



Mecanismos moleculares da interação entre betalaínas cumarínicas fluorescentes e células de glioma humano

NATHANA BARBOSA LOPES

Tese de Doutorado

Departamento de Química Fundamental
Programa de Pós-Graduação em Química

Versão corrigida da Tese defendida

Data do depósito na SPG:

22/02/2017

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

L864m Lopes, Nathana Barbosa
 Mecanismos moleculares da interação entre betalaínas
 cumarínicas fluorescentes e células de glioma humano / Nathana
 Barbosa Lopes. -- São Paulo, 2017.
 130p.

 Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
 São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
 Orientador: Bastos, Erick Leite

 1. Fotoquímica : Físico-química : Orgânica 2. Corantes
 fluorescentes I. T. II. Bastos, Erick Leite, orientador.

541.135 CDD

NATHANA BARBOSA LOPES

**Mecanismos moleculares da interação entre betalaínas
cumarínicas fluorescentes e células de glioma humano**

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Erick Leite Bastos

São Paulo
2017

Dedico esta tese ao meu amado pai, Cezar Augusto Lopes,
cuja lembrança me deu força e coragem para realizar meus sonhos.

Agradecimentos

Essa Tese de Doutorado representa uma grande vitória para mim. Vitória que não poderia ter sido alcançada sem a ajuda direta ou indireta de muitas pessoas.

Ao Erick por ter acreditado em mim e por investir tempo na minha formação. Agradeço-o por ter exigido sempre o meu melhor e ter me ajudado a crescer não só cientificamente, mas também como pessoa. Ele sempre será um modelo para mim.

Aos meus pais Argentina e Cezar que sempre me apoiaram, me educaram e fizeram de mim a pessoa que sou hoje. Tudo o que faço é por eles. Espero que um dia eles tenham por mim uma fração do orgulho que eu tenho deles. Agradeço novamente à minha mãe Argentina e também à minha tia Olga que sempre me aconselharam com tanto amor e me ensinaram que desistir nunca é uma opção e que devemos ter força de vontade e garra, sempre.

Ao meu companheiro de vida, Claudio, que sempre me aguentou falando de química e de experimentos sem sequer saber do que eu estava falando, e ainda assim se esforçou tanto para me ajudar sempre. Sem ele o caminho teria sido muito mais difícil e sem cores.

Acredito que meu maior motivo de orgulho não seja esta Tese em si, mas os amigos que conquistei ao longo desses anos. Agradeço à Letícia por todos os anos de amizade, conselhos, ensinamentos e ajuda. Agradeço ao Bruno não só por ter sido meu apoio em tantos momentos difíceis e por ter sido um amigo tão carinhoso, protetor e leal, mas também por ter passado incontáveis noites na UNIFESP comigo, me ensinando e me ajudando em uma área totalmente nova para mim. Agradeço imensamente os colegas de laboratório que conheci durante este trajeto, em especial a Ana Paula, a Caroline e a Larissa por não terem deixado que o desespero tomasse conta e por terem se tornado grandes amigas, que levarei para sempre comigo. Agradeço aos amigos que fiz fora da universidade, principalmente Luciana e Cynthia, minhas irmãs que sempre torceram por mim.

Agradeço também as muitas pessoas que me ajudaram tanto fora do IQ-USP, em especial às que conheci na UNIFESP, como Richard, Tarciso, Vera, Carlos, Natália e Rodrigo, que me emprestaram com tão boa vontade algum reagente importante ou me suportaram na realização de alguns experimentos. Ao Douglas, por sempre me fornecer

reagentes. Ao Prof. Renato Mortara (UNIFESP) por ter me permitido usar tantas vezes seu microscópio e aos seus alunos que sempre foram atenciosos e gentis. Aos técnicos Mario Cruz (CEFAP-USP), Helena Junqueira (IQ-USP), Joaquim Matheus (IQ-USP) e Jair Menegon (IQ-USP) por toda a atenção e paciência.

À Prof^a. Renata Tonelli (UNIFESP) que me acolheu em seu laboratório por tanto tempo e que me deu a oportunidade de descobrir uma nova área, pela qual me apaixonei. Ao Prof. Alexandre Bruni-Cardoso (IQ-USP) e Dr^a. Ana Zen que sempre foram muito disponíveis para me ajudar e pensar nos resultados comigo sempre que possível. Ao Prof. Ariel Silber (ICB-USP) e ao Dr. Brian Suárez que também me acolheram em seu laboratório para a realização dos experimentos de transporte. Ao Dr. Emerson Bernardes (ICESP-USP) e Ronny com os quais tive os primeiros contatos com células.

Ao Prof. Jacinto Sá e seus alunos Mariia Pavliuk, Yocef Hattori e Dr. Daniel Fernandes (Uppsala Universitët, Suécia) por toda a ajuda, carinho e atenção durante o período que realizei experimentos em seu laboratório. Agradeço também à Dr^a. Cristina Paun pela atenção nos meus primeiros dias em um país completamente novo para mim.

Não poderia deixar de agradecer à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida e ao Instituto de Química pela estrutura. Este trabalho não seria possível sem estes órgãos.

Finalmente, gostaria de agradecer à Deus, ou qualquer que seja seu nome, que me deu força e me ajudou a vencer cada obstáculo com honestidade e caráter, acima de tudo. Como diria um provérbio japonês: *“vença a si mesmo e terá vencido seu próprio adversário”*.

“Sou uma série de pequenas vitórias
e grandes derrotas,
e estou tão surpreso quanto qualquer outro
por ter chegado até aqui”

Charles Bukowski (1920–1994)
em "As pessoas parecem flores finalmente"

Resumo

LOPES, N. B. **Mecanismos moleculares da interação entre betalaínas cumarínicas fluorescentes e células de glioma humano.** 2017. 130 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Moléculas orgânicas fluorescentes são uma importante ferramenta para biologia celular. Compostos ideais para esta aplicação devem ter alto brilho (produto do coeficiente de atenuação molar e do rendimento quântico de fluorescência), ser fotoestáveis e internalizáveis, não comprometer a viabilidade celular e interagir com biomoléculas com algum grau de especificidade. Nesta Tese de Doutorado é apresentado o estudo do uso de cBeet120, uma betalaína cumarínica artificial, e células de glioma humano da linhagem U87-MG. Betalaínas são pigmentos de plantas que apresentam alta biocompatibilidade que servem como material de partida para o desenvolvimento de derivados funcionais. A sonda se acumula principalmente no núcleo das células U87-MG e marca principalmente nucléolos via interação com proteínas. A presença de DNase ou RNAse elimina a marcação nuclear, sem afetar a fraca marcação citoplasmática de fundo. Estudos de inibição de transporte sugerem que cBeet120 é internalizada por transportadores de L-glutamato da família de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT). O uso de artemisinina para inibição Ca^{2+} -ATPases aumenta a velocidade de internalização de cBeet120 em células U87-MG. Quando irradiada com luz de cor ciano, cBeet120 no interior do núcleo de células vivas é fotoativada, resultando em um aumento da intensidade de fluorescência com o tempo (monitorado por 90 min) e o deslocamento hipsocrômico do máximo de emissão. Em células fixadas com paraformaldeído, o padrão de marcação da célula se torna mais difuso e a sonda emite fluorescência sem fotoativação. Medidas de tempo de vida de fluorescência em solução e imageamento por microscopia de tempo de vida de fluorescência permitem inferir a ocorrência da formação de um complexo proteína-cBeet120 ou um produto de transaminação que pode estar sujeito a isomerização *cis/trans*.

Palavras-chave: betalaínas, fluorescência, cBeet, glioblastoma, U87-MG.

Abstract

LOPES, N. B. **Molecular mechanisms of interaction between fluorescent coumarinic betalains and human glioma cells.** 2017. 130 p. Thesis (Doctorate) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Fluorescent organic molecules are an important tool for cell biology. Ideal compounds for this application must have high brightness (product of the molar attenuation coefficient and fluorescence quantum yield), be photostable and internalizable by cells, do not compromise cellular viability and interact with biomolecules with some degree of specificity. In this Doctorate Thesis, we describe the interaction of cBeet120, an artificial coumarinic betalain, and human glioma cells of line U87-MG. Betalains are plant pigments that exhibit high biocompatibility that serve as starting material for the development of functional derivatives. The probe accumulates mainly in the nucleus of the U87-MG cells and mainly marks nucleoli via interaction with proteins. The presence of DNase or RNAase eliminates nuclear labeling, without affecting the poor background cytoplasmic labeling. Transport inhibition studies suggest that cBeet120 is internalized by L-glutamate transporters from the excitatory amino acid transporter (EAAT) family. The use of artemisinin for inhibition Ca^{2+} -ATPases increases the rate of cBeet120 internalization in U87-MG cells. When irradiated with cyan colored light, cBeet120 within the nucleus of living cells is photoactivated, resulting in an increase in fluorescence intensity over time (monitored for 90 min) and the hypochromic shift of the emission maximum. In cells fixed with paraformaldehyde, the labeling pattern of the cell becomes more diffuse and the probe emits fluorescence without photoactivation. Fluorescence life-time measurements in solution and fluorescence life-time imaging microscopy allows to infer the occurrence of the formation of a protein-cBeet120 complex or the formation of a transimination product that may be subject to *cis/trans* isomerization.

Keywords: betalains, fluorescence, cBeet, glioblastoma, U87-MG.

Lista de símbolos, abreviaturas e siglas

7AAD	7-aminoactinomicina D
AcOEt	Acetato de etila
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Ácido bicinconínico
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
Bn	Betanina
BSA	Albumina de soro bovino
BtP	Indicaxantina
c120	Cumarina 120, 7-amino-4-metilcumarina
c450	Cumarina 450, 7-amino-4,6-dietilcumarina
cBeet120	Betalocumarina 120
cBeet151	Betalocumarina 151
cBeet450	Betalocumarina 450
DAPI	Cloridrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Dubelco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	1,4-Ditrioteitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis(2-aminoetiléter)- <i>N,N,N,N'</i> -tetra-acético
EtOH	Etanol
F-12	Ham's Nutrient Medium
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FLIM	Microscopia de tempo de vida de fluorescência (do inglês, <i>fluorescence lifetime microscopy</i>)
FRET	Transferência ressonante de energia por fluorescência (do inglês, <i>fluorescence resonance energy transfer</i>)
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFP	Proteína verde fluorescente (do inglês, <i>green-fluorescent protein</i>)
HBt	Ácido betalâmico

HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, <i>high performance liquid chromatography</i>)
HRP	Peroxidase de raiz forte (do inglês, <i>horseradish peroxidase</i>)
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida
NPs	Nanopartículas
p-TsOH	Ácido paratoluenosulfônico
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (do inglês, <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PBS	Tampão fosfato salino
PET	Transferência de elétron fotoinduzida (do inglês, <i>photoinduced electron transfer</i>)
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
RGB	Sistema de cores aditivas vermelho, verde e azul.
RIPA	Tampão para imunoprecipitação (do inglês, <i>radioimmunoprecipitation assay</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SDS	Dodecil sulfato de sódio
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
TBS	Tampão tris salino
TBS-T	Tampão tris salino com tween
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
<i>trans</i>-2,4-PDC	L- <i>trans</i> -pirrolidina-2,4-dicarboxilato
TRITC	Tetrametilrodamina
ϵ	Coeficiente de atenuação molar
λ	Comprimento de onda

Sumário

Agradecimentos	vii
Resumo	xi
Abstract.....	xiii
Lista de símbolos, abreviaturas e siglas.....	xv
1 Introdução.....	21
1.1 Fluorescência e fluoróforos: visão geral.....	21
1.2 Fluorescência aplicada à biologia celular.....	25
1.3 Entrada de sondas fluorescentes pela membrana celular.....	28
1.4 Relação estrutura-acúmulo do fluoróforo em compartimentos celulares.....	29
1.5 Linhagem U87-MG como modelo de internalização	35
1.6 Betalaínas: sondas fluorescentes biocompatíveis	36
2 Objetivo	43
2.1 Objetivos específicos.....	43
3 Resultados e discussão.....	45
3.1 Interação entre cBeet120 e células animais imortalizadas	45
3.2 Estudo da marcação do núcleo de U87-MG com cBeet120.....	49
3.2.1 Viabilidade celular.....	51
3.2.2 Marcação de células vivas	52
3.2.3 Marcação de células fixadas.....	59
3.3 Efeito da irradiação sobre a fluorescência de cBeet120	63
3.4 Mecanismo de entrada e acúmulo de cBeet120 em células U87-MG.....	65
3.4.1 Estudo do transporte de cBeet120	65
3.4.2 Ensaios de competição.....	69
3.4.3 Ensaios de inibição	74
3.4.4 Acúmulo de cBeet120 no núcleo de células U87-MG	80
3.5 Identificação das estruturas nucleares marcadas	83
3.5.1 Interação de cBeet120 com componentes nucleares	83
3.5.2 Determinação do tempo de vida de fluorescência de cBeet120.....	92
3.5.3 Microscopia de tempo de vida de fluorescência (FLIM) em U87-MG..	94
4 Conclusão	97
5 Parte experimental	99

5.1	Reagentes e solventes	99
5.1.1	Reagentes químicos	99
5.1.2	Ácidos e bases	99
5.1.3	Solventes.....	99
5.1.4	Soluções tampão	100
5.1.5	Meios de cultura	101
5.2	Equipamentos	101
5.2.1	Análises espectrofotométricas	101
5.2.2	Cromatografia analítica	101
5.2.3	Citometria de fluxo	102
5.2.4	Microscopia de epifluorescência	102
5.2.5	Microscopia confocal	102
5.2.6	Microscopia confocal com detecção espectral	102
5.2.7	Microscopia de tempo de vida de fluorescência (FLIM)	103
5.3	Semissínteses de betalaínas cumarínicas	103
5.3.1	Preparação do suco de beterraba	103
5.3.2	Obtenção do ácido betalâmico.....	103
5.3.3	Semissíntese e purificação de cBeet120 e cBeet450	104
5.4	Cultura de células	104
5.4.1	Cultivo	104
5.4.2	Repique.....	105
5.4.3	Congelamento e armazenamento.....	106
5.4.4	Contagem.....	106
5.5	Microscopia e análise de imagem.....	106
5.5.1	Preparação das lamínulas/lâminas	106
5.5.2	Preparo das células para microscopia	106
5.5.3	Imagens de epifluorescência.....	107
5.5.4	Medidas ON/OFF com cBeet120 em U87-MG.....	108
5.5.5	Microscopia confocal na presença de RNase e DNase	108
5.5.6	Microscopia confocal com detecção espectral	108
5.5.7	Microscopia de tempo de vida de fluorescência (FLIM)	109
5.5.8	Análise de imagens.....	109

5.6	Ensaio de viabilidade celular	109
5.7	Extração e dosagem de proteínas celulares	110
5.7.1	Proteínas totais.....	110
5.7.2	Proteínas Citosólicas.....	110
5.7.3	Proteínas ligadas ao DNA.....	111
5.7.4	Dosagem de proteínas.....	111
5.8	Extração de gDNA e gRNA	112
5.8.1	Interação entre cBeet120 e peptídeos ou proteínas comerciais	112
5.8.2	Proteínas de U87MG	112
5.8.3	gRNA e gDNA	114
5.9	Ensaio de transporte.....	115
5.9.1	Obtenção do espectro de emissão de fluorescência intracelular.....	115
5.9.2	Quantificação de cBeet120 intracelular.....	115
5.9.3	Otimização das medidas de transporte	115
5.9.4	Medidas de inibição/competição	116
5.9.5	Imagens de microscopia após a inibição da entrada de cBeet120.....	117
5.9.6	Efeito do pH sobre o transporte de cBeet120.....	117
5.9.7	Medidas de potencial zeta.....	118
5.10	Ensaio de viabilidade celular	118
5.11	Análise de resultados	118
6	Referências	119
7	Súmula Curricular.....	129
7.1	Dados pessoais.....	129
7.2	Educação.....	129
7.2.1	Formação complementar	129
7.3	Ocupação	129
7.4	Publicações	129
7.4.1	Artigos completos.....	129
7.4.2	Resumos de congressos e apresentações	129

1 Introdução

1.1 Fluorescência e fluoróforos: visão geral

O primeiro relato sobre o que atualmente chamamos de fluorescência foi feito no séc. XVI quando se descobriu que uma infusão diurética conhecida como *lignum nephriticum* brilhava de forma incomum quando iluminada. Três séculos depois, Sir George Gabriel Stokes cunhou o termo “fluorescência” quando investigava a emissão de luz azul em uma solução de sulfato de quinino irradiada com luz UV (mais energética, menor comprimento de onda).¹ No início do séc. XX, Aleksander Jabłoński entre outros desenvolveram teorias sobre as observações de Stokes que levaram a um melhor entendimento sobre a interação entre a radiação eletromagnética e a matéria, iniciando o que seriam a fotofísica, fotoquímica e fotobiologia modernas.^{1,2}

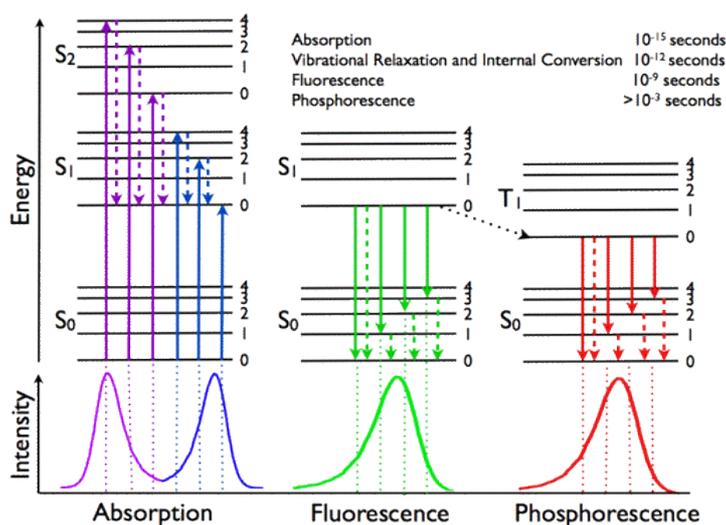
O séc. XXI tem sido marcado pelo marcante crescimento do uso de moléculas orgânicas fluorescentes como ferramentas para as ciências biológicas.² Um dos principais motivos deste avanço é o desenvolvimento de técnicas de microscopia que se beneficiam da fluorescência de moléculas e materiais inseridos em matrizes complexas, como a microscopia de epifluorescência, a microscopia confocal, microscopia multifotônica e a microscopia de super-resolução.³⁻⁵ De acordo com suas características, espécies químicas fluorescentes (também chamadas de *fluoróforos*) podem ter diversas aplicações como, por exemplo, indicadores de características intracelulares como pH, viscosidade e polaridade.^{6,7} Algumas das propriedades químicas mais relevantes para fluoróforos que serão usados em sistemas biológicos são sua lipofilicidade (tipicamente medida como log P ou log D), pK_a e pK_{aH} de seus grupos ácidos, bem como suas estabilidade e persistência.⁸ Estes parâmetros permitem determinar de forma a interação entre o fluoróforo e biomoléculas/meio. Entender a forma como o fluoróforo interage com a luz sob o ponto de vista físico e o destino do estado excitado formado são fundamentais para o desenvolvimento de novos fluoróforos. São parâmetros importantes: o coeficiente de atenuação molar (antiga absorvidade molar, ϵ), os comprimentos de onda máximos de absorção, excitação, fluorescência e fosforescência (λ_{ABS} , λ_{EX} , λ_{FL} e λ_P , respectivamente), o rendimento quântico de fluorescência (Φ_{FL}), o tempo de vida de fluorescência (τ) e as energias dos estados singlete e tripleto (E_S e E_T , respectivamente).¹

Os processos que ocorrem entre os estados eletrônicos de uma molécula podem ser ilustrados empregando-se um diagrama de Jabłoński (Esquema 1)¹. O estado fundamental, o primeiro e o segundo estados eletronicamente excitados singlete de uma molécula são representados como S_0 , S_1 e S_2 , respectivamente. Em moléculas, para cada um desses níveis de energia eletrônicos existe um número de níveis de energia vibracionais. As transições entre estados são ilustradas como linhas verticais para demonstrar a natureza instantânea da absorção de luz e o tempo aproximado deste processo é de 10^{-15} s, o que é um período muito curto para ocorrer um deslocamento expressivo dos núcleos, segundo o que é chamado de princípio de Franck-Condon.¹

Os processos de absorção e de emissão em uma molécula, na maioria dos casos, ocorrem a partir do seu estado vibracional de menor energia. Quando uma molécula absorve luz e é excitada à um nível vibracional de alta energia de S_1 ou S_2 ele rapidamente sofre relaxação para o estado vibracional de menor energia do S_1 . Este processo é chamado de conversão interna e, geralmente, ocorre em até 10^{-12} s. Visto que tempos de vida de fluorescência são tipicamente próximos de 10^{-8} s, a conversão interna, em geral, se completa antes da emissão. Assim, a emissão de fluorescência ocorre a partir de um estado excitado termicamente equilibrado, *i.e.* o estado vibracional de menor energia do S_1 . O retorno para o estado fundamental tipicamente ocorre em um estado vibracional excitado de S_0 , o que rapidamente (10^{-12} s) atinge o equilíbrio térmico. Tal retorno ao estado vibracional excitado de S_0 resulta em um espectro de emissão que é, em geral, a imagem especular do espectro de absorção da transição $S_0 \rightarrow S_1$. Isso ocorre quando a excitação eletrônica não modifica muito a geometria da molécula, sendo que o espaçamento entre os níveis de energia vibracionais do estado eletrônico fundamental é similar ao seu estado excitado. Como consequência, a estrutura vibracional observada na absorção é a mesma da emissão.

Moléculas que exibem fluorescência, em geral, possuem características em comum, como uma estrutura rígida que desfavoreça a relaxação por rotação e vibração e também uma diferença entre os momentos de dipolo da molécula do estado fundamental e excitado. Moléculas excitadas ao estado S_1 também podem sofrer um cruzamento entre sistemas que leva a formação de um estado tripleto (T_1) via inversão do spin do elétron. Quando a emissão ocorre do estado T_1 , diz-se que a molécula decai para o estado fundamental através de fosforescência.¹ Emissões de fosforescência, em geral, são

deslocadas para comprimentos de onda mais longos quando comparadas à emissões por fluorescência. Transições entre estados singlete e triplete são proibidas levando a tempos de vida muito mais longos de espécies triplete em comparação a espécies excitadas singlete. Em geral, moléculas que contêm átomos pesados (*e.g.*, bromo e iodo) facilitam o cruzamento entre sistemas favorecendo a ocorrência de fosforescência.¹ Contudo, a interação de espécies triplete com oxigênio molecular (tripleto) leva a um processo de supressão de energia que inibe a emissão de luz. A diferença de energia entre os estados excitados S_0 e S_1 é muito grande para popular o S_1 termicamente e reações térmicas tendem a comprometer a formação de estados excitados por essa via. Desta forma, luz é usada para induzir fluorescência, não calor.¹



Esquema 1 Diagrama de Jablonski ilustrando os estados eletrônicos de uma molécula e as transições entre eles.¹ Figura reproduzida com permissão da Springer.

Uma figura de mérito importante para uma sonda fluorescente é o seu brilho, medido como o produto entre o coeficiente de atenuação molar e o rendimento quântico de fluorescência ($\epsilon \times \Phi_{FL}$)^{2,9}. Enquanto o coeficiente de atenuação molar (ϵ) descreve o quão eficientemente uma molécula pode absorver luz, o rendimento quântico de fluorescência (Φ_{FL}) é a fração dos fótons absorvidos que foram reemitidos através da fluorescência. Por definição, valores de Φ_{FL} devem estar entre 0 (nenhuma fluorescência) e 1 (todos os fótons absorvidos são emitidos como fluorescência). Individualmente, ϵ e Φ_{FL} não são muito informativos, mas seu produto (*i.e.* brilho) é um parâmetro utilizado para fazer comparação entre fluóforos (Figura 1).

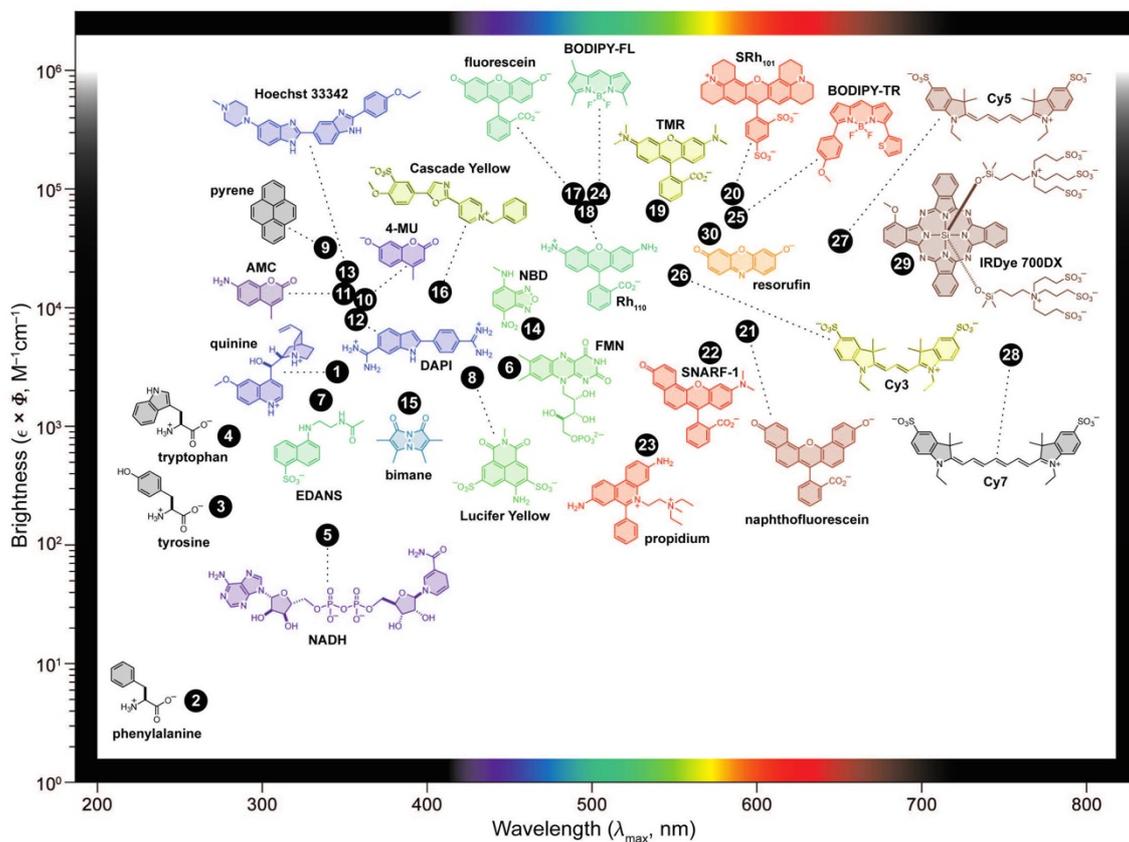


Figura 1 Brilho e o comprimento de absorção máximo de emissão (λ_{EM}) para as principais classes de fluoróforos. Figura adaptada reproduzida com permissão da American Chemical Society.²

Diversas biomoléculas presentes em organismos vivos são fluorescentes e são responsáveis pela chamada fluorescência endógena, ou *autofluorescência*.¹⁰ O próprio quinino, encontrado na casca da quinquina (*Cinchona officinalis*) é um exemplo de metabólito (no caso um alcaloide) que aumenta a autofluorescência do material vegetal no qual se encontra. Alguns aminoácidos também são capazes de emitir fluorescência. Fenilalanina e tirosina, por exemplo, exibem uma baixa emissão de fluorescência quando excitadas por comprimentos de onda na faixa do UV.¹¹ Já o triptofano é o aminoácido natural mais fluorescente, com um $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 280 nm, λ_{em} de 248 nm, ϵ de $6,3 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e Φ_{FL} de 0,13 (em água vs. quinino).^{2,12,13} A emissão de fluorescência do triptofano é sensível ao ambiente no qual ele se encontra e, por isso, tem sido usado como um índice de observação de vários processos, incluindo enovelamento de proteínas e ligação à ligantes. Outros fluoróforos naturais incluem cofatores de nicotinamida reduzidas (e.g., NADH) que exibem fluorescência mensurável ($\lambda_{m\acute{a}x}= 340$; $\lambda_{em}= 435$ nm). Flavinas também são importantes fluoróforos

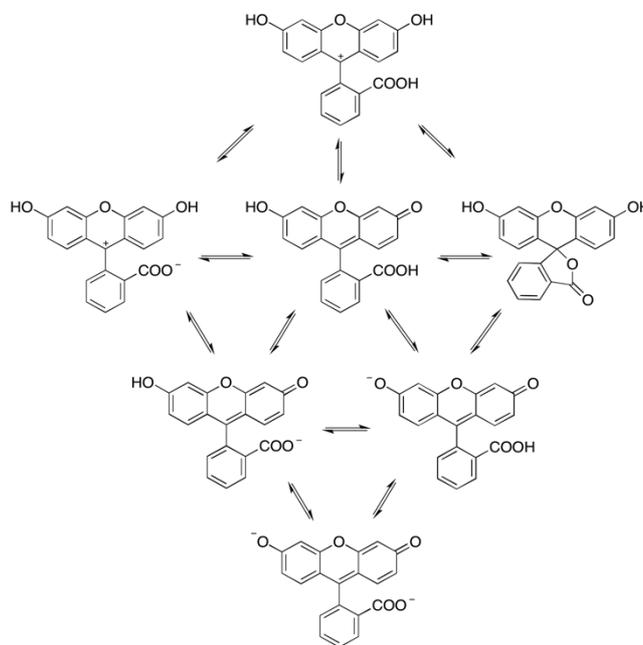
intrínsecos que exibem, no caso da flavina mononucleotídeo, $\lambda_{\text{máx}} = 450 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$, $\epsilon = 1,22 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\Phi_{\text{FL}} = 0,25$.²

Moléculas que exibem autofluorescência podem ofuscar sinais desejais por sondas em imageamento e outros experimentos *in cellulo* ou *in vivo*. O problema da autofluorescência na aquisição de imagens por microscopia de fluorescência pode ser resolvido de diversas maneiras. O uso de filtros adequados permite que a emissão de fundo seja suprimida quando o fluoróforo exógeno usado tiver alto brilho.^{10,11} Ainda, excitação seletiva de marcadores e sondas, em especial em comprimentos de onda mais longos que não excitam a maioria das biomoléculas, solucionam o problema. Finalmente, fluoróforos com propriedades óticas não lineares, como a absorção de dois fótons, podem ser excitadas com dois fótons vermelhos ou infravermelhos e emitirem na região visível, fenômeno pouco observado em fluoróforos endógenos.¹ Comprimentos de onda de excitação mais longos também são mais convenientes inclusive com o próprio DNA, já que nucleotídeos absorvem em $\lambda_{\text{máx}} \approx 260 \text{ nm}$ e possuem $\epsilon \approx (7 - 15) \times 10^3 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.⁵

1.2 Fluorescência aplicada à biologia celular

Inspiradas nas características de moléculas fluorescentes naturais, uma grande variedade de moléculas orgânicas vem sendo desenvolvida.¹⁴ Fluoresceína, a primeira molécula orgânica fluorescente artificial, foi sintetizada por Baeyer em 1871 e deu origem a uma série de derivados que são a base de diversos ensaios baseados em fluorescência usados ainda hoje.¹ Fluoresceína apresenta três prótons ácidos, resultando em diferentes estados de protonação e susceptibilidade a tautomerização e ciclização¹⁵⁻¹⁷ (Esquema 2), mas as espécies mais relevantes biologicamente são o monoânion e o diânion que estão em equilíbrio ($\text{p}K_{\text{a}} = 6,4$).¹⁵ O diânion é a forma mais fluorescente com $\lambda_{\text{máx}} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 514 \text{ nm}$, $\epsilon = 9,3 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\Phi_{\text{FL}} = 0,95$.² Com estruturas muito similares à da fluoresceína, as rodaminas também são amplamente aplicadas como fluoróforos.¹⁴ Características-chaves desta classe de pigmentos são a baixa sensibilidade à variação de pH e propriedades espectrais moduláveis; por exemplo, diferentes padrões de substituições na porção *N*-alquil afetam suas características espectrais. O membro mais simples desta classe de fluoróforos é a rodamina 110 que apresenta $\lambda_{\text{máx}} = 496 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 517 \text{ nm}$, $\epsilon = 7,4 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\Phi_{\text{FL}} = 0,92$ em solução aquosa. Entretanto, sua alquilação levando à tetrametilrodamina

desloca seus perfis de excitação e emissão para comprimentos de onda de mais longos ($\lambda_{\text{máx}} = 540 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 565 \text{ nm}$), mas diminui seu rendimento quântico de fluorescência ($\Phi_{\text{FL}} = 0,68$).²



Esquema 2 Estrutura da fluoresceína e equilíbrios tautoméricos e ácido-base pertinentes.^{15,16}

Há muitos métodos para utilizar materiais fluorescentes no estudo de sistemas biológicos. Moléculas fluorescentes, pontos quânticos e outros materiais nanoestruturados, anticorpos fluorescentes e proteínas baseadas em fluoróforos endógenos são alguns deles.¹⁸⁻²⁰ O uso de anticorpos é uma alternativa quando se deseja uma marcação com alta especificidade. Esta técnica, conhecida como imunofluorescência, usa anticorpos como uma importante ferramenta para demonstrar tanto a presença e quanto a localização subcelular de um antígeno. A marcação celular é uma técnica bastante versátil e, se o antígeno é altamente localizado, pode detectar desde uma quantidade muito pequena até quantidades enormes de moléculas de antígeno em uma célula. Em algumas circunstâncias, a marcação celular pode até mesmo ser utilizada para determinar uma concentração aproximada de antígeno, se utilizado um software de análise de imagens adequado. Ao serem conjugados com anticorpos secundários, *i.e.*, fluoróforos capazes de se ligar ao anticorpo primário, é possível a visualização da marcação do anticorpo primário. Este método levou a marcação celular a um alto nível de especificidade, entretanto o uso de anticorpos

também possui desvantagens. Por serem moléculas tipicamente grandes ($\approx 10 - 200$ kDa), técnicas de imunofluorescência não podem ser realizadas em células vivas, mas apenas em células fixadas e permeabilizadas, *i.e.* com a integridade de sua membrana comprometida.^{21,22}

Proteínas fluorescentes podem ser aplicadas como sondas fluorescentes em organismos vivos.^{19,23,24} No início dos anos 1960, enquanto pesquisadores estudavam a bioluminescência da água viva *Aequorea victoria*, foi descoberta uma proteína que foi denominada proteína verde fluorescente (GFP).¹⁹ Depois disso, a GFP tem sido amplamente modificada para produzir proteínas fluorescentes mutantes (*e.g.*, azul, ciano, amarelo). Em geral, proteínas fluorescentes podem ser utilizadas em inúmeras aplicações, em particular no imageamento de células vivas.^{3,19,25,26} O gene que codifica a GFP deve ser inserido adequadamente no genoma do organismo de interesse. Organismos geneticamente modificados com GFP são monitoráveis por fluorescência e por isso têm sido usados nas mais diversas aplicações. Proteínas fluorescentes têm uma massa molecular de 25 kD^{21} em média, sendo tipicamente menores que anticorpos, mas bem grande quando comparados a fluoróforos orgânicos (*e.g.*, a massa molecular de fluoresceína é $< 1 \text{ kD}^{21}$). Entretanto, como as proteínas são expressadas pelas células não há necessidade de utilização de agentes exógenos ou de fixação e permeabilização como os requeridos pela imunofluorescência.²³

Nanopartículas, incluindo os pontos quânticos fluorescentes, têm sido amplamente estudadas para geração de imagens. Estes materiais são muitas vezes inertes ao microambiente celular e, dependendo de sua composição, são atóxicas.¹⁸ Ainda, em contraste com fluoróforos orgânicos, NPs tem suas propriedades óticas pouco afetadas pela interação com biomoléculas, além de serem em geral mais fotoestáveis.²⁷ Embora a especificidade obtida por ensaios de imunofluorescência seja muito superior àquela observada com o uso de NPs, ensaios de marcação celular utilizando NPs são realizados com maior facilidade. Em geral NPs positivamente carregadas têm sua entrada na célula facilitada. Entretanto, NPs são muito grandes em comparação a moléculas orgânicas e, portanto, tem maior dificuldade de internalização celular, especialmente em células vivas.

