de adesão de células tratadas com cicloheximida, um inibidor de síntese proteica, 90 minutos após plaqueamento em vidro e vidro funcionalizado com PLL na presença de FBS ($n \geq 25$).

Superfície	**Tamanho médio**	**Mediana**	**Valor máximo**
Vidro	167,1 ± 144,6	120,7	519,7
PLL	37,9 ± 24,3	33,0	92,4

A Figura 4.15 mostra exemplos de imagens de RICM 90 minutos após plaqueamento de células HeLa tratadas com cicloheximida. Note que os padrões de zona de adesão são similares aos que foram observados em células não tratadas (Figuras 4.11 e 4.12). Isto indica que, ao menos 90 minutos após plaqueamento, a cicloheximida afeta mais o tamanho da zona de adesão do que o seu formato.

No caso da superfície funcionalizada com vitronectina, quase não se observaram células aderidas 90 minutos após plaqueamento. Assim, uma superfície 100% recoberta com vitronectina não parece ser o ambiente mais adequado para cultivar células HeLa, como já havia sido observado mesmo quando o remodelamento é permitido.

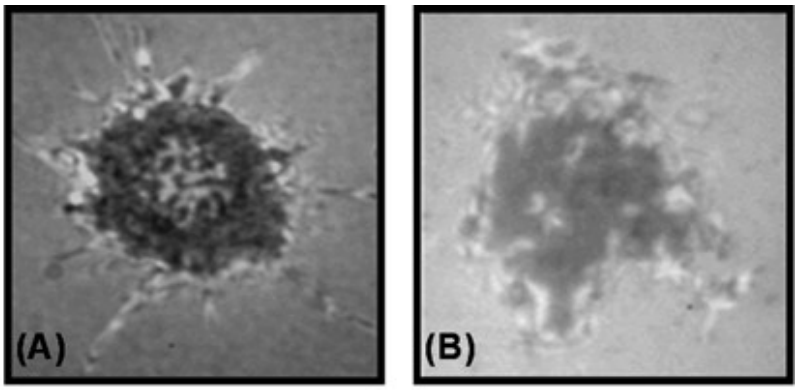


Figura 4.15: Imagens de RICM de células HeLa tratadas com ciclohexímida. Imagens obtidas 90 minutos após plaqueamento em vidro (A) e vidro funcionalizado com PLL (B) na presença de FBS. A zona de adesão é definida como as regiões que aparecem mais escuras que a luminosidade de fundo.

Em suma, foi realizada a padronização da técnica de RICM para estudo da adesão e espalhamento celular utilizando a análise da zona de adesão e não do grau de deformação das células como normalmente é realizado. Esta metodologia foi utilizada para estudar o efeito da superfície e do remodelamento de matriz na adesão e espalhamento de células HeLa em vidro, vidro funcionalizado com PLL (ambos na presença de soro fetal bovino) e vidro funcionalizado com vitronectina. Foi mostrado que esta técnica permite estudar o processo de adesão e espalhamento em todas as suas fases e que fornece informação mais detalhada que a obtida por microscopia ótica convencional sem necessidade de marcação da amostra. Também se mostrou a possibilidade de realizar estudos cinéticos da evolução de projeções de membrana, células individuais e populações de células. A dinâmica da adesão de células HeLa nas superfícies estudadas apresentou dois regimes: um limitado (vidro e PLL) e outro não limitado (VN) pela quantidade de proteínas de adesão. A adesão foi maior no regime não limitado pela quantidade de proteínas de

adesão, entretanto foi observada lise celular signficativa entre 3h e 4h após o plaqueamento. A análise das imagens revela que a zona de adesão após alcançar certo tamanho começa a migrar para as extremidades da face ventral das células culminando na formação dos contatos de adesão fibrilar. Os contatos de adesão fibrilar foram observados nas células plaqueadas em vidro mas não em vidro funcionalizado com PLL. A lise celular observada em VN pode ser devida a incapacidade das células em realizar o processo de migração das zonas de adesão devido à ausência de regiões livres de proteínas de adesão. A inibição do remodelamento por inibição da síntese proteica (tratamento com cicloheximida), aumenta a adesão celular em vidro no início do processo, mas impede que a zona de adesão cresça a partir de 2h30 após o plaqueamento. Este resultado sugere que o remodelamento de matriz através da síntese proteica é mais crítico para o espalhamento celular do que para o processo inicial de adesão. Quando as células são capazes de remodelar a matriz, a maior eficiência de adesão 1h30 após plaqueamento segue a ordem vidro $<$ PLL $<$ VN. Esta ordem é invertida quando o remodelamento é impedido. As imagens de RICM também revelaram que o tratamento com cicloheximida afeta mais o tamanho da zona de adesão do que o seu formato. Estes resultados indicam que superfícies 100% funcionalizadas com proteína adesiva não são o ambiente mais adequado para cultivar células HeLa. Eles indicam também que a matriz depositada no vidro funcionalizado com PLL oriunda do FBS não é a mais adequada para a adesão de células vivas. Resultado semelhante foi obtido por outras técnicas experimentais, como descrito no manuscrito submetido à publicação que pode ser encontrado no Anexo 1.

4.2 Síntese e caracterização da protoporfirina IX conjugada à poli-L-lisina

A PpIX foi submetida à reação com cloreto de tionila levando a formação de um intermediário reativo (cloreto de acila da PpIX nas posições 13^3 e 17^3). Este intermediário foi submetido à reação de substituição nucleofílica com PLL levando a formação do composto identificado como PLLPpIX. A Figura 4.16 ilustra os passos para a obtenção da PLLPpIX. Após o término da reação de substituição, a PLLPpIX foi purificada por partição $H_2O/CHCl_3$. A caracterização foi realizada por RMN ^{1}H (500 MHz).

Como referência para a caracterização da PpIX conjugada à PLL foi obtido o espectro da protoporfirina IX dimetil éster em $CDCl_3$. Geralmente, os espectros de RMN de porfirinas estão sujeitos a fortes alterações, tanto no que se refere ao deslocamento químico, quanto no que se refere à multiplicidade dos sinais, devido à agregação. A formação do estado agregado tem forte influência no efeito anisotrópico destes aromáticos. [146] No entanto, a excelente resolução do espectro obtido (Figura 4.17) mostra que na concentração utilizada (2 mg/mL) a protoporfirina IX dimetil éster encontra-se na forma monomérica. Nesta condição, é possível realizar a atribuição de todos os hidrogênios: os hidrogênios mesos aparecem por volta de 10 ppm, os hidrogênios vinílicos por volta de 8 e de 6 ppm, os hidrogênios metílicos entre 3 e 4 ppm. Os hidrogênios ligados ao nitrogênio não são mostrados neste espectro, pois eles aparecem entre -2 e -4 ppm, o que se deve ao fato do campo magnético, resultante das correntes de anel do sistema π do ma-

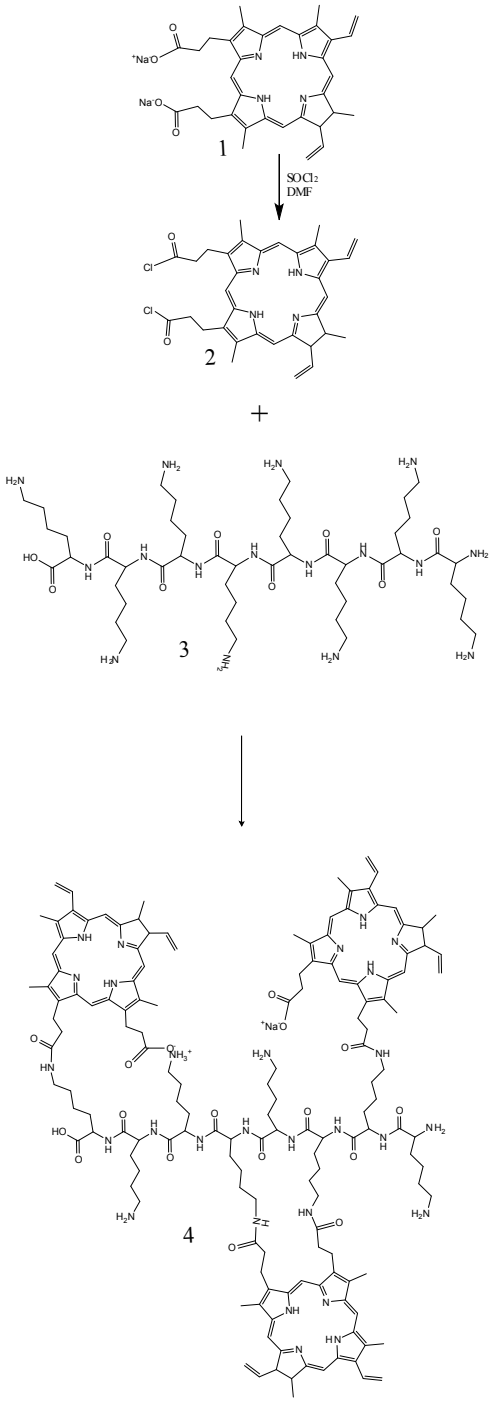


Figura 4.16: Diagrama da rota de funcionalização da PpIX com poli-L-lisina. 1) PpIX. 2) Intermediário cloreto de acila. 3) PLL. 4) PLLPpIX.

crociclo, ter no interior do anel um sentido contrário ao do campo externo aplicado [181].

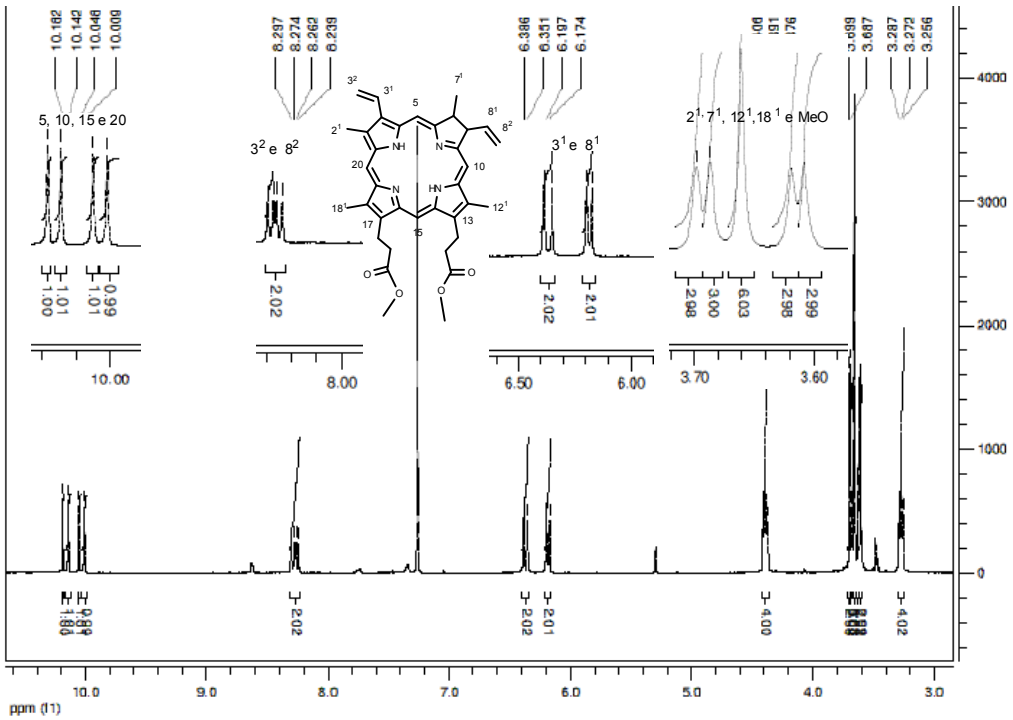


Figura 4.17: Espectro de RMN ^1H da protoporfirina IX dimetil éster em $CDCl_3$ (2 mg/mL). A atribuição dos hidrogênios é realizada conforme identificação na estrutura da molécula presente no inserto.

Como segundo parâmento de referência foi determinado o espectro da PLL em DMSO D_6 (Figura 4.18). O espectro obtido confere com o já determinado na literatura [182]. O sinal dos hidrogênios ligados ao nitrogênio na cadeia lateral do resíduo de lisina aparece sobreposto ao sinal dos hidrogênios da H_2O entre 3 e 4 ppm. O hidrogênio do grupo amida aparece por volta de 8 ppm, o hidrogênio do carbono terciário aparece por volta de 4 ppm, os hidrogênios α ao grupo amina aparecem perto de 3 ppm e os demais hidrogênios alifáticos

entre 1 e 2 ppm.

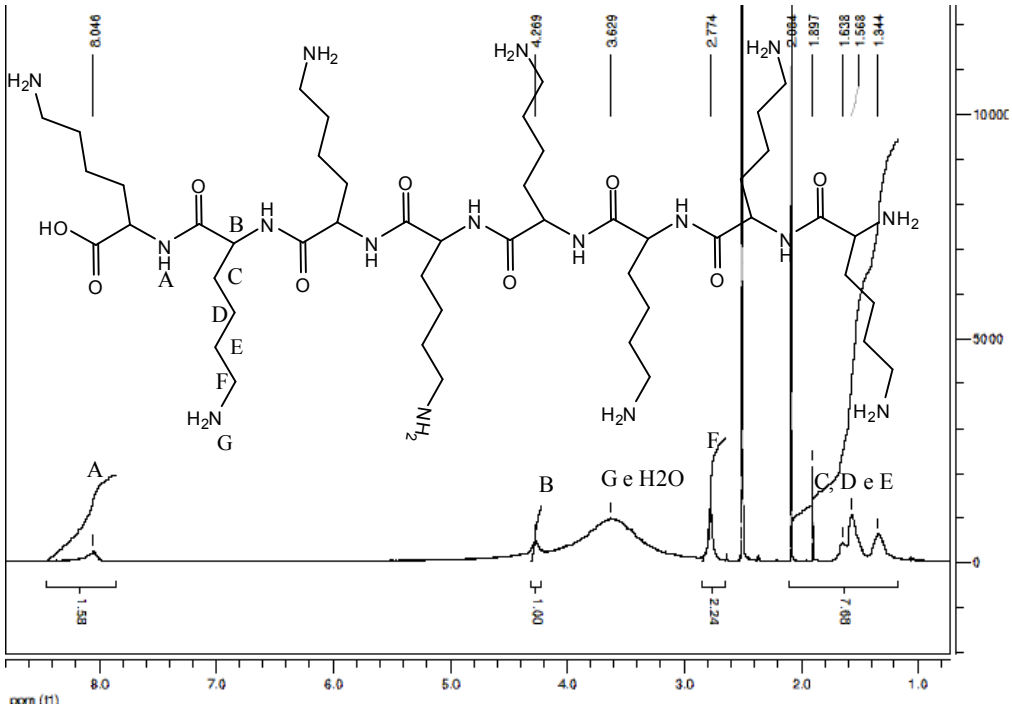


Figura 4.18: Espectro de RMN ^1H da Poli-L-Lisina em DMSO. A atribuição dos hidrogênios é realizada conforme identificação na estrutura da molécula presente no inserto.

A Figura 4.19 apresenta o espectro de RMN ^{1}H do produto da síntese. Os hidrogênios mesos encontram-se em 10,24 ppm; os hidrogênios vinílicos das posições 3^1 e 8^1 encontram-se em 8,48 ppm e os das posições 3^2 e 8^2 em 6,46 ppm. Já os hidrogênios das metilas nas posições 2^1, 7^1, 12^1 e 18^1 ligados ao anel porfirínico aparecem sobrepostos aos sinal de NH da PLL e traços de H_2O. Estes sinais encontram-se bem definidos em 3,74; 3,72; 3,62 e 3,60 ppm. Os demais sinais referentes ao espectro de hidrogênio da PLL, também foram identificados no espectro. Os hidrogênios do grupo amida encontram-

se em 8,05 ppm; os hidrogênios do carbono terciário da posio α a carbonila encontram-se em 4,26 ppm; os hidrogênios α ao grupo amina em 2,77 ppm. Os demais hidrogênios alifáticos da PLL foram atribuídos aos sinais entre 1,70 e 1,25 ppm. O espectro de RMN ^{1}H possibilitou a caracterização de praticamente todos os hidrogênios correspondentes ao composto PLLPpIX, não sendo necessário recorrer a técnicas bidimensionais.

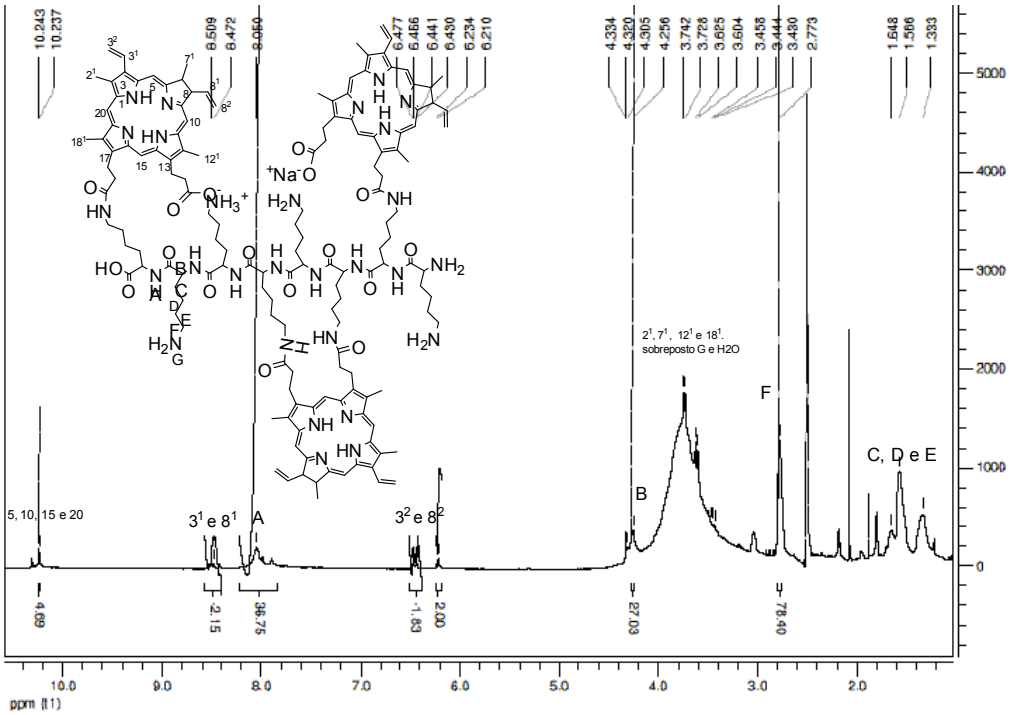


Figura 4.19: Espectro de RMN ^{1}H da PLLPpIX em DMSO. A atribuição dos hidrogênios é realizada conforme identificação na estrutura da molécula presente no inserto.

No entanto, uma análise mais detalhada do espectro nos mostra que a resolução dos sinais referentes ao anel porfirínico difere daquela considerada ideal, apresentada na Figura 4.17 para o espectro da protoporfirina IX di-

metil éster em $CDCl_3$. Pode-se observar que os hidrogênios mesos (posições 5, 10, 15 e 20) encontram-se sobrepostos compondo um único sinal em 10,24 ppm. A ausência de sinais bem definidos que possibilite a separação dos diferentes hidrogênios foi atribuída a possvel formação de agregados para estes níveis de concentração e diferenças de funcionalização do polímero com PpIX. Algumas moléculas de PpIX podem estar duplamente ligadas e algumas delas ligadas covalentemente por apenas uma carboxila, deixando a segunda como par iônico, tanto na forma de sal de amônio como na forma de sal de sódio. Desta forma, hidrogênios na mesma posição do anel porfirínico apresentam deslocamentos com mínimas diferenças, as quais são suficientes para sobrepor os hidrogênios mesos em um único sinal largo e com baixa definição. Já os hidrogênios vinílicos da posições 3^1 e 8^1 foram perfeitamente caracterizados, mas suas multipicidades foram comprometidas. Os hidrogênios vinílicos das posições 3^2 e 8^2 e os hidrogênios alifáticos das posies 13^1, 17^1; 13^2 e 17^2 foram perfeitamente caracterizados, inclusive permitindo calcular as suas constantes de acoplamento com precisão. Esta análise minuciosa do espectro é uma comprovação inequívoca a respeito do composto obtido.

O espectro de RMN ^{1}H também possibilitou fazer uma estimativa da relação porfirina/lisina. Os hidrogênios em 8,5 e em 6,4 ppm integram respectivamente para 2 e 4 hidrogênios, o que corresponde a uma unidade de PpIX. Já os hidrogênios em 4,26 ppm integram para 27, cada hidrogênio correspondendo a ^{1}H do monômero. Assim, podemos definir que existem 13,5 monômeros para cada anel porfirínico.

A busca por novos fotossensibilizadores mais eficientes é uma das linhas de pesquisa que mais prosperam no campo da PDT. A ligação a sistemas poliméricos vem sendo utilizada há algumas décadas com o objetivo de aumentar a eficiência de fotossensibilizadores [183–186]. Nesta estratégia, duas variáveis são importantes (1) o grau de substituição, isto é, o número de moléculas de fotossensibilizador ligada à cadeia polimérica e (2) o sítio de ligação no fotossensibilizador da cadeia polimérica. Como a PLL não está ligada à parte absorvedora de luz do fotossensibilizador, nomeadamente o anel porfirínico, é razoável assumir que diferenças não seriam encontradas nas propriedades fotofísicas entre PpIX e PLLPpIX. Entretanto, devido à tendência de auto-associação dos anéis porfirínicos, se as moléculas de PpIX estiverem ligadas muito próximas umas das outras na cadeia de PLL, isto deveria afetar as propriedades fotofísicas do fotossensibilizador.

O composto obtido PLLPpIX apresenta espectro UV-visível característico de PpIX, conforme esperado (seção 4.4). A Tabela 4.3 mostra o rendimento quântico de geração de $^1O_2$, assim como os tempos de vida do $^1O_2$ gerado por PpIX e PLLPpIX.