1.3 Entrada de sondas fluorescentes pela membrana celular

A composição de íons e moléculas de uma célula é variável não apenas de acordo com o ambiente celular mas também de célula para célula.²⁸ Exemplos disso podem ser observados pela razão da concentração de íons Ca^{2+} extra e intracelular que pode chegar à quatro ordens de grandeza, e a concentração de prótons, a qual em alguns compartimentos celulares também pode ser quatro ordens de grandeza maior do que em outros (*e.g.*, o pH interno de uma mitocôndria pode chegar a 8, enquanto que este valor para um lisossomo é em torno de 4).^{28,29}

Formalmente, a permeabilidade de membranas é determinada pela solubilidade da molécula que a permeia, pela difusão através da membrana até o meio intracelular e pela largura da barreira.³⁰ Bicamadas lipídicas podem ter sua permeabilidade até 10 ordens de grandeza variável. De acordo com parâmetros físico-químicos, moléculas pequenas tem permeabilidade maior do que moléculas maiores, compostos neutros podem permear membranas muito mais rapidamente do que compostos carregados e, entre estes, ânions tem maior permeabilidade do que cátions. Além disso, a regra de Overton afirma que a entrada de qualquer molécula em uma célula é governada pela sua solubilidade lipídica.³¹ Para tal afirmação, Overton considerou que membranas celulares são compostas de lipídeos que mediam o transporte de moléculas lipofílicas e também por poros proteicos que transportam moléculas hidrofílicas.^{31,30} Apesar destas descobertas terem sido confirmadas por estudos mais posteriores, a regra de Overton falha por não levar em consideração que moléculas hidrofóbicas também podem ser transportadas por diferentes classes de proteínas transportadoras^{31,32} e, atualmente, o tráfego de íons e moléculas através da membrana celular é dividido e categorizado de acordo com sua fonte de energia.³³

O transporte passivo de espécies químicas para o interior da célula ocorre sem uma fonte de energia química ou gradiente de potencial eletroquímico. A força motriz do processo é o aumento de entropia causado pela internalização. Difusão e difusão facilitada são tipos de transporte passivo importantes. Na difusão, o soluto migra da região com maior concentração para a de menor concentração, sem gasto de energia. A difusão facilitada também ocorre a favor do gradiente de concentração mas depende de proteínas transmembranares³⁴. Desta forma, o mecanismo responsável por limitar a velocidade da difusão facilitada se baseia em a substância a ser transportada se ligar à

um sítio específico de uma proteína transportadora cuja quantidade presente na membrana celular é determinante para a velocidade de internalização, *i.e.*, quando não houver mais sítios disponíveis para carrear a substância para o interior da célula, aumentar a concentração desta não resulta em uma mudança de velocidade de transporte. Transporte ativo, por sua vez, também é mediado por proteínas específicas transportadoras, entretanto, envolve o transporte de substâncias contra o seu gradiente de concentração, *i.e.*, resulta em hidrólise de ATP.

Caracterizar a via pela qual uma substância atravessa a membrana celular não é trivial, porém, dados cinéticos desempenham um papel central. Entre os métodos de rastreamento, a análise do comportamento do fluxo de pela membrana tem sido amplamente utilizado para determinar se uma espécie penetra a bicamada lipídica por difusão simples, por *simporte/antiporte* (*i.e.*, transporte simultâneo com outra espécie, na mesma direção ou em direções opostas, respectivamente), ou mesmo por transporte ativo.³⁵

1.4 Relação estrutura-acúmulo do fluoróforo em compartimentos celulares

Em geral, o comportamento de sondas fluorescentes é ditado por suas características estruturais e pelas propriedades do meio. O acúmulo da sonda em um determinado compartimento subcelular e sua interação com biomoléculas são regidas por interações eletrostáticas de diferentes naturezas. Por exemplo, o estado de protonação da espécie exógena é crítico para o seu comportamento no ambiente celular, visto que esta característica determina a carga formal da espécie e, conseqüentemente, outras propriedades como a polaridade, potencial redox e propriedades fotofísicas.^{14,36,37} Como resultado, sondas sensíveis ao pH podem ser usadas para determinar o pH intracelular, por exemplo.³⁷

Sondas seletivas para mitocôndrias, por exemplo, tem um *uptake* dependente do potencial da membrana mitocondrial e, desta forma, permitem o monitoramento da atividade, localização e abundância destas organelas, assim como o efeito de alguns agentes farmacológicos que possam alterar sua função.³⁸ Em geral, sondas mitocondriais são catiônicas, o que favorecem sua incorporação enquanto o potencial de membrana negativo da mitocôndria é mantido.³⁹ Algumas destas sondas também possuem grupos capazes de reagir com porções tiol, abundantes em proteínas

mitocondriais, o que permite que a sonda fique presa dentro da organela, uma vez em seu interior.^{40,39}

O retículo endoplasmático é rico em receptores sulfonilureia, presentes em seus canais de K^+ dependentes de ATP.⁴¹ Por este motivo, grande parte das sondas fluorescentes para marcação do retículo endoplasmático são dicarbocianinas.^{41,42} Estes corantes são essencialmente hidrofóbicos, mas possuem uma carga positiva, garantindo um certo caráter hidrofílico. De acordo com suas características físico químicas, tais corantes são sensíveis a potencial de membrana, o que também os tornam bons candidatos para marcação mitocondrial, apesar de sua alta toxicidade.⁴² Entretanto, a incubação com altas doses de dicarbocianina evidenciam estruturas reticulares na célula.

Lisossomos são organelas que contém hidrolases ácidas que tem um papel fundamental na quebra de macromoléculas como ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e polissacarídeos.⁴³ Aminas lipofílicas fracamente básicas difundem rapidamente pela membrana celular em pH fisiológico *via* transporte passivo. Entretanto, após entrar em vesículas ácidas como lisossomos, estas aminas são protonadas ficam presas no interior destas organelas, em sua forma catiônica.^{43,44} Desta forma, sondas fluorescentes para marcação lisossomal são, em geral, bases fracas, como por exemplo alaranjado de acridina e sondas da classe LysoTracker acumulam seletivamente em lisossomos graças ao baixo pH destas organelas (pH pode variar entre 4 e 5, de acordo com o tipo celular)^{37,43,44}. Porém, devido às hidrolases que existem no interior dos lisossomos, a marcação obtida pode ser, muitas vezes, instável, com um alto índice de fotobranqueamento.

Sondas para marcação de núcleos de células muitas vezes são catiônicas ou adequadas para intercalação com DNA/RNA. Dois exemplos são o alaranjado de acridina e a bisbenzimidaz.⁴⁵⁻⁴⁷ O alaranjado de acridina carregado positivamente é fortemente atraído pela carga negativa dos grupos fosfato do DNA/RNA, além de intercalar no sulco menor na dupla fita de DNA^{48,49}. Além disso, a maioria das sondas catiônicas que marcam núcleos e cromossomos em células fixadas não são capazes de marcar seletivamente núcleos de células vivas.⁵⁰ Para obter sondas com marcações mais seletivas, foi desenvolvido um modelo quantitativo de relação estrutura-atividade (QSAR), especificando as características físico-químicas de sondas que podem acumular preferencialmente no núcleo de células vivas, por exemplo.³⁶ Para utilização

do modelo QSAR é necessário descrever propriedades físico-químicas relevantes numericamente, *e.g.*, pK_a , hidrofilicidade/lipofilicidade, coeficiente de partição, tamanho, planaridade, entre outros.³⁶

A Tabela 1 apresenta, resumidamente, algumas características para a marcação dos principais compartimentos subcelulares presentes em uma célula animal e um respectivo exemplo de sonda comercial disponível (Thermo Fischer Scientific). Existe, atualmente, uma diversidade de fluoróforos, com comprimentos de onda de excitação e emissão variados e estruturas que permitem seu uso como sondas para marcação celular para diversas aplicações. Muitas vezes, a descoberta de uma aplicação para determinada sonda ocorre ao acaso, e o mecanismo da atuação da sonda não é totalmente estabelecido. Os exemplos apresentados na Tabela 1 seguem esta lógica e, mesmo sendo marcadores cotidianamente utilizados em laboratórios de pesquisa, tem seu mecanismo de acúmulo e especificidade parcialmente definidos.

Tabela 1 Marcadores de compartimentos subcelulares para células vivas.

Estrutura celular	Características gerais	Exemplo de sonda comercializada	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	Mecanismo	Problemas
Membrana celular	Compostos lipofílicos; lectinas	CellMask Orange	554/567	É incorporada pela membrana pela sua lipofilicidade e acumula devido à sua carga negativa	Marcação tem baixa duração.
Lisossomos	Bases fracas	LysoTracker Red	577/590	É protonado devido ao meio ácido no interior do lisossomo	Marcação de vesículas ácidas e autofagossomos.
Mitocôndrias	Cátions; moléculas com carbono eletrofílico	MitoTracker Green	490/516	Reage com grupos tiol presentes em proteínas mitocondriais	Não é bem retido após fixação com aldeído.
Aparato de Golgi	Lipídeos	BODIPY®FL C5-Ceramide-BSA	504/511	A porção ceramida é incorporada pelo aparato de Golgi	Grupo capaz glibencamida
Retículo endoplasmático	Derivados de dicarbocianinas	ERTracker™ Green	504/511	conjugado se liga aos receptores sulfonilureia dos canais de potássio sensíveis a ATP do retículo endoplasmático	Pode resultar em marcação vesicular.
Citoesqueleto	Moléculas capazes de interagir com actina ou tubulina	Taxol® TubulinTracker Green	494/522	Tem seus grupos lipofílicos clivados no interior celular, permitindo sua interação com tubulina	Pesença de receptores sulfonilureia em outras estruturas.
Núcleo	Intercalantes com pares de bases; cátions; aldeídos	NucBlue® Live ReadyProbes®	360/460	Liga-se preferencialmente nas regiões A-T do DNA	Dependente da atividade de esterases celulares.
					Tóxico para o acompanhamento de ciclo celular.

Sondas usadas para a marcação de retículo endoplasmático, lisossomos, mitocôndria e membrana plasmática em células vivas também tendem a ser catiônicas, levantando questões sobre a relevância da estrutura da sonda sobre a especificidade de marcação.³⁶ Por outro lado, devido à carga negativa do DNA e RNA, as proteínas que fazem parte de suas estruturas apresentam carga positiva, podendo atrair moléculas aniônicas.⁵¹ Além disso, as proteínas nucleares ligadas ao material genético podem sofrer uma série de modificações pós-traducionais que resultam novas funções químicas

com cargas formais positivas, como a metilação de resíduos de histidina em histonas,⁵¹ que aumentam a possibilidade de interação destas proteínas com moléculas aniônicas.^{47,52,53}

A variedade de sondas específicas para marcação nuclear disponíveis comercialmente tem crescido nos últimos anos. Entretanto, a maioria das sondas são caras (*e.g.*, Draq5™ Fluorescent Probe Solution, 5 mmol L⁻¹, 200 µL: R\$ 1.739,25) e, muitas vezes, são tóxicas e/ou impermeáveis, necessitando que as células passem por pré-tratamentos, como fixação e impermeabilização, e impossibilitando sua aplicação para monitoramento de eventos celulares.

A Figura 2 mostra algumas sondas nucleares e, de forma análoga à Figura 1, apresenta suas intensidades de brilho e os comprimentos de onda de emissão característicos. O composto cBeet120 é uma betalaina artificial produzida por nosso grupo e suas características serão abordadas no tópico 1.6 desta introdução. Entretanto, pode-se observar que, apesar de ser um produto com baixo rendimento quântico de fluorescência (*in vitro*, Φ_{FL} intracelular ainda não foi determinada), seu brilho é suficiente para que cBeet120 seja comparável à sondas comerciais nucleares apresentadas na Figura 2.⁵⁴

As sondas para marcação nuclear mais utilizadas atualmente são os corantes DAPI e Hoechst. Enquanto DAPI não é capaz de permear a membrana celular e, desta forma, deve ser utilizado após tratamento de fixação e permeabilização, os corantes Hoechst são permeáveis e apropriados para utilização em células vivas.⁵⁵ Ambos possuem emissão no azul e, portanto sua excitação ocorre no UV, o que requer uma quantidade de energia muito grande, que muitas vezes prejudica a integridade da amostra. Estas moléculas acumulam no núcleo devido à sua capacidade de intercalar nas porções ricas em adenina e timina do DNA.⁵⁵⁻⁵⁷

SYTO9 é uma dentre as muitas sondas da classe SYTO™ Green-Fluorescent Nucleic Acid Stains (Thermo Fisher Scientific). SYTO9 pode ser utilizado tanto para marcação de células fixadas como de células vivas devido à sua permeabilidade celular, porém tem um baixo rendimento quântico de fluorescência ($\Phi_{FL} \sim 0,01$) em sua forma livre.⁵⁸ Entretanto, ao interagir com ácidos nucleicos no interior do núcleo seu rendimento quântico de fluorescência tem um aumento de 40 vezes, produzindo um alto brilho, como pode ser observado na Figura 2.^{59,60} O mecanismo de seu acúmulo não foi

totalmente estabelecido e sua estrutura não é divulgada pelo fabricante. Seu comprimento de onda de excitação ($\lambda = 485 \text{ nm}$) é mais compatível para realizar monitoramento de eventos celulares do que as sondas Hoechst, porém seu custo é muito maior do que sondas mais populares (100 μL : R\$ 1.087,90).⁶¹

Pyronin Y é uma sonda constantemente utilizada para ensaios de citometria de fluxo para quantificação de material genético. Esta sonda é capaz de interagir inespecificamente com DNA e RNA e possui um rendimento quântico de fluorescência relativamente alto ($\Phi_{\text{FL}} \sim 0,21$).⁶² Entretanto, esta sonda gera um alto *background* citoplasmático. Devido à isso, Pyronin Y não é comumente utilizada para microscopia.

Alaranjado de acridina, pelo contrário, é uma sonda muito utilizada para aquisição de imagens. É considerada uma sonda dual, já que é capaz de marcar tanto núcleo como lisossomos, devido ao seu caráter catiônico.⁶³ Enquanto sua carta positiva promove a sua interação com as porções fosfato de DNA e RNA, também promove a sua entrada em vesículas ácidas, onde é então protonada e se acumula. Mesmo marcando duas organelas concomitantemente, alaranjado de acridina apresenta comprimentos de onda de emissão de fluorescência diferentes ($\lambda_{\text{EM}} = 525 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EX}} = 502 \text{ nm}$ na região nuclear e $\lambda_{\text{EM}} = 475 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EX}} = 590 \text{ nm}$ nos lisossomos).^{63,64} Apesar de ser facilmente absorvida pela membrana celular e ser amplamente utilizada para marcação de células vivas, alaranjado de acridina tem toxicidade comprovada.^{65,66}

Iodeto de propídeo não é permeável à membrana celular, entretanto, quando a membrana não tem sua integridade mantida, esta molécula é capaz de interagir com o material genético celular e exibe fluorescência.^{67,68} Este é um método muito utilizado para determinar a viabilidade celular *via* citometria de fluxo.⁶⁷ Iodeto de propídeo, devido à sua impossibilidade de permear membranas, pode ser utilizado apenas em células fixadas e permeabilizadas, e por isso, não é muito utilizado em microscopia de fluorescência.⁶⁹

Já Draq5 é uma sonda muito utilizada para *live-cell imaging*. Seu rendimento quântico de fluorescência é relativamente baixo quando comparado à outros exemplos apresentados na Figura 2, entretanto, conforme interage com DNA, este valor é aumentado.⁵⁸ Draq5 é uma antraquinona que é capaz de penetrar membranas celulares intactas que possui máximos de excitação e emissão no vermelho ($\lambda_{\text{EX}} = 646 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 697 \text{ nm}$), o que diminui os danos causados pela luz utilizada pelo microscópio.⁷⁰

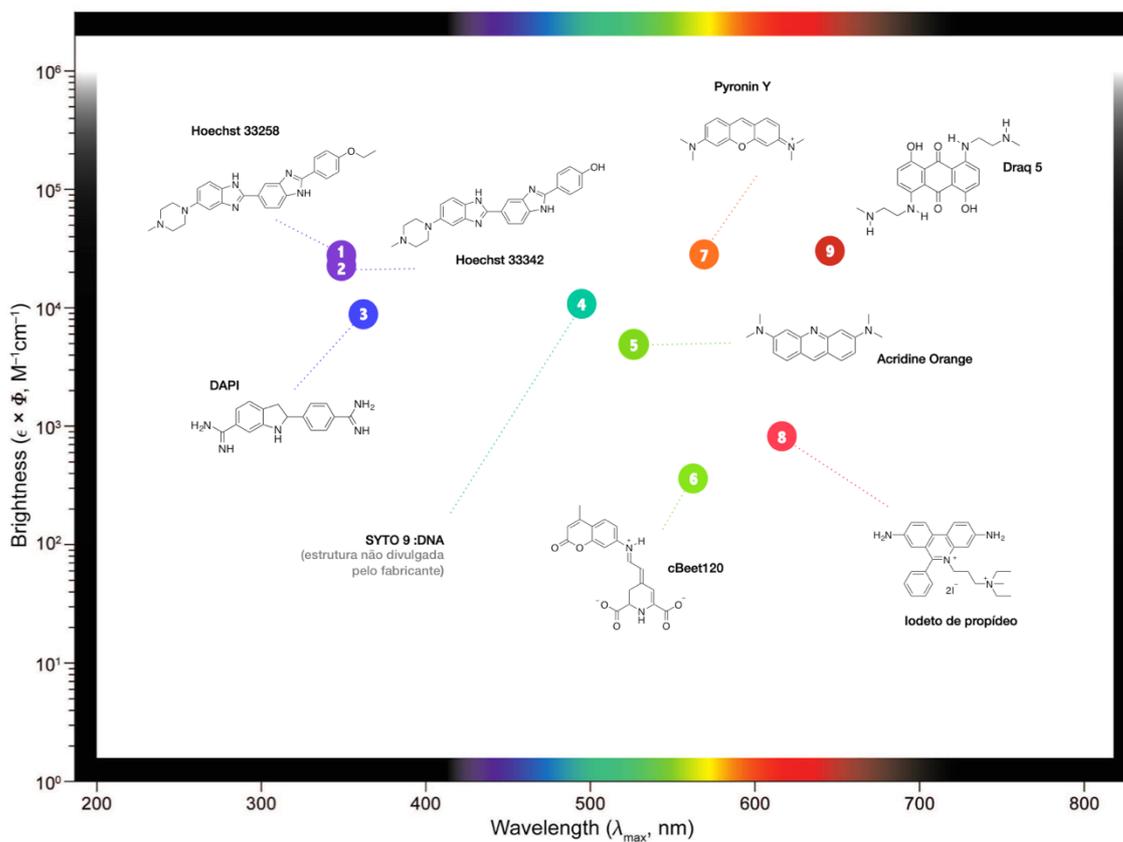


Figura 2 Fluoróforos utilizados para marcação de núcleos celulares. Figura adaptada e reproduzida com permissão da American Chemical Society.²

O entendimento da estruturação celular permite o desenvolvimento de sondas específicas para cada compartimento de acordo com suas características. O material genético dentro do núcleo celular em eucariontes está altamente organizado em complexos poliméricos denominados cromatina.^{71,72,73} A unidade fundamental do polímero de cromatina é o nucleossomo, um segmento de DNA que envolvem o núcleo protéico de oito histonas. O centro do nucleossomo é conectado ao seu nucleossomo adjacente através de um segmento de DNA, que muitas vezes está associado a histonas H1 ou H5.⁵¹ Entretanto, espermatozoides maduros usam protaminas para empacotar seu DNA genômico, provavelmente para obter um maior grau de compactação.⁷⁴ A intercalação de moléculas pequenas como DAPI, Hoechst 33342 ou acridine orange com DNA interfere em processos metabólicos fundamentais como a transcrição.⁴⁹ Por isso, a busca por novos compostos capazes de marcar a região nuclear sem intercalar com o DNA é desejável^{75,76}.

As funções relacionadas ao RNA em eucariontes, como o processamento de RNA e a biogênese de ribossomos, são realizadas nos nucléolos.^{73,77} Nucléolos contém RNA, DNA, proteínas e se formam ao redor de regiões cromossômicas específicas. Muitas proteínas nucleolares se acumulam em diferentes compartimentos do nucléolo, sugerindo composição proteica e funções diferentes.⁵² Por exemplo, a RNA polimerase I (subunidade RP A39) se localiza predominantemente no componente fibrilar enquanto a fibrilarina (proteína envolvida na metilação do rRNA) acumula no chamado componente densamente fibrilar.⁷⁷⁻⁷⁹

Além das características físico-químicas de uma molécula, o desenvolvimento de novos marcadores celulares depende das características da célula estudada. Muitas vezes, células de um mesmo tecido obtidas de indivíduos diferentes e, portanto, de linhagens celulares distintas, tem características completamente diferentes. As linhagens celulares HT-29 e Caco-2 são exemplos disso.⁸⁰ Ambas são células de epitélio de cólon coletadas de pacientes diagnosticados com adenocarcinoma coloretal, entretanto, provêm de indivíduos diferentes. Enquanto as células da linhagem Caco-2 formam monocamadas polarizadas em cultura e se diferenciam a enterócitos no epitélio intestinal, as células HT-29 são essencialmente não-diferenciadas porém heterogêneas, *i.e.*, contem uma pequena proporção (< 5%) de células secretoras de muco e enterócitos.⁸⁰ Como resultado, é necessária a escolha de uma linhagem celular que sirva como um modelo de estudo.

1.5 Linhagem U87-MG como modelo de internalização

O glioblastoma multiforme (GBM), também conhecido como astrocitoma grau IV, é o tipo mais comum e agressivo de tumor maligno cerebral humano. Este tipo de tumor tem como origem astrócitos, embora pode acometer diversos tipos de células cerebrais, e pode estar localizado nos hemisférios cerebrais ou na medula espinhal. A linhagem celular U87-MG é derivada de um glioma maligno de uma paciente em estágio 4 e ganhou esse nome devido à abreviação de *Uppsala 87 Malignant Glioma*, devido à localização onde foi imortalizada, assim como algumas outras, porém menos famosas, linhagens de células de gliomas imortalizadas foram identificadas (*e.g.*, U251-MG, U373-MG, U118-MG e U138).^{81,82} Diferentemente de células de cultura primária, células imortalizadas são uma população celular de um organismo multicelular que, normalmente, não se proliferaria indefinidamente, mas devido à uma mutação

conseguem burlar a senescência e conseguem se manter em divisão.⁸³ Desta forma, células imortalizadas podem ser mantidas por longos períodos *in vitro*. As mutações necessárias para a imortalidade podem ser atingidas naturalmente ou podem ser induzidas por meio da introdução de um gene viral que desregula parcialmente o ciclo celular, por meio da expressão artificial de proteínas chaves para a imortalidade (*e.g.*, telomerase, que previne a degradação das extremidades do cromossomo durante a replicação de DNA) ou simplesmente através do isolamento de um tumor (*e.g.*, células HeLa foram obtidas de um câncer cervical).⁸³

Outro ponto de grande interesse na utilização de células imortalizadas, além da sua facilidade de manuseio em relação a culturas primárias, possuem uma escala de obtenção muito alta e, deste modo, resultados podem ser obtidos com alta reprodutibilidade. Linhagens celulares são indispensáveis para o estudo em oncologia translacional.⁸¹ 50 anos após ser estabelecida foram reportados diversos trabalhos que contestam a verdadeira identidade da linhagem U87-MG.^{81,82,84,85}

A linhagem U87-MG, estabelecida em Uppsala, Suécia, foi distribuída e cultivada de formas diferentes com o passar dos anos e, hoje em dia, as células conservadas em Uppsala possui padrão de crescimento e fenótipo diferente das células redistribuídas pelas ATCC (*American Type Culture Collection*, Virginia, Estados Unidos), e ambas possuem características diferentes das células do glioma original, quando comparados seus perfis de expressão gênica.^{81,82,86}

Quando se trabalha com células é necessário que seja estabelecido um modelo de estudo, já que células diferentes apresentam características diferentes e, portanto, podem apresentar comportamentos diferentes frente a um mesmo fluoróforo.

1.6 Betalaínas: sondas fluorescentes biocompatíveis

Há um crescente interesse por produtos naturais que possam ser modificados a fim de produzir fluoróforos biocompatíveis.^{2,14,8788,89} Por serem metabólitos secundários, muitas vezes a entrada de produtos naturais nas células vivas ocorre naturalmente, sem a utilização de agentes fixadores e permeabilizantes.^{90,91,54} Em 2005, Gandía-Herrero e colaboradores mostraram que as pétalas das flores das variedades amarelas de algumas plantas pertencentes a ordem das Caryophyllales, como a maravilha (*Mirabilis jalapa*), onze-horas (*Portucala grandiflora*) e o cacto-margarida (*Lampranthus productus*) eram fluorescentes (Figura 3).⁹² Embora a maioria das classes de compostos fluorescentes

naturais tenham sido amplamente estudadas, essas plantas são pigmentadas por betalaínas, uma classe de pigmentos vegetais até então menos explorada do que as antocianinas e carotenoides, por exemplo.⁹³⁻⁹⁶ Esta fluorescência pode desempenhar um papel importante no processo de polinização graças aos padrões únicos de contraste observados nestas flores.⁹²



Figura 3 Emissão de fluorescência de *Mirabilis jalapa* (Maravilha) quando excitada com luz azul. A imagem foi alterada para promover maior contraste.

Betalaínas são pigmentos vacuolares vegetais encontrados na ordem das Caryophyllales das Angiospermas e em alguns fungos Basidiomicetos.^{94,97} Entretanto, a principal fonte natural destes pigmentos é a raiz da beterraba vermelha, que contém cerca de 100 mg de betanina/100 g de suco.⁹⁷ Para ampliar a gama de cores de betalaínas de modo a viabilizar a sua aplicação comercial, plantas da família *Cactaceae* têm sido exploradas, em especial as frutas da opuntia e pitaia.^{93,97-99} Nessas frutas é possível obter betalaínas com coloração entre o amarelo-laranja a vermelho-violeta, dependendo das concentrações absolutas e relativas de pigmentos (Figura 4).

As betalaínas possuem um sistema conjugado 1,7-diazaheptametílico como cromóforo e podem ser divididas em duas classes de acordo com sua estrutura (Figura 5).¹⁰⁰⁻¹⁰² As betaxantinas (do grego *xanthos*, amarelo) de coloração amarelada são iminas ou cátions imino com máximo de absorção (λ_{abs}) entre 460 e 480 nm e que se originam do acoplamento entre o ácido betalâmico e aminoácidos essenciais. Já os produtos de condensação deste ácido com derivados glicosilados e/ou acilados da ciclo-DOPA são chamados betacianinas (do grego *kyanos*, azul) e possuem coloração violeta intensa (máximo de absorção em 540 nm).⁹³ A maior limitação para o uso de betalaínas em aplicações tecnológicas é a sua baixa persistência quando submetida a altas temperaturas, irradiação com luz de alta potência, presença de metais de transição e alta

atividade de água.^{101,103,104} Contudo, derivados artificiais mais estáveis podem ser desenvolvidos.

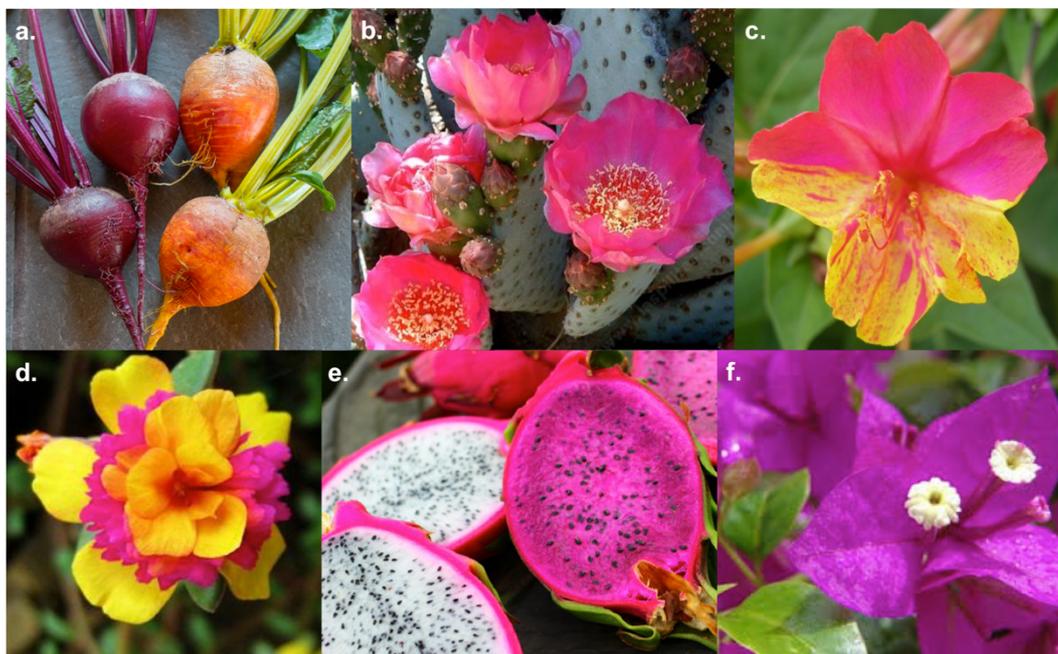


Figura 4 Fontes de betalínas naturais; (a) beterrabas vermelha e amarela (*Beta vulgaris*); (b) flores do cactus opuntia (*Opuntia ficus-indica*); (c) flor da maravilha (*M. jalapa*); (d) flor da onze-horas (*P. grandiflora*); (e) frutos da pitaia (*Hylocereus undatus*); (f) flor de primavera (*Bougainvillea spectabilis*).

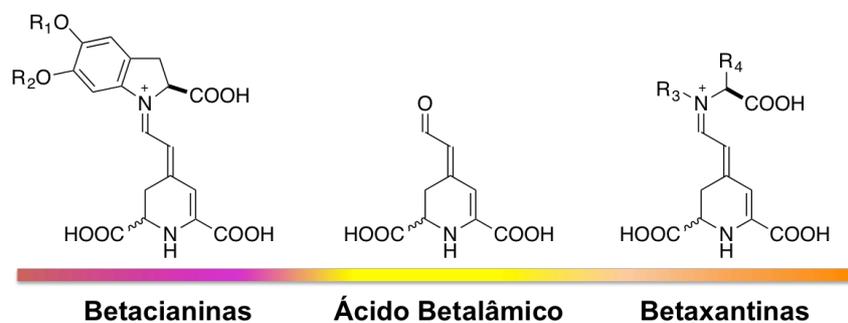


Figura 5 Betacianinas, betaxantina e seu precursor ácido betalâmico.

Betanina e indicaxantina, os adutos de ácido betalâmico com ciclo-DOPA 5-O-β glicosídeo e prolina, respectivamente, exibem atividade anti-inflamatória e antioxidante em meio biológico, protegendo desde lipoproteínas humanas de baixa densidade a membranas.^{88,91,105-107} Este potencial antioxidante de betalínas naturais tem sido a base de diversos estudos clínicos quanto ao seu uso terapêutico em doenças vinculadas ao estresse oxidativo.^{97,108,109,110,111} Betalínas apresentam biodisponibilidade similar àquela determinada para flavonoides, podendo no caso da

indicaxantina chegar a 20 nmol L^{-1} no plasma sanguíneo de humanos após uma administração oral de $2 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$ em 15 pacientes.^{88,108,112,113} Além disso, a ingestão de suco de beterraba, pitaia ou fruto da palma aumenta a dose sérica de betalaínas, que tem boa persistência *in vivo* e que são parcialmente eliminadas intactas na urina e nas fezes.^{114,115}

A viabilidade celular na presença de betalaínas é pouco conhecida, mas sabe-se que estas podem ser internalizadas por eritrócitos (*e.g.*, indicaxantina mostrou atividade *in vitro* contra β -talassemia).^{88,89,105,110,116} Estudos recentes mostraram que betalaínas são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e acumular em cérebro de ratos e, ainda, são capazes de modular a atividade bioelétrica de neurônios do hipocampo.⁹¹

A entrada destes pigmentos para o meio celular ainda não é bem caracterizada, mas sabe-se que indicaxantina e betanina, por exemplo, são moléculas que possuem um nitrogênio com carga positiva, ambas possuem outros sítios ionizáveis como os grupos carboxilas, com pK_a entre 2,0 e 5,4 conforme cálculos e dados da literatura; além disso, a indicaxantina é menos polar que betanina.^{90,113,117} Em geral, compostos carregados deveriam difundir através de monocamadas epiteliais *via* rota paracelular (*i.e.*, através do espaço intercelular) e serem transportados passivamente por arraste de solvente, ou seja, através do fluxo de água.⁹⁰

Considerando-se a capacidade de betalaínas naturais permearem membranas e possuírem um amplo espectro de atividades biológicas, o desenvolvimento de betalaínas artificiais permite expandir o leque de aplicações destes pigmentos.¹¹⁸ A obtenção do ácido betalâmico é essencial para a produção de betalaínas naturais e artificiais em laboratório através do seu acoplamento aldimínico com aminas ou aminoácidos.¹¹⁹⁻¹²¹ Graças à grande quantidade de betalaínas presentes em beterrabas, nosso grupo utiliza o suco deste vegetal como matéria prima para a hidrólise alcalina de betanina e extração de ácido betalâmico (Figura 6).^{97,122}

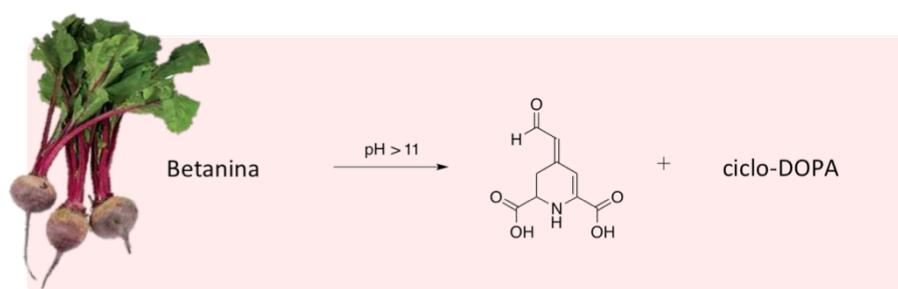


Figura 6 Obtenção do ácido betalâmico a partir da hidrólise de betanina.

Nosso grupo desenvolveu uma série de betalaínas artificiais.^{120,123} Em 2012 foi preparada a betalaína fluorescente cBeet120, derivada da 7-amino-4-metilcumarina (c120) e com rendimento de fluorescência próximo ao da indicaxantina (0,04%) (Figura 7).^{54,124} A conversão de c120 em cBeet120 provocou o deslocamento batocrômico das bandas de absorção e emissão de fluorescência (λ_{max} 520 nm, λ_{em} 570 nm) e diminuiu o deslocamento de Stokes (Figura 8).⁵⁴ Além disso, o composto cBeet120 é mais solúvel em água do que a c120.

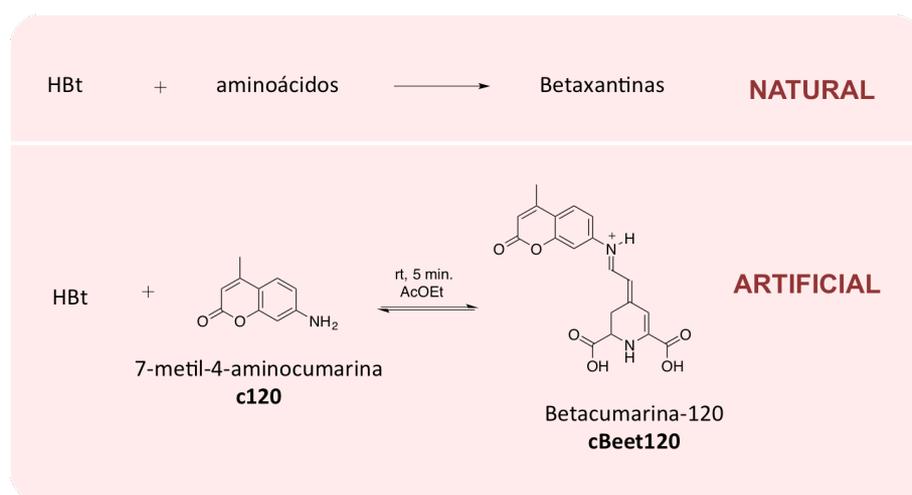


Figura 7 Semissíntese de betalaínas naturais e artificiais.

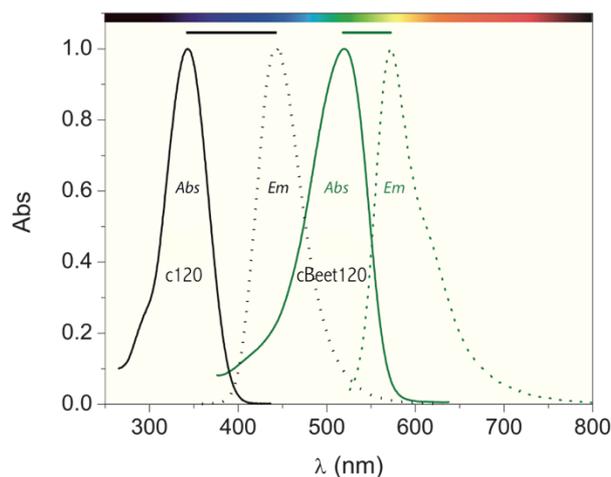


Figura 8 Espectros de absorção e emissão de c120 e cBeet120.

A estrutura catiônica de betalaínas em meio ácido permite que elas sejam bem absorvidas em vilosidades intestinais e em membranas de células. Além disso, existem relatos na literatura a respeito da permeação de betalaínas em eritrócitos. Em trabalhos publicados pelo grupo, a sonda artificial inédita cBeet120 foi estudada em eritrócitos

infectados por *P. falciparum*.⁵⁴ Apesar de possuir um baixo rendimento quântico de fluorescência ($\Phi = 4,3 \times 10^{-3}$, água vs. fluoresceína), graças ao seu alto coeficiente de absorvidade molar ($\epsilon^{520 \text{ nm}} = 6,6 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, água) cBeet120 tem um brilho ($\epsilon \times \Phi$) igual a $283 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, valor que a coloca entre L-tirosina e L-triptofano na Figura 1.⁵⁴ Como é mostrado na Figura 9, cBeet120 acumula seletivamente apenas em células infectadas. No controle feito indicaxantina (BtP), nenhuma marcação foi observada tanto em eritrócitos saudáveis como nos infectados, apesar de também exibir emissão de fluorescência.⁵⁴

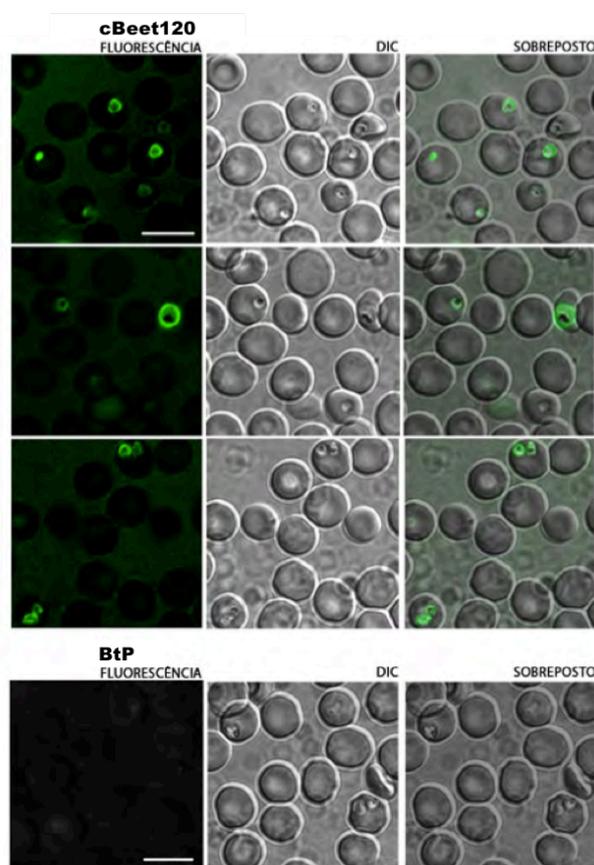


Figura 9 Microscopias de fluorescência de eritrócitos incubados com cBeet120 e BtP. Barra = 10 μm .⁵⁴

A microscopia confocal de eritrócitos infectados por *P. falciparum* revelaram uma fluorescência granular na região perinuclear do parasita (Figura 10). Esses resultados sugerem que cBeet120 foi capaz de permear as membranas do eritrócito, do vacúolo parasitóforo e do parasita, no qual se acumula.⁵⁴

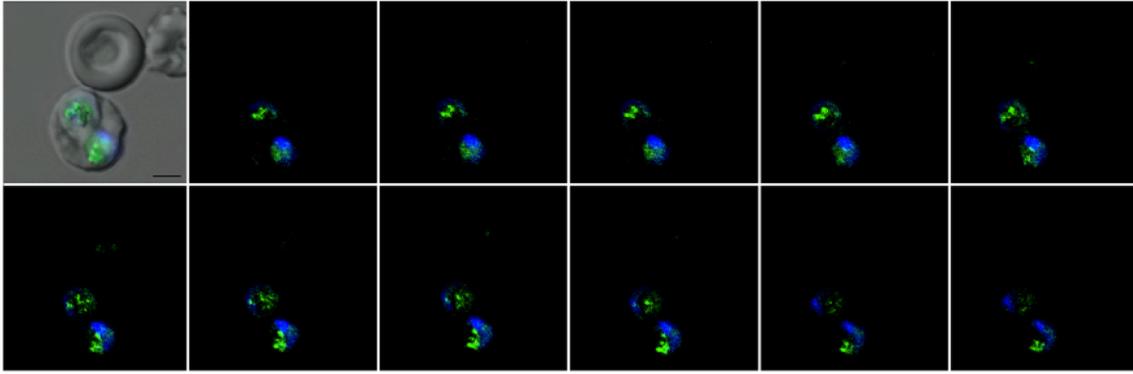


Figura 10 Imagem DIC e série Z (intervalo = 0,2 μm) das marcações obtidas por cBeet120 (35 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e Hoechst 33342. Barra = 2 μm .⁵⁴

O mecanismo de entrada de cBeet120 em eritrócitos infectados por plasmódio não foi elucidado.¹²⁵ Contudo, o acúmulo de cBeet120 pode estar relacionado com a sua lipofilicidade. Enquanto o valor teórico de logD para BtP em pH 7,4 é $-9,7$, para cBeet120 este valor é de $-3,9$, o que sugere que o aumento na lipofilicidade da betalaína cumarína pode favorecer sua interação com membranas celulares.⁵⁴

2 Objetivo

Determinar o mecanismo de internalização e acúmulo de cBeet120 em células de glioblastoma humano da linhagem U87-MG e identificar as estruturas celulares marcadas pela sonda.

2.1 Objetivos específicos

- Estabelecer um modelo para o estudo da incorporação de betalaínas fluorescentes;
- Determinar a via de entrada de cBeet120 em células U87-MG;
- Entender o padrão de marcação da sonda e determinar a natureza de seu acúmulo.

3 Resultados e discussão

3.1 Interação entre cBeet120 e células animais imortalizadas

Embora o comportamento de betalaínas em células animais tenha sido investigado tanto sob o ponto de vista de ação biológica quando de marcação de fluorescência, os mecanismos de entrada e acúmulo nestes tipos de células ainda não foram totalmente elucidados. No contexto das betalaínas em células de plantas, estes pigmentos se acumulam no vacúolo e, portanto, são retidos pelo tonoplasto. O acúmulo de betalaínas no vacúolo já foi atribuído a difusão e transportadores do tipo ABC e um relato apresenta a possibilidade de transporte ativo das betalaínas para dentro de células animais.

A primeira etapa deste trabalho foi prospectar como a sonda cBeet120 se comportava na presença de diferentes linhagens de células animais imortalizadas. Foram utilizadas seis linhagens celulares diferentes: ARPE-19 (retina humana), HT-29 (carcinoma de cólon humano), P3U1 (mieloma de rato), LLC-MK2 (rim de *Macaca mulatta*), KATOIII (tumor gástrico humano) e U87-MG (glioblastoma humano). Os experimentos foram realizados incubando-se células vivas semeadas sobre a lâmina de microscopia com uma alta concentração de cBeet120 ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS) por 3 min, seguida por lavagem exaustiva das células com PBS.

Estas condições experimentais foram definidas arbitrariamente. O estudo sistemático do efeito das condições de incubação será discutido no item 3.4.1. As propriedades de fluorescência da cBeet120 e de seus produtos de hidrólise (cumarina 120 (c120) e ácido betalâmico (Hbt)) são relevantes na escolha do sistema de excitação e visualização do microscópio de fluorescência. A maior parte dos equipamentos comerciais não tem resolução espectral, ou seja, os comprimentos de onda de excitação e emissão são selecionados por filtros. O filtro de excitação, o filtro de emissão e um espelho dicróico para corte de luz de excitação compõe um cubo instalado no caminho ótico do microscópio. Na maioria dos casos, microscópios possuem cubos especificamente montados para fluoróforos comerciais comuns (vide especificações da Tabela 4, parte experimental), como, por exemplo, DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, excitação no UV, emissão azul), FITC (isotiocianato de fluoresceína, excitação ciano, emissão verde) e TRITC (tetrametilrodamina, excitação no amarelo, emissão no

vermelho). Os máximos de absorção e emissão da sonda cBeet120 não se ajustam perfeitamente a nenhum cubo convencional. Por isso, os experimentos foram realizados utilizando-se o cubo com filtros adequados para a sonda FITC. Nestas condições, a c120, que eventualmente esteja presente no meio, não é excitada e sua emissão não é observada com o cubo FITC (Figura 11). Além disso, não há possibilidade de transferência de energia de c120 para a cBeet120.

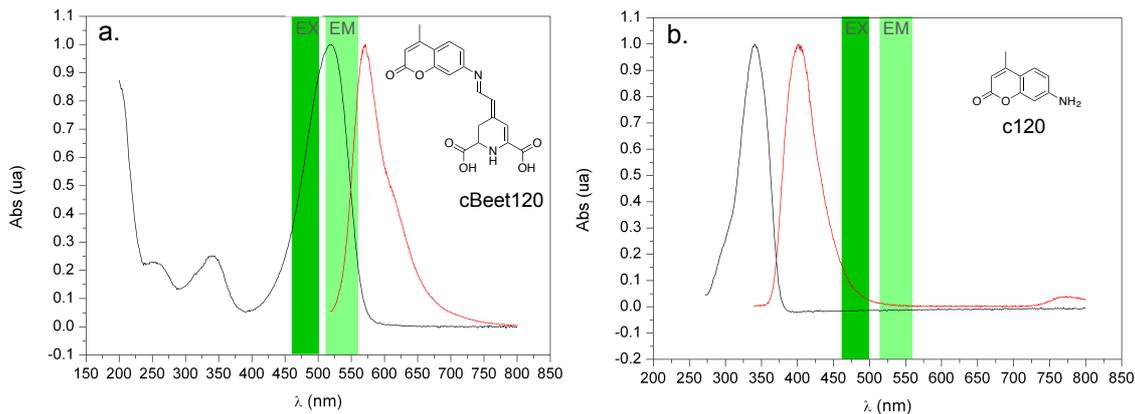


Figura 11 Espectros de absorção e emissão de c120 e cBeet120 e faixas de excitação e emissão do filtro FITC.

A partir da prospecção em algumas linhagens celulares diferentes percebeu-se que cBeet120 não é uma sonda específica para plasmódio.⁵⁴ A análise das imagens obtidas revela que a sonda cBeet120 foi internalizada em todas as linhagens, exceto em células KATOIII (Figuras 11 e 12). Contudo, os padrões de marcação não são os mesmos para todas as células. Na Figura 11a observa-se que cBeet120 apresenta uma marcação pontual no citoplasma de células da linhagem ARPE-19, sem marcar o núcleo dessas células. Um perfil difuso foi observado com células HT-29 (Figura 11b), ou seja, acúmulo no interior da célula sem, no entanto, marcar o núcleo. Para as células da linhagem KATOIII não houve marcação. A Figura 13 apresenta a imagem de microscopia de células KATOIII incubadas com cBeet120 sem qualquer etapa de lavagem posterior à incubação. Apesar desta condição afetar a qualidade da imagem, a ausência de sonda no interior da célula pôde ser evidenciada. Na Figura 14 observa-se a marcação mais intensa dos núcleos e região perinuclear de células das linhagens LLC-MK2, U87-MG e P3U1.

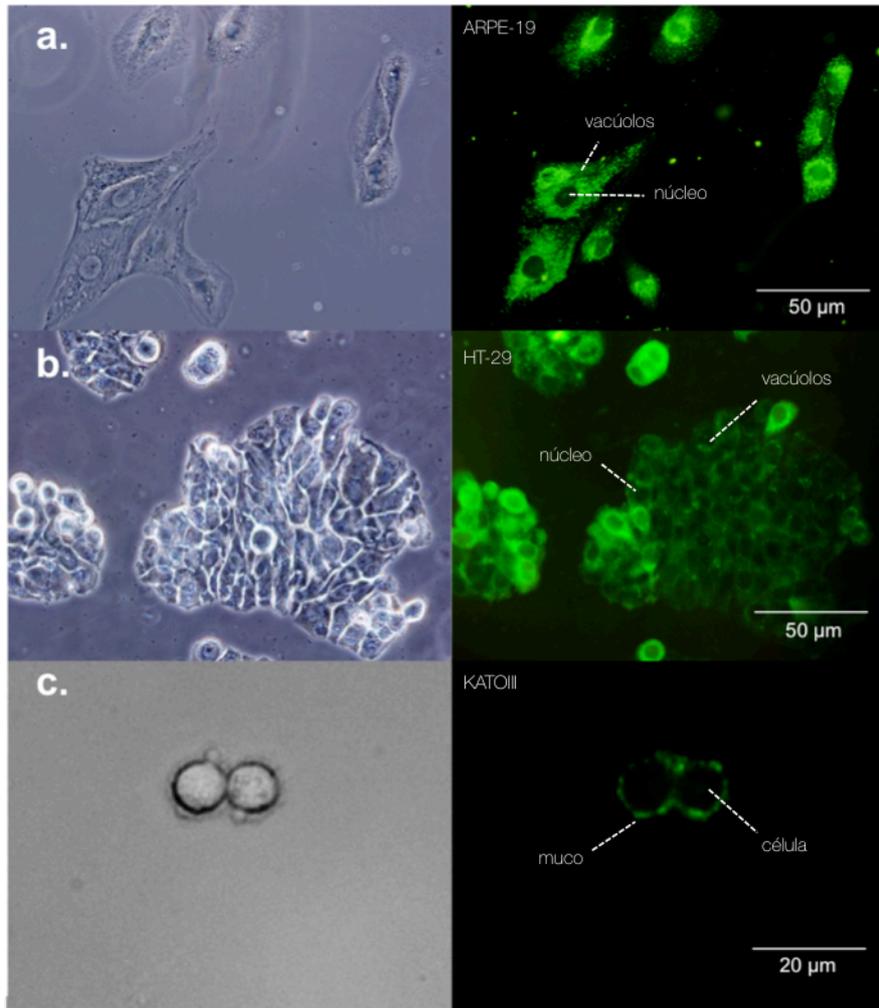


Figura 12 Microscopias de campo claro e de fluorescência de (a) ARPE-19, (b) HT-29 e (c) KATOIII vivas e incubadas com cBeet120 ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$, 3 min, filtro FITC EX488/EM520 nm).

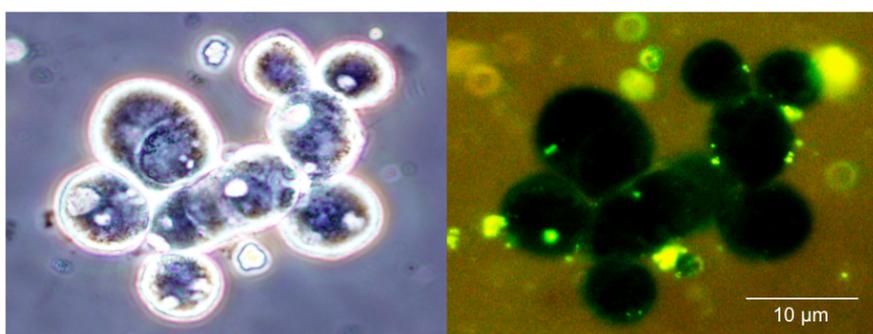


Figura 13 Microscopia de fluorescência de KATOIII incubadas com cBeet120 sem a etapa de lavagem da sonda ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$, 3 min, filtro FITC EX488/EM520 nm).

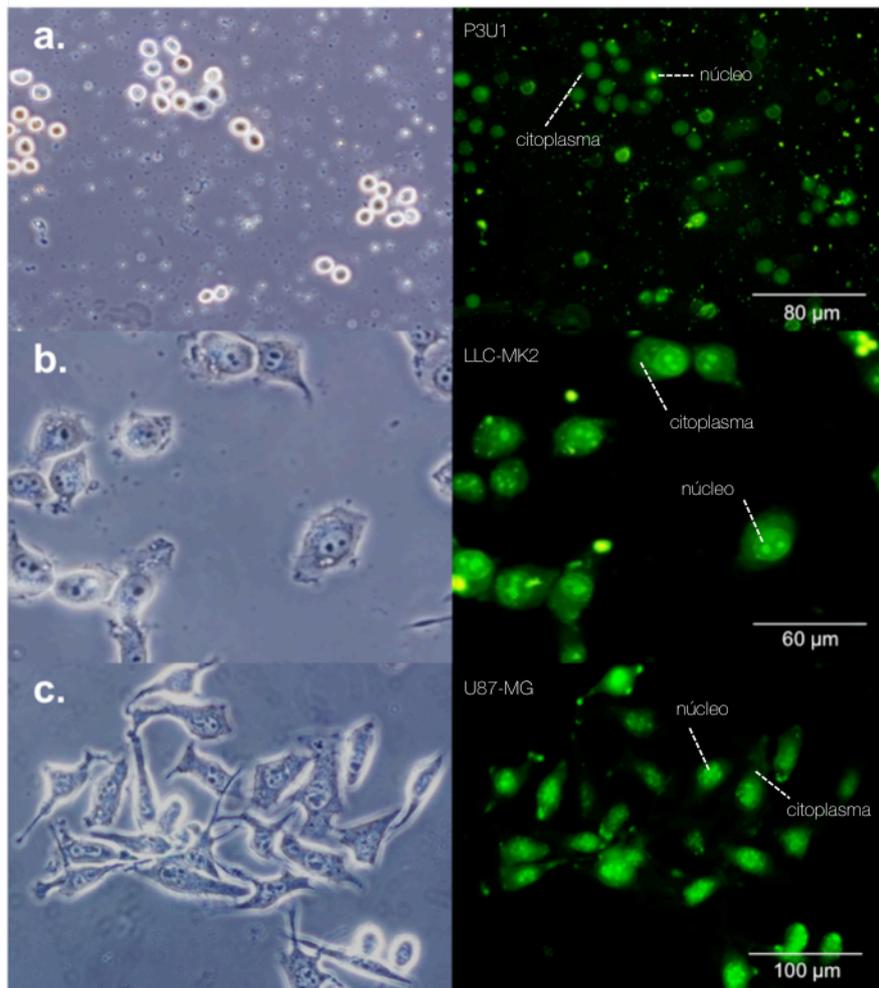


Figura 14 Microscopias de campo claro e de fluorescência de (a) P3U1, (b) LLC-MK2 e (c) U87-MG vivas e incubadas com cBeet120 ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$, 3 min, filtro FITC EM488/EM520 nm).

A imagem de microscopia de células P3U1 incubadas com cBeet120 indica marcação difusa, porém sutilmente mais concentrada na região nuclear. Já a marcação de LLC-MK2, apesar de também citoplasmática, apresenta uma emissão de fluorescência mais intensa no núcleo, indicando acúmulo da sonda nessa estrutura. Durante os experimentos com a linhagem celular U87-MG, notou-se que o tempo de irradiação da amostra afetava a emissão de fluorescência de cBeet120. Estes resultados serão discutidos no item 3.3, entretanto, todas as imagens de microscopia de células U87-MG incubadas com cBeet120 apresentadas a seguir foram irradiadas por aproximadamente 3 minutos antes de sua aquisição.

O acúmulo da sonda em núcleos de LLC-MK2 e U87-MG foi investigado em experimentos de colocalização com o corante Hoechst 33342 que marca dsDNA (DNA dupla fita) por intercalação no sulco menor. Na linhagem U87-MG o acúmulo de

cBeet120 no núcleo é muito mais evidente e a colocalização com o corante nuclear Hoechst 33342 comprova isso. Embora a região seja nuclear, a colocalização com este corante que intercala no DNA não é a mesma. Vemos na Figura 16 que a marcação com Hoechst é, em algumas células, ligeiramente deslocada em relação à cBeet120, indicando que apesar da betalaína estar no núcleo, pode estar marcado algum componente ou estrutura diferente.

As células das linhagens ARPE-19 e P3U1 apresentam uma grande quantidade de lisossomos e vesículas ácidas (Figura 12(a) e (c)).^{126,127} Betalaínas naturais são pigmentos presentes nos vacúolos vegetais, porém, não há nenhum estudo que apresente o mesmo comportamento em células animais. Para a linhagem apresentada na Figura 12(b), não são reportados na literatura indícios de uma grande quantidade de vesículas, e nestas células vemos uma marcação bem difusa.

Apesar da liberação de mucina, *i.e.*, proteínas glicosiladas de alto peso molecular que formam uma barreira viscosa que dificulta a entrada e saída de moléculas através da membrana celular, cBeet120 parece permear a membrana de células HT-29 e acumular na região perinuclear Figura 12(b). Para células da linhagem P3U1 (Figura 12(c)) parece haver uma marcação mais difusa. Assim, como a HT-29, células de KATOIII também secretam grandes quantidades de mucina, porém, há um comportamento bastante diferente entre estas linhagens. Isto significa que a presença destas glicoproteínas na membrana celular não é responsável pelo bloqueio da entrada da sonda na célula.

3.2 Estudo da marcação do núcleo de U87-MG com cBeet120

A marcação nuclear intensa de cBeet120 em núcleos de U87-MG fez com que esta linhagem celular se tornasse nosso modelo de estudo. Poucas sondas comerciais marcam a região nuclear no verde (filtro FITC, EX 488/EM 520 nm). DAPI e Hoechst são os corantes mais populares, porém são observadas no filtro azul. Alguns exemplos de sondas comerciais nucleares que podem ser observadas no filtro verde: *SYTO® green fluorescent nucleic acid stain sample* (50 µL, S7572, Thermo Fisher Scientific, R\$1.332,00) e alaranjado de acridina (5 g, A1301, Thermo Fisher Scientific, R\$481,60).

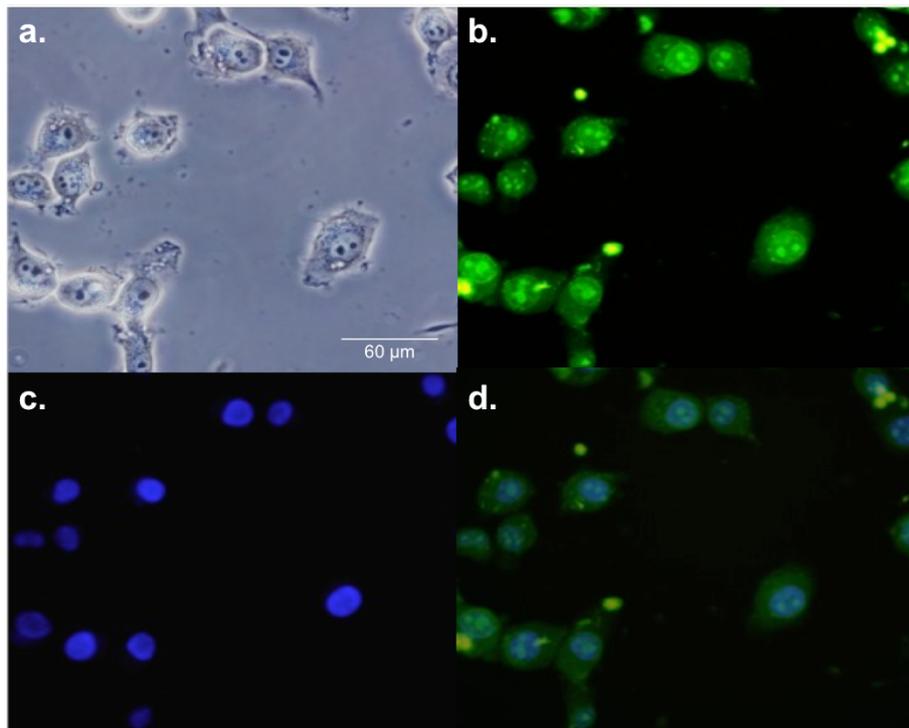


Figura 15 Imagens de microscopia de campo claro (a) e de fluorescência de LLC-MK2 vivas marcadas com (b) cBeet120 ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$, filtro FITC EX488/EM520 nm) e (c) Hoechst 33342 ($8 \mu\text{g mL}^{-1}$, filtro DAPI EX350/EM520 nm), seguida da sobreposição das imagens (d). Área de colocalização em ciano.