Tabela 4.3: Eficiências de geração e tempo de vida de $^1O_2$ em etanol obtidas a partir dos espectros de emissão do $^1O_2$ a 1270 nm. Excitação em 355 nm, 10 ns/pulso, 5 mJ/pulso.

Fotossensibilizador	Φ_Δ	**Tempo de vida**
PpIX	0,7	11,5 μs
PLLPpIX	0,6	11,4 μs

Ambos fotossensibilizadores apresentaram eficiências de geração de $^1O_2$ similares, assim como os tempos de vida do $^1O_2$ gerado. Consequentemente, a funcionalização com PLL não afetou significativamente a transferência de energia do triplete para o oxigênio molecular.

Em suma, o composto PLLPpIX foi sintetizado e caracterizado com sucesso. Os resultados mostram que a ligação da PLL à PpIX não levou a mudanças significativas das propriedades fotofísicas do fotossensibilizador. Este resultado é considerado positivo visto que a funcionalização visava alterar a interação do fotossensibilizador com macromoléculas biológicas e com as células sem alterar suas propriedades fotofísicas.

4.3 Estudo da adesão celular em função do tempo de incubação e da estrutura molecular dos fotossensibilizadores

Dados publicados na literatura mostraram que tanto fotossensibilizadores acumulados na membrana plasmática quanto na mitocôndria aumentam a resistência à tripsinização de células após PDT [124]. Estes resultados sugerem que PDT pode aumentar a adesão de células a substratos sólidos. No entanto, este aumento nunca foi estudado de maneira mecanística. Propôs-se então avaliar o efeito de fotossensibilizadores na adesão de células HeLa em diferentes tempos de incubação com e sem iluminação.

Como o primeiro passo da adesão celular é a agregação dos receptores, a qual depende das propriedades da membrana, o estudo do efeito dos fotossensibilizadores na adesão celular exige o uso de condições que não afetem a integridade da membrana plasmática. A integridade da membrana após tratamento foi verificada usando o ensaio de exclusão do corante azul de tripan imediatamente após incubação dos fotossensibilizadores seguida ou não de irradiação. Nos ensaios de adesão foram testadas as condições experimentais, descritas ao longo do texto, que causaram apenas 1% ou menos de perda de integridade de membrana.

4.3.1 No escuro

A Figura 4.20 mostra imagens de RICM de células HeLa aderindo em superfície de vidro na presença de FBS após incubação com PLLPpIX e PpIX por 1 minuto ou 3 horas. Observa-se que o padrão da zona de adesão das células incubadas com ambos fotossensibilizadores em ambos os tempos de incubação não difere significativamente entre si e em relação ao que foi observado para células não tratadas com fotossensibilizador.

O tamanho da zona de adesão é bastante variável dentro de uma população de células observada em um mesmo tempo após o plaqueamento tanto para o controle quanto para as células tratadas. Após calcular-se o tamanho médio da zona de adesão (Tabela 4.4), observou-se que tanto PpIX quanto PLLPpIX levam a um aumento do tamanho da zona de adesão em comparação às células não tratadas com fotossensibilizador para ambos os tempos de incubação. Ou seja, os fotossensibilizadores alteram o tamanho da zona de adesão sem alterar o seu formato, semelhantemente ao que foi observado para vidro funcionalizado com PLL e vidro não funcionalizado (seção 4.1). Nos ensaios de resistência à tripsinização [122–126] não havia sido reportado um efeito dos fotossensibilizadores no escuro, o qual pode ser observado utilizando-se a técnica RICM.

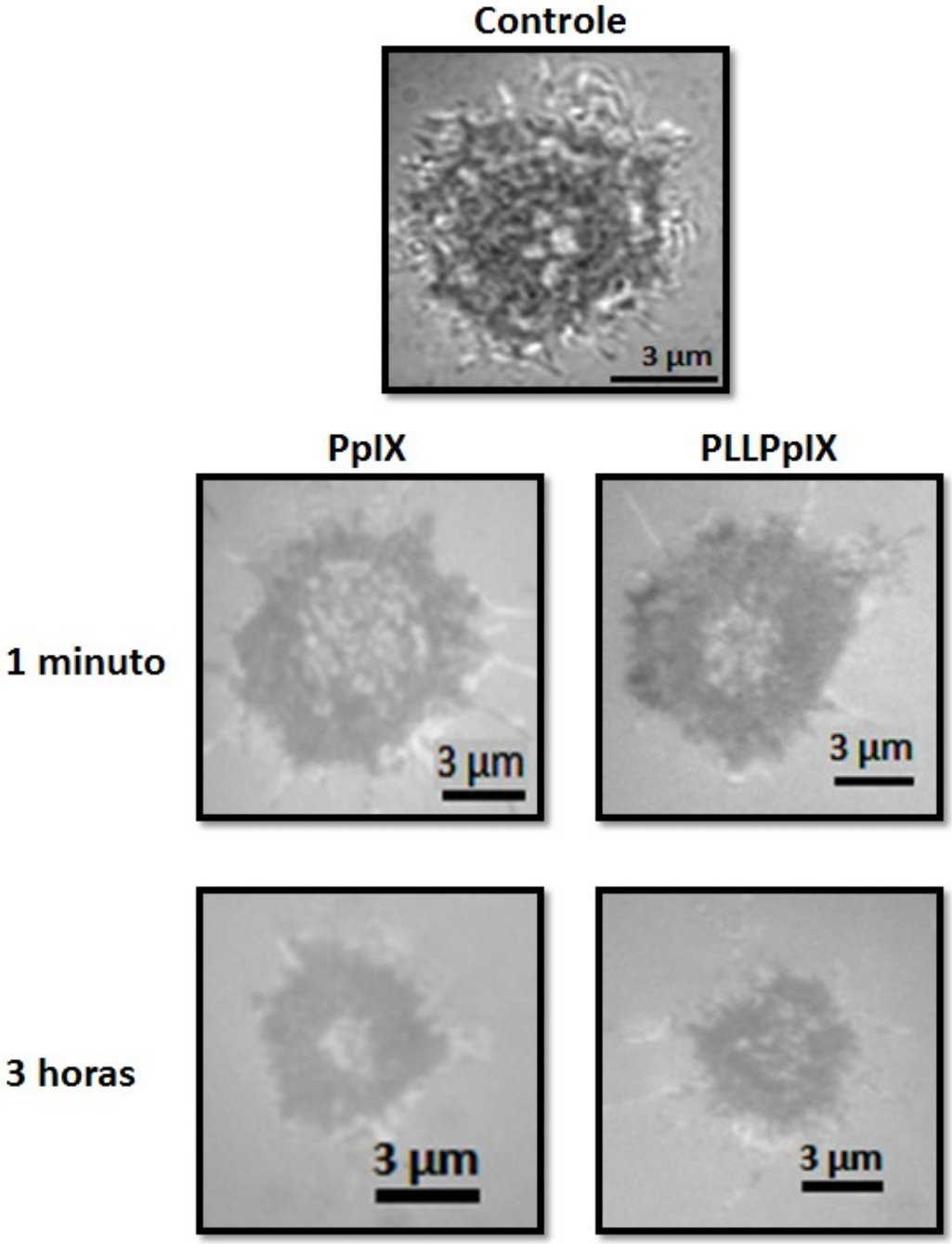


Figura 4.20: Imagens de RICM de células HeLa aderindo em superfície de vidro na presença de FBS visualizadas 1h após plaqueamento. As células foram incubadas com PpIX (absorbância 0,06) e PLLPpIX (absorbância 0,07) por 1 minuto ou 3h antes da tripsinização. Imagens obtidas à temperatura ambiente. Objetiva 100X/1,3.

Tabela 4.4: Média, mediana e valor máximo da distribuição de tamanhos da zona de adesão em função do tempo de incubação para células não irradiadas. Valores em μm^2. Após incubação, as células foram lavadas, tripsinizadas e visualizadas por RICM 1h após plaqueamento. PpIX: absorbância 0,06. PLLPpIX: absorbância 0,07. $N \geq 17$.

	Tamanho médio	**Mediana**	**Valor máximo**
Controle	17,1 ± 18,1	10,4	30,5
PpIX 1 minuto	118,7 ± 101,6	78,6	414,2
PpIX 3 horas	157,1 ± 196,1	88,2	1098,2
PLLPpIX 1 minuto	123,1 ± 74,5	115,2	266,7
PLLPpIX 3 horas	62,8 ± 63,0	46,6	246,7

Para 1 minuto de incubação, a razão entre o tamanho médio da zona de adesão de células tratadas e de células não tratadas é 6,9 e 7,2 para PpIX e PLLPpIX, respectivamente. Este resultado mostra que os fotossensibilizadores aumentam de quase uma ordem de magnitude a adesão de células em substratos sólidos bidimensionais. Como os dados publicados na literatura do efeito da iluminação desconsideravam este fato, é possível que se tenha erroneamente considerado que a PDT aumenta a adesão celular.

Note que não há diferença significativa entre os dois fotossensibilizadores. Com 1 minuto de incubação não há tempo suficiente para que ocorra uma mudança no padrão de expressão gênica ou síntese proteica, portanto, a resposta observada deve ser causada pela interação dos fotossensibilizadores com a membrana. Os dados de colocalização (seção 4.3.3) mostraram que ambos os fotossensibilizadores encontram-se na região da membrana plasmática após 1 minuto de incubação. Também, ambos os fotossensibilizadores apresentam

taxas de incorporação similares após este tempo de incubação (seção 4.3.3).

Após 3h de incubação, o efeito dos dois fotossensibilizadores na adesão celular é distinto. A PpIX tem um efeito maior do que a PLLPpIX no tamanho da zona de adesão. A razão entre o tamanho médio da zona de adesão de células tratadas e de células não tratadas é 9,2 e 3,7 para PpIX e PLLPpIX, respectivamente. Além disso, observa-se que o efeito da PpIX no aumento do tamanho da zona de adesão é maior após 3h de incubação do que após 1 minuto. O contrário ocorre com a PLLPpPIX, seu efeito no aumento do tamanho da zona de adesão é maior após 1 minuto de incubação do que após 3h. Os dados de colocalização mostram que os fotossensibilizadores não estão na membrana celular após 3h de incubação (seção 4.3.3) e, portanto, o efeito no escuro após 3h de incubação deve ser indireto, ou seja, decorrente de algum efeito no funcionamento de organelas celulares, as quais não fazem parte da maquinária da adesão celular. Este efeito indireto não será investigado com maior profundidade nesta tese.

Como as características estruturais dos fotossensibilizadores controlam sua interação com biomoléculas e organelas celulares, o efeito de características do fotossensibilizador tais como simetria, carga e coordenação a um metal foi avaliado na adesão de células HeLa em vidro na presença de FBS após incubação por 1 minuto.

A Figura 4.21 mostra imagens de RICM de células HeLa aderindo em superfície de vidro na presença de FBS após incubação com TMPyP, ZnTMPyP,

TSPP, CpPI e PpIX por 1 minuto (a fórmula estrutural das porfirinas encontra-se na página 66). Observa-se que o padrão da zona de adesão das células incubadas com todos os fotossensibilizadores não difere significativamente entre si e em relação ao que foi observado para células não tratadas com fotossensibilizador (seção 4.1). Neste caso também os fotossensibilizadores alteraram o tamanho da zona de adesão sem alterar o seu formato.

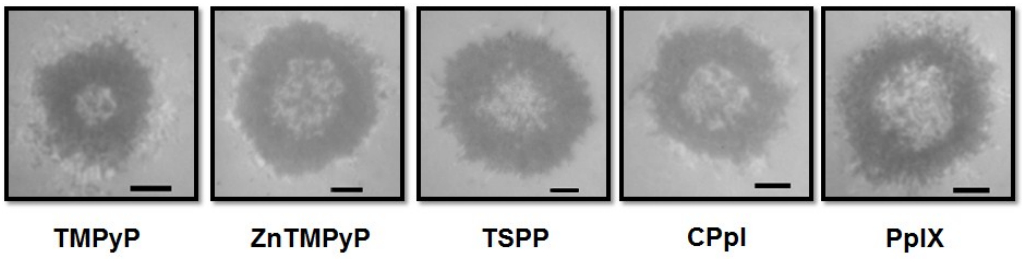


Figura 4.21: Imagens de RICM de células HeLa aderindo em superfície de vidro na presença de FBS visualizadas 1h após plaqueamento. As células foram incubadas com os fotossensibilizadores (absorbância 0,12) por 1 minuto antes da tripsinização. As zonas de adesão aparecem mais escuras que a luminosidade de fundo. Objetiva 100X/1,3. Barra de escala: 3 μm.

Calculando-se o tamanho médio da zona de adesão de uma população de células (Tabela 4.5), observou-se que todas as porfirinas estudadas causam um aumento no tamanho da zona de adesão comparado com o controle não tratado, mas com diferentes eficiências. A mais eficiente foi a PpIX e a menos eficiente foi a TMPyP. Entre as catiônicas, a presença do metal aumenta a eficiência da porfirina em 42%. Entre as aniônicas CPpI e TSPP, CPpI foi 29% mais eficiente.

Tanto CPpI quanto TSPP possuem quatro grupos negativamente carregados

Tabela 4.5: Comparação do tamanho das zonas de adesão, em μm^2, 1h após plaqueamento de células HeLa incubadas por 1 minuto com fotossensibilizadores porfirínicos (absorbância 0,12) e não irradiadas.

	Tamanho médio	**Mediana**	**Valor máximo**
Controle	17,1 ± 18,1	10,4	30,5
TMPyP	104,7 ± 108,7	75,3	517,3
ZnTMPyP	148,7 ± 132,0	110,9	520,9
TSPP	131,1 ± 63,3	125,2	305,2
CPpI	169,0 ± 122,6	133,6	493,0
PpIX	331,1 ± 289,9	221,7	1179,8

em pH fisiológico, mas estes grupos na CPpI estão na posição cis enquanto na TSPP eles estão na posição trans, o que torna a CPpI menos simétrica que a TSPP. TMPyP é uma molécula catiônica e simétrica, características que lhe conferem maior internalização na célula, mas menor interao com a membrana plasmtica. Isto ocorre em parte porque as moléculas catiônicas são atraídas pelo potencial de membrana mitocondrial [139, 143, 152] e em parte porque os quatro grupos carregados na posição trans diminuem o caráter anfifílico das moléculas [155]. PpIX, a molécula mais eficiente é também a mais assimétrica delas. Os dados de colocalização (seção 4.3.3) mostraram que, após 1 minuto de incubação, enquanto a PpIX esta mais concentrada na região perimembranar, a TMPyP está mais concentrada no citoplasma. Estes resultados indicam que a anfifilicidade é a característica que mais se correlaciona com o aumento da área de adesão.

Porfirinas anfifílicas ligam a vesículas em quantidades muito maiores e com maior afinidade do que é previsto pelos valores de coeficiente de partição

e este efeito é associado à assimetria da molécula: moléculas assimétricas intercalam melhor na membrana do que as moléculas simétricas [155]. A natureza da carga elétrica da porfirina também desempenha papel importante na sua interação com a membrana, devido à presença do glicocálice, o qual é negativamente carregado [3]. O esquema apresentado na Figura 4.22 ajuda a entender como a estrutura do fotossensibilizador afeta sua interação com a membrana no que diz respeito à simetria e à carga da molécula.

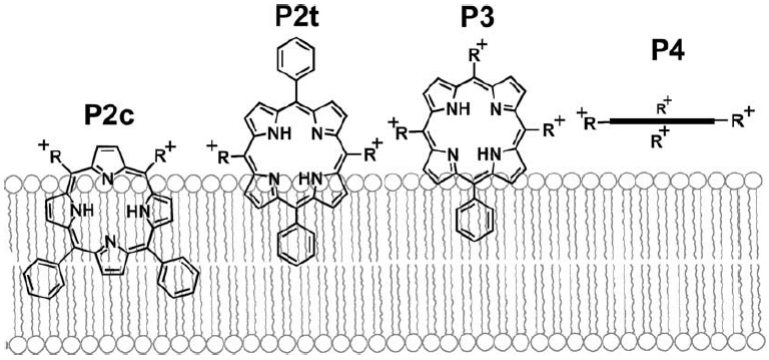


Figura 4.22: Esquema mostrando a interação com bicamadas lipídicas de diferentes porfirinas em função da carga e da simetria do fotossensibilizador. P2c = porfirina contendo dois grupos catiônicos na posição cis. P2t = porfirina contendo dois grupos catiônicos na posio trans. P3 = porfirina contendo três grupos catiônicos. P4 = porfirina contendo quatro grupos catiônicos. Esquema retirado de [155]. Este modelo de interação com a membrana foi comprovado por cálculos de dinâmica molecular [187].

A presença de metais no anel porfirínico também afeta a interação destas moléculas com a membrana. Porfirinas metaladas interagem melhor com a membrana devido à coordenação entre o metal e os grupos fosfato dos fosfolipídios [188, 189]. Foi demonstrado por microscopia confocal que a presença de Zn diminui a interação da TMPyP com a mitocôndria e aumenta sua in-

teração com a membrana de células HeLa [139].

Os resultados sugerem que o efeito direto dos fotossensibilizadores na adesão no escuro pode ser correlacionado com a capacidade das moléculas em se intercalarem na membrana plasmática. O processo de adesão e espalhamento celular requer a extensão da membrana plasmática e a agregao dos receptores, as quais são controladas pela rigidez da membrana (seção 1.2). Foi reportado para fibroblastos que a adição de compostos anfifílicos, que aumentam a área da membrana e diminuem sua rigidez, leva a um aumento da taxa de espalhamento celular e extensão de lamelipódios [190]. Assim, o aumento na área de adesão estaria relacionado a um efeito de diminuição na rigidez da membrana causado pela presença das porfirinas, o qual será maior quanto mais anfifílica for a molécula.

Além da adesão *per si*, foi avaliado o efeito de fotossensibilizadores no escuro na migração das células e na expressão de integrinas. Migração é um importante requisito para a formação de metástases, a qual envolve o destacamento de células do tumor principal e a adesão em um tecido distante [191]. Para determinar se o aumento na adesão causado pelos fotossensibilizadores no escuro também foi acompanhado de mudança na migração, um ensaio de ferida, o qual avalia a migração bidirecional das células, foi realizado. Como fotossensibilizadores modelos para este estudo escolheu-se PpIX e TMPyP, as quais foram incubadas nas células por 3h. Após incubação, uma ferida de 2,67 ± 0,09 mm foi realizada nas monocamadas de células (Figura 4.23 A) e as células foram fotografadas a cada 24h até que a ferida do controle não

tratado com fotossensibilizador se fechasse (Figura 4.23 B), processo que levou três dias. As distâncias percorridas pelas células foram então calculadas (Figura 4.23 C). Verificou-se que o tratamento com ambos os fotossensibilizadores diminui a velocidade de migração das células comparada ao controle não tratado. No intervalo de tempo em que o controle percorreu 100% da distância correspondente ao tamanho da ferida, as células tratadas com PpIX percorreram 82% e as células tratadas com TMPyP 92% desta distância.

Nota-se uma correlação entre a velocidade de migração e o aumento da zona de adesão. As células tratadas com PpIX, as quais apresentaram maior aumento no tamanho da zona de adesão (Tabela 4.5), migraram menos do que as células tratadas com TMPyP, as quais apresentaram menor aumento no tamanho da zona de adesão (Tabela 4.5). Uma leve redução na capacidade migratória também foi reportada em células de gliomas tratadas com ácido 5-aminolevulínico (ALA), um precursor da PpIX, na ausência de irradiação [131].

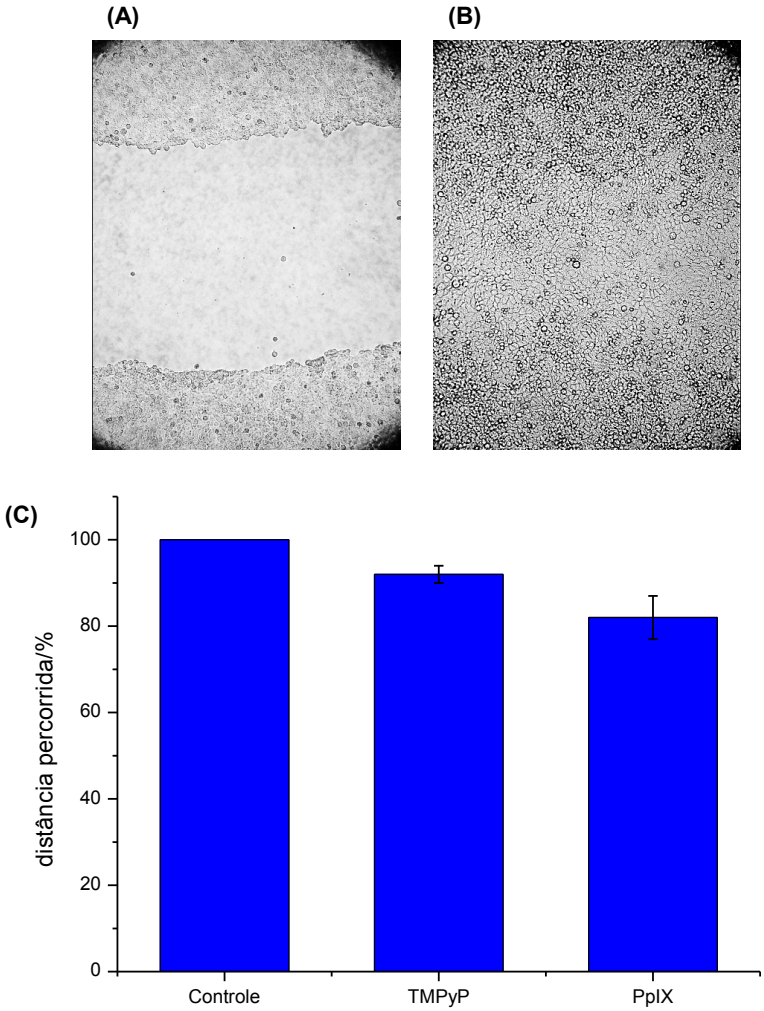


Figura 4.23: Interferência dos fotossensibilizadores na migração celular. Após incubação por 3h com o fotossensibilizador (absorbância 0,06), as células foram lavadas e uma ferida foi criada na monocamada de células (A). O fechamento das lesões pela migração celular foi acompanhado até que a ferida do controle sem fotossensibilizador estivesse completamente fechada (B) e a distância percorrida pelas células foi calculada (C). No tempo em que o controle percorreu 100% da distância correspondente ao tamanho da ferida, as células tratadas com PpIX percorreram 82% e as tratadas com TMPyP 92% desta distância.