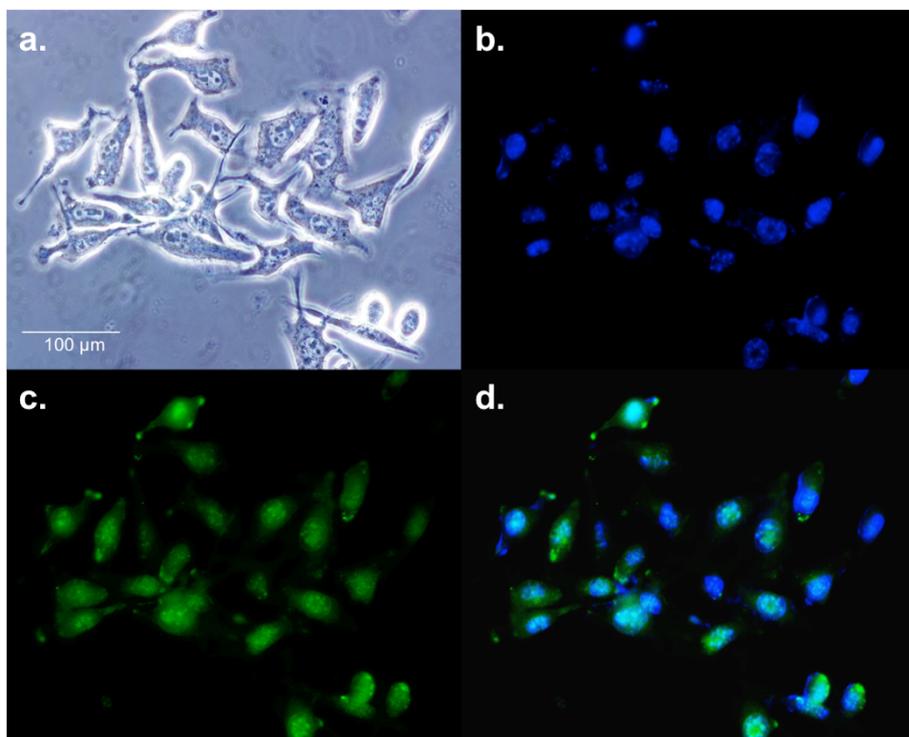


Figura 16 Imagens de microscopia de campo claro (a) e de fluorescência de U87-MG vivas marcadas com (b) Hoechst 33342 ($8 \mu\text{mol L}^{-1}$, filtro DAPI EX350/EM460 nm) e (c) cBeet120 ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$, filtro FITC EX488/EM520 nm), seguida da sobreposição das imagens (d). Área de colocalização em ciano.

Em geral, este tipo de sondas possui grande especificidade por ácidos nucleicos gerando uma marcação permanente, e por isso, a longo prazo podem ser tóxicas para a célula. Já a sonda cBeet120 é um produto hidrossolúvel, de baixo custo e preparado a partir de fontes naturais e renováveis (cerca de R\$2,50/kg de beterraba).

3.2.1 Viabilidade celular

Na Figura 17 é reportada a fluorescência de cBeet120 em células U87-MG após incubação com a sonda (linha azul) em comparação à emissão de autofluorescência celular (linha vermelha). O baixo rendimento quântico de cBeet120 torna sua detecção por citometria de fluxo difícil. Contudo, com um bom ajuste e otimização da voltagem do equipamento é possível observar sua fluorescência no interior de células U87-MG.

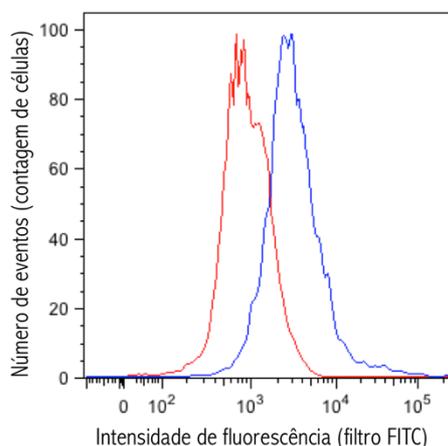


Figura 17 Citometria de fluxo de células U87-MG após incubação com 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cBeet120 durante 3 min; detecção da emissão de autofluorescência celular (vermelho) e da emissão de fluorescência de sonda (azul) no interior das células.

A viabilidade celular de U87-MG foi verificada após 5 e 60 minutos de incubação com 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cBeet120 e com seu precursor c120, sempre em tampão PBS. Após o período destas incubações, foi adicionado, conforme instruções do fabricante, o corante 7AAD. O 7AAD é um composto que atua como fluoróforo somente quando intercalado ao DNA das células.⁷¹ Entretanto, 7AAD não é capaz de permear a membrana celular de células vivas, e portanto, só entra na célula e se torna fluorescência quando a célula não se encontra mais viável.^{71,128,129}

Observa-se na Figura 18 que para um período de até 60 minutos não há nenhum dano às células causado por cBeet120. Porém, para um período de tempo curto de apenas 5 minutos, já observamos grandes danos às células na presença de c120.

Infelizmente não foi possível acompanhar a viabilidade celular frente à cBeet120 por períodos maiores devido à degradação da sonda e impossibilidade de manter as células à 37 °C na sua presença, também devido à sua instabilidade. Contudo, é interessante observar que esta é mais uma vantagem de cBeet120 sobre seu precursor.

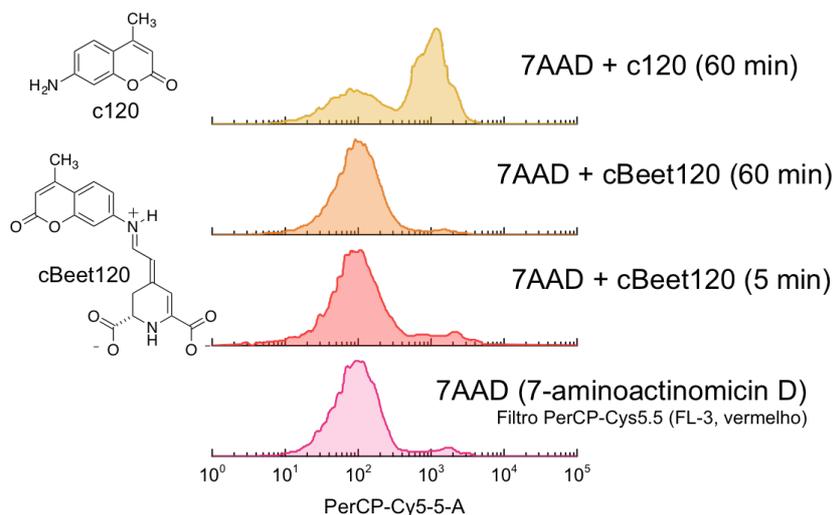


Figura 18 Viabilidade celular após incubação com $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cBeet120 e de uma solução saturada de c120 em U87-MG após 5 e 60 minutos.

As betalainas naturais mais populares possuem sua toxicidade bem estabelecida e muitas aplicações biológicas reportadas, porém nunca foram publicados dados similares com betalainas artificiais fora de nosso grupo. Muitas moléculas utilizadas como marcadores celulares possuem alta toxicidade, e só podem ser usadas por um breve período de tempo ou em células fixadas. A utilização de sondas para experimentos de imageamento de células vivas trazem vantagens como, por exemplo, o acompanhamento de processos celulares por microscopia. Entretanto, qualquer dano causado à célula durante esse tipo de imagem deve interferir no experimento e nos resultados observados. Por isso, estudar o efeito da sonda sobre a viabilidade celular é de suma importância.

3.2.2 Marcação de células vivas

Após determinar que cBeet120 não afeta a viabilidade das células U87-MG por um período de incubação de pelo menos 60 min, o perfil de marcação da sonda em células U87-MG vivas foi estudado de maneira mais elaborada por microscopia de epifluorescência e microscopia de fluorescência confocal. A emissão de fluorescência da sonda cBeet120 é mais intensa no núcleo das células U87-MG (Figura 20), conforme

discutido no item 3.1. Entretanto, observa-se que na população de células no campo, algumas células parecem brilhar mais do que outras.

Nesta tese, o uso de cBeet120 sempre foi realizado na presença de tampão PBS pH 7,4. Entretanto, é sabido que tampões à base de fosfato são nucleofílicos e que favorecem a decomposição desta betalaína. Desta forma, a hidrólise de cBeet120 em PBS ($t_{1/2} = 90$ min) compromete sua aplicação como sonda fluorescente em sistemas biológicos. Na literatura, a instabilidade de betalaínas em meio aquoso é sempre reportada. Porém, também foi reportado que a hidrólise de betalaínas pode ser minimizada na presença de açúcares, diminuindo a atividade de água e, conseqüentemente, aumentando a persistência destes pigmentos. A Figura 19 mostra o acompanhamento da hidrólise de cBeet120 em PBS e na presença de sacarose.

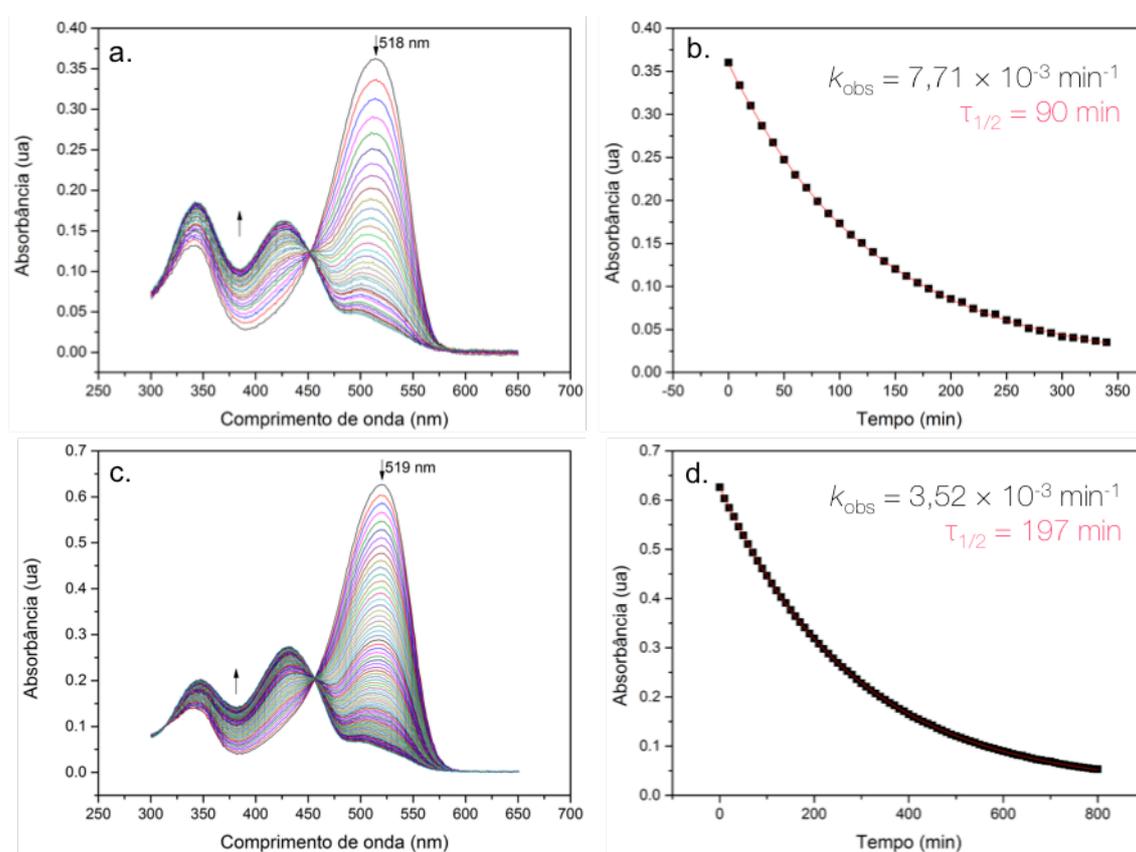


Figura 19 Cinética de hidrólise de cBeet120 à 25 °C na presença de (a) tampão PBS e (c) 1 mol L⁻¹ de sacarose em PBS e suas respectivas curvas de decaimento (b) e (d).

A presença de sacarose em concentração 1 mol L⁻¹ no meio aumentou em mais de duas vezes a persistência de cBeet120 em PBS. Além disso, percebemos que durante

microscopias de fluorescência em células U87-MG havia um aumento da intensidade de luz emitida pela sonda (Figura 21).

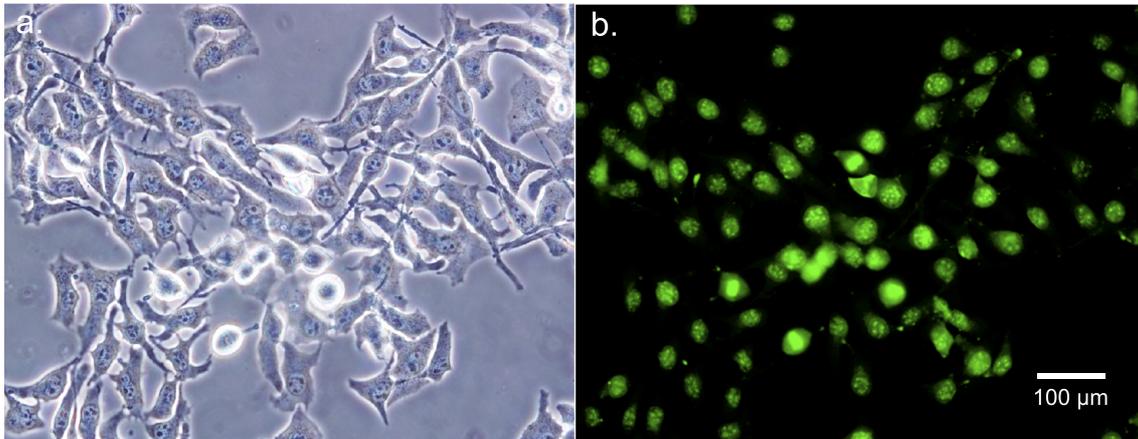


Figura 20 Células U87-MG vivas marcadas com cBeet120 ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$, filtro FITC EX488/EM520 nm). Imagem deconvolvida.

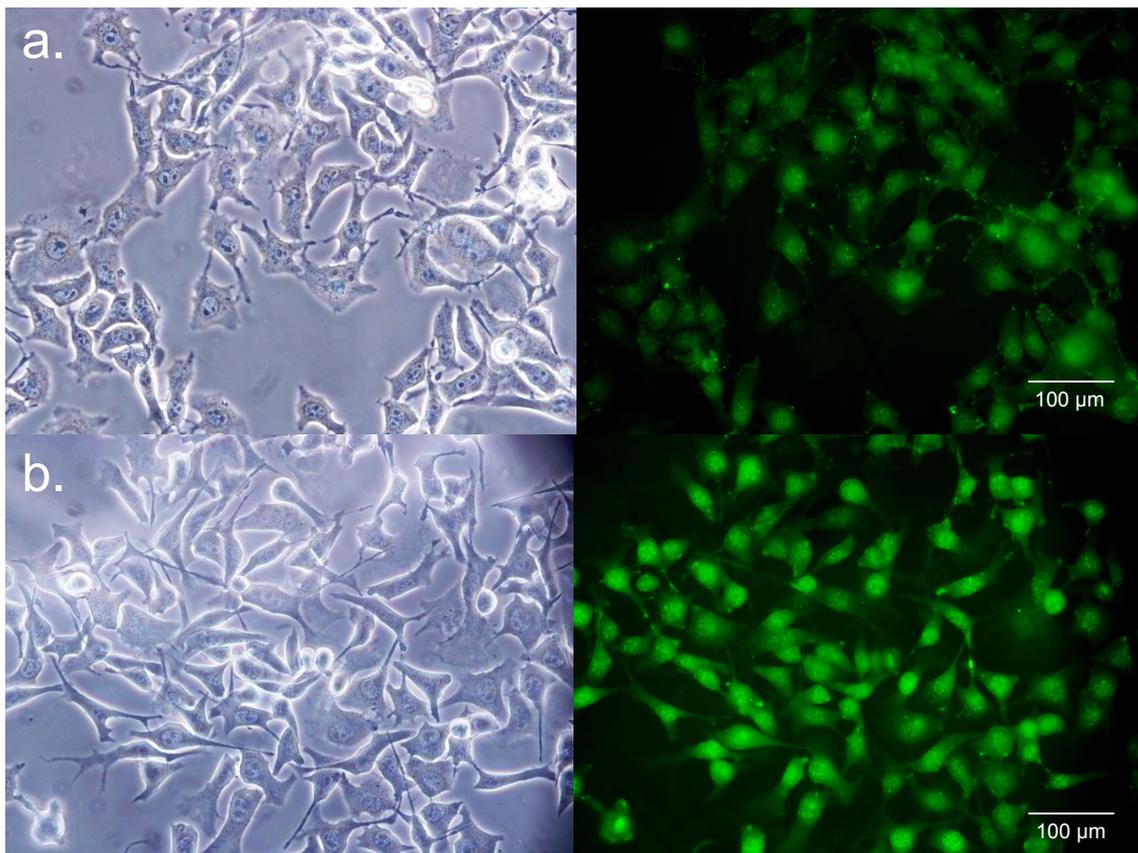


Figura 21 Imagens de microscopia de fluorescência de U87-MG incubadas com cBeet120 na (a) ausência e (b) na presença de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de sacarose durante a incubação. Imagens não deconvolvidas.

A partir da aquisição de imagens exatamente nas mesmas condições, foi possível correlacionar a intensidade de pixels exibida pela imagem com a frequência relativa de células emitindo esta fluorescência, como mostra a Figura 22.

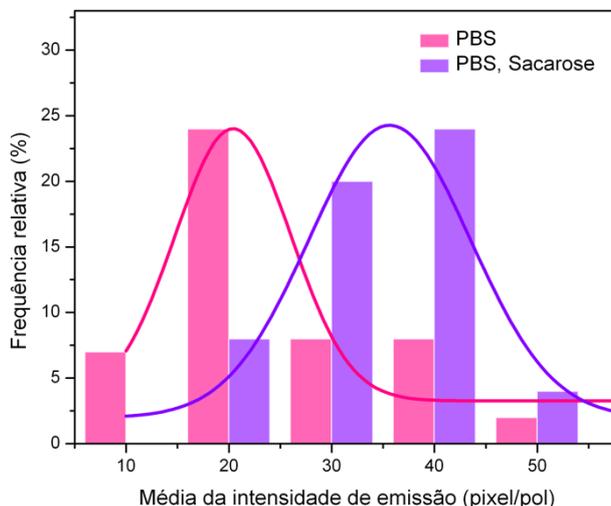


Figura 22 Distribuição de pixels da emissão de fluorescência de cBeet120 em células U87-MG com tampão PBS pH 7,4 e sacarose ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão PBS.

Quando utilizamos sacarose no meio, além de um maior tempo de meia-vida de cBeet120 em solução PBS, percebemos pela Figura 22 que há uma distribuição gaussiana para a intensidade de emissão de fluorescência entre as células observadas na imagem. Na Figura 22a há um grande número de células emitindo em uma intensidade mais baixa enquanto poucas emitem com intensidade maior. Já na Figura 22b observamos um comportamento oposto. Há um número maior de células emitindo com maior intensidade, enquanto poucas células emitem uma fluorescência mais fraca.

Entretanto a utilização de sacarose numa concentração tão alta na célula é prejudicial pois pode afetar a pressão osmótica do meio. Como o tempo para realizar o experimento de microscopia é muito menor que o tempo de meia-vida do composto, não houve necessidade de utilizar açúcar no meio. Contudo, esse é um resultado importante para o armazenamento prolongado de cBeet120, já que esta betalaína tem tempo de meia-vida baixo, como mencionado. Desta forma, a sacarose no meio de incubação foi retirada e as condições experimentais dos experimentos a seguir foram realizados sempre apenas em PBS, sem a adição de nenhum outro composto que pudesse prejudicar o entendimento da entrada e do acúmulo da betalaína nas células.

A Figura 23 traz uma microscopia confocal de U87-MG vivas incubadas com cBeet120. A microscopia confocal permite o seccionamento da célula em diversos planos focais, sem qualquer tipo de contato físico. Neste tipo de microscopia é possível obter um melhor contraste, já que a fluorescência de fundo de outros planos focais e, desta forma, aumenta o contraste. Como consequência, podemos observar melhor a localização do acúmulo de cBeet120 nas células vivas. Como descrito anteriormente, cBeet120 acumulada em células U87-MG respondem à irradiação da lâmpada do microscópio utilizando o filtro FITC. Contudo, esse comportamento não é reproduzido com fonte de laser, de mesmo comprimento de onda de excitação e mesma região de detecção e, por isso, todas as imagens de microscopia confocal desta tese também necessitaram ser excitadas por cerca de 1 min antes das imagens serem adquiridas.

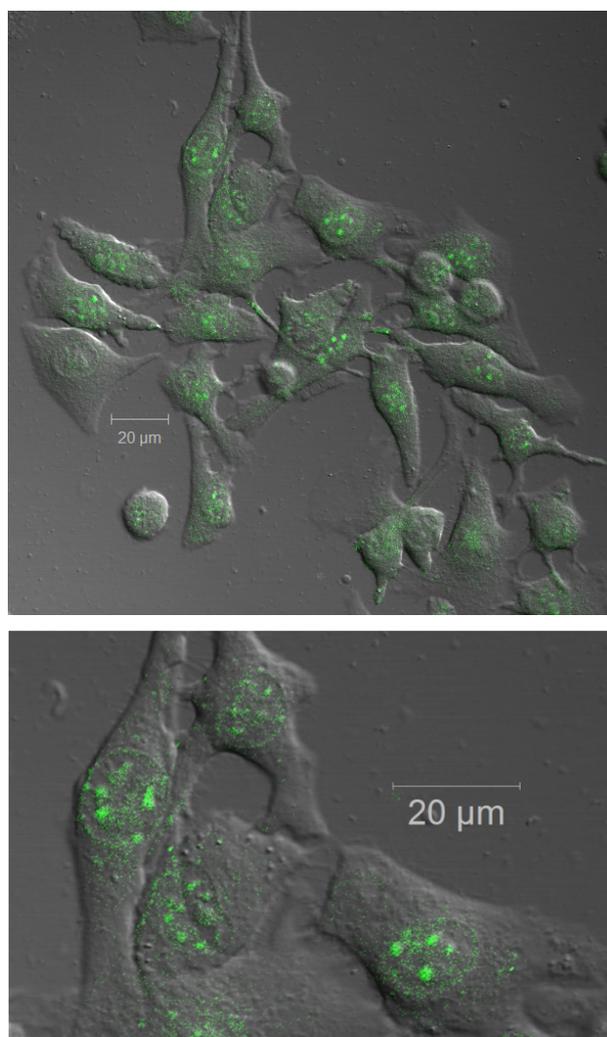


Figura 23 Microscopias confocal de U87-MG vivas incubadas com $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cBeet120

A Figura 23, por ser uma imagem digital, possui um esquema de cores falso, no qual a imagem é colorida digitalmente. Na imagem acima e em todas as imagens de microscopia confocal apresentadas nesta Tese, o esquema de cores foi escolhido de acordo com seus máximos de emissão correspondentes. Portanto, no caso de cBeet120, verde.

O espectro de emissão de fluorescência de cBeet120 no interior de células U87-MG não havia sido obtido por técnicas fluorimétricas em nosso laboratório ou nos de nossos colaboradores devido à baixa concentração intracelular de sonda e à sobreposição da banda de emissão do plástico das placas de cultivo celular. Entretanto, microscópios equipados com detecção espectral permitem imagens que contêm o espectro de emissão para cada pixel obtido, para um dado comprimento de onda de excitação. Desta forma, é possível obter o espectro da emissão intracelular de fluorescência de um determinado fluoróforo. Para tal, o experimento apresentado a seguir foi realizado no SciLifeLab (Science for Life Laboratories, Solna, Suécia) por meio da colaboração de nosso grupo de pesquisa com o grupo *Advanced Light Microscopy* (Dr. Hjalmar Brismar e Dr. Hans Blom, Karolinska Institutet, Estocolmo, Suécia). Inicialmente, as células foram cultivadas nas mesmas condições já utilizadas previamente e incubadas com cBeet120. Após alguns segundos de exposição à luz (FITC, λ_{EX} 500-544/ λ_{EM} 526-588 nm), as imagens foram adquiridas através de excitação em 488 nm e detecção entre 504 e 691 nm. Desta forma, a imagem obtida contém um mapa de espectros de emissão de fluorescência, no qual é possível selecionar qualquer região da imagem e visualizar seu espectro.

A Figura 24 mostra dois campos diferentes de U87-MG incubadas com cBeet120. As células utilizadas neste experimento foram células adquiridas no Rudbecklaboratoriet (Uppsala Universitét). Conforme discutido no item 3.2, a linhagem celular U87-MG sofreu mutações com o tempo conforme seu local de armazenamento e cultivo. As células utilizadas para todos os experimentos desta tese foram adquiridas pelo BCRJ (Banco de Células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro), com exceção deste. Durante os ensaios foi possível observar uma mudança no perfil de marcação produzido pelo acúmulo de cBeet120 na célula. O fenótipo das células parecia bastante diferente, já que parecia ter uma série de vesículas que não são observadas nas células que estamos acostumados a lidar. Na Figura 24, no primeiro campo, as células têm

aparência viável, e o padrão de marcação com cBeet120 se assemelha ao esperado, com exceção de uma marcação citoplasmática menos sutil. Contudo, o comportamento responsivo à irradiação permanece igual ao observado com as células obtidas no Brasil. Porém, no segundo campo, as células já apresentavam emissão de fluorescência inicial, ao contrário do que observamos com células vivas, e esta emissão não responde ao período de irradiação pela lâmpada do microscópio.

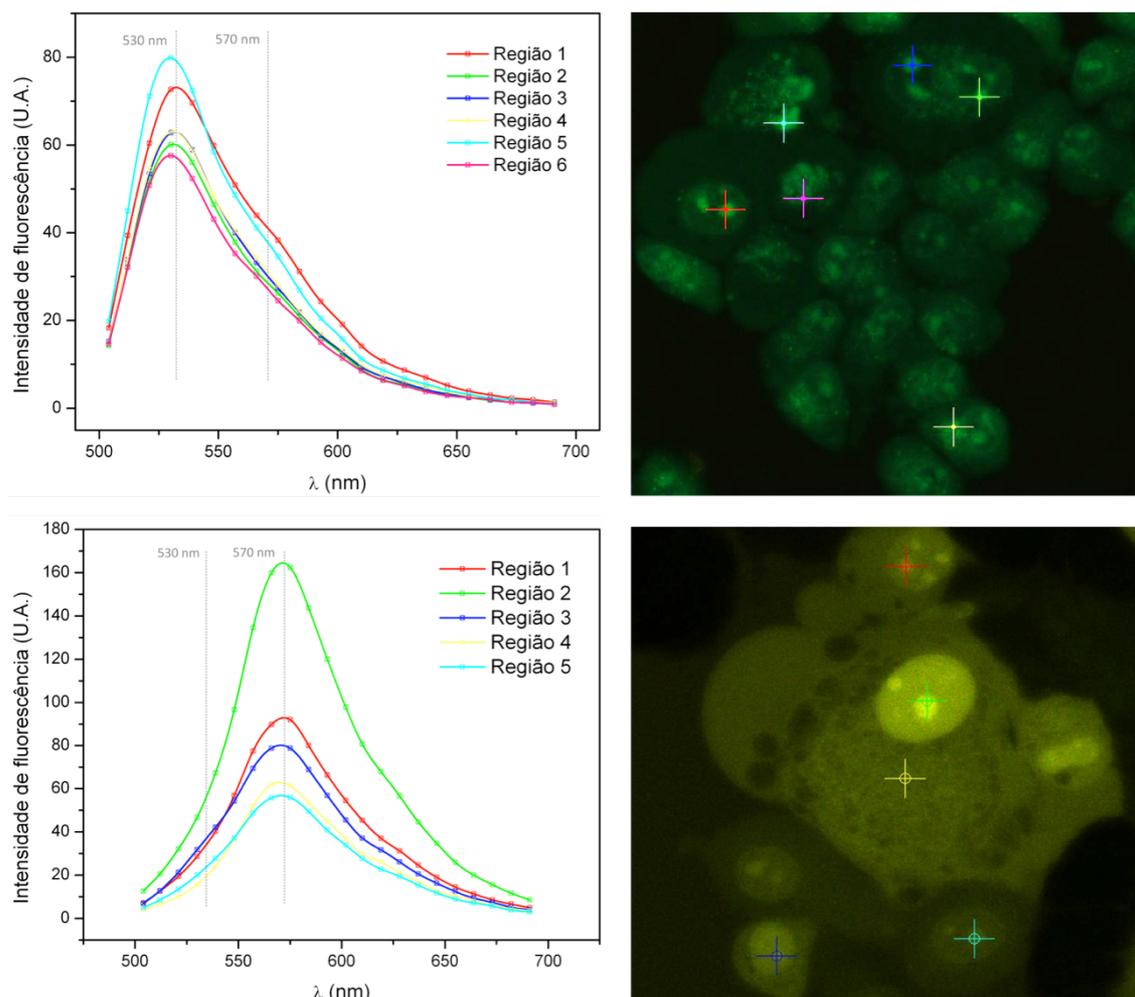


Figura 24 Espectro de emissão de fluorescência de células U87-MG vivas e não viáveis, respectivamente, incubadas com cBeet120 em diferentes regiões.

O deslocamento hipsocrômico observado indica que há uma maior delocalização da carga, estabilizando a cBeet120, sugerindo que algum processo ocorre com a sonda que é dependente de luz e da integridade da membrana celular. Tal característica permite que a sonda cBeet120 possa ser utilizada como um marcador de viabilidade celular.

3.2.3 Marcação de células fixadas

Diversas técnicas, como imunofluorescência, imageamento com fluoróforos tóxicos ou impermeáveis à membrana e alguns métodos de citometria de fluxo necessitam que as células sejam primeiramente fixadas. Este procedimento garante que a célula permaneça preservada e que moléculas menos lipofílicas e/ou muito grandes sejam internalizadas. Sempre com a linhagem U87-MG como modelo, foram testadas dois agentes de fixação: formaldeído e metanol. Devido à rápida degradação de cBeet120 em formaldeído, nenhuma marcação foi observada. No método de fixação com metanol é possível observar marcação com a sonda, porém, diferentemente das imagens obtidas com células vivas, a célula inteira é marcada com cBeet120, sem qualquer especificidade, como mostra a Figura 25. Durante o processo de fixação a integridade morfológica da célula é preservada, porém, o agente fixador causa danos à célula (*e.g.*, afetar a estrutura terciária de proteínas ou degradar alguns componentes lipídicos), alterando a permeabilidade seletiva da membrana celular. Quando a célula está fixada, cBeet120 atravessa livremente a membrana e é capaz de interagir com uma grande quantidade de componentes celulares (Figura 25).

Para prevenir a marcação total das células fixadas, tentou-se uma nova abordagem, na qual as células são incubadas com cBeet120 ainda vivas e só depois fixadas. Esse método foi testado a partir de três agentes fixadores: metanol, paraformaldeído e formaldeído. Cada um dos métodos de fixação funciona por um mecanismo diferente. O metanol, assim como álcools em geral, são capazes de precipitar proteínas pelo efeito *salting-out*.^{130,131} Este efeito pode ser melhor explicado pela transferência de energia dos aminoácidos da água para o álcool, que mostra que a interação entre glicina, asparagina e histidina com álcool é desfavorável, levando à diminuição de sua solubilidade neste solvente. Entretanto, quanto mais a cadeia lateral do aminoácido se torna hidrofóbica, há uma redução na transferência de energia observada para aminoácidos como leucina e fenilalanina, o que significa que há interação favorável entre estas cadeias laterais apolares e metanol. Para aminoácidos mais hidrofílicos, a interação termodinamicamente desfavorável com o solvente força a sua precipitação. Além disso, proteínas desenoveladas possuem grupos carregados, polares e ligações peptídicas expostas, fazendo com que sua solubilidade diminua com o aumento da concentração de solvente orgânico no meio.

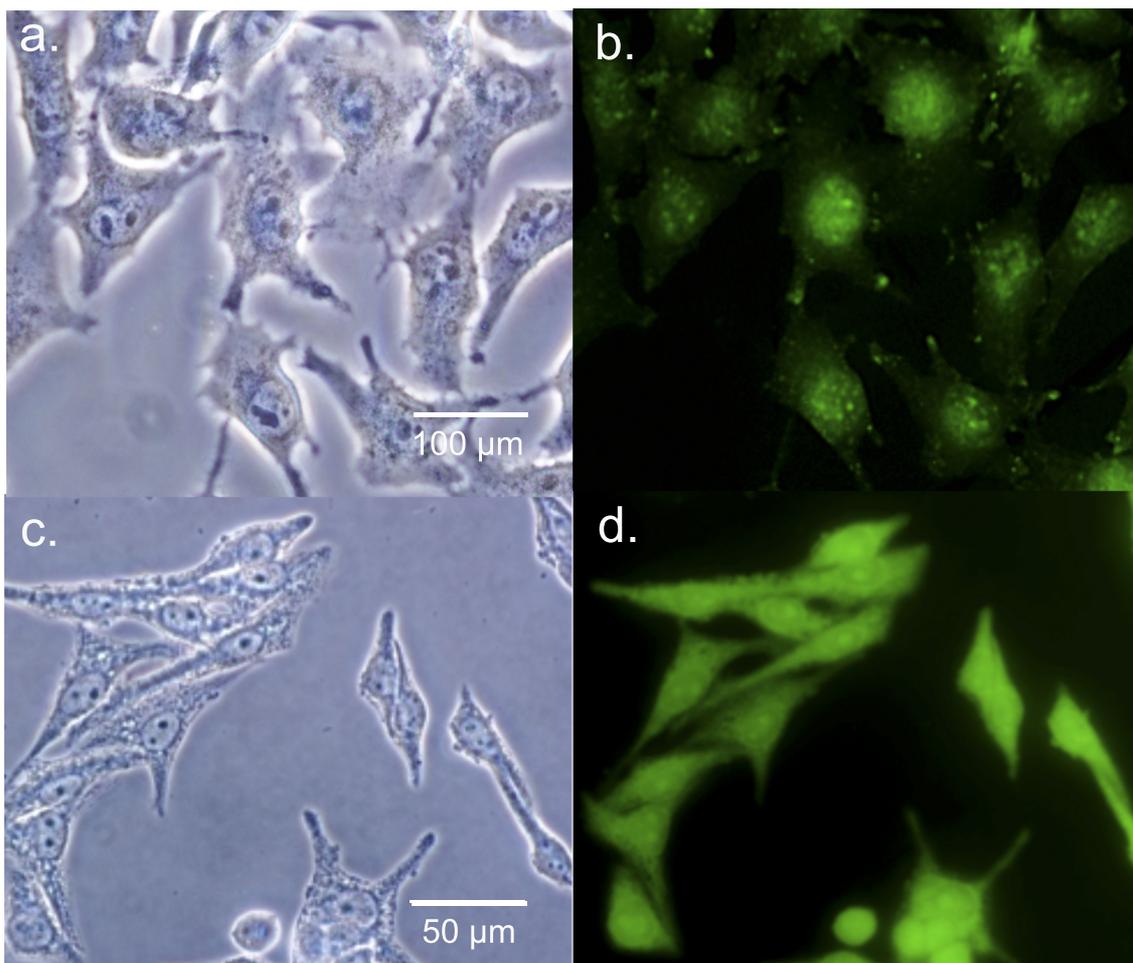


Figura 25 Microscopias de fluorescência de U87-MG (a) vivas e (b) fixadas com metanol antes de serem incubadas com cBeet120.

O formaldeído é convertido ao seu hidrato em água. Este hidrato (metanodiol) reage com proteínas fazendo ligações cruzadas através da adição de um grupo metilênico¹³⁰. Além disso, uma característica da fixação com formaldeído é a formação de um padrão granular do núcleo celular, pois a cromatina, que contém grandes quantidade de DNA e proteínas fortemente básicas, é coagulada pelo solvente.^{132,133} Desta forma, o núcleo fixado com formaldeído tem uma aparência muito mais parecida com o núcleo de uma célula viva, como mostra a Figura 26e. O paraformaldeído é um polímero de formaldeído, que é submetido a hidrólise alcalina ou aquecimento para ser utilizado convertido a monômeros de formaldeído antes da utilização. Sua ação é, portanto, idêntica àquela do formaldeído.¹³¹⁻¹³³

Fixar células já marcadas com cBeet120 altera o padrão de marcação, que depende o agente fixador usado (Figura 26). Embora seja possível a visualização do núcleo e os

nucléolos em todos os casos, a fixação com formaldeído resultou em uma marcação mais distinta, onde é possível observar o acúmulo de sonda numa região mais periférica da célula, enquanto a marcação com metanol também parece promover uma marcação pontual citoplasmática ao redor no núcleo, mesmo que sutil. Desta forma, o agente fixador escolhido para os estudos subsequentes utilizando células fixadas foi sempre o paraformaldeído.

A Figura 27 mostra uma microscopia confocal nas mesmas condições experimentais que a microscopia de U87-MG incubada com cBeet120 e posteriormente fixada com PFA observada na Figura 27. A técnica permite visualizar a marcação com maior resolução e que se parece muito mais com a marcação observada em células vivas.

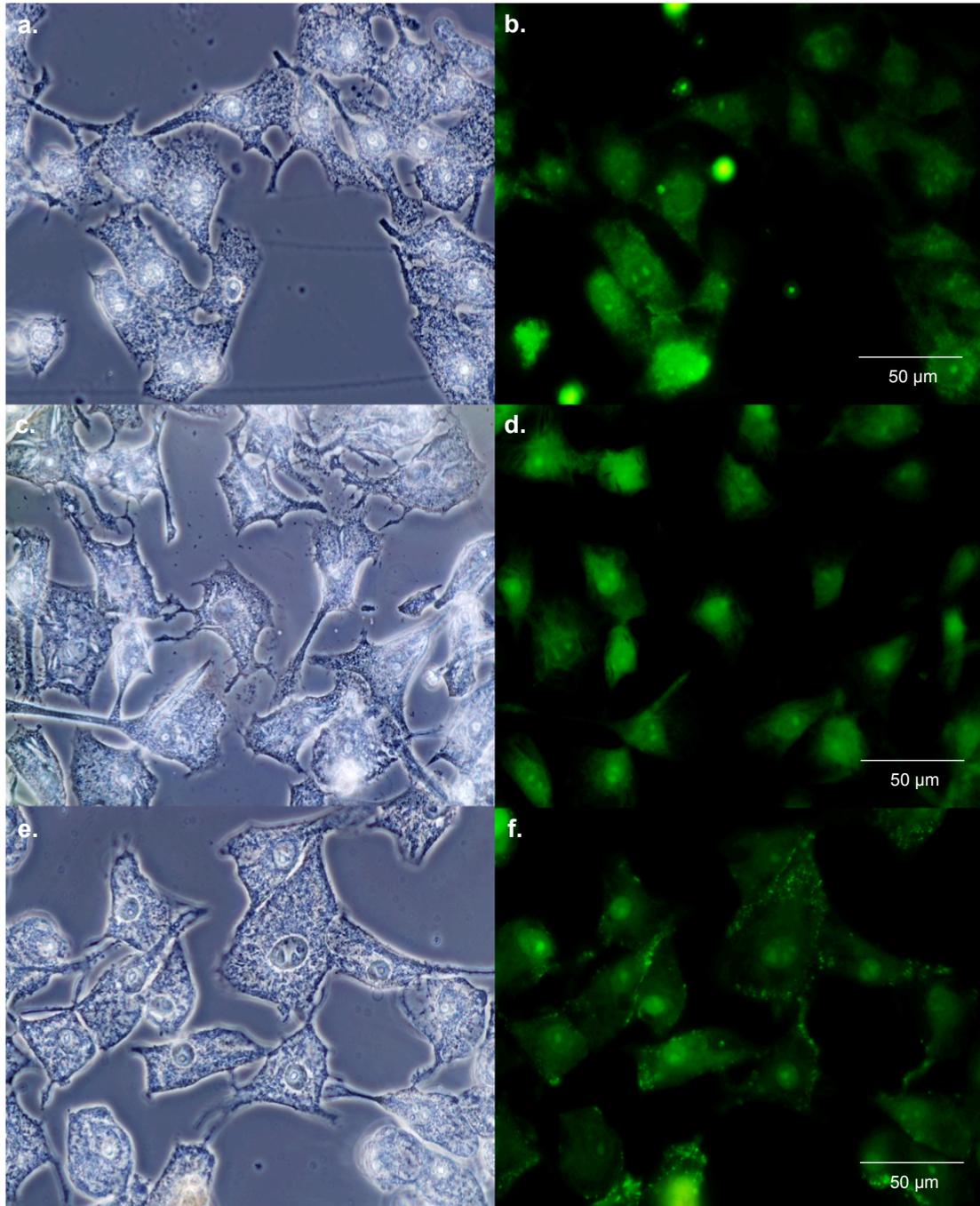


Figura 26 Microscopias de fluorescência de células incubadas com $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cBeet120 e depois fixadas com (a) 50% metanol/PBS, (c) 3,7% paraformaldeído/PBS e (d) 3,7% formaldeído/PBS.

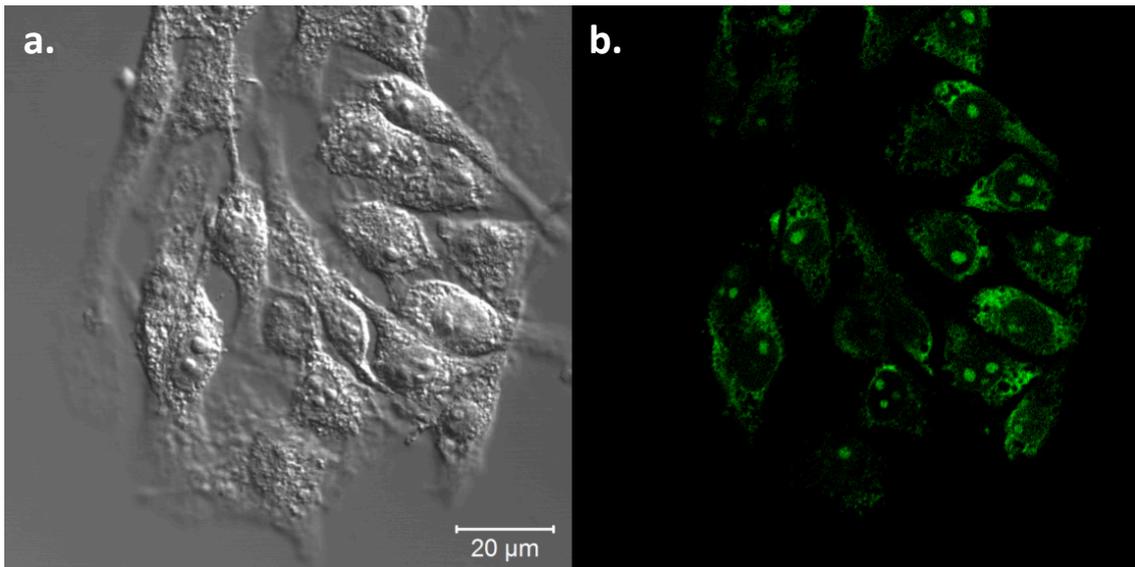


Figura 27 Microscopia confocal de células incubadas com $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ cBeet120 e posteriormente incubadas com 3,7% paraformaldeído/PBS por 10 minutos.

3.3 Efeito da irradiação sobre a fluorescência de cBeet120

Durante os experimentos para a aquisição de imagens por microscopia, diversas vezes a sonda cBeet120 não emitia fluorescência quando incubada com células vivas. Conforme o entendimento sobre o comportamento da sonda aumentou, percebeu-se que manter a irradiação com luz ciano ligada resultava no aumento gradativo da emissão de cBeet120 em células vivas.

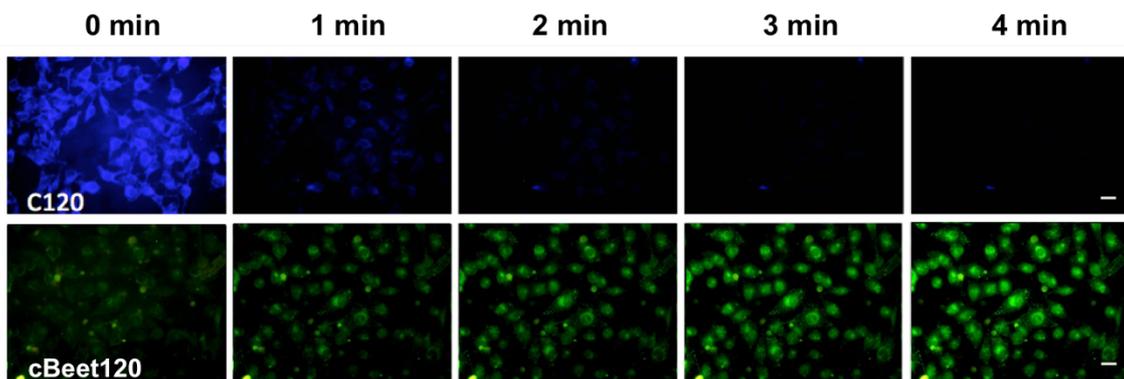


Figura 28 Acompanhamento da emissão de fluorescência em U87-MG incubadas com solução saturada de c120 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cBeet120 durante exposição contínua a luz do microscópio (DAPI EX350/EM420 nm e FITC EX488/EM520 nm).

O comportamento da emissão de cBeet120 quando irradiada no filtro DAPI é oposto, *i.e.*, sua intensidade diminui. Entretanto, logo que irradiada no filtro FITC, sua emissão de fluorescência volta a aumentar, como se a sonda pudesse ser ativada quando

irradiada no FITC e desativada quando irradiada no DAPI. Esse comportamento *ON/OFF* também ampliam o leque de aplicações possíveis para cBeet120.

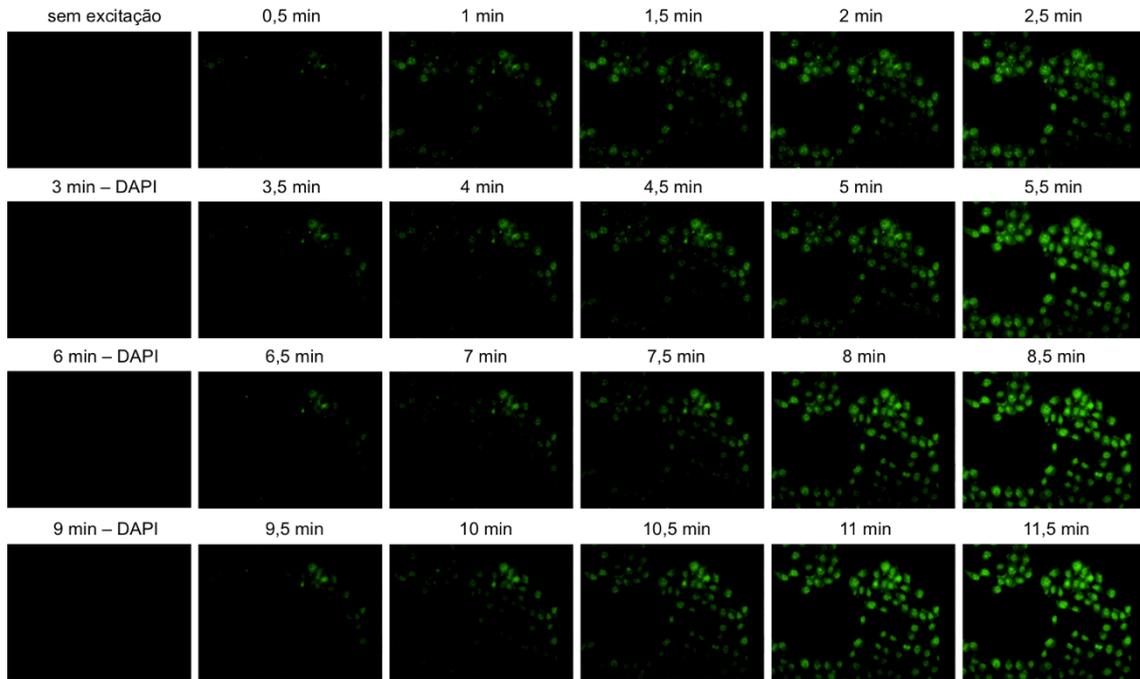


Figura 29 Comportamento *ON/OFF* de cBeet120 através da excitação no filtro FITC (*on*) e do filtro DAPI (*off*). Imagens continuamente expostas à luz e adquiridas a cada 30 segundos.

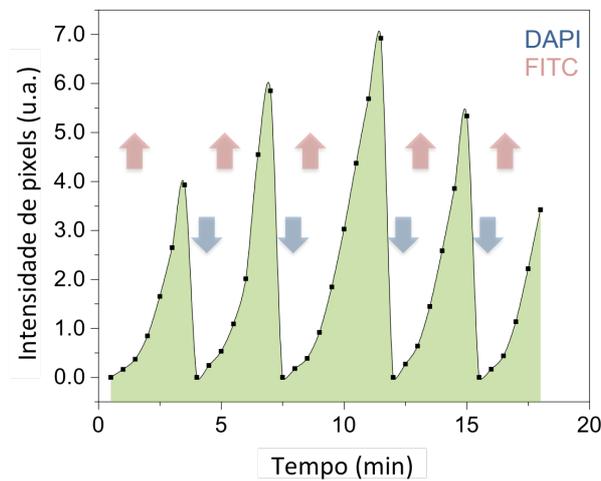


Figura 30 Intensidade de pixels observada para cada imagem obtida na Figura 31 de acordo com a mudança manual entre os filtros DAPI e FITC do microscópio de epifluorescência.

Contudo, quando é feito o controle de células incubadas com cBeet120 expostas continuamente à luz (filtro FITC) mas, desta vez, fazendo pausas na excitação (sem luz) de, também, 30 segundos, observamos que a emissão de fluorescência permanece inalterada, isto é, a sonda permanece ativada (Figura 31).

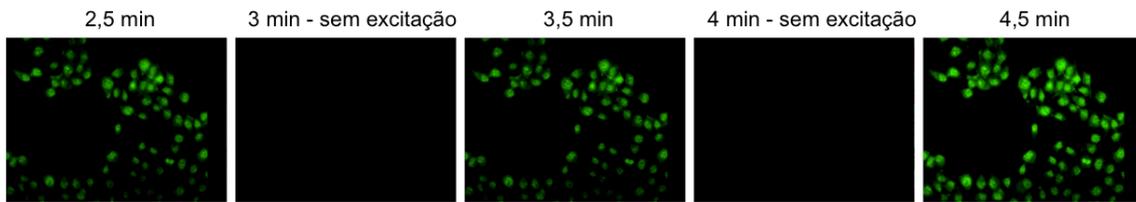


Figura 31 Comportamento de cBeet120 ativada após 30 segundos na ausência da luz.

Neste caso, diferentemente do que acontece quando a sonda é desativada pela incidência de luz com o filtro DAPI, a emissão de fluorescência de cBeet120 aumenta de forma sutil, já que não houve desativação prévia. Este fenômeno é observado somente com cBeet120 em células vivas. Em células fixadas, observa-se emissão de fluorescência máxima de cBeet120 com a irradiação. Quando comparada a sondas comerciais, cBeet120 também possui um comportamento contrário, no qual as sondas testadas têm sua emissão de fluorescência inalterada ou, em sua maioria, sofrem rápido fotobranqueamento (Figura 32). Ao fim de 4 min de exposição à luz, LysoTracker DND99 e Rodamina123 já não podem ser observadas.

3.4 Mecanismo de entrada e acúmulo de cBeet120 em células U87-MG

A diferença na marcação de cBeet120 com células U87-MG vivas e fixadas pode ser discutida com maior embasamento conhecendo-se o mecanismo de entrada da sonda nas células. Nesta sessão serão discutidos os resultados acerca do estudo do mecanismo de entrada de cBeet120 em células U87-MG.

3.4.1 Estudo do transporte de cBeet120

O estudo do transporte de cBeet120 para o interior da célula requer uma curva de calibração que permita determinar a partir da intensidade de fluorescência a concentração intracelular de cBeet120. A relação entre a intensidade de fluorescência e a concentração de um soluto é dada pela Eq. 1:

$$I_f = kI_0\Phi_{FL}[1 - (10^{-\varepsilon bc})] \quad \text{Eq. 1}$$

onde, k é uma constante de proporcionalidade que depende do aparelho, I_0 é a intensidade de luz incidente, Φ_{FL} é o rendimento quântico de fluorescência, ε é o coeficiente de atenuação molar, b é o caminho óptico e c é a concentração.

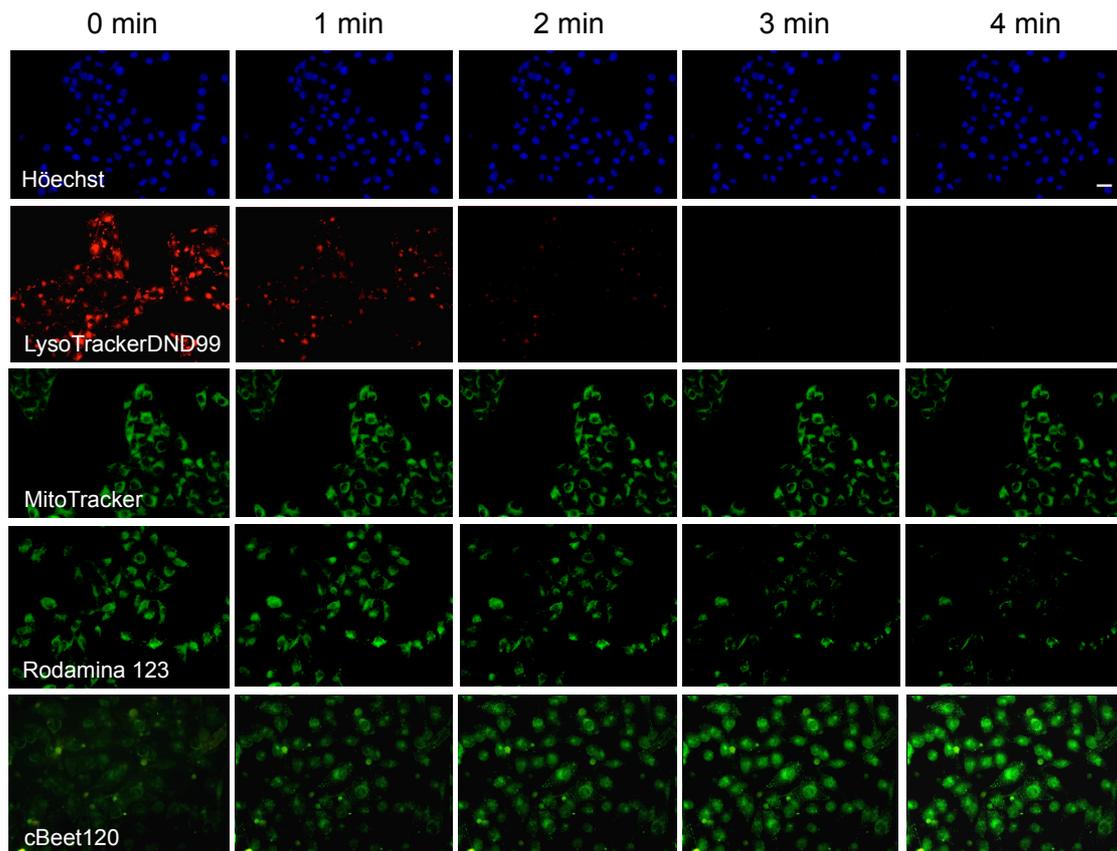


Figura 32 Comparação entre cBeet120 e sondas comerciais em função do tempo de exposição à luz.

Quando a concentração de fluoróforo é suficientemente baixa para evitar efeitos de filtro interno (ou seja, a reabsorção da radiação emitida que resulta na diminuição do rendimento quântico ou mudança da do espectro de emissão), a Eq. 1 assume uma forma simplificada (Eq. 2):

$$I_f = kI_0\Phi_{FL}[\epsilon bc] \quad \text{Eq. 2}$$

que implica em uma relação linear entre a intensidade de fluorescência e a concentração da sonda. Com a diminuição do caminho ótico, b , mantendo-se constante a concentração da solução o efeito de filtro interno é reduzido, uma consequência da lei de Beer-Lambert (Eq. 3):

$$T = 10^{-A} = 10^{-\epsilon bc} \quad \text{Eq. 3}$$

onde, T é a transmissão e A é a absorção. Além disso, o efeito de filtro interno pode ser corrigido empregando-se a Eq. 4¹³⁴:

$$I_f^{corr} = I_f^{obs} \times 10^{\frac{A_{\lambda_{EX}} + A_{\lambda_{EM}}}{2}} \quad \text{Eq. 4}$$

onde, a intensidade de fluorescência é corrigida empregando-se o valor observado e a absorção nos comprimentos de onda de excitação ($A_{\lambda EX}$) e de emissão ($A_{\lambda EM}$). Desta forma, a Figura 33 mostra a curva de calibração obtida para diferentes concentrações de cBeet120 em PBS e suas respectivas intensidades de fluorescência, a qual foi realizada em um fluorímetro com excitação em 510 nm e leitura em 570 nm, mantendo-se o caminho ótico sempre constante, *i.e.*, mantendo o volume de soluções a serem medidas sempre igual. Entretanto, para concentrações mais altas de cBeet120 podemos observar a perda da linearidade, o que ocorre devido ao efeito de filtro interno. Para determinar a equação que correlaciona intensidade de fluorescência e concentração de cBeet120, foi utilizada a porção linear da curva.

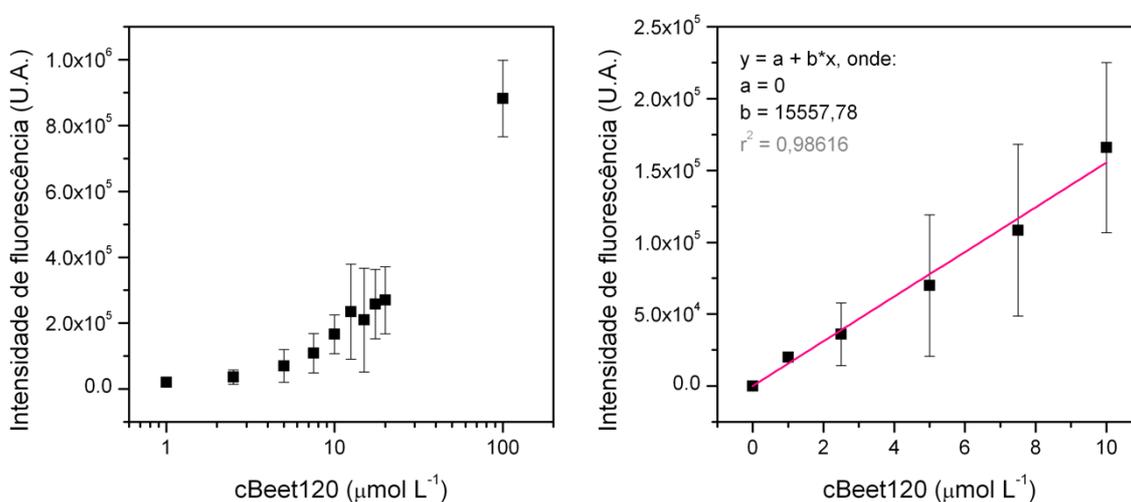


Figura 33 Correspondência entre concentrações de cBeet120 e suas intensidade de emissão de fluorescência em (A) escala logarítmica e (B) em maior aumento da parte linear para obtenção da equação da reta. Ensaio realizado na ausência de células.

Com a curva de calibração determinada, variou-se a concentração de cBeet120 na presença de um filme de células U87-MG confluentes. Para cada concentração de cBeet120 testada, as células foram incubadas por 3 min com a sonda, lavadas com PBS ($3 \times$, $100 \mu\text{L}$) e $100 \mu\text{L}$ de PBS foram adicionados antes da leitura da intensidade de fluorescência em 570 nm. A intensidade de fluorescência de cBeet120 no interior das células foi obtida em triplicata e em modo de varredura, *i.e.*, foram adquiridos 356 pontos por poço a cada replicata.

O valor médio de intensidade foi convertido em concentração de cBeet120 empregando-se a curva de calibração obtida anteriormente. O valor resultante foi dividido pelo tempo de incubação (3 min) resultando na taxa (velocidade) de entrada de

cBeet120 em $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ (Figura 34). Como a concentração de cBeet120 no interior das células é sempre inferior a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, a curva de calibração é válida supondo que o rendimento quântico de fluorescência dentro da célula é constante independente da relação cBeet120/biomoléculas nas condições experimentais empregadas.

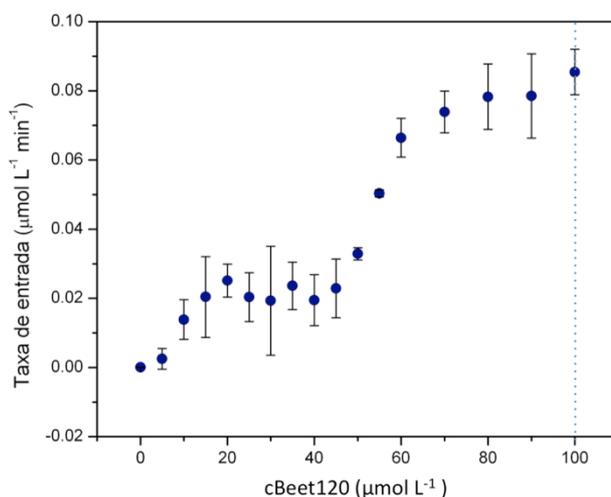


Figura 34 Relação entre concentração de incubação *versus* taxa de internalização de cBeet120.

Para determinar o tempo ótimo de incubação de cBeet120, foi feito o experimento contrário, onde a concentração de betalaína foi mantida constante ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e variou-se apenas o tempo. A Figura 35 mostra a dependência do tempo para uma dada concentração de sonda até 3 minutos e períodos maiores não resultam em sua maior internalização.

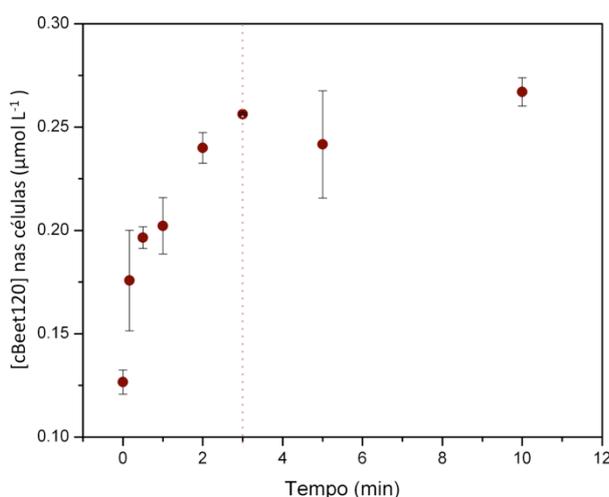


Figura 35 Dependência do tempo de incubação com a entrada de cBeet120 nas células.

A Figura 34 e a Figura 35 mostram que, como inferido, a internalização de cBeet120 nas células de U87-MG ocorre por meio de transportadores localizados na membrana celular. Entretanto, isso não exclui a possibilidade de que a entrada da sonda também ocorra via difusão, já que este processo pode ocorrer em tempos maiores e depende de um gradiente eletroquímico favorável, ou seja, acontece na direção de uma concentração maior para uma área de concentração menor até atingir um equilíbrio. A entrada via transportador vai contra o gradiente eletroquímico, e, por isso, ocorre com gasto de energia, e em geral acontece em um período de tempo mais curto.

3.4.2 Ensaios de competição

Os estudos de internalização de cBeet120 em células U87-MG foram iniciados determinando-se a influência de agentes relevantes para o transporte de solutos sobre a entrada de cBeet120. Foram selecionadas sete substâncias diferentes: cloreto de sódio (Na^+), cloreto de potássio (K^+), cloreto de cálcio (Ca^{2+}), ácido glutâmico (Glu), ácido aspártico (Asp), ácido α -cetoglutárico e ácido γ -aminobutírico (GABA). Estas substâncias foram selecionadas considerando-se a importância de íons em processos de transporte e na hipótese do mecanismo de transporte de cBeet120 ser similar ao de aminoácidos negativamente carregados. Experimentos-controle para determinar se cBeet120 interage com estas substâncias foram realizados por meio do acompanhamento da velocidade de degradação da sonda na presença e ausência de todos os sais utilizados (Figura 36).

A Figura 36h mostra que apesar de os íons sódio, potássio e cálcio alterarem a constante cinética de degradação de cBeet120, durante o tempo do experimento (3 min de incubação com a sonda), não há alteração significativa para causar algum efeito na betalaína. Contudo, para experimentos mais longos, seria necessário considerar o efeito destes cátions sobre a marcação de betalaínas. A Figura 37 mostra o efeito da adição de diversos sais na internalização de cBeet120. Por estar em escala logarítmica, o ponto zero ($0,08 \pm 0,02$), *i.e.*, sem adição de qualquer espécie à cBeet120, não aparece no gráfico.