Como as integrinas são receptores que controlam a adesão celular, alterações na adesão podem ser acompanhadas por mudanças no padrão de expressão de integrinas na superfície celular. Sendo assim, propôs-se avaliar se o aumento na adesão observado com os fotossensibilizadores no escuro era acompanhado de alterações no padrão de integrinas expressas na superfície das células (Figura 4.24). Como no ensaio de ferida, este estudo foi realizado utilizando-se PpIX e TMPyP (absorbância 0,06) incubados por 3h. Adicionalmente, realizou-se o mesmo estudo com células plaqueadas em superfícies funcionalizadas com PLL, outra situação na qual se observou aumento na adesão celular (seção 4.1).

Apesar dos diferentes mecanismos que governam o efeito dos fotossensibilizadores e da superfície funcionalizada com PLL na adesão celular, observa-se que os três casos tem em comum um aumento da expressão de αV e αVα3 e uma diminuição da expressão de α2 e α3 em relação ao controle. Embora seja significativamente diferente do controle, a análise estatística revela que não há diferença entre o nível de expressão de αV entre PLL, TMPyP e PpIX. Isto sugere que os diferentes mecanismos que levam ao aumento do tamanho da zona de adesão, convergem quanto ao nível de expressão de αV na superfície das células. Integrinas αV parecem ser particularmente importantes durante o remodelamento de tecido, seja ele associado ao reparo de lesão, angiogênese ou câncer. [26, 108, 192, 193] As integrinas αV têm sido implicadas na invasão tumoral, entretanto, vale lembrar que as integrinas *per si* não são oncogênicas. Aqui nós observamos um aumento da adesão e uma diminuição da migração associada ao aumento da expressão de αV na

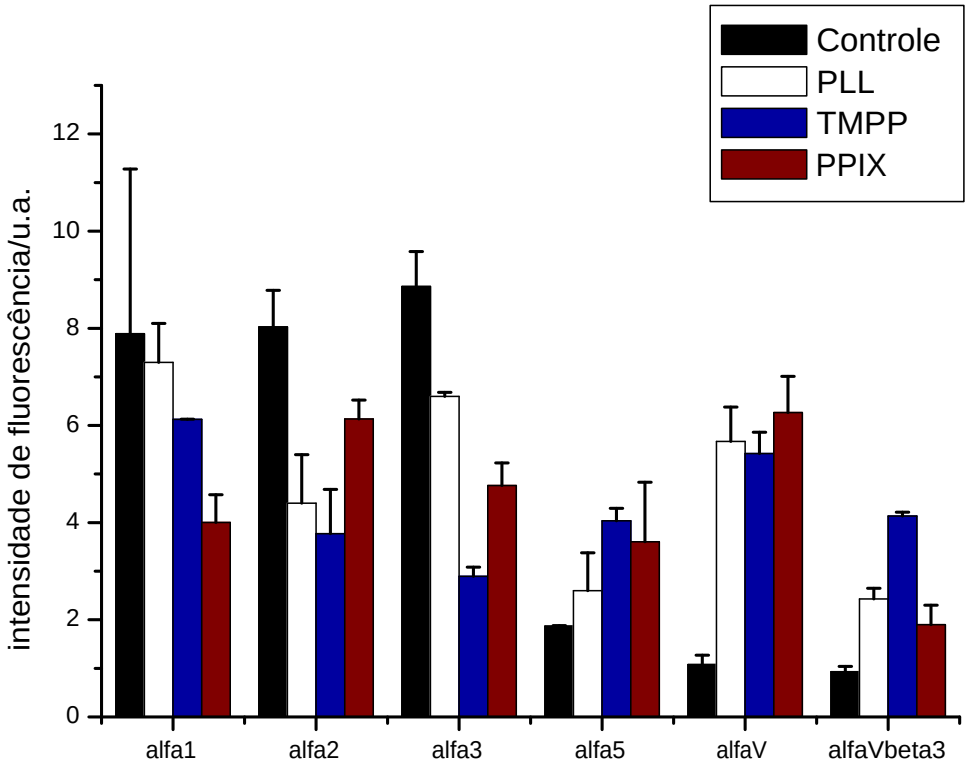


Figura 4.24: Perfil de integrinas expressas na superfície de células HeLa. Controle: células aderindo a TCPS (do inglês, tissue culture polystyrene standard) não tratadas com fotossensibilizador. PLL: células não tratadas com fotossensibilizador aderindo a TCPS funcionalizado com PLL. TMPyP: células tratadas com TMPyP e não irradiadas aderindo a TCPS. PpIX: células tratadas com PpIX e não irradiadas aderindo a TCPS. Dados normalizados pela intensidade de fluorescência do controle negativo (BSA). Os fotossensibilizadores foram incubados por 3h (absorbância 0,06).

superfície da linhagem tumoral HeLa. Levando em conta a importância do remodelamento para as células e especialmente em superfícies funcionalizadas com PLL (seção 4.1), parece que a maior capacidade de remodelamento conferida pela maior expressão de αV correlaciona com a maior adesão celular.

Além disso, o papel das integrinas é tipo celular-específico. Por exemplo, enquanto foi vista uma correlação positiva entre invasão e $\alpha 2\beta 1$ em melanoma, $\alpha \mathrm{V}\beta 3$ em câncer ovariano, $\alpha 6\beta 4$ em carcinoma colorretal e $\alpha 6\beta 1$ em glioma, também foi observado que as integrinas podem servir como efetores negativos que impedem ou neutralizam a invasão, tais como $\alpha \mathrm{V}\beta 3$ em melanoma, $\alpha 2\beta 1$ em carcinoma mamário e $\alpha 5\beta 1$ em carcinoma de cólon. [194]

Também é preciso ter em mente que as integrinas não são os únicos receptores a mediarem a adesão celular, há também os sindecans, que são proteoglicanos de heparam sulfato transmembranares. Alguns estudos têm apontado para o papel crítico dos sindecans na invasão tumoral e o sinergismo entre integrinas e sindecans na determinação do comportamento celular [195, 196].

Em suma, utilizando a técnica de RICM observou-se que os fotossensibilizadores são capazes de aumentar a adesão celular mesmo na ausência de irradiação. Este efeito não havia sido observado nos ensaios de resistência à tripsinização normalmente utilizados na literatura. O aumento da adesão correlaciona com a diminuição da migração, a qual é uma importante etapa do processo metastático. Quando os fotossensibilizadores se localizam na

membrana plasmática, o efeito na adesão pode ser correlacionado com a capacidade das moléculas em se intercalarem nela. Quanto mais anfifílico for o fotossensibilizador, maior será seu efeito na adesão. Este efeito pode ser explicado por uma diminuição na rigidez da membrana que ocorre pela presença do fotossensibilizador intercalado nela, uma vez que a rigidez da membrana controla o processo de adesão e espalhamento celular. Quando os fotossensibilizadores não estão na região da membrana plasmática e sim em organelas celulares, o efeito na adesão celular é indireto e necessita maior investigação. Entretanto, PpIX foi mais eficiente em aumentar a adesão celular no escuro do que PLLPpIX, o que pode ser relacionado a diferenças de citolocalização. A análise do padrão de expressão de integrinas na superfície celular revela que o aumento no tamanho da zona de adesão correlaciona com o aumento na expressão de αV.

4.3.2 Após irradiação

A Figura 4.25 apresenta imagens de RICM de células HeLa aderindo em superfície de vidro na presença de FBS após incubação com PLLPpIX e PpIX por 1 minuto ou 3h seguida de irradiação por 1 minuto. Observa-se que o padrão da zona de adesão após fotossensibilização das células incubadas com ambos fotossensibilizadores por 1 minuto não difere significativamente entre si (A e B) e em relação ao que foi observado para células não tratadas com fotossensibilizador ou tratadas com fotossensibilizador sem irradiação (Figura 4.20). O mesmo acontece para células incubadas com PpIX por 3h (C). Em (D) observa-se a imagem típica de células não aderidas, visualizadas aqui após tratamento com PLLPpIX por 3h. As áreas de adesão foram quantificadas e a Tabela 4.6 sumariza o efeito dos fotossensibilizadores PpIX e PLLPpIX na adesão de células HeLa em função do tempo de incubação após irradiação por 1 minuto.

É notável a habilidade da PLLPpIX em modular a adesão celular após 3h de incubação: na ausência de luz, esta molécula leva a um aumento da adesão celular em relação ao controle não tratado (Tabela 4.4) e após irradiação ela completamente impede a adesão celular (Figura 4.25 D). Uma vez que a PpIX não apresenta este efeito de modulação da adesão celular e alterações na estrutura molecular do fotossensibilizador podem modificar sua interação com macromoléculas (como será demonstrado de maneira mais aprofundada na seção 4.4) e com organelas celulares [152], esta habilidade em modular a adesão celular deve ser conferida pela presença do polímero (a explicação

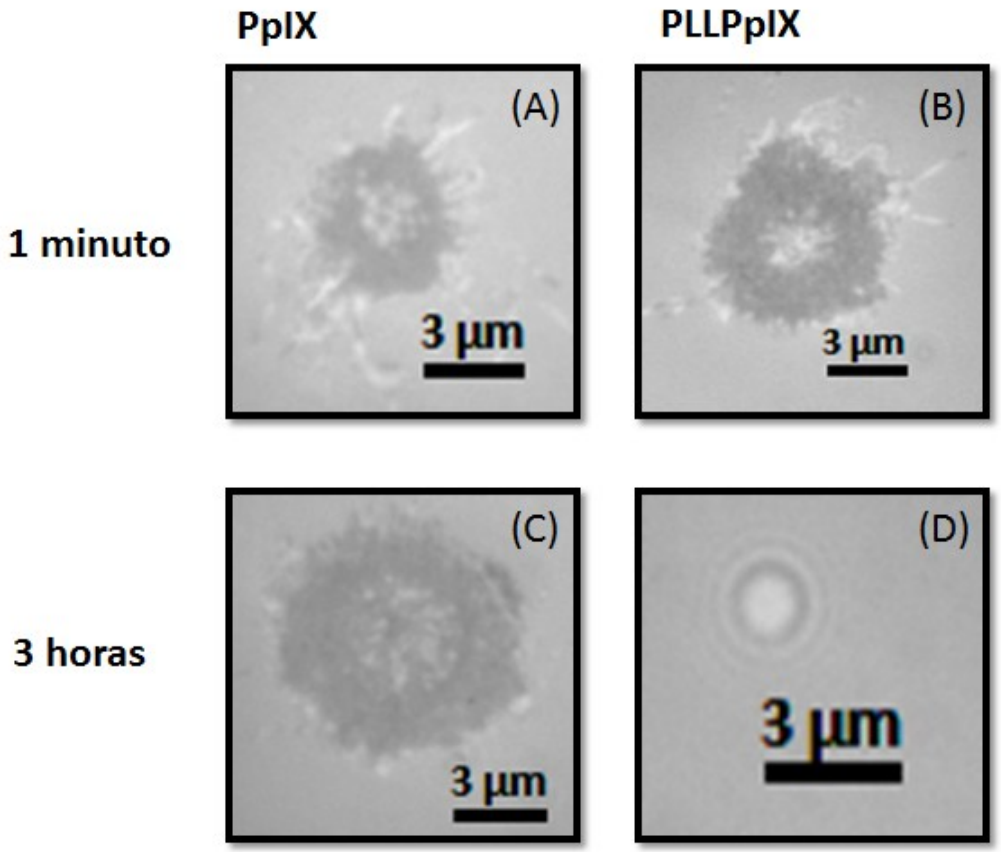


Figura 4.25: Imagens de RICM de células HeLa aderindo em superfície de vidro na presença de FBS, visualizadas 1h após o plaqueamento. As células foram incubadas com PpIX (absorbância 0,06) e PLLPpIX (absorbância 0,07) por 1 minuto ou 3h, irradiadas por 1 minuto e tripsinizadas. Objetiva 100X/1,3.

mecanística deste fenômeno será apresentada no decorrer do texto).

Tabela 4.6: Média, mediana e valor máximo da distribuição de tamanhos da zona de adesão em função do tempo de incubação para células irradiadas. Valores em μm^2. Após incubação, as células foram lavadas, irradiadas por 1 minuto com luz azul (filtro FITC), tripsinizadas e visualizadas por RICM 1h após plaqueamento. PpIX: absorbância 0,06. PLLPpIX: absorbância 0,07. $N \geq 15$.

	Tamanho médio	**Mediana**	**Valor máximo**
Controle irradiado	35,4 ± 23,5	32,9	92,5
PpIX 1 minuto	54,7 ± 82,7	24,7	320,2
PpIX 3 horas	172,5 ± 232,0	69,0	968,8
PLLPpIX 1 minuto	56,1 ± 45,5	45,7	207,1
PLLPpIX 3 horas	*células não aderidas*		

Com 1 minuto de incubação observou-se um aumento da zona de adesão em relação ao controle irradiado sem fotossensibilizador, sem diferença entre os fotossensibilizadores (Tabela 4.6), como foi observado na ausência de irradiação (Tabela 4.4). A similaridade do efeito dos dois fotossensibilizadores na adesão celular pode ser associada a ambos estarem presentes na região perimembrar após 1 minuto de incubação, à similar taxa de incorporação (seção 4.3.3) e a semelhança na eficiência de geração de oxigênio singlete (seção 4.2). Nota-se também que há uma diminuição de cerca de 50% no tamanho da zona de adesão quando as células tratadas com os fotossensibilizadores são irradiadas, comparadas às células tratadas com os fotossensibilizadores sem irradiação (Tabela 4.4). Assim, utilizando-se as células tratadas com fotossensibilizador no escuro como controle, os resultados mostram que a PDT

diminui a adesão celular, ao contrário do que havia sido reportado na literatura. [122–126]

Os dois possíveis alvos das reações de fotossensibilização são os lipídios ou as proteínas. Danos em lipídios das membranas tendem a ocasionar a formação de hidroperóxidos que causam expansão da membrana e diminuição da rigidez [106, 190]. Olhando simplesmente para o efeito da oxidação dos lipídios e expansão da membrana, poderíamos concluir que deveria haver um aumento da adesão e não diminuição como foi observado. É possível que ocorra a oxidação de proteínas de membrana que se sobreporiam ao efeito do aumento de fluidez das membranas [112, 197]. No que diz respeito à afinidade das integrinas com as proteínas da ECM, observou-se que a oxidação das proteínas de matriz pode levar a inibição da adesão celular, conforme será discutido na seção 4.4.

Outra hipótese para explicar, na presença dos fotossensibilizadores, a menor adesão após irradiação comparada ao controle não irradiado seria que o aumento da adesão celular causado pela diminuição da rigidez da membrana alcança um valor ótimo e então decai fazendo-se com que não se observe um efeito aditivo gerado pelo fotossensibilizador intercalado na membrana e pela formação de hidroperóxidos. Entretanto, a observação de que a adesão de fibroblastos aumenta quase linearmente com a adição de concentrações crescentes de detergente (até a concentração de 0,4 mM) [190] enfraquece esta hipótese.

Com 3h de incubação, PLLPpIX impede a adesão celular após irradiação, enquanto PpIX praticamente não muda a adesão comparada com o controle sem irradiação (Tabela 4.4). As diferenças observadas entre PpIX e PLLPpIX poderiam ser relacionadas a diferenças de incorporação ou citolocalização. Como os fotossensibilizadores não aparecem na membrana celular (seção 4.3.3) e as organelas celulares não estão diretamente associadas à maquinaria de adesão celular, os efeitos dos fotossensibilizadores após 3h de incubação seguida de irradiação são indiretos. Além disso, a ausência do efeito da irradiação sugere que a PpIX afeta a adesão celular principalmente devido a sua intercalação na membrana de organelas celulares e não à formação de espécies reativas.

A ausência de células aderidas após tratamento com PLLPpIX pode ser devida ao desencadeamento de um processo de morte celular programada causada por dano às mitocôndrias [198] ou devida a uma alteração na capacidade das integrinas ligarem-se às proteínas da ECM[2]. Como o ensaio de exclusão do corante azul de tripan realizado imediatamente após o tratamento atestou 99% de células viáveis e como após 3h de incubação PLLPpIX não aparece na região da membrana (seção 4.3.3), a primeira hipótese é a mais provável. Neste caso, a ausência de adesão seria consequência da apoptose. PLLPpIX sendo catiônica, teria maior afinidade pelas mitocôndrias do que a PpIX, o que explicaria porque não se observou ausência de células aderidas após tratamento com PpIX.

[2]É descrita na literatura um tipo de apoptose (*anoikis*) que é desencadeada por ausência de contato com a ECM. [5–7]

A Figura 4.26 mostra micrografias de transmissão de células HeLa incubadas com PLLPpIX por 3h, irradiadas por 1 minuto, tripsinizadas e visualizadas 1h após o plaqueamento. Características morfológicas como formação de bolhas e contração do conteúdo celular são observadas.

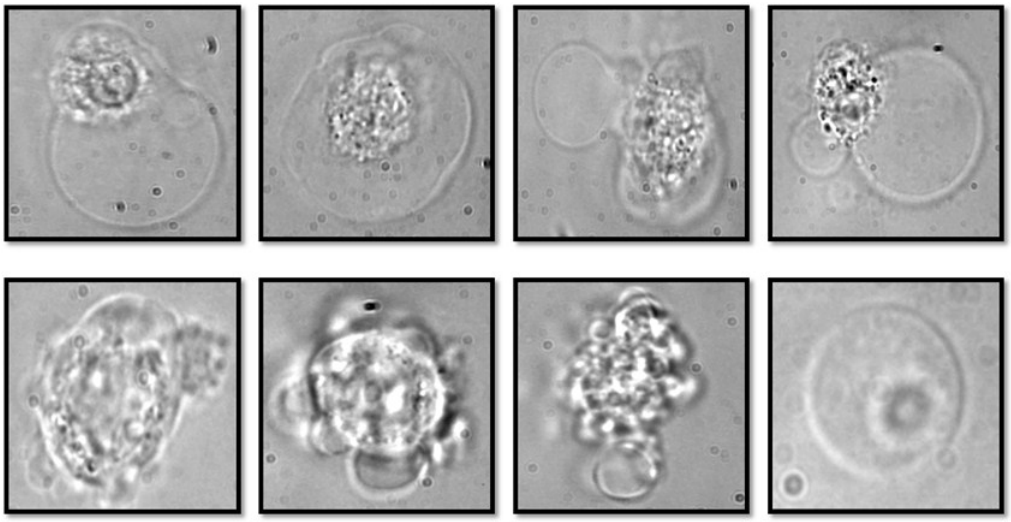


Figura 4.26: Micrografias de transmissão de células HeLa incubadas com PLLPpIX por 3h, irradiadas por 1 minuto (Filtro FITC), tripsinizadas e visualizadas 1h após o plaqueamento.

Características morfológicas do processo apoptótico, o qual termina na desintegração das células em vesículas, os chamados corpos apoptóticos, incluem o aparecimento de protusões de membrana na forma de bolhas e contração do conteúdo celular [199,200]. Por outro lado, a formação de corpos apoptóticos também pode ocorrer mesmo sem a fragmentação do DNA e ativação de caspase-3, sinais clássicos de apoptose, devido à ativação de transglutaminases, enzimas dependentes de Ca^{2+} que catalisam a formação de ligações

cruzadas em proteínas [201]. O mecanismo que leva a formação de corpos apoptóticos após PDT mediada por PLLPpIX ainda necessita maior investigação.

Em suma, quando os fotossensibilizadores estão concentrados na região perimembranar e as células são irradiadas, há um aumento da adesão em relação ao controle sem fotossensibilizador. Entretanto, este aumento na adesão é menor do que o observado na ausência de irradiação. Em ambos os casos, não se observou diferença entre os fotossensibilizadores após 1 minuto de incubação. Assim, utilizando como controle células tratadas com o fotossensibilizador no escuro, a PDT não leva a um aumento da adesão celular e sim a uma diminuição. Com 3h de incubação, PLLPpIX impede a adesão celular, diferentemente do que ocorreu na ausência de irradiação, enquanto PpIX praticamente não muda a adesão comparada com o controle sem irradiação. Esta capacidade de modular a adesão celular é associada à presença do polímero, o qual modifica a interação da porfirina com macromoléculas e organelas celulares. Sendo catiônica, PLLPpIX teria maior afinidade pelas mitocôndrias e, portanto, estaria mais concentrada nesta organela do que a PpIX. A ausência do efeito da irradiação no caso da PpIX sugere que esta molécula afeta a adesão celular principalmente devido a sua intercalação na membrana de organelas celulares e não à formação de espécies reativas. Embora a viabilidade celular tenha sido checada via ensaio de integridade de membrana imediatamente após os tratamentos, a ausência de adesão celular após tratamento com PLLPpIX parece estar associada ao desencadeamento de um mecanismo de morte celular programada, segundo dados morfológicos

obtidos 1h após plaqueamento.

A seguir descrevemos os dados de incorporação e citolocalização dos fotossensibilizadores que embasaram nossas conclusões.

4.3.3 Interação dos fotossensibilizadores com células

Além das propriedades fotofísicas similares, PpIX e PLLPpIX possuem também taxas de incorporação similares ($p > 0{,}05$) em células HeLa em função do tempo de incubação (Figura 4.27), indicando que este parâmetro não deve ser o responsável pelas diferenças observadas entre PpIX e PLLPpIX. As taxas de incorporação obtidas para 3h são compatíveis com os valores encontrados na literatura para a incorporação de porfirinas em células HeLa [139, 152].