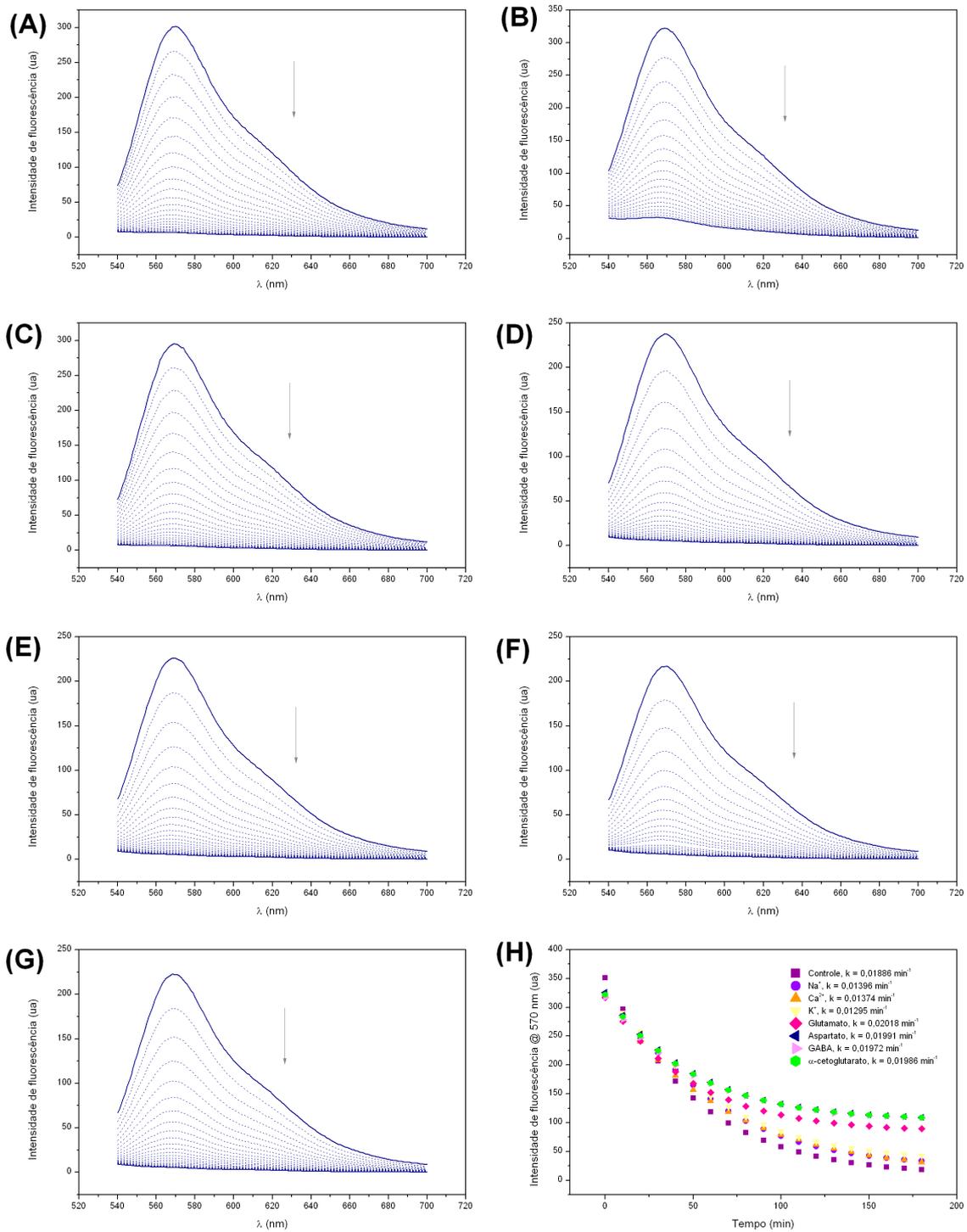


Figura 36 Cinéticas de emissão de fluorescência de cBeet120 em PBS na presença de (A) 100 μmol L⁻¹ de íons sódio, (B) 100 μmol L⁻¹ de íons cálcio, (C) 100 μmol L⁻¹ de íons potássio, (D) 15 mmol L⁻¹ de glutamato, (E) 15 mmol L⁻¹ de aspartato, (F) 15 mmol L⁻¹ de GABA e (G) 15 mmol L⁻¹ de α-cetoglutarato. A emissão de fluorescência foi acompanhada em 570 nm ($\lambda_{EX} = 510$ nm) e sua curva de decaimento e respectivas constantes cinéticas são apresentadas em (H).

Os íons sódio, potássio e cálcio possuem efeito na entrada de cBeet120. Sódio e potássio, possuem efeitos opostos, já que atuam como um *antiporter* e causam um

aumento de 39% e uma diminuição de 129%, respectivamente, na intensidade de fluorescência, e portanto, na entrada de cBeet120. A adição de cálcio causa um aumento de fluorescência de cerca de 208%. Este valor está de acordo com os resultados anteriores se considerarmos que em células do tipo U87-MG a presença deste íon no meio externo regula o transporte de glutamato. A Figura 37 mostra que a entrada de cBeet120 também é afetada quando variamos a quantidade de glutamato extracelular, saturando os receptores e inibindo a entrada da sonda (82%). Os ensaios envolvendo os íons sódio, potássio e cálcio foram realizados em tampão colina (150 mmol L⁻¹ ajustado a pH 7,2 com 50 mmol L⁻¹ de Tris) para evitar o efeito dos sais de potássio e sódio que estão presentes no tampão PBS, no qual os outros experimentos são realizados.

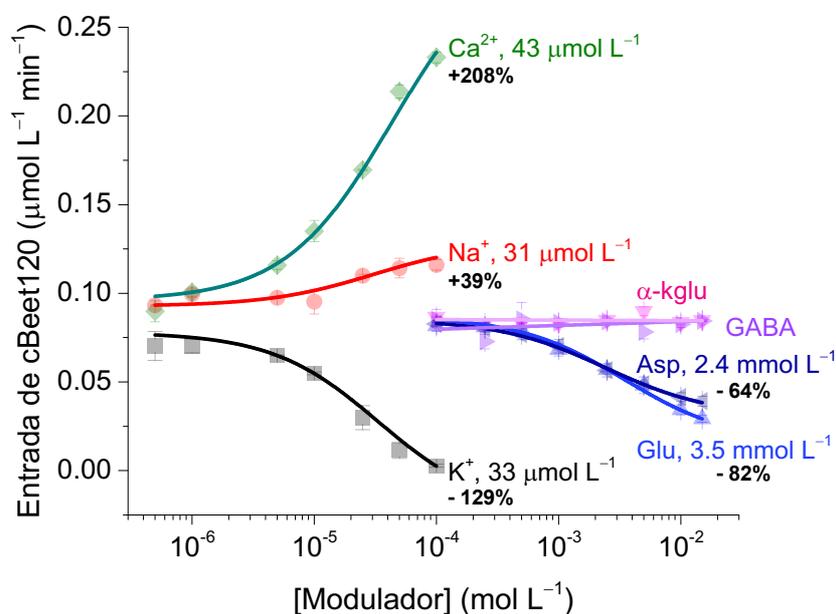


Figura 37 Efeito de sais sobre a entrada de cBeet120.

O mecanismo de internalização de cBeet120, como mostrado acima é dependente de sódio, potássio, cálcio, glutamato e aspartato. A relação entre os transportes dessas espécies foi estudada e a Figura 39 apresenta uma explicação coerente para os dados obtidos. Sódio e potássio estão relacionados pelo transportador Na⁺/K⁺-ATPase, no qual três íons de sódio são expulsos da célula enquanto dois íons de potássio entram e isso ocorre com o gasto de uma molécula de ATP. Embora o efeito da adição de sódio sob a internalização de cBeet120 seja sutil, a adição de potássio, por sua vez, causa uma inibição considerável na entrada da sonda.

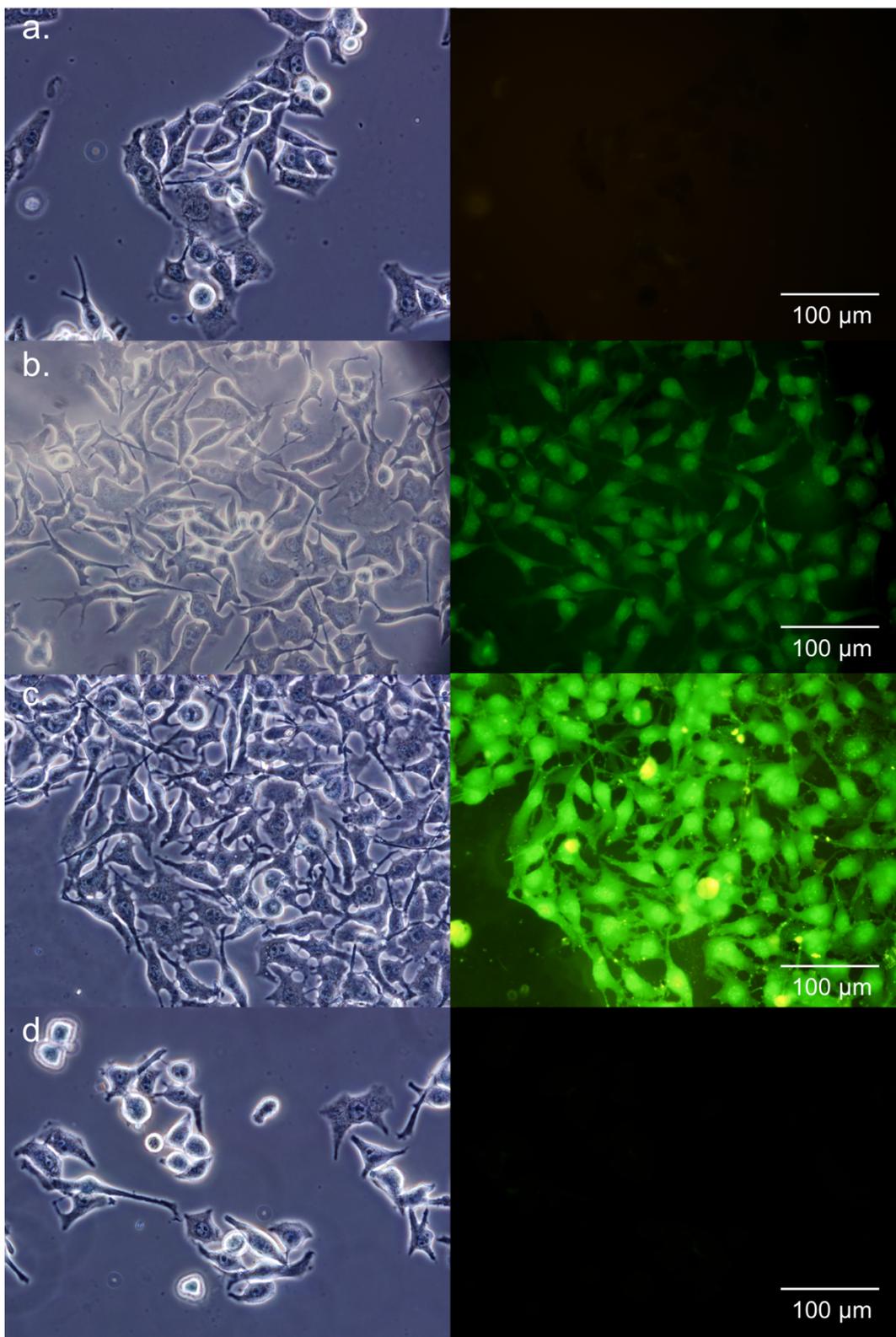


Figura 38 Microscopias de fluorescência de células incubadas com $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ cBeet120 por 3 minutos na presença de (a) $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ potássio, (b) $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ sódio, (c) $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ cálcio e (d) 15mmol L^{-1} glutamato, sempre nas mesmas condições de aquisição de imagem. (A imagem (c) é apresentada saturada com o propósito de evidenciar o aumento da fluorescência na presença de cálcio em comparação aos outros sais, utilizando sempre o mesmo tempo de exposição para aquisição de imagem).

A adição de cálcio no meio extracelular, entretanto, causa um aumento expressivo na entrada de sonda, o que pode ser explicado pelo feedback negativo causado por sua alta concentração extracelular, bloqueando a saída deste íon. Cálcio e potássio podem ser relacionados por meio do balanço de sódio na célula, por ação do NCX (Na^+/Ca^{2+} -exchanger).¹³⁵ A presença de cálcio e potássio tem efeitos contrários, o que está de acordo com o observado na Figura 39.¹³⁶ Essas informações também são compatíveis com os ensaios utilizando inibidores. A ação da artemisinina (inibidor de Ca^{2+} -ATPase), no entanto, também aumenta a entrada de cBeet120 nas células. Isso ocorre porque artemisinina bloqueia a saída de cálcio, aumentando os níveis de cálcio intracelular, que por sua vez causa um efeito indireto nos níveis de potássio. Além disso, glutamato também exibe um efeito inibitório da entrada de cBeet120 nas células, devido à competição com nossa sonda pelo transportador EAAT, que permite a entrada de glutamato/aspartato com a saída de potássio. A adição do inibidor *trans*-2,4-PDC, responsável pela inibição de transportadores de glutamato, também inibe a entrada de sonda. Isso significa que os efeitos observados pela entrada de cBeet120 em U87-MG é feita por competição em transportadores de glutamato/aspartato, e desbalanços nos níveis de potássio e cálcio causam efeitos indiretos.¹³⁶ A utilização de nigericina (inibidor do ionóforo K^+/H^+) causa um efeito negativo na entrada de cBeet120, o que também está de acordo com os dados obtidos neste item.

A internalização celular de cBeet120 também foi observada após incubação com aspartato. Entretanto, presença deste aminoácido inibiu em 64% a entrada de sonda na célula. GABA e α -cetoglutarato foram também foram testados como controles e realmente não influenciam no transporte da sonda. O transporte de íons sódio e potássio são dependentes, entretanto, modelos que explicam a regulação e a relação destes canais com os canais de cálcio em astrócitos ainda não são totalmente estabelecidos.¹³⁷ O aumento de íons potássio no meio extracelular pode regular o funcionamento de transportadores Ca^{2+} -ATPase, aumentando sua concentração intracelular em astrócitos.^{135,137} Em células da glia, em geral, e mais especificamente em astrócitos, o glutamato é o principal aminoácido excitatório e desencadeia suas funções através da ativação de receptores de membrana específicos.^{136,137} O processo de captação do glutamato desencadeia uma série de cascatas bioquímicas complexas que modificam a fisiologia das células da glia a imediato, a curto e a longo prazo de modo a serem

capazes de absorver, transformar e libertar estes aminoácidos numa quantidade regulada e em um período de tempo apropriado para sustentar a neurotransmissão glutamatérgica.^{135,137} Entre as cascatas de sinalização ativadas em células da glia por transportadores de glutamato, estão o aumento intracelular de Na^+ e Ca^{2+} , aumento extracelular de K^+ , modificações pós-traducionais de proteínas e regulação da expressão de genes nos níveis de transcrição e tradução.

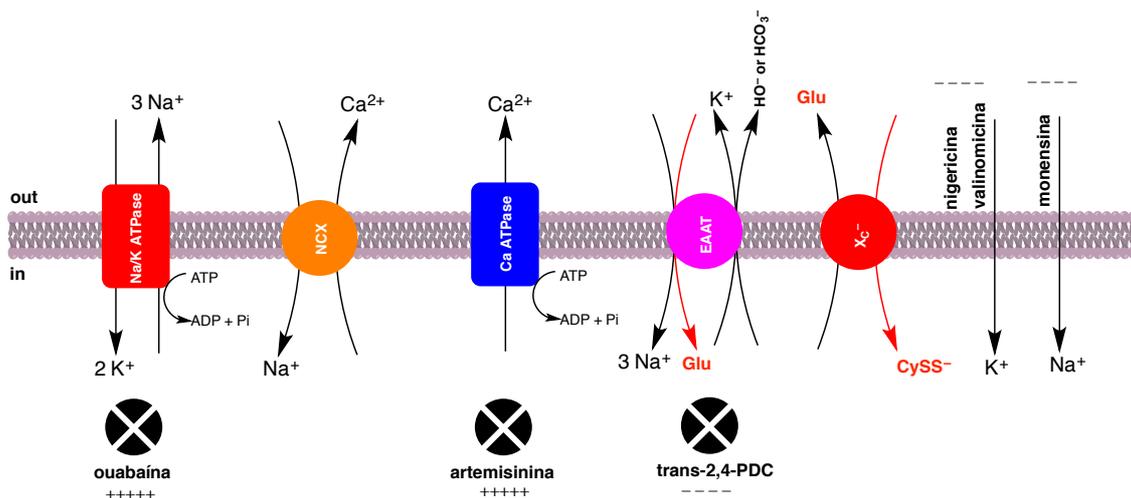


Figura 39 Esquema simplificado do mecanismo de internalização de cBeet120 em U87-MG; As setas vermelhas indicam as possíveis vias de entrada da sonda; CySS: cistina.

3.4.3 Ensaios de inibição

Sabendo que cBeet120 é transportada para dentro da célula ativamente, foi iniciado um estudo para determinar quais transportadores estariam envolvidos nesse mecanismo. Começamos testando inibidores de ionóforos comuns para o tipo de célula estudado e fazendo uma varredura de concentrações para entender o comportamento da entrada de cBeet120 frente à inibição destes canais. Foram testados monensina (inibidor de ionóforos de sódio), valinomicina (inibidor de ionóforos de potássio), nigericina (inibidor de K^+/H^+ -ATPase), ouabaína (inibidor não seletivo de ionóforos de sódio e potássio) e artemisinina (inibidor de Ca^{2+} -ATPase). Entretanto, para verificar a possibilidade de interação da sonda com os inibidores usados, foram realizadas cinéticas para acompanhar a emissão de fluorescência da sonda em sua presença. Os espectros das cinéticas de decaimento para cada composto testado e suas respectivas constantes são apresentadas na Figura 40. Como é possível observar, não há mudança significativa das constantes de decaimento. Desta forma, os efeitos sobre a emissão de fluorescência da sonda observada nos experimentos de inibição são reais e não por alguma interação

entre a sonda e os inibidores. O comportamento da adição de inibidor *versus* entrada de cBeet120 na célula é mostrado na Figura 41.

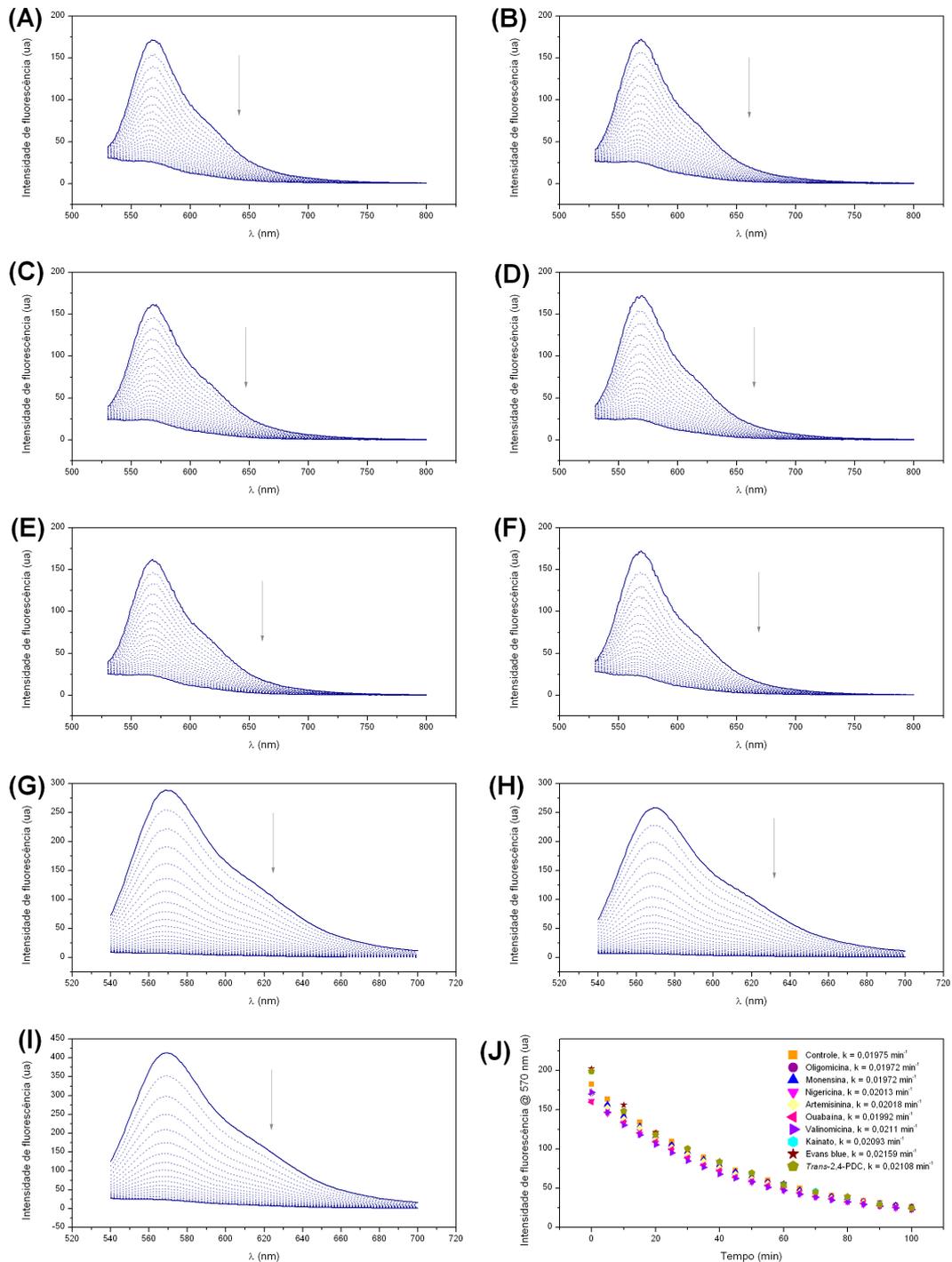


Figura 40 Cinéticas de emissão de fluorescência de cBeet120 em PBS e na presença de (A) $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de oligomicina, (B) $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de monensina, (C) $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de nigericina, (D) $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de artemisinina, (E) $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ouabaina, (F) $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de valinomicina, (G) $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de kainato, (H) $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de evans blue e (I) $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de *trans*-2,4-PDC. A emissão de fluorescência foi acompanhada em 570 nm ($\lambda_{\text{EX}} = 510 \text{ nm}$) e sua curva de decaimento e respectivas constantes cinéticas são apresentadas em (J).

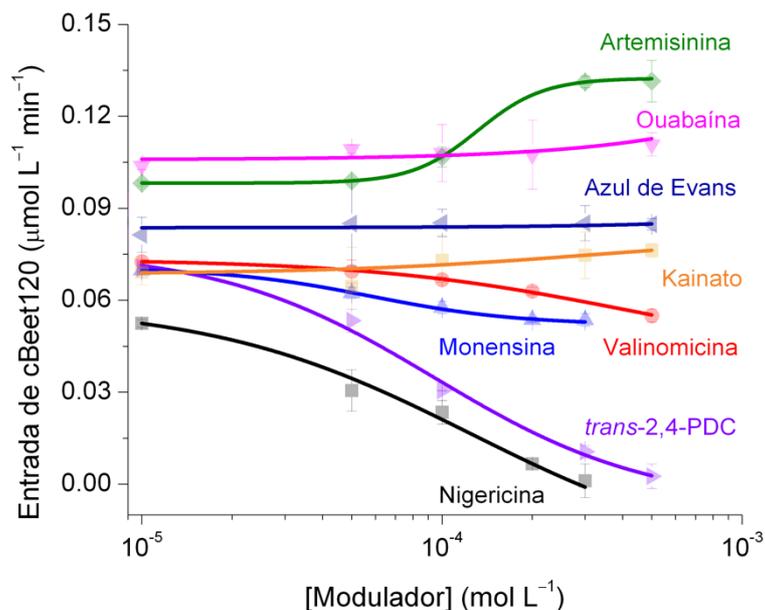


Figura 41 Efeito dos inibidores sobre a entrada de cBeet120 em células U87-MG.

As células foram incubadas com os inibidores em meio RPMI a 37 °C e 5% de CO_{2(g)} sempre nos 30 minutos anteriores à incubação das células com cBeet120 (100 µmol L⁻¹). A Figura 41 mostra que monensina e valinomicina são capazes de diminuir sutilmente a entrada da sonda nas células. A semelhança deste efeito para os inibidores de canais de sódio e potássio era esperada devido ao acoplamento existente destes transportadores que formam a bomba Na⁺/K⁺. Esta bomba atua como um *antiporter* que joga 3 íons sódio para o meio extracelular com a entrada de 2 íons potássio e o consumo de um ATP. Nigericina também é capaz de inibir a entrada de cBeet120 nas células, mas com uma eficiência muito maior (98,6%). Este dado reafirma que a entrada da sonda é dependente de ionóforo de K⁺/H⁺, com gasto de energia. Contudo, Figura 41 que mostra a ação de ouabaína não parece ter efeito expressivo sobre a entrada de cBeet120. Surpreendentemente, a inibição de Ca²⁺-ATPase provoca um aumento na entrada de cBeet120 nas células (53,9%). Assim como realizado nos ensaios de competição, também foram feitas as microscopias de U87-MG na presença de 300 µmol L⁻¹ de nigericina, 500 µmol L⁻¹ de artemisinina, 500 µmol L⁻¹ de valinomicina e 500 mmol L⁻¹ de monensina. Na Figura 43 pode-se observar que as imagens de microscopia corroboram com os resultados obtidos pelo ensaio de inibição.

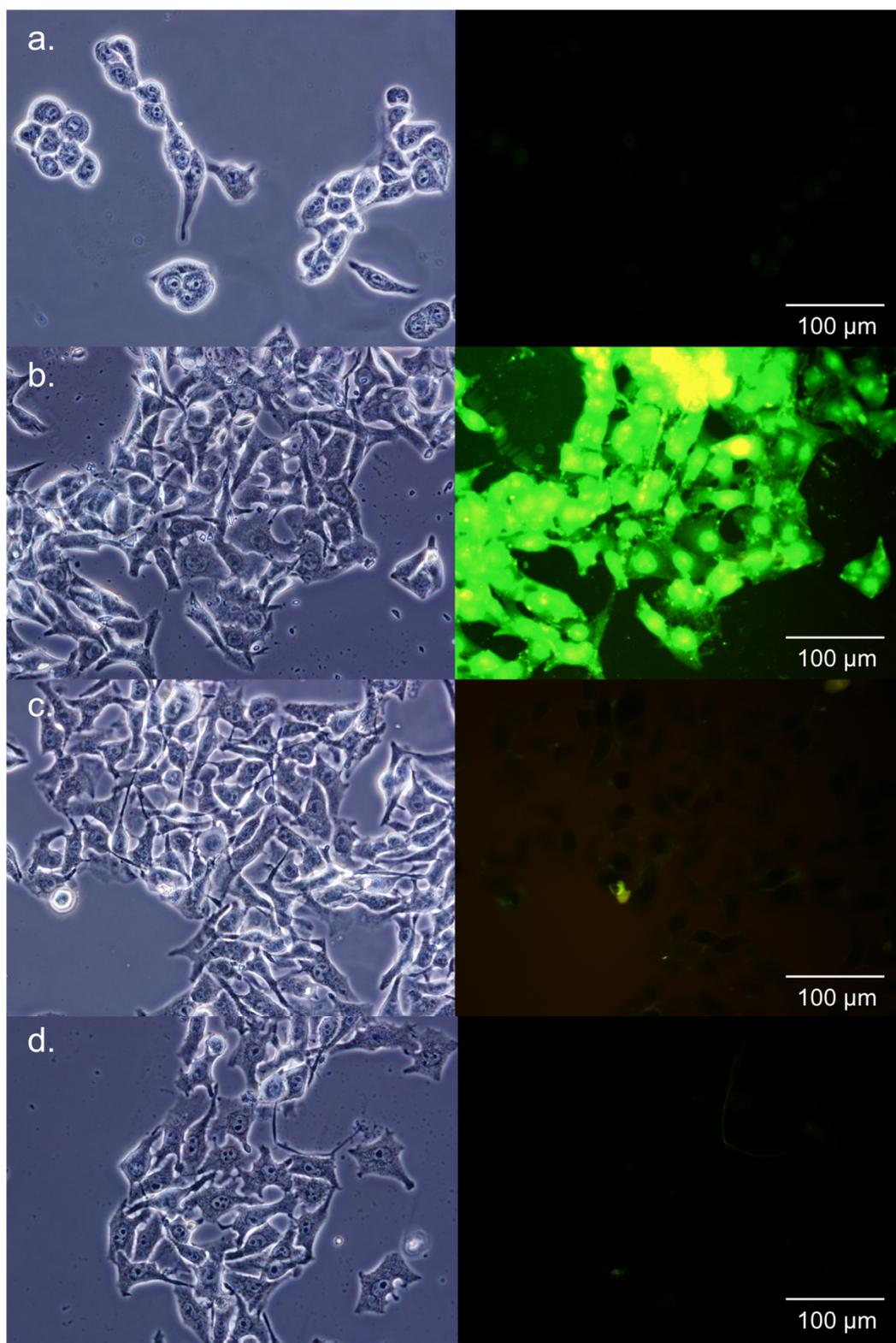


Figura 42 Microscopias de fluorescência de células incubadas com $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ cBeet120 por 3 minutos na presença de (a) $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ nigericina, (b) $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ artemisinina, (c) $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ valinomicina e (d) 500mmol L^{-1} monensina, sempre nas mesmas condições de aquisição de imagem. (A imagem (b) é apresentada saturada com o propósito de evidenciar o aumento da fluorescência na presença de artemisinina em comparação aos outros inibidores, utilizando sempre o mesmo tempo de exposição para aquisição de imagem).

O completo entendimento sobre a relação entre estes efeitos só foi possível estudando estes resultados em conjunto com os dados obtidos por ensaios de competição, conforme foi proposto na Figura 39. Em astrócitos, a bomba Na^+/K^+ atua fazendo uma troca de 3 íons de sódio por 2 íons de potássio com a quebra de uma molécula de ATP, assim como em qualquer outro modelo celular.¹³⁵ Entretanto, neste tipo de células, o acúmulo de potássio extracelular regula o ionóforo Ca^{2+} -ATPase, que eleva os níveis de cálcio no interior da célula. O cálcio, por sua vez, é responsável pela regulação da liberação de glutamato, quando em altos níveis intracelulares.^{136,137}

Existem diversos tipos de transportadores de glutamato e as células neuronais e de suporte saudáveis possuem um número imenso deste tipo de transportador. Contudo, células de glioblastoma excretam mais glutamato que sua versão saudável, e evidências sugerem que essa liberação excessiva de glutamato tem um papel central na sua proliferação e invasão, tornando-a uma doença maligna. Glioblastomas que possuem liberação de glutamato aumentada tem uma vantagem extra matando neurônios e se expandindo livremente pelo cérebro. Além disso, o próprio glutamato pode estimular o crescimento do tumor e sua migração por uma via autócrina ou parácrina. Resumidamente, a presença de receptores de glutamato é essencial à sobrevivência de gliomas.^{135,137-139}

De modo geral, os transportadores de glutamato em células da glia podem ser divididos em duas classes, os *Excitatory Amino Acid Transportes* (EAATs) e os *Vesicular Glutamate Transporters* (VGLUTs), os quais possuem mecanismos de transportes diferentes. Como mostram os dados obtidos nos ensaios de competição, a presença de aspartato inibe a entrada de cBeet120 nas células. Como já discutido, isso já indica que o transportador de glutamato envolvido na internalização da sonda também é sensível à aspartato. Para classificar o transportador do qual estamos falando, foi necessário realizar um novo ensaio de inibição, mas agora com inibidores específicos para cada classe de transportador: EEAT ou VGLUT. Para tal, foram testados nas mesmas condições que os experimentos anteriores os compostos Evans Blue e *trans*-2,4-PDC, inibidores de VGLUT e EEAT, respectivamente. A Figura 43 mostra que, enquanto Evans Blue não tem nenhum efeito sobre a entrada de cBeet120, *trans*-2,4-PDC inibe a entrada da betalaína em 99,7%, ou seja, totalmente.

Tabela 2 Transportadores de glutamato (Sigma-Aldrich).