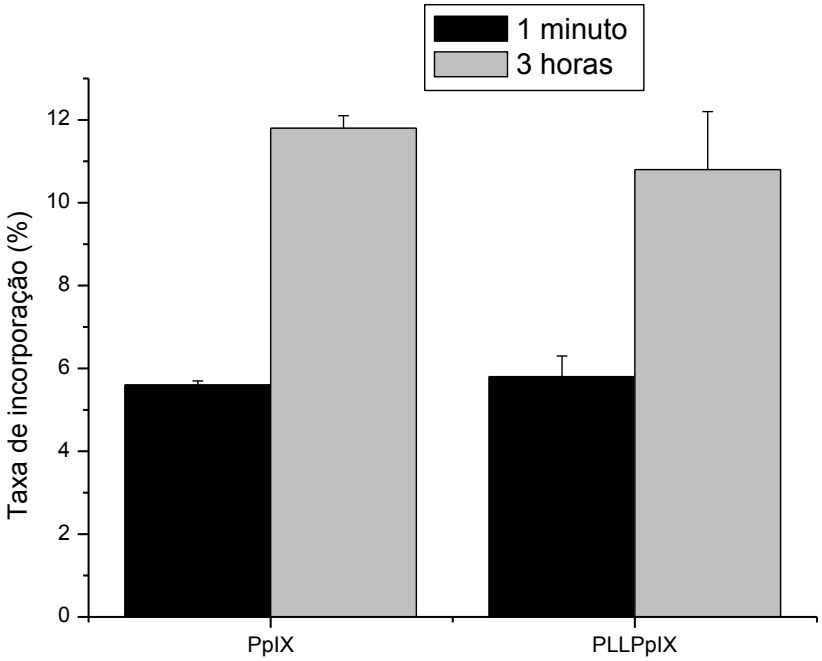


Figura 4.27: Taxa de incorporação dos fotossensibilizadores PpIX e PLLPpIX em células HeLa, investigada medindo a intensidade de fluorescência dos fotossensibilizadores no meio extracelular e no lisado de células após incubação por 1 minuto e 3h.

A internalização de moléculas pelas células pode ocorrer por dois diferentes mecanismos: endocitose ou partição seguida de difusão no meio intracelular [202]. Entretanto, qualquer que seja o mecanismo de incorporação, deve haver uma interação inicial do fotossensibilizador com a membrana, a qual pode ocorrer por interação eletrostástica, hidrofóbica, hidratação ou coordenação [143, 147, 148, 155, 188, 203].

Em um estudo com conjugados PLL-clorina e6 com diferentes graus de substituição da cadeia polimérica [186], observou-se aumento da incorporação celular com o aumento da taxa de substituição, sugerindo que a ligação às células é mediada mais pelo fotossensibilizador do que pela cadeia polimérica. Ou seja, a incorporação pelas células é principalmente dirigida pelas interações hidrofóbicas do que pela atração eletrostática.

Uma vez que tanto PLLPpIX quanto PpIX mostraram taxas de incorporação similares, acredita-se que ambos os fotossensibilizadores são internalizados pela mesma via. A cinética da internalização mediada por endocitose é mais lenta do que a mediada por partição seguida de difusão [203], assim a maior parte da incorporação ter ocorrido nos primeiros minutos de incubação sugere que a difusão é o mecanismo mais importante de internalização destes fotossensibilizadores.

Para testar esta hipótese, a incorporação da PpIX foi avaliada após tratamento das células para inibir os mecanismos de endocitose. Endocitose é um processo dependente de energia livre celular enquanto a difusão não

é. Portanto, a endocitose é mais impedida quando a incubação é realizada a baixa temperatura (4 °C ao invés de 37 °C) [202]. A endocitose pode ser mediada por receptor. A via mais comum é aquela assistida por clatrina. O pré-tratamento das células com meio hipertônico antes da exposição ao fotossensibilizador inibe esta via. A endocitose também pode ser realizada através de microdomínios ricos em colesterol, conhecidos como balsas lipidícas. O pré-tratamento das células com β-ciclodextrina antes da exposição ao fotossensibilizador inibe esta via. Moléculas que são internalizadas via vesículas recobertas por clatrina são tipicamente destinadas a degradação enzimática nos lisossomos, enquanto que a internalização independente de clatrina está associada a uma via não degradativa. [204]

A Figura 4.28 mostra as taxas de incorporação da PpIX após tratamento para inibir as vias endocíticas. Não foi observada uma alteração significativa nas taxas de incorporação, indicando que a PpIX é internalizada por difusão e não por endocitose. O experimento com a PLLPpIX ainda não foi realizado, mas clorina e6 conjugada à PLL (peso molecular 35-55 KDa) mostrou incorporação similar em função do tempo em células de carcinoma epidermóide a 4 °C e a 37 °C, um indicativo de que o conjugado PLL-fotossensibilizador é internalizado por um mecanismo independente da maquinaria endocítica [184].

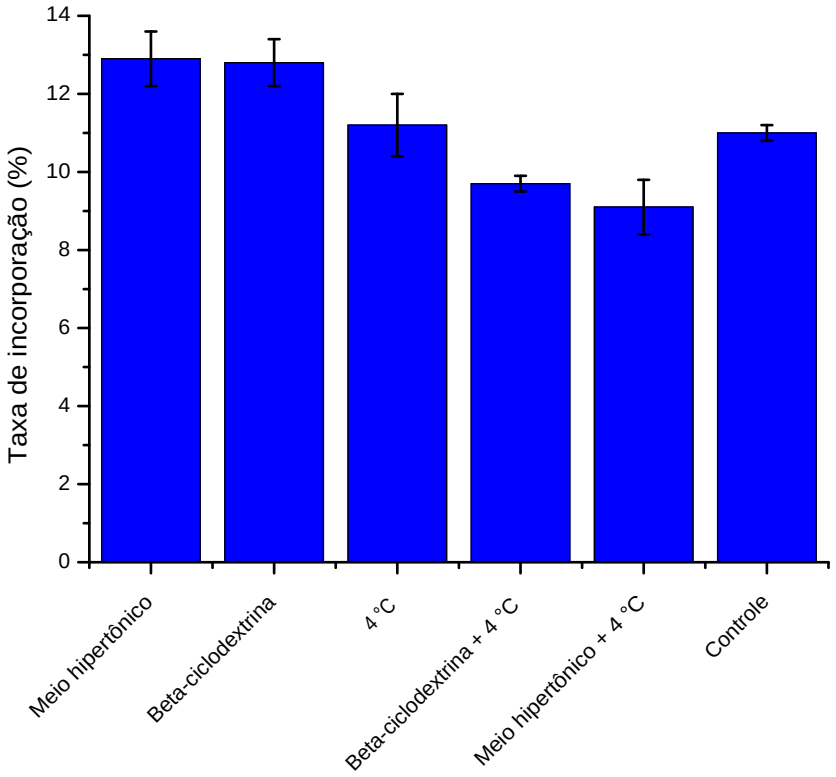


Figura 4.28: Taxa de incorporação da PpIX em células HeLaapós inibição das vias de endocitose. As células foram pré-tratadas com sacarose 0,45M para inibir a via mediada por clatrina, deixadas durante a incubação com o fotossensibilizador a 4°C para inibir o transporte ativo e pré-tratadas com β-ciclodextrina 100 μM para inibir a via mediada por balsas lipidícas. As inibições duplas servem para impedir que uma via endocítica seja compensada por outra. Os pré-tratamentos foram realizados 30 minutos antes da incubação com PpIX por 10 minutos.

Com relação à citolocalização, a sobreposição das imagens de transmissão das células com imagens de fluorescência do marcador de mitocôndrias (Mitotracker Green) e dos fotossensibilizadores após 1 minuto de incubação é mostrada na Figura 4.29. A eventual colocalização do marcador (fluorescência em verde) com PpIX e PLLPpIX (fluorescência em vermelho) pode ser visualizada pelo aparecimento da cor amarela nas imagens, enquanto a eventual colocalização do marcador com a TMPyP (fluorescência em azul) pode ser visualizada pelo aparecimento da cor ciano nas imagens. Observa-se que a PpIX concentra-se quase que totalmente na região perimembranar (A), a PLLPpIX se distribui no citoplasma e na região perimembranar (B) e a TMPyP concentra-se quase que totalmente no citoplasma (C).

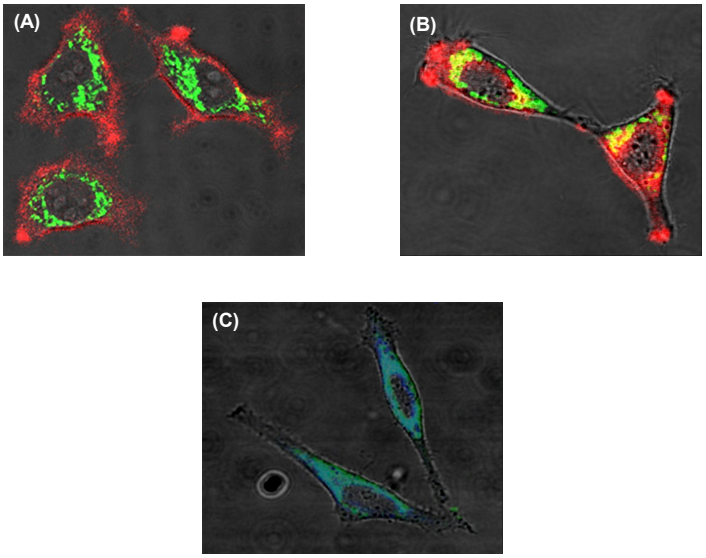


Figura 4.29: Análise da citolocalização dos fotossensibilizadores após 1 minuto de incubação via microscopia confocal. Sobreposição das imagens de transmissão (aumento de 400x) e de fluorescência dos fotossensibilizadores (A) PpIX e (B) PLLPpIX em vermelho, TMPyP (C) em azul e do marcador de mitocôndrias MitoTracker (em verde).

Dentre os vários coeficientes que podem ser utilizados para quantificar a colocalização de dois marcadores foi escolhido o coeficiente de Manders, que neste caso representa quanto do fotossensibilizador colocaliza com o marcador de mitocôndrias [205]. Observa-se que após 1 minuto de incubação apenas 11% da PpIX encontra-se nas mitocôndrias, contra 45% da PLLPpIX e 86% da TMPyP (Tabela 4.7).

A Figura 4.30 mostra a sobreposição das imagens de transmissão das células com imagens de fluorescência do marcador de mitocôndrias e dos fotossensibilizadores PLLPpIX (A) e PpIX (B) após 3h de incubação. Observa-se que os fotossensibilizadores concentram-se quase que totalmente no citoplasma: 91% de colocalização com o marcador de mitocôndrias no caso da PLLPpIX e 85% no caso da PpIX (Tabela 4.7).

Tabela 4.7: Índice de colocalização fotossensibilizador/Mitotracker após 1 minuto e 3h de incubação. O coeficiente de Manders foi calculado utilizando o plugin JACoP do programa ImageJ e representa quanto do fotossensibilizador colocaliza com o marcador de mitocôndrias. $N \geq 10$.

Fotossensibilizador	**Coeficiente de Manders**	
	1 minuto	*3 horas*
PpIX	0,11 ± 0,05	0,85 ± 0,08
PLLPpIX	0,45 ± 0,09	0,91 ± 0,06
TMPyP	0,86 ± 0,21	*não analisado*

PpIX adicionada externamente se distribui entre lisossomos e mitocôndrias [206]. Como moléculas catiônicas são atraídas pelo potencial de membrana

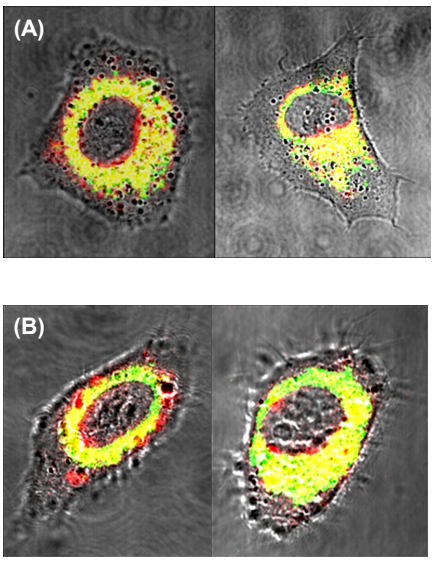


Figura 4.30: Análise da citolocalização dos fotossensibilizadores após 3h de incubação via microscopia confocal. Sobreposição das imagens de transmissão (aumento de 400X) e de fluorescência dos fotossensibilizadores (A) PpIX e (B) PLLPpIX em vermelho e do marcador de mitocôndrias MitoTracker em verde.

mitocondrial [143], é razoável assumir que a afinidade da PLLPpIX pelas mitocôndrias seja maior do que a da PpIX. Um estudo comparando hematoporfirina IX (produzida por hidroxilação das olefinas periféricas da PpIX) e um derivado catiônico da PpIX mostraram que o derivado catiônico colocaliza quase que exclusivamente nas mitocôndrias (95%) enquanto a hematoporfirina IX se distribui entre lisossomos (36%) e mitocôndrias (50%) [152]. Além de mitocôndrias e lisossomos, PpIX pode também se acumular em outros sistemas membranares como, por exemplo, o retículo endoplasmático [207]. Segundo os dados de colocalização obtidos, PLLPpIX apresentou afinidade um pouco maior pelas mitocôndrias do que PpIX.

Em suma, os diferentes efeitos apresentados pelos fotossensibilizadores na

adesão celular podem ser correlacionados a diferenças de citolocalização, a qual por sua vez depende da estrutura da molécula. As taxas de incorporação mostraram-se semelhantes e não devem estar contribuindo para as diferenças observadas entre PpIX e PLLPpIX na modulação da adesão celular.

4.4 Efeito da fotossensibilização do soro fetal bovino na adesão celular

Quando um fotossensibilizador entra em contato com um tecido, devido ao fenômeno de partição, uma parte das moléculas permanece na matriz extracelular enquanto a outra entra na célula. Sendo assim, decidiu-se investigar o efeito dos fotossensibilizadores PLLPpIX e PpIX na adesão celular após tratamento das proteínas de matriz. Como estes fotossensibilizadores apresentam propriedades fotofísicas similares (seção 4.2), foi possível estudar a relação entre a estrutura e a capacidade destas moléculas em modular a adesão de células HeLa, em vidro na presença de soro fetal bovino (FBS).

A adesão celular foi estudada por RICM utilizando a metodologia apresentada na seção 4.1. Com esta metodologia foi possível observar a adesão celular em todas as suas etapas, desde o momento em que a célula está pairando próxima da superfície até o momento em que a célula está completamente espalhada. Assim, quando células HeLa são colocadas para aderir em uma superfície de vidro na presença de meio de cultura suplementado com 10% de FBS, a imagem de RICM que é tipicamente observada está mostrada na Figura 4.31 A. Como descrito anteriormente (seção 3.3.8), a zona de adesão é definida como as regiões mais escuras que a luminosidade de fundo.

Uma das maneiras pelas quais a PDT pode interferir no processo de adesão celular é através da oxidação de proteínas da matriz extracelular. Quando o meio de cultura suplementado com FBS é irradiado por 1 minuto na pre-

sença de um dos fotossensibilizadores, duas situações são observadas: (1) se o fotossensibilizador é a PpIX livre, as células aderem a superfície num padrão que não difere muito daquele observado na ausência do fotossensibilizador (compare Figura 4.31 A e B); (2) se o fotossensibilizador é a PLLPpIX, as células ficam pairando sobre a superfície sem conseguir aderir (Figura 4.31 C).

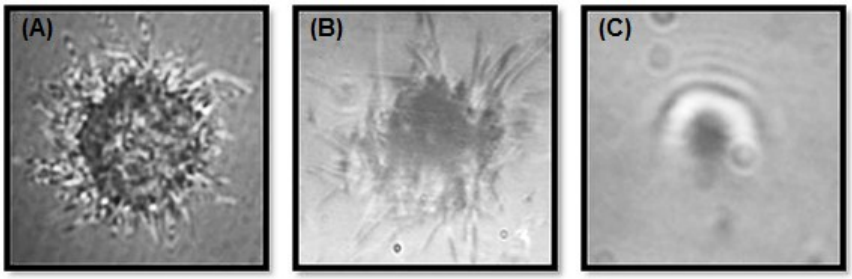


Figura 4.31: Micrografias de RICM de células HeLa durante a adesão a uma superfície de vidro na presença de FBS não tratado (A), tratado com PpIX + irradiação (B) e tratado com PLLPpIX + irradiação (C). Imagens obtidas 2h após o plaqueamento. FBS foi irradiado por 1 minuto utilizando o filtro FITC do microscópio, na presença dos fotossensibilizadores com absorbância igual a 0,12.

Quando a concentração de PLLPpIX ou o tempo de irradiação são diminuidos à 1/4 dos valores anteriores (Figura 4.31), ou seja, absorbância de 0,03 e tempo de irradiação de 15 s, as células voltam a ser capazes de aderir (Figuras 4.32 A e B), indicando que o efeito de inibição da adesão celular é dependente da quantidade de luz e da concentração de PLLPpIX. Da mesma forma se antes da irradiação são adicionados ao meio de cultura 5 mM de glutationa reduzida (GSH), um potente antioxidante [208], a fotossensibilização mediada por PLLPpIX deixa de impedir a adesão celular (Figura 4.32 C). A

presença de adesão celular com a diminuição do tempo de irradiação e com a adição de GSH indica que o mecanismo de ação da PLLPpIX deve ser via oxidação foto-induzida.

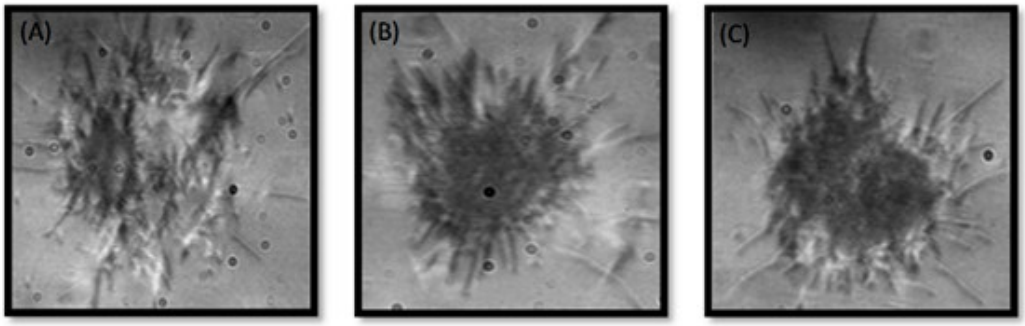


Figura 4.32: Micrografias de RICM de células HeLa aderindo à uma superfície de vidro após fotossensibilização do FBS mediada por PLLPpIX. Imagens obtidas 1h após o plaqueamento. (A) Tempo de irradiação de 15s. (B) Fotossensibilizador na absorbância de 0,03. (C) Adição de 5 mM de GSH antes da irradiação. A condição de irradiação foi idêntica à descrita na Figura 4.31

PpIX, na mesma absorbância que PLLPpIX, não só não foi capaz de impedir a adesão celular (Figura 4.31 B), como aumentou o tamanho médio da zona de adesão em ∼7 vezes comparado ao controle sem fotossensibilizador (Tabela 4.8). A maior adesão e espalhamento celular na presença de superfícies funcionalizadas com porfirina também foi reportada para células de adenocarcinoma mamário (MCF-7), mas na ausência de irradiação [209]. Nosso resultado de aumento significativo na adesão celular com PpIX, bem como o trabalho de Guo e colaboradores [209], nos levou a estudar o efeito na adesão celular dos fotossensibilizadores no escuro. Estes resultados foram apresentados na seção 4.3.

Tabela 4.8: Tamanho médio, μm^2, da zona de adesão de células HeLa 2h após plaqueamento em DMEM + FBS irradiado (Filtro FITC) na ausência e na presença de fotossensibilizador (absorbância 0,12). A condição de irradiação foi idêntica à descrita na Figura 4.4

	Tamanho médio
Controle	51,9 ± 36,0
PpIX	385,5 ± 190,1
PLLPpIX	0

No entanto, o resultado de inibição da adesão obtido com PLLPpIX indica que a funcionalização com PLL modula a ação do fotossensibilizador: fotossensibilização do FBS com PpIX livre aumenta a adesão celular; fotossensibilização do FBS com PpIX conjugada a PLL impede a adesão celular.

Uma hipótese que pode explicar a ausência de adesão celular após fotossensibilização do meio de cultura suplementado com FBS é a oxidação das proteínas presentes no FBS. FBS é constituído principalmente de albumina, mas também contém proteínas adesivas, sendo a principal a vitronectina, além de fatores de crescimento [165, 210].

Para quantificar a magnitude do estresse oxidativo induzido pelos fotossensibilizadores e assim, comparar a eficiência da PLLPpIX em oxidar as proteínas presentes no FBS em relação a PpIX, realizou-se a dosagem de proteínas carboniladas (Figura 4.33). Devido principalmente à estabilidade química dos grupos carbonila que são formados, esta dosagem é um ensaio aceito de

quantificação do nível de estresse oxidativo . Além disso, grupos carbonila são gerados em proteínas por quase todas as espécies reativas de oxigênio, incluindo $^1O_2$ [110, 114]. Dentre as sondas disponíveis que reagem com grupos carbonila, escolheu-se a fluoresceína 5-tiosemicarbazida (FTC) devido a maior a sensibilidade propiciada pela sua detecção fluorimétrica [162].

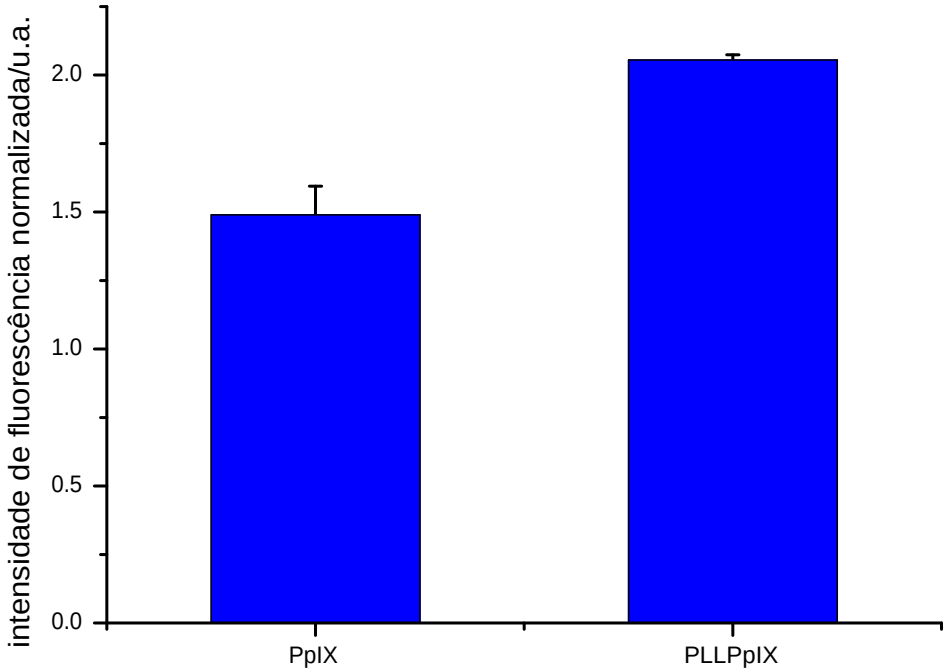


Figura 4.33: Dosagem de proteína carbonilada através da intensidade de fluorescência da sonda fluoresceína-5-tiosemicarbazida. Comparação do nível médio de proteína carbonilada gerada por fotossensibilização mediada por PLLPpIX e PpIX (absorbância 0,12). Os dados foram normalizados pela fluorescência do meio de cultura suplementado com FBS irradiado na ausência de fotossensibilizadores. A irradiação foi realizada utilizando o filtro DAPI do microscópio por 5 minutos. As intensidades de fluorescência observadas foram: Controle = 446,3 ± 11,7; PpIX = 665,0 ± 46,7; PLLPpIX = 917,3 ± 8,3.

Note que a quantidade de proteína carbonilada no meio de cultura suplementado com FBS irradiado na presença de ambos fotossensibilizadores foi maior do que a quantidade de proteína carbonilada presente no controle (meio de cultura suplementado com FBS irradiado na ausência dos fotossensibilizadores). Além disso, PLLPpIX gerou uma quantidade de proteína carbonilada ∼27% maior do que PpIX, o que é condizente com o fato da fotossensibilização mediada por PLLPpIX, e não por PpIX, ser capaz de impedir a adesão celular (Figura 4.31).

Para verificar se a oxidação observada era específica para uma determinada proteína presente no FBS, separou-se as proteínas por eletroforese em gel de poli-acrilamida corando-as simultaneamente com azul de Coomassie e fluoresceína 5-tiosemicarbazida (Figura 4.34). Utilizando a marcação com azul de Coomassie para determinar as distâncias percorridas pelas proteínas em função dos pesos moleculares, foi possível traçar o perfil de intensidade de fluorescência oriunda das proteínas marcadas com FTC em função da distância percorrida no gel. Note que ambos os fotossensibilizadores oxidam as proteínas do FBS de forma geral, não se restringindo à albumina, seu maior componente. O perfil de fluorescência obtido apresenta duas bandas principais, uma na região de alto peso molecular, onde se concentram a maior parte dos grupos carbonila gerados, a outra na região de médio peso molecular, onde se encontra a albumina (66 kDa). Interessantemente, nem todas as proteínas carboniladas por PLLPpIX são carboniladas por PpIX. Por exemplo, em ∼1 polegada aparece uma banda no gráfico da PLLPpIX que não aparece no gráfico da PpIX. Nota-se também que a PLLPpIX apresenta um

nível mais intenso de marcação para todas as faixas de peso molecular em concordância com os resultados de espectrofluorimetria (Figura 4.33).

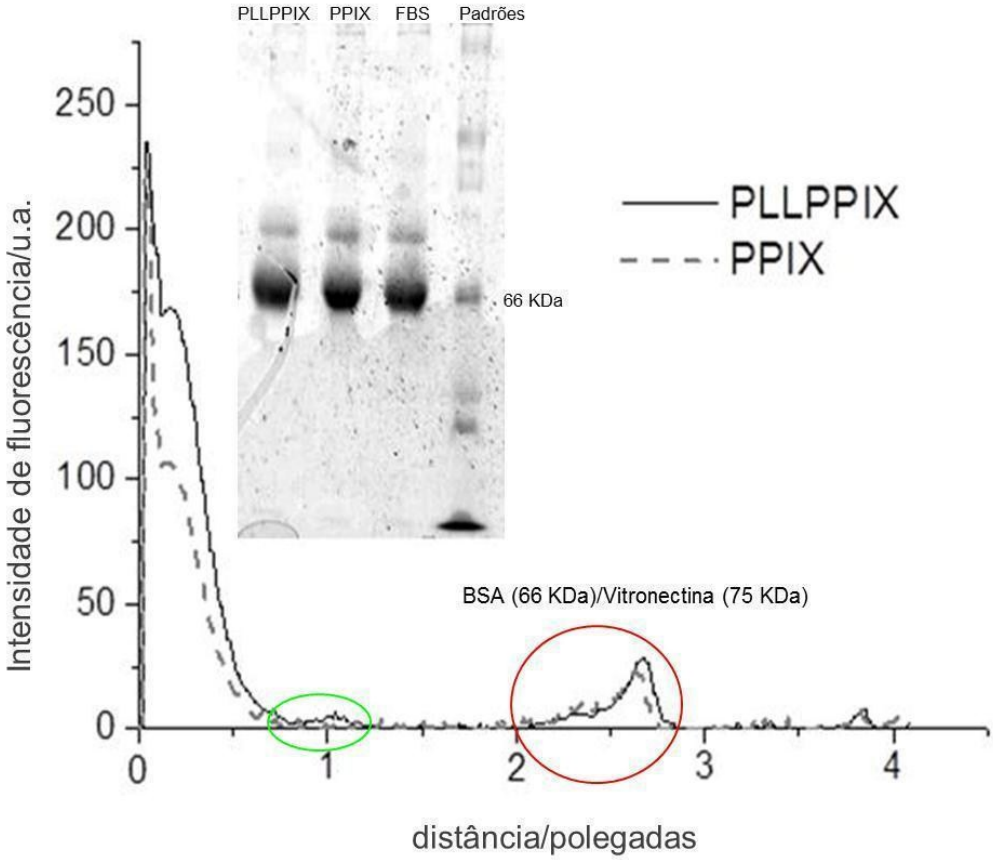


Figura 4.34: Imagem do gel: SDS-PAGE com simultânea marcação com azul de Coomassie e fluoresceína-5-tiosemicarbazida das proteínas presentes no FBS não tratado e tratado com PLLPpIX e PpIX. Gráfico: perfil de fluorescência da sonda FTC ligada a grupos carbonilas em função da distância percorrida no gel pelas proteínas do FBS, conforme marcação com azul de Coomassie.

Devido ao aparecimento de marcação para proteína carbonilada na região de peso molecular da vitronectina (Figura 4.34), a principal proteína adesiva do FBS, é possível que a inibição da adesão celular esteja relacionada à sua ina-

tivação, apesar do maior número de grupos carbonil aparecer em proteínas com maior peso molecular. Para testar esta hipótese, avaliou-se a capacidade de células HeLa aderirem a uma superfície de vidro funcionalizada com vitronectina, a qual foi previamente fotossensibilizada com PLLPpIX e PpIX (Figura 4.35).

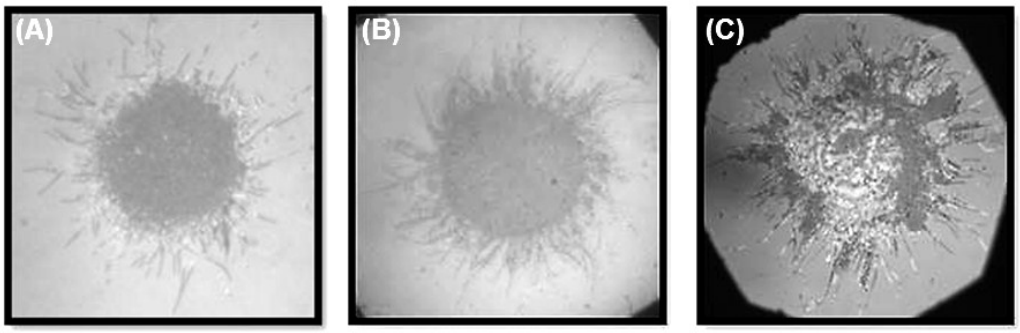


Figura 4.35: Micrografias de RICM obtidas 1h após plaqueamento de células HeLa em superfície de vidro funcionalizada com vitronectina não oxidada (A) e vitronectina previamente fotossensibilizada com (B) PpIX e (C) PLLPpIX. As zonas de adesão são definidas como as regiões mais escuras que a luminosidade de fundo. Irradiação: 1 minuto, filtro FITC. Objetiva 100X/1.3.

As células foram capazes de aderir a vitronectina em ambos os casos, mas enquanto no caso da PpIX (Figura 4.35 B) a zona de adesão aparece homogênea e é semelhante a do controle não oxidado (Figura 4.35 A), no caso da PLLPpIX (Figura 4.35 C) a zona de adesão apresenta-se não homogênea. Além disso, a zona de adesão no caso da PLLPpIX é ∼12% menor do que no caso da PpIX. A não homogeneidade apresentada pela zona de adesão após fotossensibilização da vitronectina mediada por PLLPpIX pode ser devida a criação de áreas contendo proteínas oxidadas, que não podem ser reconhecidas pelos receptores celulares. Estes resultados corroboram os da-

dos anteriores que mostraram a PLLPpIX como mais eficiente em oxidar as proteínas presentes no FBS.

Pode-se questionar por que no caso do FBS tratado com PLLPpIX ocorre inibição completa da adesão celular (Figura 4.31 C), enquanto que neste experimento a inibição foi apenas parcial (Figura 4.35 C). Imaginamos que a resposta desta pergunta tenha relação com dois fatores: (1) a diferente razão fotossensibilizador:proteína de adesão presente nos dois experimentos. No caso do experimento da Figura 4.35, a quantidade relativa de vitronectina é maior, sugerindo que a perda completa da capacidade adesiva deva ocorrer a partir de um certo limiar de oxidação. Esta interpretação é reforçada pelos resultados anteriores de adesão (Figura 4.31) e dosagem de protena total carbonilada (Figura 4.33), onde este limiar somente foi alcançado pela PLLPpIX; (2) a oxidação da principal proteína adesiva do FBS não seria o único alvo responsável pela perda das propriedades adesivas do FBS após fotossensibilização. O perfil de proteínas carboniladas obtido por eletroforese do FBS (Figura 4.34) sugere que esta hipótese é verdadeira também, uma vez que o maior número de grupos carbonil aparece em proteínas com peso molecular maior que o da vitronectina.

Fica evidente que a inibição da adesão celular está relacionada com a oxidação de proteínas do FBS. No entanto, a razão da maior eficiência da PLLPpIX em relação à PpIX livre ainda precisa ser explicada. Assim, para compreender porque a PLLPpIX é mais eficiente do que a PpIX em oxidar as proteínas do FBS, as propriedades fotoquímicas e fotofísicas destes fotossensibilizadores

foram estudadas neste meio.

Sabe-se que ambos fotossensibilizadores têm propriedades fotofísicas semelhantes (seção 4.2) e, portanto, a princípio, ambos os fotossensibilizadores deveriam ter a mesma capacidade de oxidar as proteínas presentes no FBS. Entretanto, observou-se uma maior eficiência da PLLPpIX (Figura 4.33). Uma hipótese para explicar este fenômeno poderia ser a interação diferencial entre estes fotossensibilizadores e as proteínas presentes no FBS.

Uma forma de caracterizar a ligação destas moléculas a proteínas é através da análise dos espectros de fluorescência dos fotossensibilizadores na presença do FBS, uma vez que as interações dos fluoróforos com as moléculas circundantes podem afetar parâmetros tais como o comprimento de onda máximo de emissão, o rendimento quântico e o tempo de vida do estado excitado [211]. Como o FBS é uma mistura complexa, utilizou-se a albumina, seu maior constituinte, como sistema modelo.

A quantidade de proteína total do lote de FBS utilizado foi de ∼4 mg/mL e por esta razão escolheu-se esta concentração para se avaliar o efeito da presença de albumina na fluorescência dos fotossensibilizadores. Nesta concentração, foi observado aumento da fluorescência da PpIX, além de um deslocamento do máximo de emissão para o vermelho (Figura 4.36 A). Estes efeitos estão de acordo com o que foi observado para porfirinas glico-conjugadas [212], TSPP e TMPyP [145] interagindo com BSA, além da própria protoporfirina interagindo com HSA [213] e BSA [214]. As explicações para

estas alterações espectroscópicas são associadas à desagregação, causando o aumento da fluorescência, e a mudanças no microambiente do fotossensibilizadores causadas por ligação a um sítio hidrofóbico, causando o deslocamento do máximo de emissão dos fotossensibilizadores.

Por outro lado, no caso da PLLPpIX ocorre supressão da fluorescência sem alteração no comprimento de onda máximo de emissão, em concentrações de albumina de até 10X mais do que aquela presente no FBS (Figura 4.36 B). Estes efeitos são consistentes com a PLLPpIX estar desagregada em solução e se ligar à albumina em um sítio que a deixa exposta ao solvente.

No inserto da Figura 4.36 está apresentado o gráfico de supressão de fluorescência de Stern-Volmer, onde Fo corresponde à intensidade de fluorescência na ausência de albumina e F é a intensidade de fluorescência na presença de albumina. O coeficiente angular do ajuste linear fornece a chamada constante de Stern-Volmer ($K_{SV} = 10^5$ M^{-1}), que é o produto da constante de velocidade da reação do estado excitado com o supressor e o tempo de vida do estado excitado na ausência do supressor.

A falta de curvatura no gráfico de Stern-Volmer é um sinal de que apenas um tipo de supressão está ocorrendo, a qual pode ser causada por uma variedade de mecanismos, incluindo filtro interno (o que não é o caso porque a albumina absorve por volta de 280 nm e as amostras foram excitadas a 395 nm), supressão dinâmica e estática. Na supressão dinâmica ocorre a desativação do fluoróforo no estado excitado sob contato ou colisão com

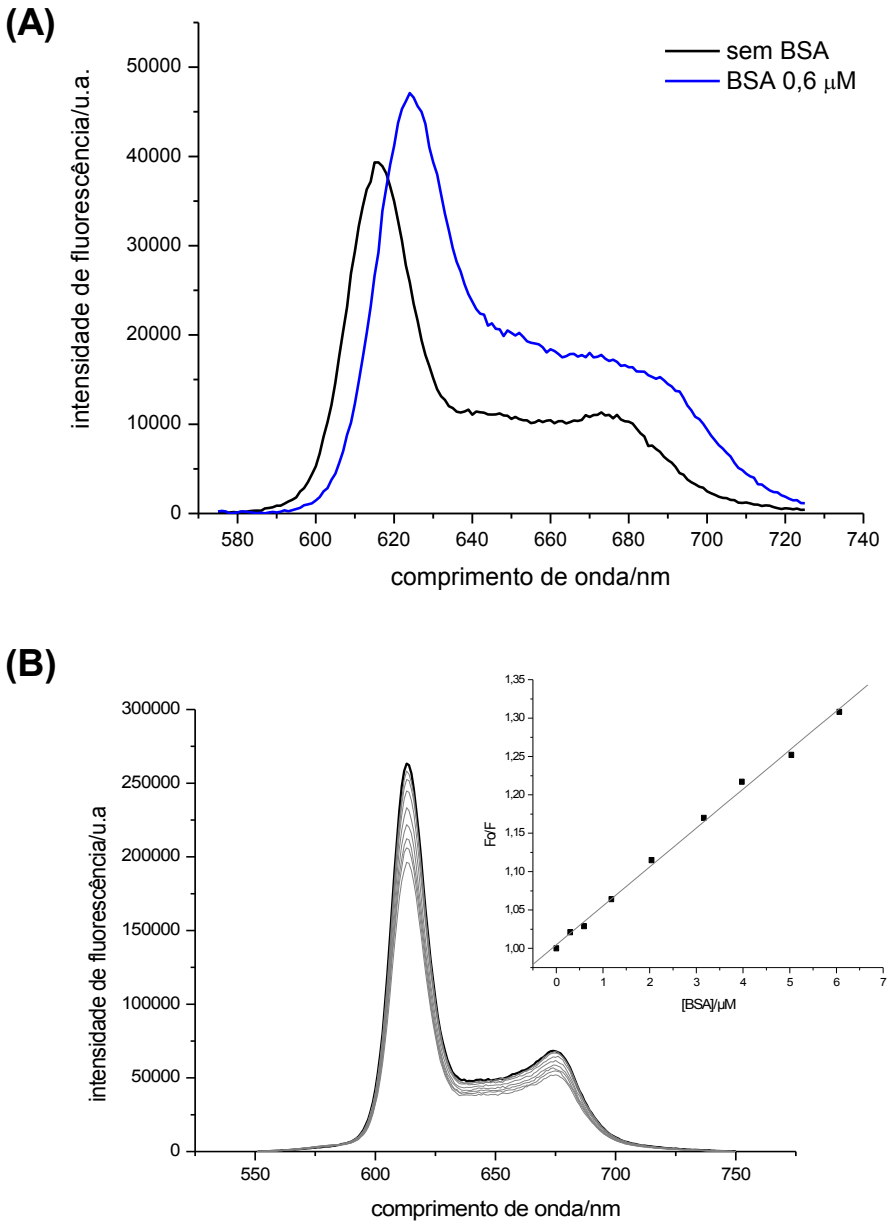


Figura 4.36: Espectros de emissão de fluorescência de PpIX (A) e PLLP-pIX (B) na ausência e na presença de albumina. No inserto (B), gráfico de supressão de fluorescência de Stern-Volmer, onde Fo corresponde à intensidade de fluorescência na ausência da albumina e F é a intensidade de fluorescência na presença de albumina.

uma molécula (supressor), sem que o fluoróforo sofra modificação química. A supressão estática ocorre quando o fluoróforo e o supressor formam um complexo não fluorescente, o qual reduz o número de moléculas excitáveis. Em ambos os casos a relação entre a diminuição na intensidade de fluorescência e a concentração do supressor é linear. [211] A existência do complexo entre o fluoróforo no estado fundamental e o supressor pode ser detectada através do espectro de absorção do fluoróforo na presença do supressor. A Figura 4.37 mostra o espectro de absorção da PLLPpIX na ausência e na presença de albumina. Note que o espectro de absorção da PLLPpIX na presença de albumina apresenta uma diminuição na magnitude além de um deslocamento para o vermelho, indicando que a supressão é estática e a constante de Stern-Volmer obtida ($K_{SV} = 10^5$ M^{-1}) dá uma idéia da constante de complexação. De fato, 10^5 M^{-1} é da mesma ordem de grandeza da constante de ligação entre a PpIX e a BSA, $K_B = 2x10^5$ M^{-1} [214].

A comparação dos dados de ligação da PpIX e da PLLPpIX com a albumina sugerem que a presença de PLL impede que a porfirina seja escondida dentro de cavidades na estrutura tridimensional da proteína. Ou seja, PLLPpPIX na presença de albumina pode interagir com moléculas do ambiente, como por exemplo, o O_2, enquanto PpIX não pode. Se este for o caso, PLLPpIX gerará mais $^1O_2$ que PpIX e, portanto, terá maior eficiência em oxidar as proteínas presentes no FBS. Esta hipótese é reforçada por estudos da interação entre BSA desnaturada e porfirinas, os quais indicam que a estrutura terciária da proteína é essencial para ligação destes fotossensibilizadores [215] e que a constante de remoção do $^1O_2$ pela HSA é 2 vezes maior na presença

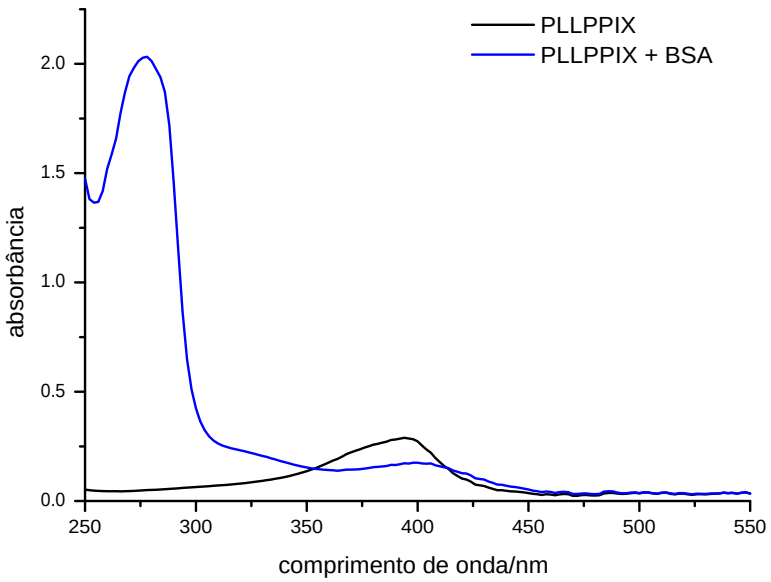


Figura 4.37: Espectros de absorção da PLLPpIX na ausência e na presença de albumina (0,6 μM).

de proteína desnaturada [216].

Para testar esta hipótese, investigou-se a geração de $^1O_2$ na presença de albumina. O oxigênio singlete foi detectado pela medida direta da sua fosforescência em D_2O. Realizou-se o ensaio em água deuterada devido ao curto tempo de vida do $^1O_2$ em H_2O (3,5 μs em H_2O, 67 μs em D_2O) [102].