Nome atual	EAAT1	EAAT2	EAAT3	EAAT4	EAAT5	VGLUT1	VGLUT2	VGLUT3
Nome alternativo	GLAST	GLT-1	EAAC1	-	-	BNPI	DNPI	-
Informação estrutural	542 aa	547 aa	525 aa	564 aa	561 aa	560	582 aa	589 aa
Inibidores de uptake	Trans-2,4-PDC	Trans-2,4-PDC Diidroquinato Kainato T3MG TBOA TFB-TBOA Trans-2,3-PDC WAY-855	Trans-2,4-PDC	Trans-2,4-PDC	Trans-2,4-PDC	Evans Blue 4-metil-glutamato Trans-ACPD QDC Desacopladores	Evans Blue 4-metil-glutamato Trans-ACPD QDC Desacopladores	4-metil-glutamato Trans-ACPD QDC Desacopladores
Substratos	L-Glu/D-Asp	L-Glu/D-Asp	L-Glu/D-Asp	L-Glu/D-Asp	L-Glu/D-Asp	L-Glu	L-Glu	L-Glu
Tecido de expressão	Cérebro Astroglia	Cérebro Astroglia	Cérebro Neurônios Rins	Cerebelo Neurônios	Retina	Cérebro Vias glutamatérgicas	Cérebro Vias glutamatérgicas	Cérebro Vias não glutamatérgicas
Função fisiológica	Controle [Glu] _{extracelular}	Controle [Glu] _{extracelular}	desconhecido	Controle [Glu] _{extracelular}	Controle [Glu] _{extracelular}	Saída de Glu	Saída de Glu	desconhecido
Doença relacionada	Alzheimer Esclerose lateral amiotrófica	Alzheimer Esclerose lateral amiotrófica Epilepsia	Esquizofrenia Transtorno bipolar	Transtorno bipolar Transtorno depressivo Canavan	Retinopatia	Esquizofrenia	desconhecido	desconhecido

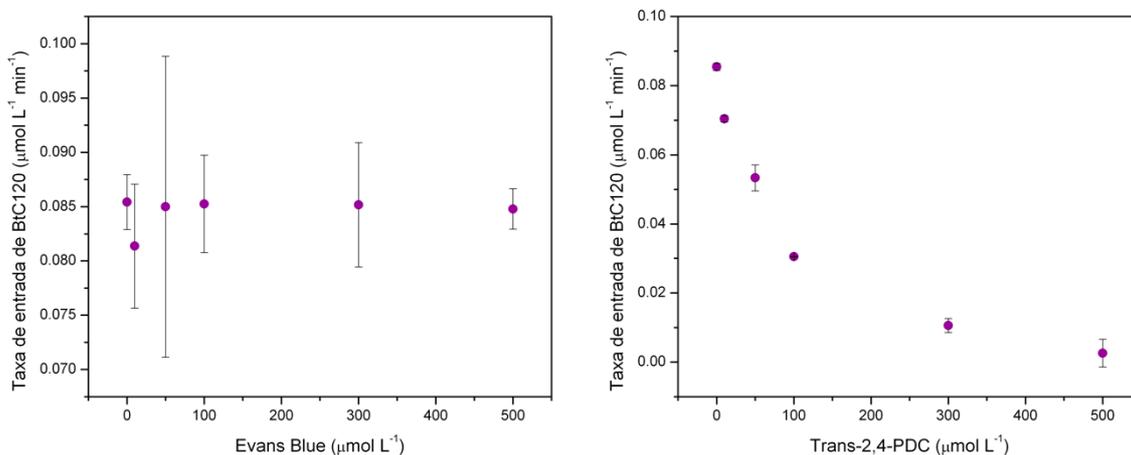


Figura 43 Efeito de inibidores do transporte de glutamato na entrada de cBeet120.

O dado acima está associado aos efeitos da presença de glutamato e aspartato reforçam que a entrada de cBeet120 ocorre via EEAT, entretanto a subclasse cujo este transportador permanece desconhecida. A função geral dos EAATs é regular as concentrações de glutamato extracelular e manter baixos seus níveis para evitar excitotoxicidade causada pela superestimulação dos receptores deste aminoácido. Neste transportador, o *uptake* de glutamato é acoplado à entrada de 3 íons sódio e um próton e à saída de um íon potássio, e essa estequiometria resulta em um total de duas cargas positivas entrando na célula para cada molécula de glutamato transportada. Esse transportador funciona contra o gradiente de sódio e potássio, promovendo a hidrólise de um ATP pela bomba Na⁺/K⁺-ATPase, cujos níveis de potássio são regulam a concentração intracelular de cálcio pela Ca²⁺-ATPase. Interações físicas e funcionais

entra EAATs e ATPase têm sido descritas, bem como um possível acoplamento metabólico.

3.4.4 Acúmulo de cBeet120 no núcleo de células U87-MG

cBeet120 possui pK_{as} e pK_{aH} aproximados já estabelecidos pelo grupo (Figura 44) e está sujeito à estados de protonação diferentes. Além disso, como todas as betalainas que estudamos, cBeet120 está sujeita a hidrólise em meios mais alcalinos e à degradação em meios mais ácidos.

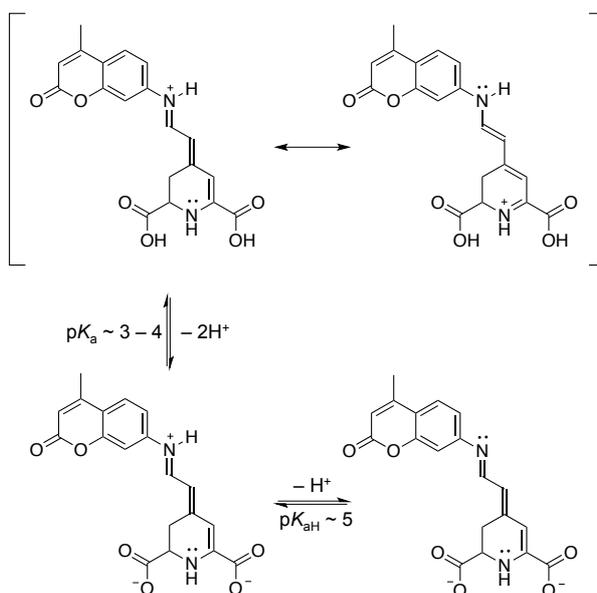


Figura 44 Estrutura de cBeet120 e seus pK_{as} aproximados.⁵⁴

Para determinar o efeito do pH extracelular no transporte de cBeet120 para o interior da célula, foi necessário encontrar um intervalo no qual as células sofressem o mínimo possível, mas também no qual a sonda estivesse estável. Desta forma, o experimento foi realizado entre os pHs 4,5 e 7,5, sempre em tampão PBS ajustado, para não causar qualquer interferência devido à presença de outros sais. A Figura 45 mostra que apesar do estado de protonação e conseqüente carga líquida de cBeet120, não há efeito expressivo do pH extracelular.

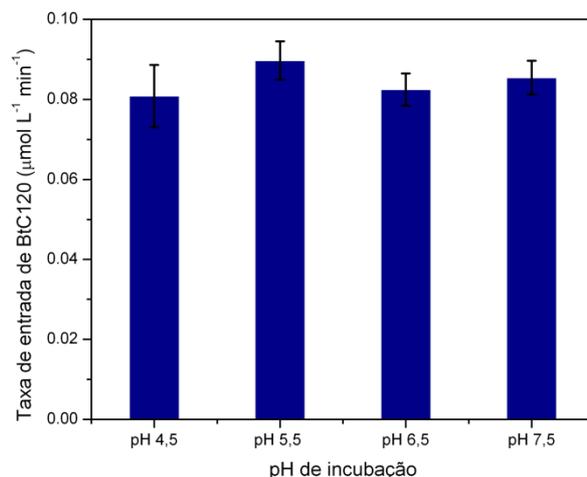


Figura 45 Efeito do pH sobre a entrada de cBeet120.

Como controle para verificar o efeito dos pK_a s de cBeet120 no acúmulo de células U87-MG, foi semissintetizada uma nova betalaína artificial derivada do acoplamento de HBt com uma aminocumarina etilada (c450), a qual denominamos cBeet450 (Figura 47). Sua semissíntese foi realizada em acetato de etila acidificado com *p*-TsOH e sua purificação foi realizada da mesma forma que para cBeet120, em cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 em condições *flash* e com água como eluente. A porção rosa-alaranjada foi recolhida e submetida à espectroscopia de absorção e fluorescência, conforme mostra a Figura 46.

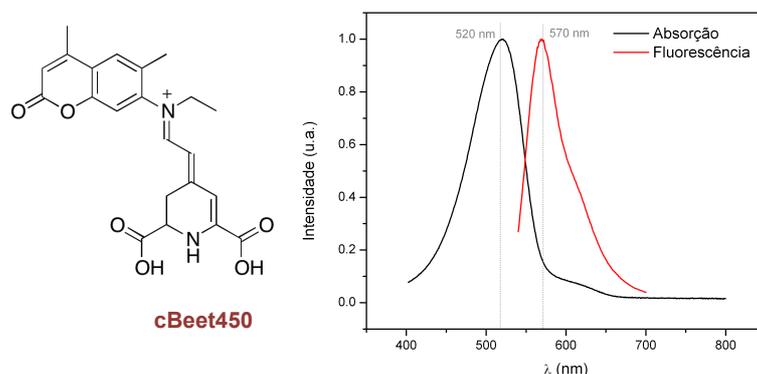


Figura 46 Estrutura da cBeet450 e seus respectivos espectros de absorção (linha preta) e emissão de fluorescência (linha vermelha, $\lambda_{EX} = 510$ nm) em água.

A utilização de cBeet450 como controle surgiu da necessidade de entender o efeito da possibilidade de protonação da imina da estrutura da cBeet120, que na nova molécula utilizada está protegida pela etila. Desta forma, cBeet450 serve como controle para o estudo deste do efeito do pH sobre moléculas cBeet e como se dá sua interação

com proteínas. Para a avaliação deste efeito, foi feita a microscopia confocal de fluorescência de cBeet450 exatamente nas mesmas condições que para cBeet120, e a Figura 47 mostra uma comparação entre as imagens obtidas por ambos.

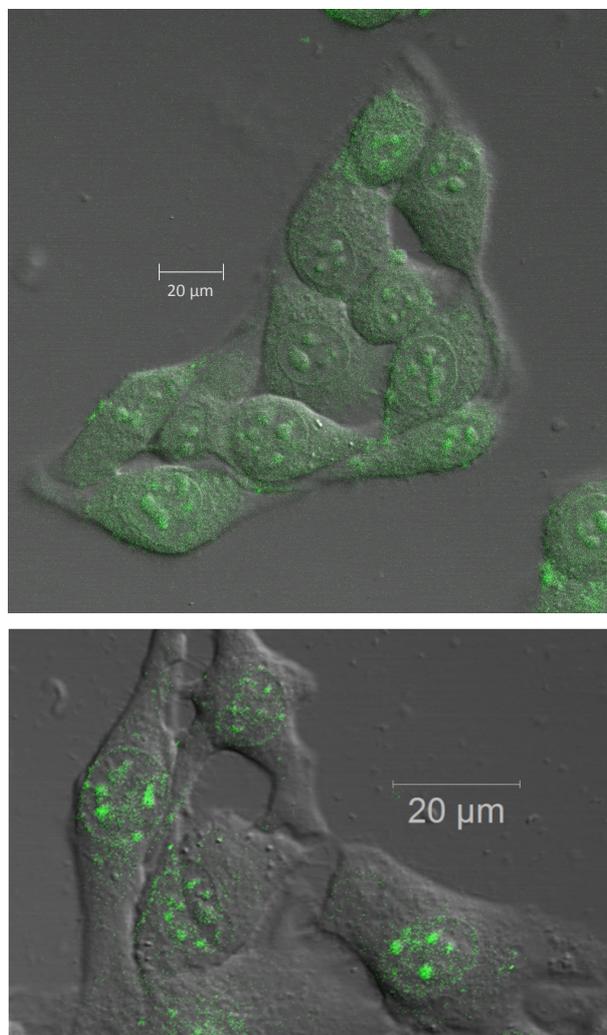


Figura 47 Microscopia confocal de células de U87-MG vivas após incubação por 3 min com $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ cBeet450 em tampão PBS *versus* cBeet120, nas mesmas condições.

Pode-se observar na Figura 47 que, apesar de possuir uma marcação nuclear assim como para cBeet120, mas em contrapartida possui também uma marcação citosólica difusa muito mais expressiva. Desta forma, como os dados parecem sugerir que o estado de protonação da sonda cBeet120 não está relacionado com o seu acúmulo no núcleo, passamos a investigar interações intermoleculares que pudessem explicar essa observação experimental.

3.5 Identificação das estruturas nucleares marcadas

3.5.1 Interação de cBeet120 com componentes nucleares

Quando a membrana celular está danificada, cBeet120 permeia livremente a célula e a marca completamente. Dados do grupo (Rodrigues, A. C. B., 2016) mostraram que cBeet120 é capaz de interagir com BSA, e esta interação é dependente do pH do meio e do ponto isoelétrico (pI) da proteína. Visto que proteínas são os principais e mais abundantes componentes celulares e que cBeet120 pode interagir com elas, foi investigada a interação deste pigmento com as próprias proteínas das células U87-MG.

3.5.1.1 Interação de cBeet120 com proteínas

Como vemos que cBeet120 acumula no núcleo de células vivas, foi feita a extração de proteínas celulares de U87-MG de forma diferencial, *i.e.*, foram preparados extratos de proteínas totais, enriquecido de proteínas citoplasmáticas solúveis e enriquecido de proteínas ligadas ao DNA, respectivamente.

Tanto a dupla-fita de DNA como o RNA tem cargas negativas; portanto, as proteínas ligadas ao material genético que dão origem ao nucleossomo possuem carga positiva, o que faz sentido considerando que no pH nuclear (em torno de 7,3, quando $\text{pH}_{\text{extracelular}} = 7,4$) cBeet120 está desprotonada e, portanto, carregada negativamente (Figura 44). Para isolar as proteínas citosólicas solúveis das proteínas nucleares, foi feita uma extração diferencial com tampão de extração. Já para a obtenção das proteínas nucleares, os núcleos de U87-MG foram primeiramente isolados, como mostra a Figura 48.

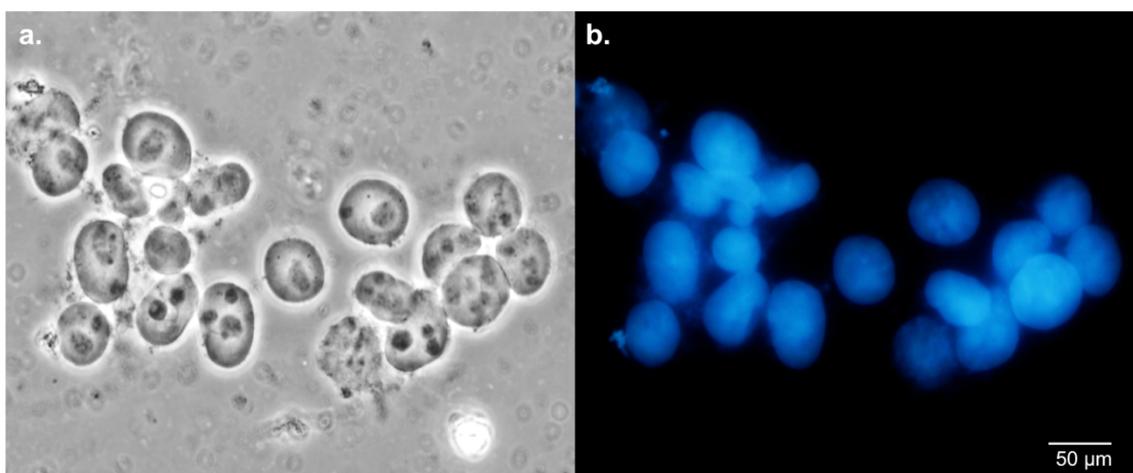


Figura 48 Núcleos isolados de U87-MG marcados com DAPI.

Com a obtenção dos núcleos isolados de U87-MG, foi feita a lise da membrana nuclear e extração das proteínas ligadas ao DNA. A partir dos extratos de proteínas totais, proteínas solúveis e extrato enriquecido de proteínas ligadas ao DNA, foi feito um SDS-PAGE no qual e posterior Western Blot para observação do perfil de proteínas separadas por tamanho e carga e transferidas para a membrana, como mostra a Figura 48.

Para provar que cada banda é correspondente à fração certa, foi feito um Western Blot dos mesmos extratos na presença de anticorpos específicos de citoplasma e de núcleo. Para confirmar o extrato enriquecido de proteínas citosólicas, foi utilizado o anticorpo contra a GAPDH, uma enzima de ~37 KDa que cataliza o sexto passo da glicólise, enquanto que para confirmar o extrato enriquecido de proteínas ligadas ao DNA, foi utilizado um anticorpo contra uma proteína componente do nucleossomo de peso molecular em torno de 17 KDa e denominada Histona-H3 (Figura 48).

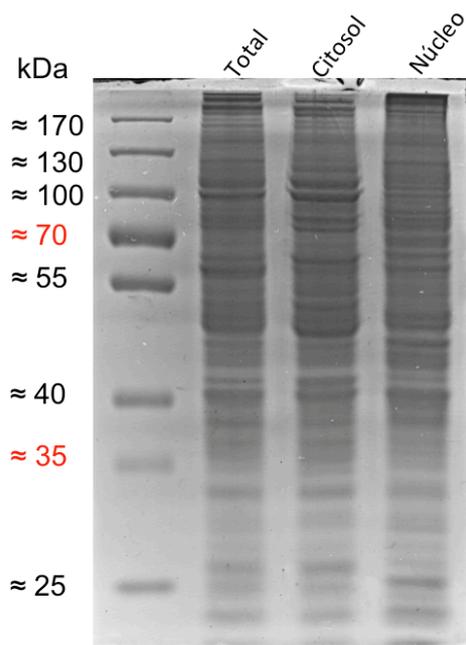


Figura 49 Perfil de proteínas totais, solúveis e ligadas ao núcleo (U87-MG), respectivamente.

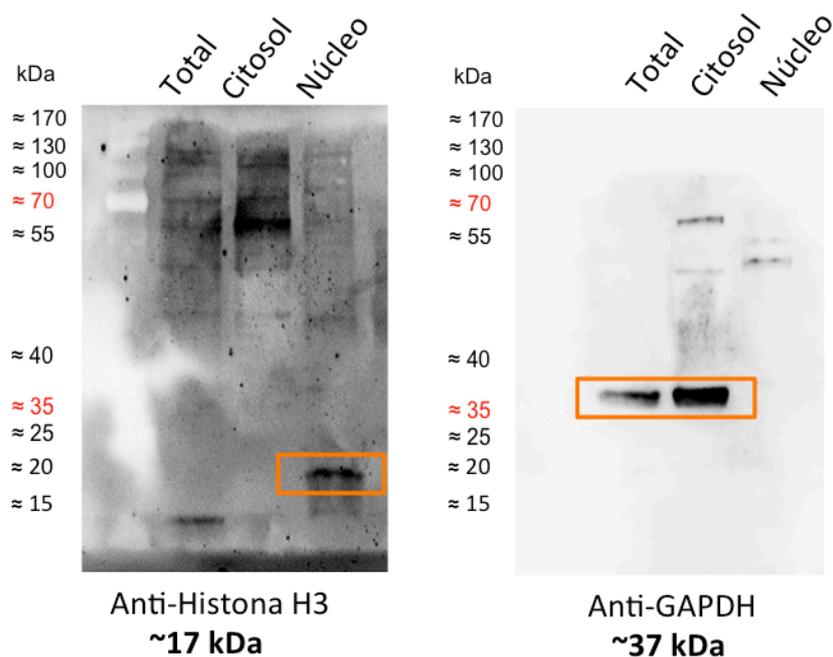


Figura 50 Marcação das membranas de nitrocelulose contendo os extratos diferenciados de proteínas de U87-MG marcados com os anticorpos anti-H3 e anti-GAPDH.

Como esperado, o anticorpo citoplasmático (anti-GAPDH), marca tanto no extrato de citosol como no total, mas não no de núcleo. Já o anticorpo nuclear (anti-H3), marca somente no extrato de núcleo. Embora fosse esperado que ele também marcasse o extrato total, sua marcação não é evidente devido à sua baixa concentração no extrato de proteínas totais. Uma nova membrana foi então incubada durante 3 minutos com cBeet120 ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS) e lavadas três vezes com PBS, assim como no experimento de microscopia, e a imagem adquirida pelo fotodocumentador é apresentada a seguir (Figura 50).

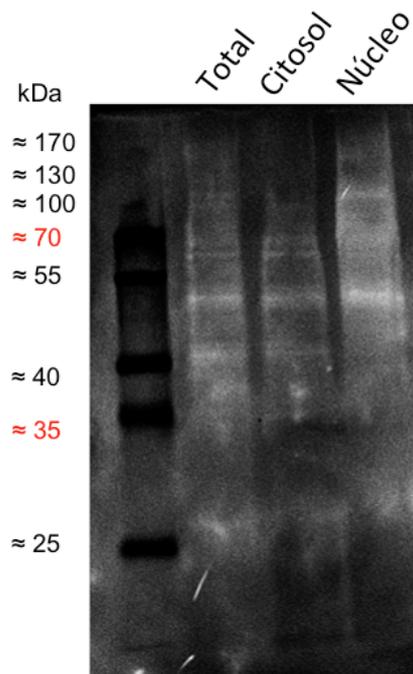


Figura 51 Membrana de nitrocelulose com extratos de proteína de U87-MG após incubação da membrana com cBeet120.

Embora seja possível ver uma marcação mais intensa na banda de extrato enriquecido de proteínas do núcleo, cBeet120 parece marcar uma grande parte de proteínas presentes na célula. Entretanto, é possível reparar que cBeet120 não interage exatamente com todas as bandas presentes na Figura 50, mostrando que talvez a interação com as proteínas tenha algum padrão.

Dados recentes de nosso grupo indicam que o rendimento quântico de fluorescência de cBeet120 tem um aumento de dez vezes em $\text{pH} = 3$ (Rodrigues, A. C. B., 2016). Uma possível explicação pode se dar pelo pK_a da albumina que é em torno de 8,5, e em $\text{pH} = 3$ esta proteína deve estar totalmente protonada enquanto metade das espécies de cBeet120 já possuem suas carboxilas desprotonadas, podem sofrer interação eletrostática e interagir mais fortemente. Devido a isso, foram escolhidas proteínas com cargas positivas e negativas em determinados pHs para estudar o comportamento da sonda de acordo com as características do meio. Foram testadas pepsina ($\text{pI} = 2,2 - 2,8$), histona tipo 2A ($\text{pI} \sim 10,8$), polilisina ($\text{pI} \sim 9,59$) e protamina ($\text{pI} \sim 13,8$) em pHs = 3, 5 e 7, em cinco concentrações diferentes de espécies citadas e concentração fixa de cBeet120.¹⁴⁰⁻¹⁴³ Além disso, a força iônica do sistema foi mantida constante em todas as concentrações testadas. O objetivo desse experimento foi identificar uma possível

variação da intensidade de fluorescência de cBeet120 em determinados estados de protonação de cBeet120, mantendo a carga das espécies constantes (Tabela 3).

Tabela 3 Pontos isoelétricos e cargas das proteínas em cada pH estudado.¹⁴⁰⁻¹⁴⁴

	pI	Carga total da proteína		
		pH = 3	pH = 5	pH = 7
Pepsina	1,0	-	-	-
Histona - 2A	10,8	+	+	+
Poli Lisina	9,59	+	+	+
Protamina	13,8	+	+	+

A pepsina não afeta a emissão de fluorescência de cBeet120, provavelmente devido à sua acidez (Figura 52). Entretanto, vemos que para concentrações maiores de histona há uma tendência do aumento e em seguida de supressão da emissão de fluorescência de cBeet120 em pH 5 e 7, mesmo que muito sutil (Figura 52), entretanto, em pH 3 não parece haver efeito expressivo. Apesar do polímero poli lisina ser igualmente básico, vemos um comportamento diferenciado, onde vemos apenas uma dispersão de pontos. Além disso, poli lisina não é muito solúvel em pH 7, o que também pode ser observado na figura a seguir. No caso da protamina, nenhum efeito parece ser observado em pH 3, mas em pH 5 e 7 parece haver um aumento da intensidade de fluorescência de acordo com a quantidade de proteína, que pode ser utilizada em maior quantidade em relação às outras espécies estudadas.

Os efeitos sutis observados na Figura 52 e na Figura 53 foram causados devido à baixa quantidade de equivalentes testados. Essa dificuldade técnica surgiu da indisponibilidade de reagentes em escala suficiente para superar a quantidade de cBeet120, que por sua vez não poderia ser menor que $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para que pudéssemos observar emissão de fluorescência. No meio celular, devido à compartimentalização e ao tamanho reduzido das estruturas, espera-se um acúmulo muito maior de proteínas em relação à quantidade de cBeet120 que pode ser internalizada e que acumula nos núcleos. A retenção da sonda numa área tão pequena pode ser, inclusive, um dos fatores que permitem que a sonda seja visualizada na célula, apesar de seu baixo rendimento

quântico de fluorescência. Ainda, em pH 3 cBeet120 não é muito estável, o que também favorecia a diminuição da intensidade de fluorescência observada.

Para entender melhor esses resultados, também foram feitas cinéticas de decaimento de cBeet120 na ausência e presença das proteínas nos três tampões. Os gráficos de intensidade de fluorescência *versus* tempo foram ajustados com uma função de decaimento exponencial de segunda ordem e suas constantes comparadas (Figura 54). Imediatamente não há efeito expressivo no perfil de decaimento de cBeet120, entretanto, polilisina parece ter efeito estabilizante de cBeet120 em todos os pHs, mas principalmente em pH 3.

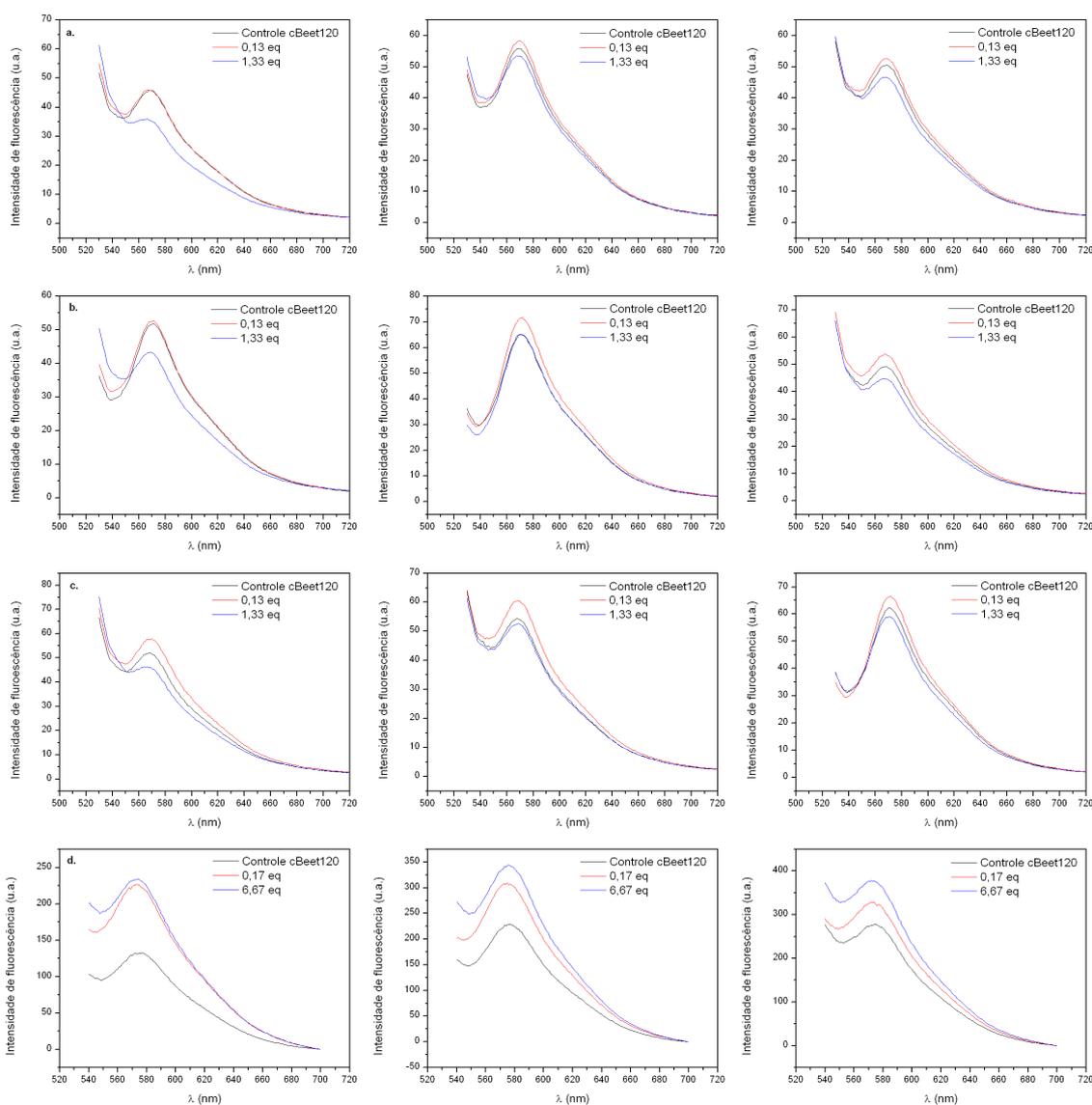


Figura 52 Acompanhamento do perfil de emissão de fluorescência de cBeet120 na ausência e na presença da quantidade mínima e máxima de espécie testadas (a) pepsina, (b) histona, (c) polilisina e (d) protamina em pH 3, 5 e 7, respectivamente.

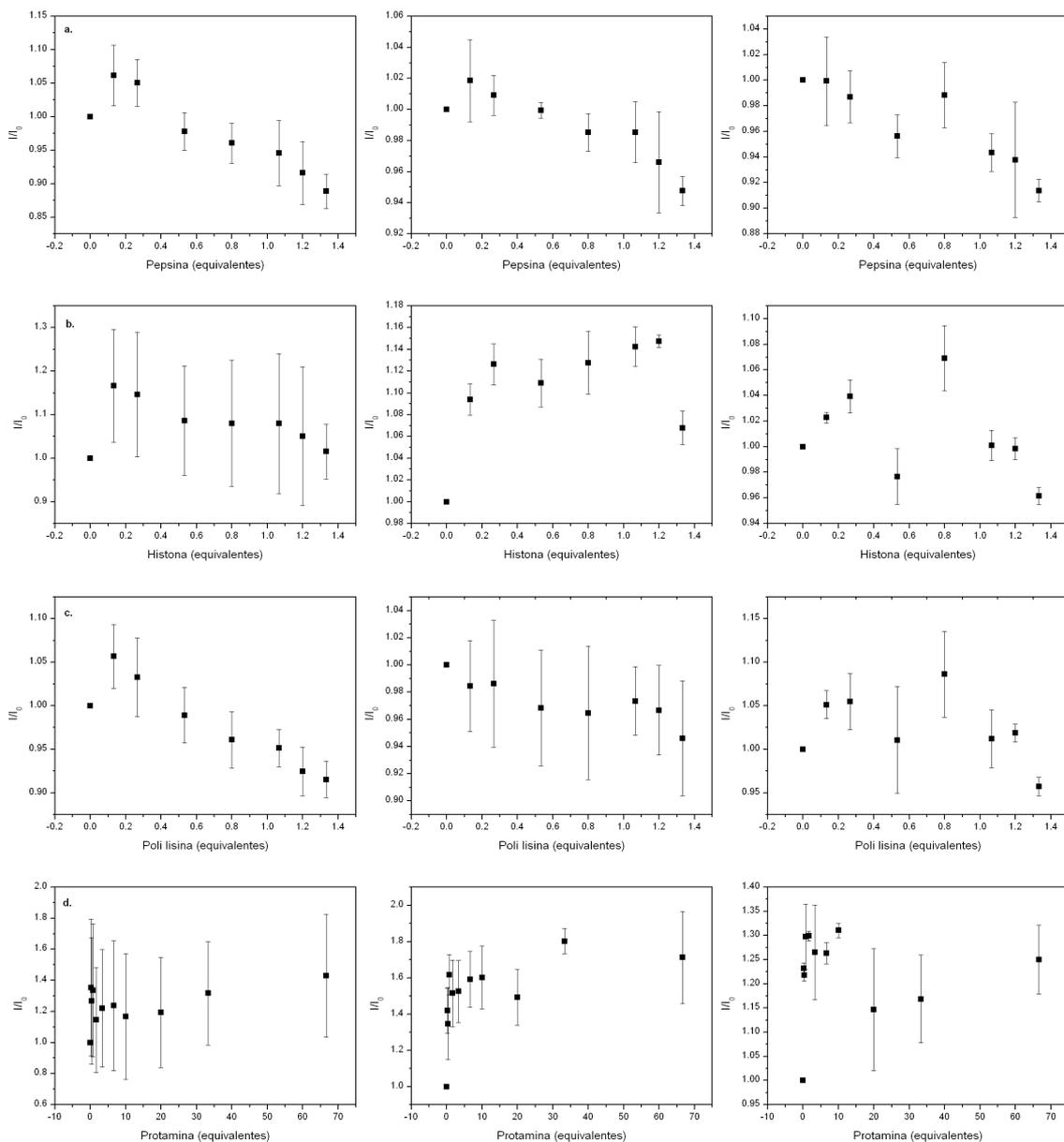


Figura 53 Comportamento da emissão de fluorescência de cBeet120 na presença das proteínas/poli lisina em cada pH estudado (3, 5 e 7, respectivamente).