A Figura 4.38 mostra o efeito da presença de albumina na eficiência de geração de $^1O_2$ pela PpIX. Na presença de 4 mg/mL de albumina, a geração de $^1O_2$ é suprimida em $\sim$ 64%, o que corrobora a hipótese levantada pela análise dos espectros de fluorescência (Figura 4.36): ou seja, a interação entre a albumina e a PpIX esconde esta molécula do O_2 do ambiente, consequen-

temente impedindo a geração de $^1O_2$. Esta supressão da geração de $^1O_2$ pela interação com albumina explicaria a menor eficiência da PpIX em oxidar as proteínas do FBS (Figura 4.33) e assim impedir a adesão celular (Figura 4.31 C). Infelizmente, não foi possível verificar o impacto da albumina na eficiência de geração de $^1O_2$ pela PLLPpIX porque esta não é suficientemente solúvel em D_2O. Entretanto, os dados de fluorescência (Figura 4.36) e de fotólise de relâmpago a laser (Figura 4.39) indicam que não ocorre supressão da geração de $^1O_2$.

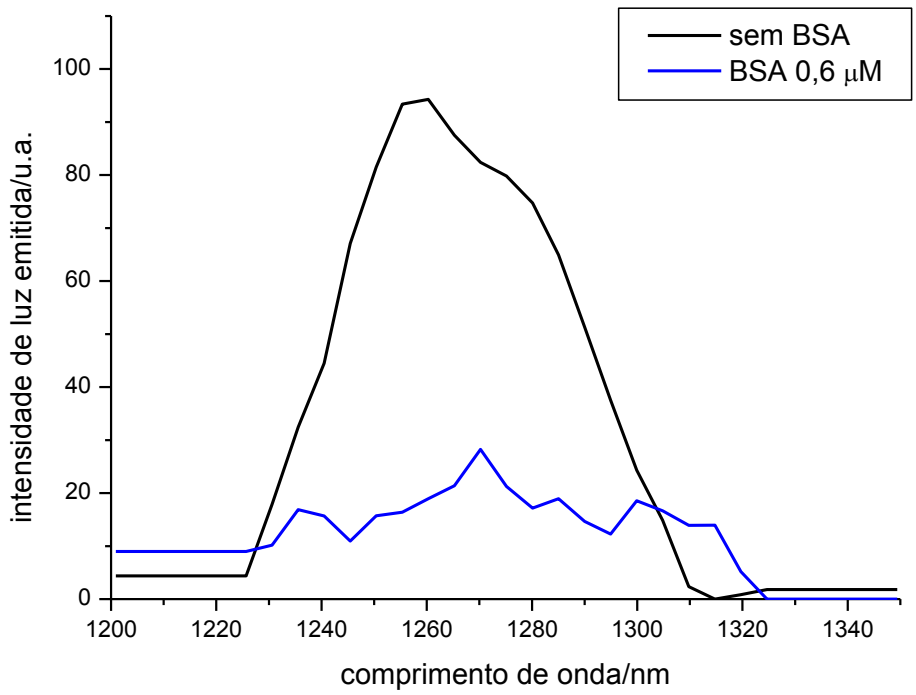


Figura 4.38: Espectros de emissão do $^1O_2$ em D_2O obtidos sob excitação da PpIX (1 μM) em 532 nm na ausência e na presença de albumina (0,6 μM). As integrais foram calculadas de 1220 a 1330 nm e forneceram os valores 4880 e 1764 na ausência e na presença de albumina, respectivamente.

A eficiência de geração de $^1O_2$ é diretamente relacionada ao rendimento e tempo de vida do estado triplete do fotossensibilizador, como foi apresentado na Figura 1.7. Assim, o tempo de vida do estado triplete dos fotossensibilizadores foi avaliado na presença e na ausência de albumina em PBS (pH 7,4; 100 mM).

A Figura 4.39 mostra as curvas de decaimento do estado triplete da PLLP-pIX saturada em Argônio na ausência e na presença de albumina 0,6 μM. No caso da PLLPpIX, foi possível detectar um transiente tanto na ausência (Figura 4.39 A) quanto na presença de albumina (Figura 4.39 B). A Tabela 4.9 mostra os tempos de vida do estado triplete calculados através do ajuste exponencial (decaimento de primeira ordem) dos gráficos apresentados na Figura 4.39. Os tempos de vida medidos estão de acordo com os observados na literatura para porfirinas não metaladas [217]. Observa-se que a presença de albumina pouco afetou o tempo de vida do estado triplete da PLLPpIX, indicando que o triplete mesmo na presença de albumina está acessível para reagir com o oxigênio e formar $^1O_2$. Este dado corrobora a hipótese levantada pelos dados de fluorescência de que a interação da PLLPpIX com a albumina é restrita à superfície da proteína deixando o fotossensibilizador exposto ao solvente.

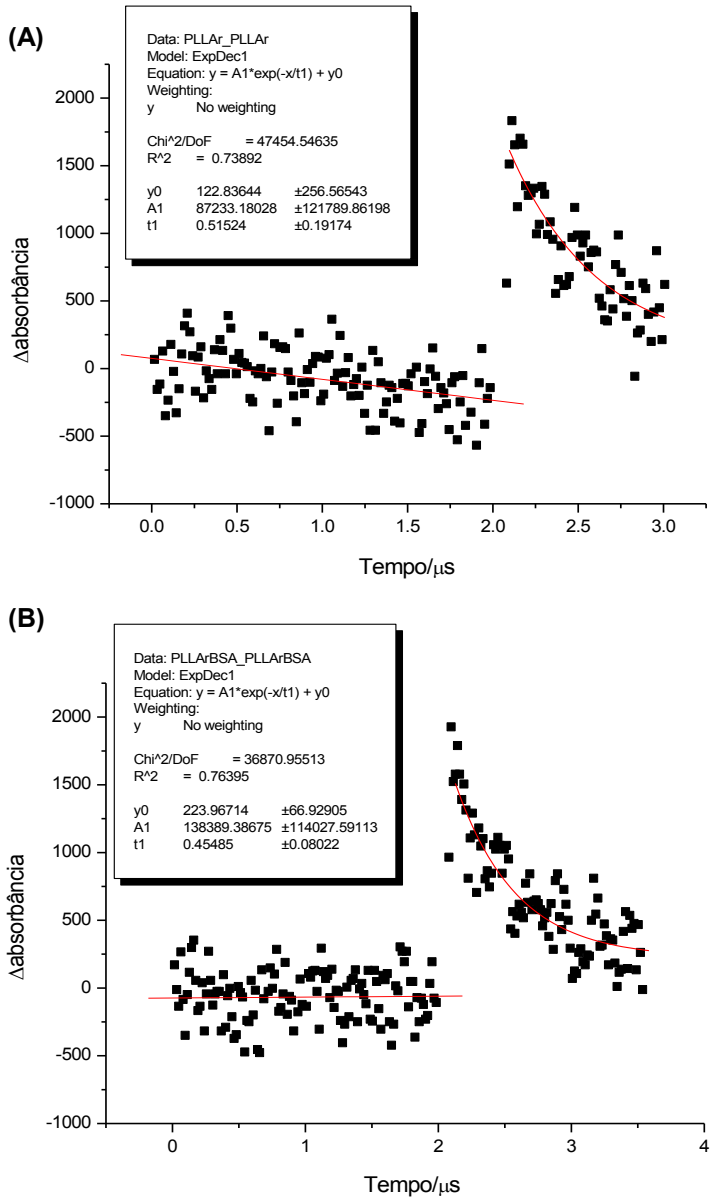


Figura 4.39: Variação da absorbância em função do tempo, monitorada em 396 nm, do estado triplete da PLLPpIX em solução saturada com Argônio na ausência (A) e na presença de albumina 0,6 μM (B). Excitação: 355nm.

Tabela 4.9: Tempo de vida, em ns, do estado triplete da PLLPpIX em PBS (pH 7,4; 100 mM) saturado em Argônio na presença e na ausência de albumina 0,6 μM.

	Tempo de vida do triplete	**R^2**
PLLPpIX	515 ± 192	0,74
PLLPpIX-BSA	455 ± 80	0,76

A Figura 4.40 mostra as curvas de decaimento do estado triplete da PpIX nas mesmas condições experimentais que a PLLPpIX. No caso da PpIX, concordantemente com a literatura [218], não foi possível detectar o estado triplete em pH 7,4 (Figura 4.40 A) devido à agregação da PpIX. Na presença de BSA é possível detectar um transiente (Figura 4.40 B), devido a um efeito de desagregação do fotossensibilizador pela ligação com a BSA (Figura 4.36 A), cujo longo tempo de vida (258 ± 40 μs) sugere que a reação com o O_2 está impedida.

Uma vez que em complexos não covalentes proteína-fotossensibilizador o estado excitado do fotossensibilizador é criado fisicamente unido à macromolécula, é concebível que nestes complexos o fotossensibilizador no estado excitado possa engajar-se em um evento de transferência de elétron (mecanismo tipo I) o qual levaria a formação de um radical semi-reduzido do fotossensibilizador [219]. Efeito similar foi visto na interação entre BSA e outras duas porfirinas, onde se observou que tal interação reduzia as constantes de desativação dos tripletes das porfirinas pelo O_2 [220], semelhantemente ao que também foi observado com ftalocianinas [221, 222]. Em um estudo feito com triarilmetanos [219] e outro feito com Azul de Metileno [211], um

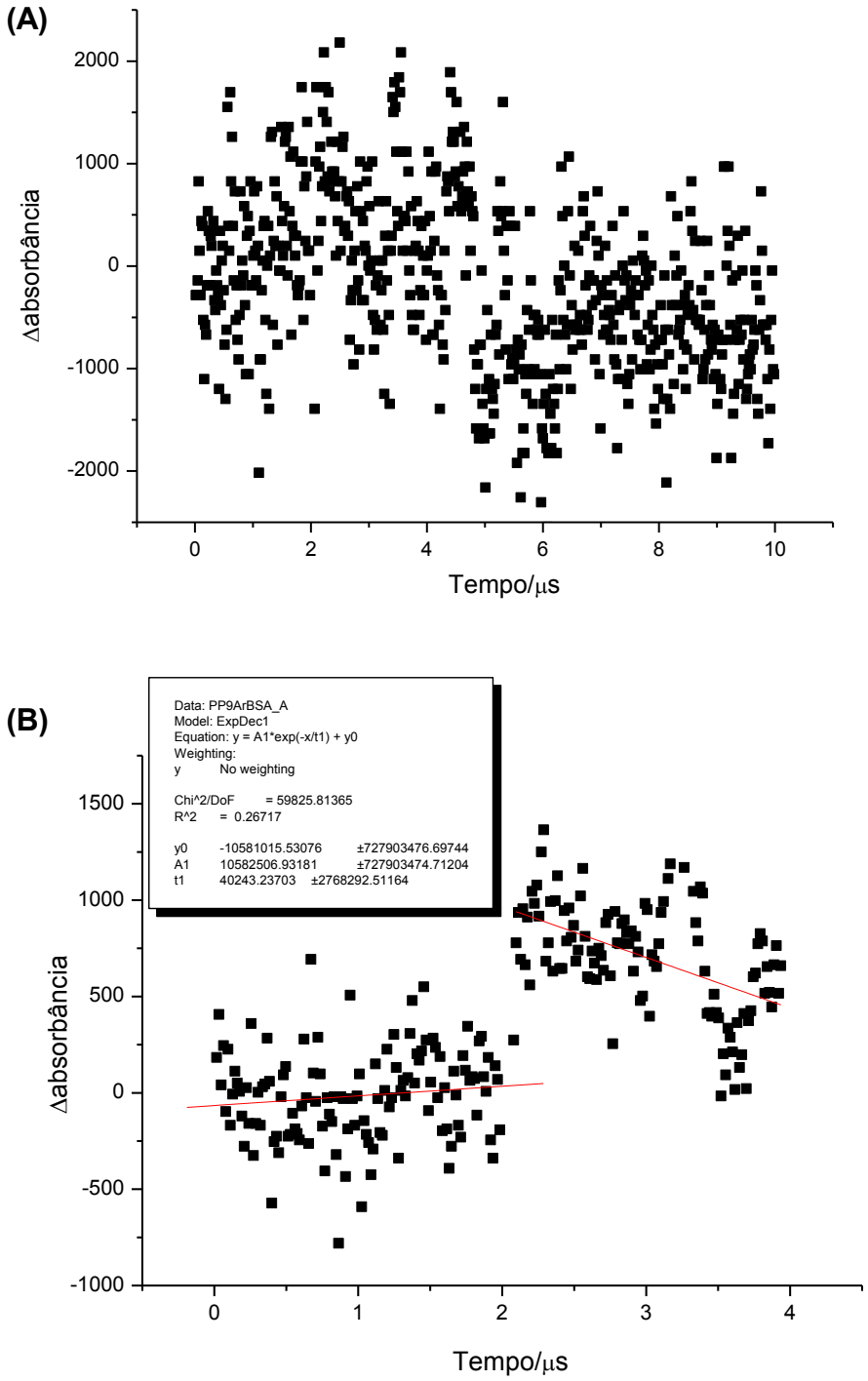


Figura 4.40: Variação da absorbância em função do tempo, monitorada em 396 nm, do estado triplete da PpIX em solução saturada com Argônio na ausência (A) e na presença de albumina 0,6 μM (B). Excitação: 355nm.

composto da classe das fenotiazinas, a ligação do fotossensibilizador à BSA também levou ao favorecimento do mecanismo tipo I comparado com o fotossensibilizador livre em solução. A presença do polímero PLL deve impedir que a porção porfirínica da PLLPpIX seja escondida dentro de cavidades na estrutura tridimensional da BSA, favorecendo o mecanismo tipo II (transferência de energia para o oxigênio molecular com geração de $^1O_2$).

Em suma, a interação diferencial entre PLLPpIX e PpIX com a BSA, o principal componente do FBS, explica a maior eficiência apresentada pela PLLPpIX em oxidar as proteínas do FBS e, portanto, sua capacidade de impedir a adesão celular. A presença do polímero PLL é responsável por esta interação diferencial, uma vez que ao criar um impedimento estérico, força que a interação da PpIX na PLLPpIX com a BSA fique restrita a superfície da proteína, deixando o fotossensibilizador disponível para interagir com o O_2, gerando oxigênio singlete (Figura 4.41). Este conhecimento é relevante para o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores com atividade fotodinâmica melhorada.

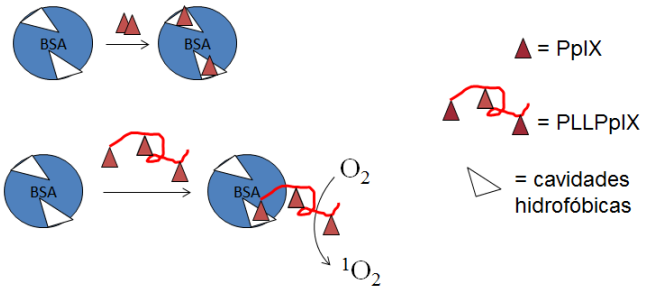


Figura 4.41: Modelo proposto da interação dos fotossensibilizadores com a BSA.

Capítulo 5

Conclusões e Perspectivas

O objetivo geral do presente trabalho foi estudar o efeito dos fotossensibilizadores porfirínicos na adesão celular. Para tal foi utilizada principalmente a técnica RICM, a qual permite o estudo detalhado da zona de contato entre duas interfaces, e os tratamentos foram realizados utilizando doses sub-letais.

A técnica foi padronizada e revelou dois regimes de adesão celular: um limitado e outro não limitado pela quantidade de proteína adesiva adsorvida na superfície. No regime não limitado (superfície 100% recoberta com vitronectina) foi observada lise celular signficativa entre 3h e 4h após o plaqueamento. Quando as células são capazes de remodelar a matriz, a maior eficiência de adesão segue a ordem regime limitado $<$ regime não limitado e esta ordem é invertida quando o remodelamento é impedido. Estes resultados indicam que superfícies 100 % recobertas com proteínas adesivas não são biocompatíveis com células HeLa.

Utilizando RICM e ensaios de ferida, observou-se que todos os fotossensibilizadores estudados são capazes de aumentar a adesão celular na ausência de irradiação, o que foi correlacionado com a capacidade das moléculas em se intercalarem na membrana plasmática, causando uma diminuição na rigidez da membrana e facilitando o processo de adesão e espalhamento. A análise do padrão de expressão de integrinas na superfície celular revela que o aumento no tamanho da zona de adesão correlaciona com o aumento na expressão de αV.

Quando os fotossensibilizadores PLLPpIX e PpIX estão concentrados na região perimembranar (1 minuto de incubação) e as células são irradiadas, demonstrou-se que a PDT leva a uma diminuição da adesão celular, o que contraria o que é descrito na literatura quando se utilizam ensaios de resistência à tripsinização. Com 3h de incubação, PLLPpIX impede totalmente a adesão celular, diferentemente do que ocorreu na ausência de irradiação, enquanto PpIX praticamente não muda a adesão comparado ao controle não irradiado. Esta capacidade de modular a adesão celular foi associada à presença do polímero, o qual modifica a interação da porfirina com macromoléculas e organelas celulares. Quando os fotossensibilizadores não estão na região da membrana plasmática e sim em organelas celulares, o efeito na adesão celular é indireto e necessita maior investigação, mas pode ser correlacionado a diferenças de citolocalização dos fotossensibilizadores e a indução de morte celular por apoptose.

A oxidação das proteínas do soro fetal bovino impediu a adesão celular,

no caso da oxidação mediada por PLLPpIX mas não por PpIX. A razão da maior eficiência da PLLPpIX foi associada a presença do polímero, o qual promove uma interação diferencial do fotossensibilizador com as proteínas do soro. O polímero cria um impedimento estérico que faz com que a interação da PLLPpIX com a albumina, o componente majoritário do soro, fique restrita à superfície da proteína, deixando o fotossensibilizador disponível para interagir com o oxigênio molecular e gerar oxigênio singlete, o qual vai oxidar as proteínas adesivas presentes.

Assim, a estratégia de funcionalização de fotossensibilizadores com polímeros é capaz de modular sua interação com células e biomoléculas tornando-os mais eficientes. Esta estratégia foi aplicada com sucesso na modulação da adesão celular com o fotossensibilizador agindo tanto dentro da célula quanto na matriz extracelular.

Possíveis extensões do trabalho aqui desenvolvido incluem:

- síntese e avaliação de novos fotossensibilizadores funcionalizados com outros polímeros;
- estudo do efeito de outras classes de fotossensibilizadores como, por exemplo, as fenotiazinas, na adesão celular;
- testes *in vivo* com a PLLPpIX;
- estudo detalhado dos mecanismos envolvidos nos efeitos dos fotossensibilizadores sobre a adesão celular quando estes não estão localizados na membrana celular.

Referências

[1] R Zaidel-Bar, S Itzkovitz, A Ma'ayan, R Iyengar, and B Geiger. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nature Cell Biology*, 9(8):858–867, 2007.

[2] A L Berrier and K M Yamada. Cell Matrix adhesion. *Journal of Cellular Physiology*, 213:565–573, 2007.

[3] B Alberts, A Johnson, J Lewis, M Raff, K Roberts, and P Walter. *Molecular Biology of the Cell.* Garland Science, New York, 4th edition, 2002.

[4] D E Discher, P Janmey, and Y-L Wang. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 310:1139–1143, November 2005.

[5] X Zhong and F J Rescorla. Cell surface adhesion molecules and adhesion-initiated signaling: understanding of anoikis resistance mechanisms and therapeutic opportunities. *Cellular Signalling*, 24:393–401, 2012.

[6] M L Taddei, E Giannoni, T Fiaschi, and P Chiarugi. Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. *The Journal of Pathology*, 226:380–393, 2012.

[7] Y-N Kim, K H Koo, J Y Sung, U-J Yun, and H Kim. Anoikis resistance: an essential prerequisite for tumor metastasis. *International Journal of Cell Biology*, 2012:306879, 2012.

[8] A J Bailey, R G Paul, and L Knott. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mechanisms Of Ageing And Development*, 106:1–56, 1998.

[9] P Lu, V M Weaver, and Z Werb. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *Journal of Cell Biology*, 196(4):395–406, 2012.

[10] R O Hynes and A Naba. Overview of the matrisome - An inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4:a004903, 2012.

[11] C Frantz, K M Stewart, V M Weaver, C Frantz, K M Stewart, and V M Weaver. The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, 123:4195–4200, 2010.

[12] C Chiodoni, M P Colombo, and S Sangaletti. Matricellular Proteins: from homeostasis to inflammation, cancer, and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 29:295–307, 2010.

[13] D F Mosher and J C Adams. Adhesion-modulating / matricellular ECM protein families: a structural, functional and evolutionary appraisal. *Matrix Biology*, 31:155–161, 2012.

[14] A Sainio, M Koulu, T N Wight, R Penttinen, and H Ja. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews*, 61:198–223, 2009.

[15] J Takagi. Structural basis for ligand recognition by integrins. *Current Opinion in Cell Biology*, 19:557–564, 2007.

[16] R O Hynes. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110:673–687, September 2002.

[17] M A Arnaout, S L Goodman, and J-P Xiong. Coming to grips with integrin binding to ligands. *Current Opinion in Cell Biology*, 14:641–651, 2002.

[18] E Ruoslahti. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual Reviews Cell and Development Biology*, 12:697–715, 1996.

[19] T A Springer and M L Dustin. Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. *Current Opinion in Cell Biology*, 24:107–115, 2012.

[20] J Takagi, B M Petre, T Walz, and T A Springer. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell*, 110:599–611, 2002.

[21] A Byron, J D Humphries, J A Askari, S E Craig, A P Mould, and M J Humphries. Anti-integrin monoclonal antibodies. *Journal of Cell Science*, 122:4009–4011, 2009.

[22] R K Paradise, D A Lauffenburger, and K J van Vliet. Acidic extracellular pH promotes activation of integrin alphaVbeta3. *PloS One*, 6(1):e15746, 2011.

[23] S-H Kim, J Turnbull, and S Guimond. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *The Journal of Endocrinology*, 209:139–151, May 2011.

[24] H Okayama. Cell cycle control by anchorage signaling. *Cellular Signalling*, 24:1599–1609, 2012.

[25] D S Harburger and D A Calderwood. Integrin signalling at a glance. *Journal of Cell Science*, 122:1472–1472, April 2009.

[26] W Guo and F G Giancotti. Integrin signalling during tumour progression. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5:816–826, October 2004.

[27] M R Morgan, A Byron, M J Humphries, and M D Bass. Giving off mixed signals. Distinct functions of $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha V\beta 3$ integrins in regulating cell behaviour. *IUBMB Life*, 61(7):731–738, 2012.

[28] A K Pullikuth and A D Catling. Scaffold mediated regulation of MAPK signaling and cytoskeletal dynamics: a perspective. *Cellular Signalling*, 19:1621–1632, 2007.

[29] E Zamir and B Geiger. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *Journal of Cell Science*, 114:3583–3590, October 2001.

[30] E Puklin-Faucher and M P Sheetz. The mechanical integrin cycle. *Journal of Cell Science*, 575:179–186, 2009.

[31] I Delon and N H Brown. Integrins and the actin cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology*, 19:43–50, 2007.

[32] D C Worth and M Parsons. Adhesion dynamics: mechanisms and measurements. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40:2397–2409, 2008.

[33] K A DeMali, K Wennerberg, and K Burridge. Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology*, 15:572–582, 2003.

[34] R L Juliano. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annual Reviews Pharmacology and Toxicology*, 42:283–323, 2002.

[35] K Kawakami, H Tatsumi, and M Sokabe. Dynamics of integrin clustering at focal contacts of endothelial cells studied by multimode imaging microscopy. *Journal of Cell Science*, 114:3125–3135, 2001.

[36] P Bongrand. Adhesion of cells. In R. Lipowsky and E. Sackmann, editors, *Handbook of Biological Physics V.1*, volume 1, chapter 16, pages 755–803. Elsevier B.V., 1995.

[37] R Bruinsma and E Sackmann. Bioadhesion and the dewetting transition. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences-Paris*, 2(IV):803–815, 2001.

[38] A Kloboucek, A Behrisch, J Faix, and E Sackmann. Adhesion-induced receptor segregation and adhesion plaque formation: a model membrane study. *Biophysical Journal*, 77:2311–2328, October 1999.

[39] A Albersdorfer, T Feder, and E Sackmann. Adhesion-induced domain formation by interplay of long-range repulsion and short-range attraction force: a model membrane study. *Biophysical Journal*, 73:245–257, 1997.

[40] A Pierres, P Eymeric, E Baloche, D Touchard, A-M Benoliel, and P Bongrand. Cell membrane alignment along adhesive surfaces: contribution of active and passive cell processes. *Biophysical Journal*, 84:2058–2070, 2003.

[41] E Sackmann and S Goennenwein. Cell adhesion as dynamic interplay of lock-and-key, generic and elastic forces. *Progress of Theoretical Physics*, 165:78–99, 2006.

[42] P-Y Chan, M B Lawrence, M L Dustin, L M Ferguson, D E Golan, and T A Springer. Influence of receptor lateral mobility on adhesion strengthening between membranes containing LFA3 and CD2. *Journal of Cell Biology*, 115(1):245–255, 1991.

[43] K Sengupta and L Limozin. Adhesion of soft membranes controlled by tension and interfacial polymers. *Physical Review Letters*, 104:088101, 2010.

[44] P W Atkins. *Physical Chemistry*. Oxford University Press, Oxford, 6th edition, 1997.

[45] E Sackmann and R F Bruinsma. Cell adhesion as wetting transition? *Chemphyschem*, 3:262–269, March 2002.

[46] D Cuvelier, M Théry, Y-S Chu, S Dufour, J-P Thiéry, M Bornens, P Nassoy, and L Mahadevan. The universal dynamics of cell spreading. *Current Biology*, 17:694–699, 2007.

[47] P Streicher, P Nassoy, M Bärmann, A Dif, V Marchi-Artzner, F Brochard-Wyart, J Spatz, and P Bassereau. Integrin reconstituted in GUVs: a biomimetic system to study initial steps of cell spreading. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788:2291–2300, October 2009.

[48] D Cuvelier and P Nassoy. Hidden dynamics of vesicle adhesion induced by specific stickers. *Physical Review Letters*, 93:228101, 2004.

[49] A Boulbitch, Z Guttenberg, and E Sackmann. Kinetics of membrane adhesion mediated by ligand-receptor interaction studied with a biomimetic system. *Biophysical Journal*, 81:2743–2751, 2001.

[50] Q Liu, W Limthongkul, G Sidhu, J Zhang, A Vaccaro, R Shenck, N Hickok, I Shapiro, and T Freeman. Covalent attachment of P15 peptide to titanium surfaces enhances cell attachment , spreading, and osteogenic

gene expression. *Journal of Orthopaedic Research*, (October):1626–1633, 2012.

[51] Martin J Humphries. Cell adhesion assays. *Methods in Molecular Biology*, 18:57–61, January 2001.

[52] M Benoit and H E Gaub. Measuring cell adhesion forces with the Atomic Force Microscope at the molecular level. *Cells Tissues Organs*, 172:174–189, 2002.

[53] H Kim, H Arakawa, T Osada, and A Ikai. Quantification of cell adhesion force with AFM: distribution of vitronectin receptors on a living MC3T3-E1 cell. *Ultramicroscopy*, 97:359–363, 2003.

[54] C-Y Yang, L-Y Huang, T-L Shen, and J A Yeh. Cell adhesion, morphology and biochemistry on nano-topographic oxidized silicon surfaces. *Biochemistry*, 20:415–430, 2010.

[55] G Wrobel, M Höller, S Ingebrandt, S Dieluweit, F Sommerhage, H Peter, and A Offenhäusser. Transmission electron microscopy study of the cell-sensor interface. *Journal of the Royal Society Interface*, 5:213–222, 2008.

[56] P E Morton and M Parsons. Dissecting cell adhesion architecture using advanced imaging techniques. *Cell Adhesion & Migration*, 5(4):351–359, 2011.

[57] R Parthasarathy and J T Groves. Optical techniques for imaging membrane topography. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 41:391–414, 2004.

[58] N D Huebsch and D J Mooney. Fluorescent Resonance Energy Transfer: a tool for probing molecular cell-biomaterial interactions in three dimensions. *Biomaterials*, 28(15):2424–2437, 2007.

[59] A S G Curtis. Cell reactions with biomaterials: the microscopies. *European Cells and Materials*, 1:59–65, 2001.

[60] K D Walker, S H Doak, and P R Dunstan. Mechanisms of cell cell adhesion identified by immunofluorescent labelling with quantum dots: a scanning near-field optical microscopy approach. *Ultramicroscopy*, 111:1200–1205, 2011.

[61] D Axelrod. Cell-substrate contacts illuminated by Total Internal Reflection Fluorescence. *The Journal of Cell Biology*, 89:141–145, 1981.

[62] K-F Giebel, C Bechinger, S Herminghaus, M Riedel, P Leiderer, U Weiland, and M Bastmeyer. Imaging of cell/substrate contacts of living cells with surface plasmon resonance microscopy. *Biophysical Journal*, 76:509–516, 1999.

[63] G Zeck and P Fromherz. Repulsion and attraction by extracellular matrix protein in cell adhesion studied with nerve cells and lipid vesicles on silicon chips. *Langmuir*, 19:1580–1585, 2003.

[64] J K Stuart and V Hlady. Reflection interference contrast microscopy combined with scanning force microscopy verifies the nature of protein-ligand interaction force measurements. *Biophysical Journal*, 76:500–508, 1999.

[65] L Limozin and K Sengupta. Quantitative reflection interference contrast microscopy (RICM) in soft matter and cell adhesion. *Chemphyschem*, 10:2752–2768, November 2009.

[66] D Gingell. The interpretation of interference-reflection images of spread cells: significant contributions from the thin peripheral cytoplasm. *Journal of Cell Science*, 49:237–247, 1981.

[67] A S G Curtis. A study by interference reflection microscopy. *Journal of Cell Biology*, 20:199–215, 1964.

[68] J S Ploem. Reflection contrast microscopy as a tool for investigation of the attachment of living cells to a glass surface. In R van Furth, editor, *Mononuclear Phagocytes in Immunity, Infection and Pathology.* Blackwell, Oxford, 1975.

[69] C S Izzard and L R Lochner. Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *Journal of Cell Science*, 21:129–159, 1976.

[70] Z Feng, B Chen, S-C Tang, K Liao, W Ning, and V Chan. Effect of cytoskeleton inhibitors on deadhesion kinetics of HepG2 cells on biomimetic surface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75:67–74, 2010.

[71] K Sengupta, H Aranda-Espinoza, L Smith, P Janmey, and D Hammer. Spreading of neutrophils: from activation to migration. *Biophysical journal*, 91(12):4638–4648, December 2006.

[72] R Simson, E Wallraff, J Faix, J Niewohner, G Gerisch, and E Sackmann. Membrane bending modulus and adhesion energy of wild-type and mutant cells of Dictyostelium lacking talin or cortexillins. *Biophysical Journal*, 74:514–522, 1998.

[73] W H Goldmann, M Schindl, T J Cardozo, and R M Ezzell. Motility of vinculin-deficient F9 embryonic carcinoma cells analyzed by video, laser confocal, and reflection interference contrast microscopy. *Experimental Cell Research*, 221:311–319, 1995.

[74] M Schindl, E Wallraff, B Deubzer, W Witke, G Gerisch, and E Sackmann. Cell-substrate interactions and locomotion of Dictyostelium wild-type and mutants defective in three cytoskeletal proteins: a study using quantitative reflection interference contrast microscopy. *Biophysical Journal*, 68:1177–1190, 1995.

[75] I Weber, E Wallraff, R Albrecht, and G Gerisch. Motility and substratum adhesion of Dictyostelium wild-type and cytoskeletal mutant cells: a study by RICM/bright-field double-view image analysis. *Journal of Cell Science*, 108:1519–1530, 1995.

[76] N Cai, C C Wong, Y X Gong, S C W Tan, V Chan, and K Liao. Modulating cell adhesion dynamics on carbon nanotube monolayer engineered with extracellular matrix proteins. *Applied Materials & Interfaces*, 2(4):1038–1047, April 2010.

[77] T He, Z L Shi, N Fang, K G Neoh, E T Kang, and V Chan. The effect of adhesive ligands on bacterial and fibroblast adhesions to surfaces. *Biomaterials*, 30:317–326, 2009.

[78] N Cai, Y Gong, K S Chian, V Chan, and K Liao. Adhesion dynamics of porcine esophageal fibroblasts on extracellular matrix protein-functionalized poly (lactic acid). *Biomedical Materials*, 3:015014, 2008.

[79] K Franke, T Pompe, M Bornha, and C Werner. Engineered matrix coatings to modulate the adhesion of CD133 + human hematopoietic progenitor cells. *Biomaterials*, 28:836–843, 2007.

[80] Z Feng, N Cai, V Chan, P S Mhaisalka, K S Chian, B D Ratner, and K Liao. Novel biophysical techniques for investigating long-term cell adhesion. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 585(3):151–165, 2006.

[81] A P Zhu, N Fang, M B Chan-Park, and V Chan. Adhesion contact dynamics of 3T3 fibroblasts on poly (lactide-co-glycolide acid) surface modified by photochemical immobilization of biomacromolecules. *Biomaterials*, 27:2566–2576, 2006.

[82] N Fang, A P Zhu, M B Chan-Park, and V Chan. Adhesion contact dynamics of fibroblasts on biomacromolecular surfaces. *Macromolecular Bioscience*, 5:1022–1031, 2005.

[83] A P Zhu and N Fang. Adhesion dynamics, morphology, and organization of 3T3 fibroblast on chitosan and its derivative: the effect of O-carboxymethylation. *Biomacromolecules*, 6:2607–2614, 2005.

[84] A Hategan, K Sengupta, S Kahn, E Sackmann, and D E Discher. Topographical pattern dynamics in passive adhesion of cell membranes. *Biophysical Journal*, 87(5):3547–3560, 2004.

[85] C Yin, K Liao, H-Q Mao, K W Leong, R-X Zhuo, and V Chan. Adhesion contact dynamics of HepG2 cells on galactose-immobilized substrates. *Biomaterials*, 24:837–850, 2003.

[86] C Gimond, I Mercier, I Weber, and M Aumailley. Adhesion complexes formed by OVCAR-4 cells on laminin 1 differ from those observed on fibronectin. *Cell Adhesion Communication*, 3(6):527–539, 1996.

[87] P Ryzhkov, M Prass, M Gummich, J-S Kühn, C Oettmeier, and H-G Döbereiner. Adhesion patterns in early cell spreading. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 22:194106, May 2010.

[88] R G Richards, M Stiffanic, G R H Owen, M Riehle, I A P Gwynn, and A S G Curtis. Immunogold labelling of fibroblast focal adhesion sites visualized in fixed material using Scanning Electron Microscopy, and living, using Internal Reflection Microscopy. *Cell Biology International*, 25(12):1237–1249, 2001.

[89] W J Parak, J Domke, M George, A Kardinal, M Radmacher, H E Gaub, and A D G de Roos. Electrically excitable normal rat kidney fibroblasts: a new model system for cell-semiconductor hybrids. *Biophysical Journal*, 76:1659–1667, 1999.

[90] J Kajstura and J Bereiter-Hahn. Loss of focal contacts accompanies the density dependent inhibition of cell growth. *Cell Biology International Reports*, 13(4):377–383, 1989.

[91] F Lanni, A S Waggoner, and D L Taylor. Structural organization of interphase 3T3 fibroblasts studied by Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 100:1091–1102, 1985.

[92] W J Tan, G P Teo, K Liao, K W Leong, H-Q Mao, and V Chan. Adhesion contact dynamics of primary hepatocytes on poly(ethylene terephthalate) surface. *Biomaterials*, 26:891–898, 2005.

[93] B S Berlett and E R Stadtman. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(33):20313–20316, August 1997.

[94] E C Kennett, C Y Chuang, G Degendorfer, J M Whitelock, and M J Davies. Mechanisms and consequences of oxidative damage to extracellular matrix. *Biochemical Society Transactions*, 39:1279–1287, 2011.

[95] J M Berg, J L Tymoczko, and L Stryer. *Biochemistry*. W H Freeman and Company, New York, 5th edition, 2002.

[96] D R Bickers and M Athar. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *Journal of Investigative Dermatology*, 126:2565–2575, 2006.

[97] G T Wondrak, M K Jacobson, and E L Jacobson. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for

skin photoprotection. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 5:215–237, 2006.

[98] R R Allison and C H Sibata. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 7(2):61–75, June 2010.

[99] M S Baptista and M Wainwright. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for the treatment of malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis. *Brazilian Journal of Medical and*, 44(1):1–10, 2011.

[100] M Wainwright. Photodynamic therapy: the development of new photosensitisers. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 8:280–291, April 2008.

[101] C S Foote. Mechanisms of photosensitized oxidation. *Science*, 162(3857):963–970, 1968.

[102] P R Ogilby. Chemistry of singlet oxygen. 42. Effect of solvent, solvent isotopic substitution, and temperature on the lifetime of singlet molecular oxygen (1. DELTA. g). *Journal of the American Chemical Society*, 105:3423–3430, 1983.

[103] R W Redmond and I E Kochevar. Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. *Photochemistry and Photobiology*, 82:1178–1186, 2006.

[104] A. Frimer, editor. *Singlet O2*. CRC, Boca Raton, FL, 1985.

[105] G E Ronsein, S Miyamoto, E Bechara, P Mascio, and G R Martinez. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Química Nova*, 29(3):563–568, 2006.

[106] K A Riske, T P Sudbrack, N L Archilha, A F Uchoa, A P Schroder, C M Marques, M S Baptista, and R Itri. Giant vesicles under oxidative stress induced by a membrane-anchored photosensitizer. *Biophysical Journal*, 97:1362–1370, September 2009.

[107] W Caetano, P S Haddad, R Itri, D Severino, V C Vieira, M S Baptista, A P Schröder, and C M Marques. Photo-induced destruction of giant vesicles in methylene blue solutions. *Langmuir*, 23:1307–1314, January 2007.

[108] G J Mizejewski. Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 222:124–138, 1999.

[109] J E Schwarzbauer and J L Sechler. Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly. *Current Opinion in Cell Biology*, 11:622–627, 1999.

[110] E R Stadtman and R L Levine. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25(3-4):207–218, December 2003.

[111] V Au and S A Madison. Effects of singlet oxygen on the extracellular matrix protein collagen: oxidation of the collagen crosslink Histi-

dinohydroxylysinonorleucine and Histidine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 384(1):133–142, 2000.

[112] R Santus and J-P Reyftmann. Photosensitization of membrane components. *Biochimie*, 68:843–848, 1986.

[113] T Breitenbach, M K Kuimova, P Gbur, S Hatz, N B Schack, Brian Wett Pedersen, J D C Lambert, L Poulsen, and P R Ogilby. Photosensitized production of singlet oxygen: spatially-resolved optical studies in single cells. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8:442–452, 2009.

[114] E Shacter. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews*, 32(3-4):307–326, 2000.

[115] M J Davies. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305:761–770, June 2003.

[116] K-D Kroncke, L-O Klotz, C V Suschek, and H Sies. Comparing nitrosative versus oxidative stress toward zinc finger-dependent transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 277(15):13294–13301, 2002.

[117] D Suto, Y Iuchi, Y Ikeda, K Sato, Y Ohba, and J Fujii. Inactivation of cysteine and serine proteases by singlet oxygen. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 461:151–158, 2007.

[118] J Cadet, T Douki, and J-L Ravanat. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radical Biology and Medicine*, 49:9–21, 2010.

[119] M Dizdaroglu, G Kirkali, and P Jaruga. Formamidopyrimidines in DNA: mechanisms of formation, repair, and biological effects. *Free Radical Biology and Medicine*, 45:1610–1621, 2008.

[120] P D Ray, B-W Huang, and Y Tsuji. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24:981–990, 2012.

[121] P Chiarugi. From anchorage dependent proliferation to survival: lessons from redox signalling. *IUBMB Life*, 60(5):301–307, 2008.

[122] S C Denstman, L E Dillehay, and J R Williams. Enhanced susceptibility to HpD-sensitized phototoxicity and correlated resistance to trypsin detachment in SV40 transformed IMR-90 cells. *Photochemistry and Photobiology*, 43:145–147, 1986.

[123] D J Ball, S Mayhew, D I Vernon, M Griffin, and S B Brown. Decreased efficiency of trypsinization of cells following photodynamic therapy: evaluation of a role for tissue transglutaminase . *Photochemistry and Photobiology*, 73(1):47–53, 2001.

[124] A Uzdensky, A Juzeniene, L-W Ma, and J Moan. Photodynamic inhibition of enzymatic detachment of human cancer cells from a substratum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1670:1–11, January 2004.

[125] J-C Tsai, C-L Wu, H-F Chien, and C-T Chen. Reorganization of cytoskeleton induced by 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic

therapy and its correlation with mitochondrial dysfunction. *Lasers in Surgery and Medicine*, 36:398–408, 2005.

[126] X Hong, F Jiang, S N Kalkanis, and Z G Zhang. Intracellular free calcium mediates glioma cell detachment and cytotoxicity after photodynamic therapy. *Lasers in Medical Science*, 24(5):777–786, 2009.

[127] P Margaron, R Sorrenti, and J G Levy. Photodynamic therapy inhibits cell adhesion without altering integrin expression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1359:200–210, December 1997.

[128] J M Runnels, N Chen, B Ortel, D Kato, and T Hasan. BPD-MA-mediated photosensitization in vitro and in vivo: cellular adhesion and beta1 integrin expression in ovarian cancer cells. *British Journal of Cancer*, 80(7):946–953, June 1999.

[129] M-T Foultier, V Vornax-Coinsmann, S Cordel, A Combre, and T Patrice. Modulation of colonic cancer cell adhesiveness by haematoporphyrin derivative photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 23:9–17, 1994.

[130] T-H Yang, C-T Chen, C-P Wang, and P-J Lou. Photodynamic therapy suppresses the migration and invasion of head and neck cancer cells in vitro. *Oral Oncology*, 43:358–365, 2007.

[131] N Etminan, C Peters, J Ficnar, S Anlasik, E Bunemann, P J Slotty, D Hanggi, H-J Steiger, R V Sorg, and W Stummer. Modulation of migratory activity and invasiveness of human glioma spheroids following

5-aminolevulinic acid-based photodynamic treatment. *Journal Of Neurosurgery*, 115:281–288, 2011.

[132] F I Simplicio, F Maionchi, and N Hioka. Terapia Fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Química Nova*, 25(5):801–807, 2002.

[133] J P Tardivo, A Del Giglio, C S de Oliveira, D S Gabrielli, H C Junqueira, D B Tada, D Severino, R F Turchiello, and M S Baptista. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(3):175–191, September 2005.

[134] A P Castano, T N Demidova, and M R Hamblin. Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(4):279–293, December 2004.

[135] E D Sternberg, D Dolphin, and C Brickner. Porphyrin-based photosensitizers for use in Photodynamic Therapy. *Tetrahedron*, 54(447):4151–4202, 1998.

[136] D A Skoog, F J Holler, and T A Nieman. *Princípios de Análise Instrumental*. Artmed Editora S.A., Porto Alegre, 5 ed edition, 2002.

[137] K Berg, P K Selbo, A Weyergang, A Dietze, L Prasmickaite, A Bonsted, B O Engesaeter, E Angell-Petersen, T Warloe, N Frandsen, and A Hogset. Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications. *Journal of Microscopy*, 218(2):133–147, 2005.

[138] L Brancaleon, S W Magennis, I D W Samuel, E Namdas, A Lesar, and H Moseley. Characterization of the photoproducts of protoporphyrin IX bound to human serum albumin and immunoglobulin G. *Biophysical Chemistry*, 109(3):351–360, June 2004.

[139] C Pavani, A Uchoa, C S Oliveira, Y Iamamoto, and M S Baptista. Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8(2):233–240, February 2009.

[140] F Wilkinson, WP Helman, and AB Ross. quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *Journal of Physical Chemistry Reference Data*, 22(1):113–262, 1993.

[141] A M d'A R Gonsalves and M M Pereira. A new look into the Rothemund meso-tetraakyl and tetrarylporphyrin synthesis. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 22:931–933, 1985.

[142] C A Hunter and J K M Sanders. The nature of π-π interactions. *Journal of American Chemical Society*, 112(2):5525–5534, 1990.

[143] D Gabrielli, E Belisle, D Severino, A J Kowaltowski, and M S Baptists. Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. *Photochemistry and Photobiology*, 79(3):227–232, 2004.

[144] C R Lambert, E Reddi, J D Spikes, M A J Rodgers, and G Jori. The effects of porphyrin structure and aggregation state on photosensitized

processes in aqueous and micellar media. *Photochemistry and Photobiology*, 44(5):595–601, 1986.

[145] I E Borissevitch, T T Tominaga, H Imasato, and M Tabak. Water soluble porphyrins with bovine serum albumin. The role of albumin and porphyrin aggregation. *Journal of Luminescence*, 69:65–76, 1996.

[146] K Kano, K Fukuda, H Wakami, R Nishiyabu, and R F Pasternack. Factors influencing self-aggregation tendencies of cationic porphyrins in aqueous solution. *Journal of American Chemical Society*, 122:7494–7502, 2000.

[147] H C Junqueira, D Severino, L G Dias, M S Gugliotti, and M S Baptista. Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 4:2320–2328, May 2002.

[148] D Severino, H C Junqueira, M Gugliotti, D S Gabrielli, and M S Baptista. Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. *Photochemistry and Photobiology*, 77(5):459–468, May 2003.

[149] L P F Aggarwal and I E Borissevitch. On the dynamics of the TPPS4 aggregation in aqueous solutions Successive formation of H and J aggregates. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 63:227–233, 2006.

[150] D K Deda, C Pavani, E Caritá, M S Baptista, H E Toma, and K Araki. Correlation of photodynamic activity and singlet oxygen quantum yi-

elds in two series of hydrophobic monocationic porphyrins. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 16:55–63, 2012.

[151] A F Uchoa, K T Oliveira, M S Baptista, A J Bortoluzzi, Y Iamamoto, and O A Serra. Chlorin photosensitizers sterically designed to prevent self-aggregation. *Journal of Organic Chemistry*, 76(21):8824–8832, 2011.

[152] A F Uchoa, C S Oliveira, and M S Baptista. Relationship between structure and photoactivity of porphyrins derived from protoporphyrin IX. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 14:832–845, 2010.

[153] K T Oliveira, F F Assis, O Ribeiro, C R Neri, A U Fernandes, M S Baptista, N P Lopes, O A Serra, and Y Iamamoto. Synthesis of phthalocyanines-ALA conjugates: water-soluble compounds with low aggregation. *Journal of Organic Chemistry*, 74:7962–7965, 2009.

[154] C S Oliveira, R Turchiello, A J Kowaltowski, G L Indig, and M S Baptista. Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency. *Free Radical Biology & Medicine*, 51(4):824–833, August 2011.

[155] F M Engelmann, I Mayer, D S Gabrielli, H E Toma, A J Kowaltowski, K Araki, and M S Baptista. Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39(2):175–185, April 2007.

[156] J Bereiter-Hahn, C H Fox, and B Thorell. Quantitative reflection contrast microscopy of living cells. *Journal of Cell Biology*, 82:767–779, September 1979.

[157] J Schilling, K Sengupta, S Goennenwein, A R Bausch, and E Sackmann. Absolute interfacial distance measurements by dual-wavelength reflection interference contrast microscopy. *Physical Review E*, 69:021901, 2004.

[158] J Radler and E Sackmann. Imaging optical thicknesses and separation distances of phospholipid vesicles at solid surfaces. *Journal of Physics II France*, 3:727–748, 1993.

[159] D Ge, D Wu, Z Wang, W Shi, T Wu, A Zhang, S Hong, J Wang, Y Zhang, and L Ren. Cellular uptake mechanism of molecular umbrella. *Bioconjugate Chemistry*, 20(12):2311–2316, December 2009.

[160] B D Chithrani and W C W Chan. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Letters*, 7(6):1542–1550, June 2007.

[161] N W S Kam, Z Liu, and H Dai. Carbon nanotubes as intracellular transporters for proteins and DNA: an investigation of the uptake mechanism and pathway. *Angewandte Chemie (International Edition in English)*, 45(4):577–581, January 2006.

[162] J G Mohanty, S Bhamidipaty, M K Evans, and J M Rifkind. A fluorimetric semi-microplate format assay of protein carbonyls in blood plasma. *Analytical Biochemistry*, 400:289–294, May 2010.

[163] A R Chaudhuri, E M de Waal, A Pierce, H Van Remmen, W F Ward, and A Richardson. Detection of protein carbonyls in aging liver tissue: a fluorescence-based proteomic approach. *Mechanisms of Ageing and Development*, 127:849–861, November 2006.

[164] J-M Dubois and G Ouanounou. The Boltzmann equation in molecular biology. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 99:87–93, 2009.

[165] X Zheng, H Baker, W S Hancock, F Fawaz, M McCaman, and E Pungor Jr. Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. *Biotechnology Progress*, 22(5):1294–1300, 2006.

[166] P Rajagopalan, W A Marganski, X Q Brown, and J Y Wong. Direct comparison of the spread area, contractility, and migration of balb/c 3T3 fibroblasts adhered to fibronectin- and RGD-modified substrata. *Biophysical Journal*, 87:2818–2827, 2004.

[167] M Larsen, V V Artym, J A Green, and K M Yamada. The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 18:463–471, 2006.

[168] M A Wozniak, K Modzelewska, L Kwong, and P J Keely. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1692:103–119, 2004.

[169] N Faucheux, R Tzoneva, M-D Nagel, and T Groth. The dependence of fibrillar adhesions in human fibroblasts on substratum chemistry. *Biomaterials*, 27:234–245, 2006.

[170] J Yue, K Zhang, and J Chen. Role of integrins in regulating proteases to mediate extracellular matrix remodeling. *Cancer Microenvironment*, 5(3):275–283, 2012.

[171] A Ben-ze'ev, S R Farmer, and S Penman. Protein synthesis requires cell-surface contact while nuclear events respond to cell shape in fibroblasts. *Cell*, 21:365–372, 1980.

[172] L Weiss and M K Chang. Some effects of actinomycin D, cycloheximide and puromycin on cell adhesion. *Journal of Cell Science*, 12:655–664, 1973.

[173] E Ranzato, S Grosso, M Patrone, P G Betta, A Viarengo, and S Biffo. Spreading of mesothelioma cells is rapamycin-sensitive and requires continuing translation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 108:867–876, 2009.

[174] A Chlenski and S L Cohn. Modulation of matrix remodeling by SPARC in neoplastic progression. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 21:55–65, 2010.

[175] A Chlenski, L J Guerrero, H R Salwen, Q Yang, Y Tian, M La Madrid, S Mirzoeva, P G Bouyer, D Xu, M Walker, and S L Cohn. Secreted protein acidic and rich in cysteine is a matrix scavenger chaperone. *PloS One*, 6(9):e23880, 2011.

[176] H C Chong, C K Tan, R-L Huang, and N S Tan. Matricellular proteins: a sticky affair with cancers. *Journal of Oncology*, page 351089, 2012.

[177] D D Roberts. Emerging functions of matricellular proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68:3133–3136, 2011.

[178] R A Latour. Biomaterials: Protein Surface Interactions. In *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, pages 1–15. Marcel Dekker, New York, 2005.

[179] C J Wilson, R E Clegg, D I Leavesley, and M J Pearcy. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue engineering*, 11(1-2):1–18, 2005.

[180] P Roach, D Farrar, and C C Perry. Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes. *Journal of the American Chemical Society*, 127(22):8168–8173, June 2005.

[181] V Sol, M Enache, G Garcia, R Granet, M Guilloton, J C Blais, and P Krausz. Polyamine conjugates of meso-tritolylporphyrin and protoporphyrin IX: potential agents for photodynamic therapy of cancers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14:1364–1377, 2006.

[182] N Gunari, Y Cong, B Zhang, K Fischer, A Janshoff, and M Schmidt. Surfactant induced helix formation of cylindrical brush polymers with poly-L-lysine side chains. *Macromolecular Rapid Communications*, (29):821–825, 2008.

[183] N Davis, D Liu, A K Jain, S-Y Jiang, F Jiang, A Richter, and J G Levy. Modified polyvinyl alcohol-benzoporphyrin derivative conjugates as phototoxic agents. *Photochemistry and Photobiology*, 57(4):641–647, 1993.

[184] N S Soukos, M R Hamblin, and T Hasant. The effect of charge on cellular uptake and phototoxicity of polylysine chlorin e6 conjugates. *Photochemistry and Photobiology*, 65(4):723–729, 1997.

[185] M F Grahn, A Giger, A Mcguinness, M L De Jode, J C M Stewart, H-b Ris, and H J Altermatt. mTHPC polymer conjugates : the in vivo photodynamic activity of four candidate compounds. *Lasers in Medical Science*, 14:40–46, 1999.

[186] M R Hamblin, J L Miller, I Rizvi, and B Ortel. Degree of substitution of chlorin e6 on charged poly- L-lysine chains affects their cellular uptake, localization and phototoxicity towards macrophages and cancer cells. *Journal of X-Ray Science and Technology*, 10:139–152, 2002.

[187] R M Cordeiro, R Miotto, and M S Baptista. Photodynamic efficiency of cationic meso-porphyrins at lipid bilayers: insights from molecular dynamics simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116:14618–14627, 2012.

[188] A A Pashkovskaya, E A Sokolenko, V S Sokolov, E A Kotova, and Y N Antonenko. Photodynamic activity and binding of sulfonated metallophthalocyanines to phospholipid membranes: contribution of metal-

phosphate coordination. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768:2459–2465, 2007.

[189] C Pavani, Y Iamamoto, and M. S. Baptista. Mechanism and efficiency of cell death of type II photosensitizers: effect of Zinc chelation . *Photochemistry and Photobiology*, 88:774–781, 2012.

[190] D Raucher and M P Sheetz. Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. *The Journal of Cell Biology*, 148(1):127–136, January 2000.

[191] D Hanahan and R A Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100:57–70, 2000.

[192] J D Hood and D A Cheresh. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nature Reviews. Cancer*, 2:91–100, 2002.

[193] S M Weis and D A Cheresh. alphaV integrins in angiogenesis and cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1:a006478, 2011.

[194] P Friedl and K Wolf. Tumor-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews. Cancer*, 3:362–374, 2003.

[195] D L M Beauvais and A C Rapraeger. Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2:3, January 2004.

[196] M R Morgan, M J Humphries, and M D Bass. Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(12):957–969, December 2007.

[197] B D Smith, P La Celle, G E Siefring, L Lowe-Krentz, and L Lorand. Membrane biology effects of the calcium-mediated enzymatic cross-linking of membrane proteins on cellular deformability. *Journal of Membrane Biology*, 61:75–80, 1981.

[198] A P Castano, T N Demidova, and M R Hamblin. Mechanisms in photodynamic therapy: part three photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(2):91–106, June 2005.

[199] U Ziegler, P Groscurth, U Ziegler, and P Groscurth. Morphological features of cell death. *News in Physiological Sciences*, 19:124–128, 2004.

[200] G Hacker. The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research*, 301:5–17, 2000.

[201] T S Johnson, C I Scholfield, J Parry, and M Griffin. Induction of tissue transglutaminase by dexamethasone: its correlation to receptor number and transglutaminase-mediated cell death in a series of malignant hamster fibrosarcomas. *Biochemical Journal*, 112:105–112, 1998.

[202] A M Seddon, D Casey, R V Law, A Gee, R H Templer, and O Ces. Drug interactions with lipid membranes. *Chemical Society Reviews*, 38:2509–2519, 2009.

[203] I Bronshtein, S Aulova, A Juzeniene, V Iani, L-W Ma, K Smith, Z Malik, J Moan, and B Ehrenberg. In vitro and in vivo photosensitization by protoporphyrins possessing different lipophilicities and vertical loca-

lization in the membrane. *Photochemistry and Photobiology*, 82:1319–1325, 2006.

[204] L M Bareford and P W Swaan. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(8):748–758, August 2007.

[205] V Zinchuk, O Zinchuk, and T Okada. Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta Histochemica Cytochemica*, 40(4):101–111, 2007.

[206] S Sandberg and I Romslo. Phototoxicity of protoporphyrin as related to its subcellular localization in mice livers after short-term feeding with griseofulvin. *Biochemical Journal*, 198:67–74, 1981.

[207] K Huang, L Chen, S Lv, and J Xiong. Protoporphyrin IX photobleaching of subcellular distributed sites of leukemic HL60 cells based on ALA-PDT in vitro. *Journal of Biochemical Science and Engeneering*, 5:548–555, 2012.

[208] P M Kidd. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alternative Medicine Review*, 2(3):155–176, 1997.

[209] M Guo, J Chen, Y Zhang, K Chen, C Pan, and S Yao. Enhanced adhesion/spreading and proliferation of mammalian cells on electropolymerized porphyrin film for biosensing applications. *Biosensors & Bioelectronics*, 23(6):865–871, January 2008.

[210] E G Hayman, M D Pierschbacher, S Suzuki, and E Ruoslahti. Vitronectin - a major cell attachment-promoting protein in fetal bovine serum. *Experimental Cell Research*, 160:245–258, 1985.

[211] J R Lakowicz, editor. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, London, 3rd edition, 2009.

[212] M Obata, S Hirohara, K Sharyo, H Alitomo, K Kajiwara, S-I Ogata, M Tanihara, C Ohtsuki, and S Yano. Sugar-dependent photodynamic effect of glycoconjugated porphyrins: a study on photocytotoxicity, photophysical properties and binding behavior to bovine serum albumin (BSA). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770(8):1204–1211, August 2007.

[213] A A Lamola, I Asher, U Muller-Eberhard, and M Poh-Fitzpatrick. Fluorimetric study of the binding of protoporphyrin to haemopexin and albumin. *The Biochemical Journal*, 196(3):693–698, June 1981.

[214] L Brancaleon and H Moseley. Effects of photoproducts on the binding properties of protoporphyrin IX to proteins. *Biophysical Chemistry*, 96(1):77–87, April 2002.

[215] S Chatterjee and T S Srivastava. Spectral investigations of the interaction of some porphyrins with bovine serum albumin. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 157:147–157, 2000.

[216] J R Kanofsky. Quenching of singlet oxygen by human plasma. *Photochemistry and Photobiology*, 51(3):299–303, 1990.

[217] J H Yu, Y X Weng, X S Wang, L Zhang, B W Zhang, and Y Cao. The triplet excited state changes of amphiphilic porphyrins with different side-chain length in AOT reverse micelles. *Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 156:139–144, 2003.

[218] J Lafferty and T G Truscott. Triplet state of Protoporphyrin IX. *Chemical Communications*, pages 51–52, 1978.

[219] M S Baptista and G L Indig. Effect of BSA binding on photophysical and photochemical properties of triarylmethane dyes. *Journal of Physical Chemistry B*, 102:4678–4688, 1998.

[220] I E Borissevitch, T T Tominaga, and C C Schmitt. Photophysical studies on the interaction of two water-soluble porphyrins with bovine serum albumin. Effects upon the porphyrin triplet state characteristics. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 114:201–207, April 1998.

[221] E Alarcón, A M Edwards, A M Garcia, M Muñoz, A Aspée, C D Borsarelli, and E A Lissi. Photophysics and photochemistry of zinc phthalocyanine/bovine serum albumin adducts. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8:255–263, February 2009.

[222] M S Foley, A Beeby, A W Parker, S M Bishop, and D Phillips. Excited triplet state photophysics of the sulphonated aluminium phthalocyanines bound to human serum albumin. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology*, 38:10–17, March 1997.

Súmula curricular

DADOS PESSOAIS

Nome: Patrícia Araújo dos Santos

Nome em Citações: Santos, P. A.

Local de Nascimento: Alvorada/RS

Data de Nascimento: 26/06/1980

EDUCAÇÃO

Ensino Médio

Escola Municipal Prof. Derville Allegretti

São Paulo/SP

Curso Técnico em Administração de Empresas

Ingresso: 1995

Conclusão: 1997

Graduação

Instituto de Química da Universidade de São Paulo

São Paulo/SP

Bacharelado e Licenciatura em Química

Ingresso: 2002

Conclusão:

Bacharelado – 2o. semestre de 2006

Licenciatura – 1o. semestre de 2007

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Françês Fluente – DALF 50/100 (Novembro 2008)

Aperfeiçoamento em Tópicos de Estatística - IMEUSP

Carga Horária: 180h

Ingresso: Fevereiro/2013

OCUPAÇÃO

Estudande de Doutorado

Bolsista do Programa Institucional de Bolsas (CNPq)

Vigência: Fevereiro/2007 – Fevereiro/2012 (Interrupção entre Outubro/2009

– Outubro/2010)

Bolsista do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (CAPES)
Vigência: Outubro/2009 – Outubro/2010

Bolsista do Programa USP-COFECUB
Vigência: Abril/2012 – Julho/2012

PUBLICAÇÕES

Artigos Publicados

PEDRIALI, C. A.; FERNANDES, A. U.; SANTOS, P. A.; SILVA, M. M.; SEVERINO, D.; BAPTISTA, M. S.; *Antioxidant activity, cito- and photo-toxicity of pomegranate (Punica granatum L.) seed pulp extract*; Ciência e Tecnologia de Alimentos (2010) 30:4 1017-1021.

Artigos Submetidos

SANTOS, P. A.; ROCHA, C. S.; BAPTISTA, M. S.; *Adhesion of HeLa and fibroblasts cells to chemically modified gold surfaces.* Biomaterials

Manuscritos em fase final de preparação

VALENGA, F.; DECHER, G.; WITT, M. A.; SANTOS, P. A.; SCHREINER, W. H.; LUCYSZYN, N.; SIERAKOWSKI, M. R.; *Galactomannan-alginate blend as polyanion applied in biocompatible layer-by-layer thin films.*

Abstract

Galactomannan (GM), a neutral biopolymer obtained from Leucaena leucocephala seeds and sodium alginate (AL) from macroalgae were mixture in solution, and the GM-AL blend was approved by zeta potential measurements as polyanion in multilayers films (LbL). The fluorescence microscopy from the two derivate polysaccharides during film growth proved that the GM-AL mixture was adsorbed onto glass and was not removed during the wash steps. LbL films were obtained by different deposition techniques using chitosan (CHI) as polycation. Characterization surface by ellipsometry, AFM, and XPS allowed determining which method produced the thickest, the more homogeneous and smoother films. From QCM-D analysis it could be seen the mobility of water between the layers suggesting a non-rigid film formation. Besides films construction and characterization, biocompatibility of the films was approved by cell adhesion analysis. These results suggest a potential application of GM-AL blend as suitable polyanion for LbL films due to its low cost and abundance, creating potential materials for biomedical and biotechnological devices as demonstrated by the adsorption onto silicon surfaces in this study.

Trabalhos em Congressos

Estudos físico-químico e estrutural da permeação de corantes fenotiazínicos – Santos, P. A.; Turchielo, R. F.; Severino, D.; Baptista, M. S. – XIII Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP – Brasil/2005

Estudos físico-químico e estrutural da permeação de corantes fenotiazínicos em tecidos vivos – Santos, P. A.; Turchielo, R. F.; Severino, D.; Baptista, M. S. – XIV Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP – Brasil/2006

Estudos físico-químico e estrutural da permeação de corantes fenotiazínicos – Santos, P. A.; Turchielo, R. F.; Severino, D.; Baptista, M. S. – II Workshop Terapia Fotodinâmica: Integração dos Aspectos Moleculares, Tecnológicos e Aplicações na Área da Saúde – Brasil/2007

Quantificação da morte e alterações no ciclo celular causadas por azul de metileno após fotoativação das linhagens de retinoblastoma infantil Y79 e WERI – Turchielo, R. F.; Severino, D.; Santos, P. A.; Baptista, M. S. – II Workshop Terapia Fotodinâmica: Integração dos Aspectos Moleculares, Tecnológicos e Aplicações na Área da Saúde – Brasil/2007

Antioxidant activity, cito- and phototoxicity of pomegranate (Punica granatum L.) seed pulp extract – Pedriali, C. A.; Fernandes, A. U.; Santos, P. A.; Silva, M. M.; Severino, D.; Baptista, M. S. – VI International Symposium

on Natural Product Chemistry and its Applications - Chile/2007

Influência das propriedades das superfícies na adesão celular. Estudo da utilização de células em sensores de SPRi – Santos, P. A.; Baptista, M. S. – XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Brasil/2009

Protoporphyrin IX-mediated photosensitization of cell adhesion – Santos, P. A.; Marques, C. M.; Schroder, A. P.; Fernandes, A. U.; Baptista, M. S. – 467 WE Heraeus Seminar on Biophysics of Membrane Transformations – Alemanha/2010

Effect of Protoporphyrin IX-mediated photosensitization on cell adhesion visualized by RICM – Santos, P. A.; Marques, C. M.; Schroder, A. P.; Fernandes, A. U.; Baptista, M. S. – XXII Congrès de la Société Française de Biophysique – França/2010

Cell adhesion can be modulated by the photosensitizer Protoporphyrin IX and its derivative conjugated with Poly-L-Lysine – Santos, P. A.; Marques, C. M.; Schroder, A. P.; Fernandes, A. U.; Baptista, M. S. – Summer School Dynamics of Biological Membranes – Frana/2011

Effect of Protoporphyrin IX-mediated photo-oxidation on HeLa cell adhesion – Santos, P. A.; Fernandes, A. U.; Marques, C. M.; Schroder, A. P.; Baptista, M. S. – I São Paulo Advanced School on Redox Processes in Biomedicine and VII Meeting of South American Group of the SFRBM – Brasil/2011

Effect of photo-oxidation of ECM proteins on the adhesion of HeLa cells – Santos, P. A.; Fernandes, A. U.; Marques, C. M.; Baptista, M. S. – XI Brazilian Symposium on Extracellular Matrix and VI International Symposium on Extracellular Matrix – Brasil/2011

Effect of photo-oxidation on cell adhesion – Santos, P. A.; Fernandes, A. U.; Marques, C. M.; Baptista, M. S. – Gordon Research Conference on Oxygen Radicals – EUA/2012