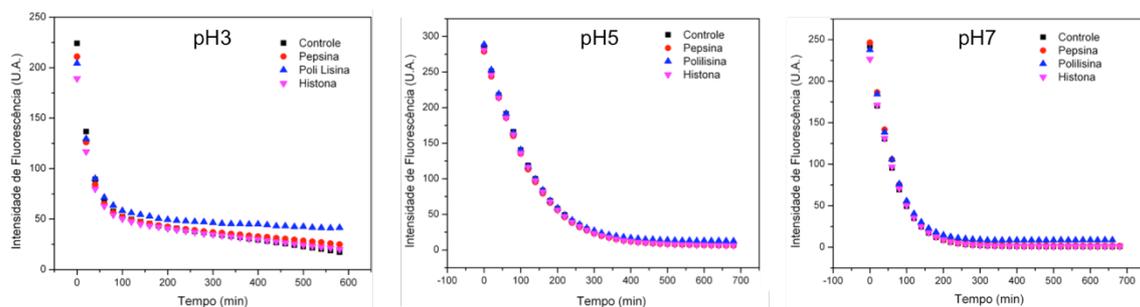


Figura 54 Decaimentos do controle, pepsina, poli-lisina e histona nos pHs 3,5 e 7, respectivamente.

Na Figura 54, observa-se que em pH 5 e 7 não há diferença significativa entre as constantes de decaimento observadas (k_{obs}) entre cBeet120 na ausência e presença de pepsina, poli lisina e histona. Entretanto, pode ser observado que, de modo geral, a cinética de decaimento de cBeet120 em pH 5 é mais lenta que em pH 7. Este dado faz sentido considerando que pH 5 é justamente o pH no qual cBeet120 se encontra mais estável. Já o comportamento observado em pH 3 por ser explicado pelo favorecimento da hidrólise da betalaína. Vemos que os valores de k_{obs} tendem a ser maiores na ausência de poli lisina, propondo que este poliaminoácido possa estabilizar de alguma forma cBeet120 frente ao papel do íon fosfato na assistência nucleofílica de sua hidrólise.

3.5.1.2 Interação de cBeet120 com DNA e RNA

Apesar de nossa hipótese envolver a interação de cBeet120 com proteínas, devido ao padrão de marcação, o mesmo estudo retratado no item anterior foi feito com DNA e RNA em pHs 3, 5 e 7 (Figura 55).

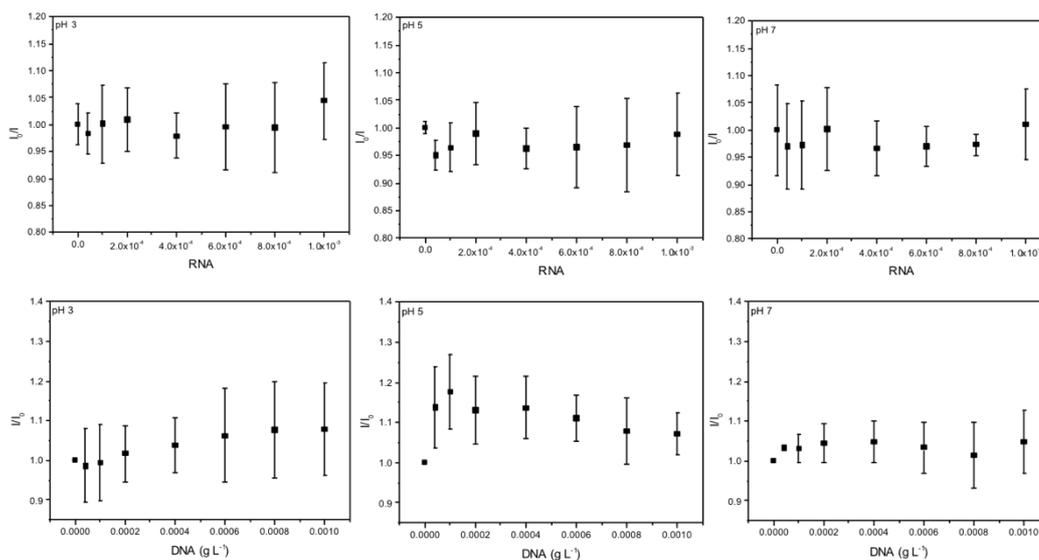


Figura 55 Comportamento da emissão de fluorescência de cBeet120 na presença de RNA e DNA em cada pH estudado (3, 5 e 7, respectivamente).

Neste experimento foi enfrentado o mesmo problema que o retratado no item anterior. Devido à impossibilidade de obter quantidades muito altas de DNA e RNA, não foi possível realizar o experimento com concentrações de material genético muito superior à quantidade de cBeet120. Desta forma é inconclusivo se existe algum efeito destas moléculas com cBeet120, já que no ambiente celular a proporção de DNA/RNA

deve ser muito superior à quantidade de sonda interiorizada. Quando tratadas com RNase ou DNase (Figura 56 e Figura 57), a marcação de cBeet120 não pode ser mais observada como aquela vista anteriormente na Figura 23.

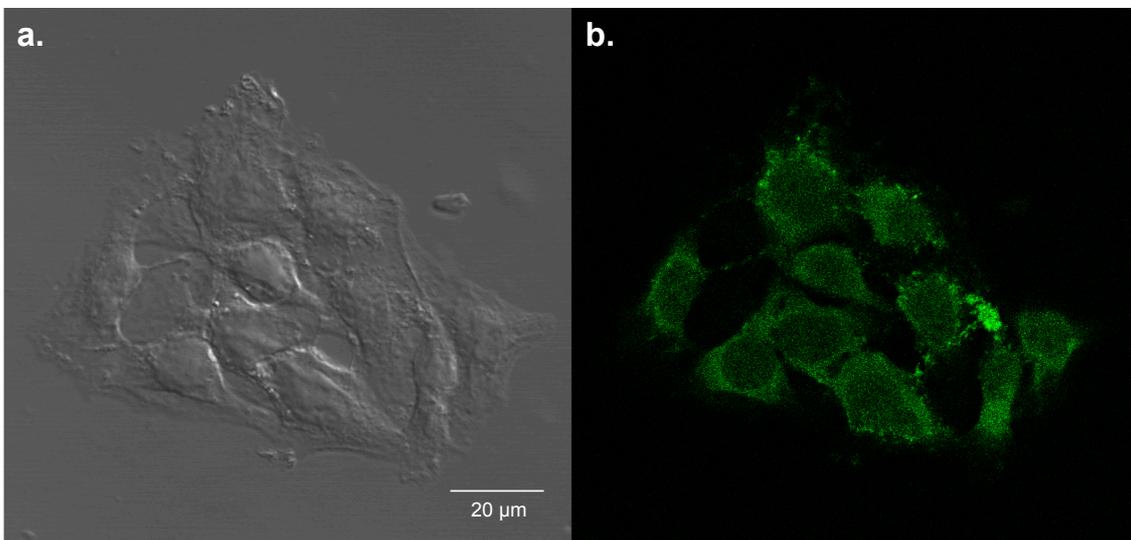


Figura 56 Células incubadas com cBeet120, fixadas com 3,7% PFA e incubadas com DNase ($100 \mu\text{g L}^{-1}$, 10 min).

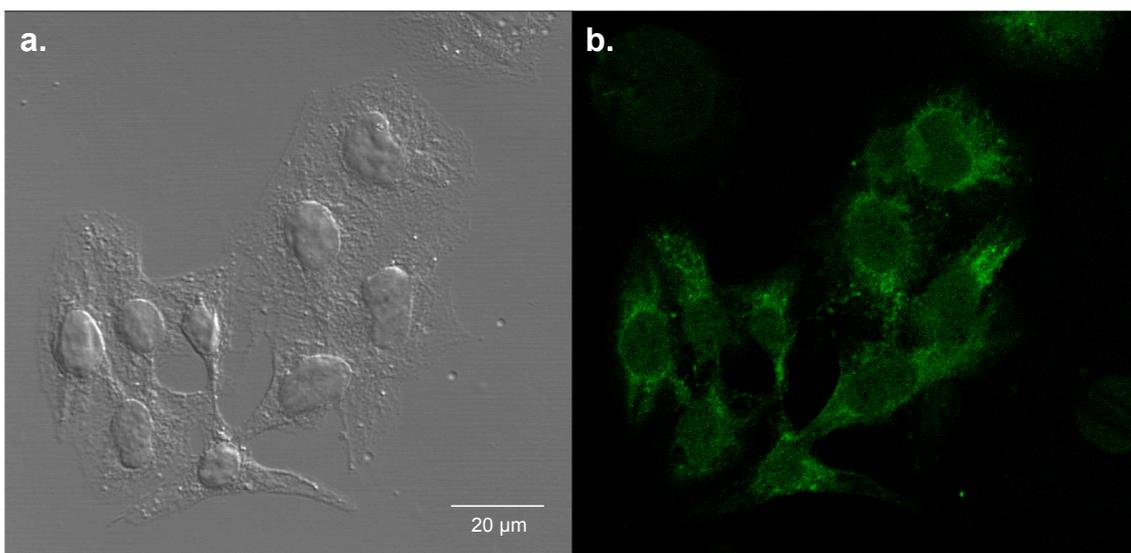


Figura 57 Células incubadas com cBeet120, fixadas com 3,7% PFA e incubadas com RNase ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$, 10 min).

O desaparecimento da marcação nuclear de cBeet120 após tratamento com RNase ou DNase sugere que, após a destruição das estruturas nucleares formadas por RNA ou DNA, há perda de afinidade da sonda por qualquer elemento localizado no núcleo. Contudo, pelos experimentos de interação entre cBeet120 com DNA ou RNA, não é

observada nenhuma interação da sonda ácidos nucleicos, voltando a fazer nossas hipóteses se direcionarem às proteínas, mas agora, as proteínas mais básicas, como àquelas ligadas ao DNA e/ou RNA.

Como a marcação de cBeet120 na linhagem de células U87-MG é bem definida e aparece sempre no envoltório nuclear e em estruturas denominadas nucléolos, buscamos marcadores específicos destas regiões para realizar ensaios de colocalização. Devido à sua especificidade e à falta de sondas nucleares comerciais, elegemos anticorpos para a realização de um protocolo de imunofluorescência. Contudo, anticorpos são moléculas maiores e, em geral, impermeáveis à membranas celulares. Para seu uso como marcador, é necessária a fixação e permeabilização celular anterior à incubação. Como observado na Figura 25 cBeet120 perde totalmente seu padrão de marcação quando aplicada em células fixadas e seu uso deve ser feito através de sua incubação antes desse procedimento (Figura 26). Entretanto, o protocolo comumente utilizado para ensaios de imunofluorescência é demorado e constituído de várias etapas de incubação e lavagem. O tempo de meia-vida de cBeet120 no interior celular é desconhecido, entretanto, sabe-se que para uma solução da sonda em tampão PBS pH 7,4, este período é de apenas 90 minutos. Desta forma, todas as tentativas de colocalização de cBeet120 com anticorpos contra lamina B ou nucleolina, para a observação do envoltório nuclear e nucléolos, respectivamente, foram mal sucedidos, devido à provável hidrólise da sonda durante o preparado de experimento.

3.5.2 Determinação do tempo de vida de fluorescência de cBeet120

A determinação do tempo de vida de fluorescência de cBeet120 foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Jacinto Sá (Uppsala Universitët, Suécia) em um equipamento de laser pulsado em intervalos de femtossegundos, o que permite a visualização de eventos que ocorrem no estado excitado da molécula.

Nossas suspeitas nos levaram a realizar medições do tempo de vida de fluorescência da betalaína na presença dos principais componentes nucleares em função do pH, *i.e.*, DNA, RNA e protamina, assim como realizado nos ensaios de interações no estado fundamental. Entretanto, se a interação ocorre quando a molécula é excitada, é necessária a utilização de uma técnica resolvida no tempo através da espectroscopia *pump-probe*, na qual há dois pulsos ópticos com intervalos de tempo entre eles variáveis. O primeiro pulso (*pump*) excita a amostra e o segundo pulso (*probe*) é gerado

com diferentes atrasos em relação ao primeiro. Desta forma, é possível realizar uma varredura da resposta gerada pelo primeiro pulso em função do tempo. Nos experimentos apresentados a seguir foi utilizado um atraso ótico equivalente ao *time range* 1 do equipamento. A Figura 58 mostra os decaimentos de fluorescência para soluções de cBeet120 em pH 3, 5 e 7, respectivamente, na ausência de qualquer aditivo. Os tempos de vida determinados para cada um dos pHs testados são todos coerentes entre si e tem valor de 38 ps.

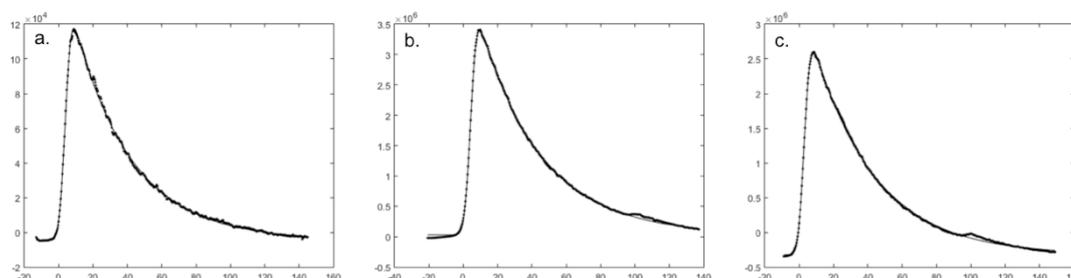


Figura 58 Tempos de vida de fluorescência determinados para cBeet120 em pH 3, 5 e 7, respectivamente ($\lambda_{EX} = 520$ nm, *time range* = 1).

Tendo os valores de tempo de vida de fluorescência para cBeet120 pura em diferentes pHs, foram determinados os tempos de vida para cBeet120 na presença de dos Desta forma, o experimento resolvido no tempo permite a observação do estado excitado, e assim podemos entender se existe alguma interação entre essas espécies e cBeet120 no estado excitado, resultando em uma modificação no tempo de vida de fluorescência. Entretanto, foram observados efeitos apenas a presença de protamina (100 eq.), como mostra a Figura 59.

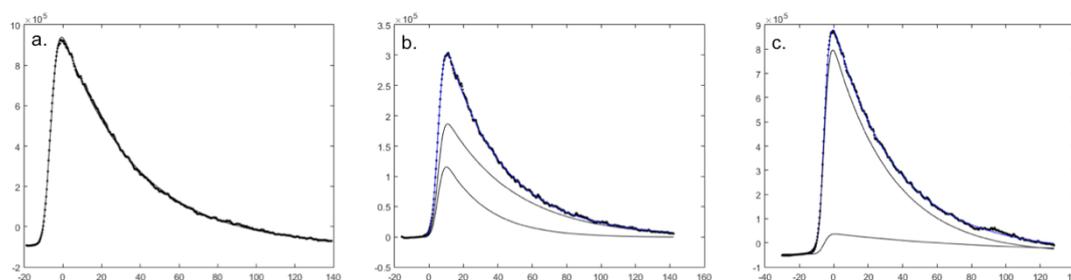


Figura 59 Tempos de vida de fluorescência determinados para cBeet120 em pH 3, 5 e 7, respectivamente, na presença de 100 equivalentes de protamina ($\lambda_{EX} = 520$ nm, *time range* = 1).

Em pH 3, o decaimento foi ajustado com uma equação e o valor de tempo de vida obtido foi compatível com o valor obtido para cBeet120 na ausência de qualquer

espécie adicional ($\tau = 34$ ps). Para os pHs 5 e 7, os decaimentos puderam ser ajustados com duas equações, resultando em dois tempos de vidas para cada um dos meios. Em pH 5 observa-se um $\tau_1 = 34$ ps, que diz respeito à cBeet120 livre, e um $\tau_2 = 101,5$ ps. Já em pH 7, além de $\tau_1 = 39$ ps (cBeet120), há um $\tau_2 = 388$ ps, sugerindo que em pH 5 e 7 há interação entre a betalaína e a proteína, resultando em uma espécie diferente.

3.5.3 Microscopia de tempo de vida de fluorescência (FLIM) em U87-MG

Devido à observação do aumento da emissão de fluorescência com o tempo de exposição à luz das células vivas incubadas com cBeet120, e com os dados obtidos pelo grupo de que cBeet120 é capaz de interagir com BSA, foi realizado o experimento para determinação do tempo de vida de cBeet120 intracelular.

Em solução aquosa, cBeet120 tem seu tempo de vida de fluorescência determinado ($\tau \cong 38$ ps, Rodrigues, A. C. B., 2016). Caso a sonda interaja fortemente ou se ligue covalentemente à alguma proteína nuclear, de acordo com nossa hipótese, espera-se um tempo de meia vida de fluorescência diferente. Estas medidas foram feitas pelo microscópio de tempo de vida de fluorescência (Prof. Maurício Baptista, IQ-USP), no qual é possível observar dois tempos de vida diferentes para cBeet120 dentro da célula (Figura 60), através do ajuste do decaimento obtido (Figura 61).

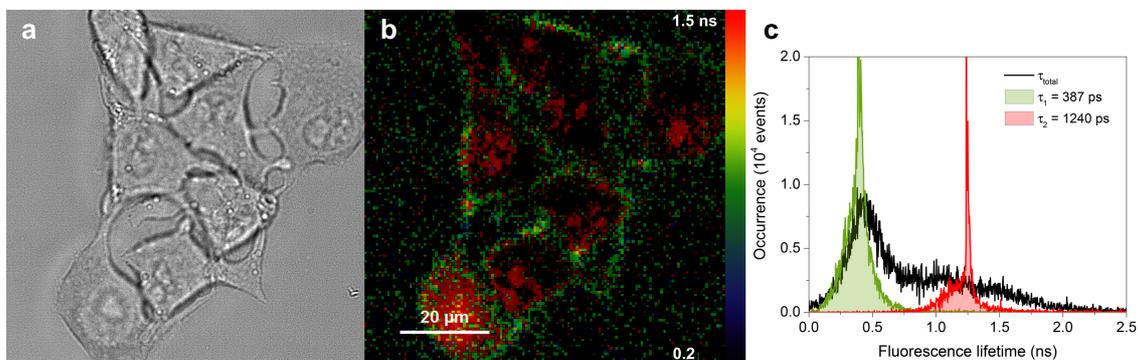


Figura 60 Microscopia de tempo de vida de fluorescência de células U87-MG vivas incubadas com cBeet120; (a) microscopia de campo claro; (b) microscopia de tempo de vida; (c) identificação dos tempos de vida de fluorescência observados.

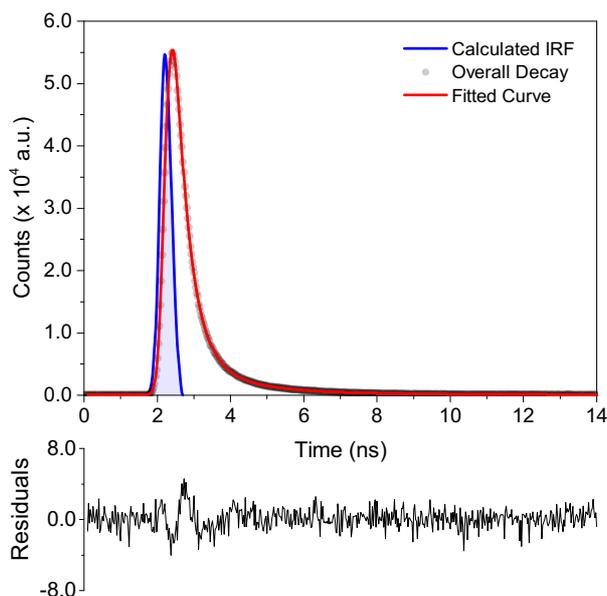


Figura 61 Decaimento do tempo de vida de fluorescência de células U87-MG vivas incubadas com cBeet120.

O tempo de vida mais curto ($\tau = 387$ ps) é correspondente ao tempo de vida de fluorescência obtido em solução para cBeet120 em contato com protamina em pH 7. Entretanto, o segundo tempo de vida obtido é bem mais longo, e é compatível com os valores obtidos pelo grupo de cBeet120 na presença de BSA (Rodrigues, A. C. B., 2016). Além disso, quando analisamos a Figura 60a e b, vemos a distribuição de tempos de vida exibidos dentro das células, e os tempo de vida mais longos ($\tau = 1240$ ps) são localizados no interior do núcleo, exatamente onde vemos a marcação de cBeet120 nas imagens de microscopia de fluorescência. Ainda, a marcação nuclear de cBeet120 tem sua intensidade aumentada em células vivas com o tempo, coisa que não ocorre em células fixadas. Isto indica que há forte interação da betalaína com proteínas nucleares. A observação de um tempo de vida além do valor esperado para a cBeet120 dentro das células U87-MG sugere a existência da sonda em duas formas diferentes, *i.e.*, cBeet120 em sua forma livre e de um complexo entre cBeet120 e alguma estrutura nuclear.

4 Conclusão

cBeet120 é capaz de atravessar membranas e acumular células de linhagens muito diferentes entre si. O mecanismo de transporte de cBeet120 envolve um transportador de glutamato da classe EAAT e a sua internalização é dependente de cálcio e potássio. cBeet120 não afeta a viabilidade de células U87MG no período necessário para a aquisição de imagens. A natureza do acúmulo de cBeet120 relaciona-se com a interação da sonda com proteínas nucleares e a sonda marca tanto células fixadas quanto não fixadas. Por isso, cBeet120 pode apresentar vantagens quando comparada à marcadores comerciais como o DAPI, que só marca células fixadas, ou Hoechst 33342, que marca as células vivas através de sua intercalação com DNA, comprometendo suas funções. A fotoativação observada em células vivas com luz ciano tornam cBeet120 uma sonda versátil, visto que sua resposta pode ser modulada de forma não invasiva.

5 Parte experimental

5.1 Reagentes e solventes

5.1.1 Reagentes químicos

Sephadex LH-20 (LH20100, Sigma), HEPES (H3375, Sigma), ampicilina (A9393, Sigma), estreptomicina (S9137, Sigma), dodecil sulfato de sódio (SDS, 436143, Sigma-Aldrich), soro fetal bovino (10270106, Thermo Fischer Scientific), tripsina (T7409, Sigma), EDTA (E9884, Sigma-Aldrich), formaldeído (252549, Sigma-Aldrich), pepsina (P7125, Sigma), polilisina (P8920, Sigma), histona H2a (H9250, Sigma), protamina (P4380, Sigma), nigericina (N7143, Sigma), valinomicina (V0627, Sigma), monensina (M5273, Sigma), ouabaína (O3125, Sigma), oligomicina (75351, Sigma), artemisinina (361593, Sigma), evans blue (E2129, Sigma), *trans*-2,4-PDC (P7575, Sigma), ácido kaínico (K0250, Sigma), cloreto de sódio (S7653, Sigma), cloreto de potássio (451029, Aldrich), cloreto de cálcio (1.02083, EMD Millipore), glutamato (49621, Aldrich), aspartato (A9256, Sigma), GABA (A2129, Sigma), α -cetogluturato (75890, Sigma), cumarina 120 (7-amino-4-metilcumarina, C120, Sigma, >98%) e cumarina 450 (7-etilamino-4,6-dimetilcumarina, C450, Chemsavers) foram utilizadas como recebidos.

5.1.2 Ácidos e bases

Ácido clorídrico concentrado (HCl, Synth, 36,5-38%), ácido *p*-toluenossulfônico monoidrato (*p*-TsOH, Sigma-Aldrich, >98,5%), ácido fórmico (HCO₂H, Sigma-Aldrich, >95%), hidróxido de sódio (NaOH, Synth, >95%) e hidróxido de amônio (NH₄OH, Synth, 27%) foram usados sem qualquer tratamento prévio.

5.1.3 Solventes

Acetato de Etila (AcOEt, Synth, 99,5% v/v), metanol (MeOH, Synth, 99,8% v/v), dimetilsulfóxido (DMSO, Synth, 99,9% v/v), acetona (Synth, 99,5% v/v), éter etílico (Et₂O, Synth, 98,6% v/v), acetonitrila (MeCN, Tedia, 99,9% v/v), etanol (EtOH, Vetec, 99,8% v/v) e isopropanol (*i*-PrOH, Synth, 99,5% v/v) são grau PA e foram usados como recebidos. A água empregada em todos os experimentos foi submetida a osmose reversa e deionizada (ultrapura, Tipo 1, Milli-Q, resistividade = 18,2 M Ω cm).

5.1.4 Soluções tampão

5.1.4.1 Tampão PBS 10x

A solução estoque de PBS foi preparada sempre 10 vezes concentrada em relação à concentração final de uso (27 mmol L⁻¹ NaCl; 1,37 mmol L⁻¹ KCl; 100 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄, 18 mmol L⁻¹ NaH₂PO₄). Antes do uso a solução foi diluída para sua concentração adequada (100 mmol L⁻¹) e água milli-Q e autoclavadas para uso posterior.

5.1.4.2 Tampões fosfato pH 3 e pH 7

Para tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 3 foram utilizados 100 mmol L⁻¹ de H₃PO₄ e 100 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄ em água milli-Q. Para tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 7 foram utilizados 100 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄ e 100 mmol L⁻¹ de Na₂HPO₄ em água milli-Q. Os pHs foram ajustados conforme necessário com soluções de NaOH (100 mmol L⁻¹) ou HCl (100 mmol L⁻¹).

5.1.4.3 Tampão acetato pH 5

Para tampão acetato 100 mmol L⁻¹ pH 5 foram utilizados 100 mmol L⁻¹ de ácido acético glacial em água milli-Q. O pH foi ajustado com 100 mmol L⁻¹ NaOH em água milli-Q conforme necessário.

5.1.4.4 Tampão HEPES

10 mmol L⁻¹ HEPES foram diluídos em água milli-Q e seu pH foi acertado para 7,9 com HCl (100 mmol L⁻¹) ou NaOH (100 mmol L⁻¹) conforme necessário e seu volume posteriormente acertado.

5.1.4.5 Tampão Tris-HCl 10x

Foi preparada uma solução estoque de 10 mol L⁻¹ Trizma base em água. Seu pH foi sempre ajustado antes do uso com HCl (1 mol L⁻¹) e as soluções diluídas conforme a concentração final necessária.

5.1.4.6 Tampão TBS 10x

A solução estoque foi preparada a partir de 200 mmol L⁻¹ de Trizma base e 1,5 mol L⁻¹ de NaCl em água milli-Q. O pH foi ajustado com 1 mol L⁻¹ HCl até atingir 7,6. A

solução foi diluída 10x antes do seu uso. Quando necessário, foi utilizado 0,1% de Tween (TBS-T).

5.1.5 Meios de cultura

Os meios de cultura RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium, 11865119, Thermo Fischer Scientific), IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, 12200036, Thermo Fischer Scientific) e DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium:Ham's F-12 Nutrient Medium, 12500096, Thermo Fischer Scientific) foram solubilizados em água deionizada e tiveram seu pH ajustado para 7,4 com NaOH ou HCl conforme necessário. Ampicilina e estreptomicina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram adicionados ao meio, que foi em seguida filtrado à vácuo em membrana PVDF hidrofílica $0,22 \mu\text{m}$ (EMD Millipore SCHVU05RE, Thermo Fisher Scientific). Soro fetal bovino foi adicionado após a filtração e os meios foram estocados a 4°C por até 60 dias após preparados.

5.2 Equipamentos

5.2.1 Análises espectrofotométricas

Os espectros de absorção foram adquiridos na região do UV-Vis do espectro eletromagnético em um espectrofotômetro Varian Cary Bio 50. Espectros de emissão e excitação de fluorescência foram registrados empregando-se um espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse.

5.2.2 Cromatografia analítica

Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu 20A equipado com um detector PDA SPD20A e com um detector de fluorescência em condições de fase reversa localizado no laboratório do Grupo de Pesquisas em Química Ambiental (IQ-USP) ou em nosso. Os experimentos foram realizados com uma coluna de sílica C18 (Onyx Monolítica, $100 \times 4,6 \text{ mm}$, Phenomenex)) empregando diferentes proporções de solventes A e B para compor a rampa cromatográfica (fluxo: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$): solução A, água e HCO_2H (0,05% v/v); solução B, 60% v/v de MeCN em água e HCO_2H (0,05% v/v). As soluções foram preparadas e submetidas a degaseamento ultrassônico antes do uso. Cada corrida foi

seguida por uma rotina de limpeza com MeOH 50%. Os dados foram obtidos utilizando o programa de aquisição LCSolution.

5.2.3 Citometria de fluxo

As análises de citometria de fluxo foram realizadas na central multiusuário do Departamento de Fisiologia do Edifício de Ciências Biomédicas da UNIFESP com o auxílio do doutorando responsável Tarciso Almeida Sellani. Foi utilizado um citômetro de fluxo BD FACS CantoII, observando-se a fluorescência de cBeet120 sempre no filtro FITC (FL-2, verde) e, para os ensaios de viabilidade celular, de 7AAD no filtro PerCP-Cys5.5 (FL-3, vermelho).

5.2.4 Microscopia de epifluorescência

Foi usado um microscópio vertical de epifluorescência Olympus BX51 acoplado a uma câmera digital DP-71 (12,5 Mpixel) localizado no laboratório do professor Dr. Renato A. Mortara na EPM-UNIFESP. Todas as imagens foram realizadas utilizando-se a objetiva de aumento de 60x Olympus PlanApo 1.40 Oil (filtro LBD, Light Blue Daylight). Os filtros usados para a aquisição das imagens de fluorescência são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Especificações dos filtros que compõe os cubos usados com o microscópio Olympus BX51.

	TRITC (red, R)	FITC (green, G)	DAPI (blue, B)
$\Delta\lambda$ de excitação	532 – 554	467 – 498	352 – 402
$\Delta\lambda$ de emissão	570 – 613	513 – 556	417 – 477
λ corte dicróico	562	506	409

5.2.5 Microscopia confocal

As imagens de microscopia confocal foram realizadas no CEFAP (ICB-USP) pelo Dr. Mario Cruz utilizando um microscópio confocal Zeiss LSM-780-NLO (Zeiss EC Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil DIC M27, pinhole: 31 μm ; zoom: 2.0, pixel dwell: 3.15 μs , 16-bit) após 30 segundos de exposição à luz (FITC, λ_{EX} 500-544/ λ_{EM} 526-588 nm).

5.2.6 Microscopia confocal com detecção espectral

As imagens de microscopia confocal com detector espectral foram realizadas no SciLifeLab (Karolinska Institutet, Solna, Suécia) utilizando um microscópio confocal Zeiss LSM-510-META (Zeiss Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27, pinhole: 599

μm ; zoom: 1.0, pixel dwell: 2.18 μs , 8-bit) após 30 segundos de exposição à luz (FITC, λ_{EX} 500-544/ λ_{EM} 526-588 nm).

5.2.7 Microscopia de tempo de vida de fluorescência (FLIM)

Foi utilizado um microscópio de fluorescência resolvido no tempo (PicoQuant) no laboratório do Prof. Maurício Baptista (QBQ, IQ-USP), com o auxílio da Dra. Helena Junqueira. O sistema consiste em um microscópio invertido Olympus IX73 equipado com uma objetiva de imersão em água Olympus UPlanSApo 60x/NA 1.2. Um laser diodo de pulso de picosegundos (LDH-D-C-485, PicoQuant) operando a 485 nm e com pulsos de >64 ps foi usado para excitação da amostra. A taxa de repetição foi ajustada pelo de gerador de função (Peaktec 4025, Peaktec) ou diretamente pelo driver de laser de diodo (PDL 828, PicoQuant). O feixe de laser foi direcionado para a objetiva utilizando um espelho dicróico Z. A luz foi guiada através de um *pinhole* de 50 μm e foi detectada por um diodo *single-photon avalanche* (SPAD, SPCM-AQR-13, Perkin Elmer).

5.3 Semissínteses de betalaínas cumarínicas

5.3.1 Preparação do suco de beterraba

Beterrabas frescas tiveram seus talos retirados, foram lavadas e processadas em uma centrífuga tipo juicer (RI186399, Philips Walita). O suco resultante foi filtrado com filtro de pano para retirar eventual material sólido residual.

5.3.2 Obtenção do ácido betalâmico

Em um béquer munido de agitação mecânica e um eletrodo de pH, adicionou-se NH_4OH (30% v/v) a suco de beterraba (aprox. 500 mL) resfriado a 10 °C até que o pH atingisse 11,4. A mistura foi mantida sob agitação vigorosa até que a sua coloração passasse de magenta característico das betacianinas para o amarelo brilhante do ácido betalâmico (cerca de 30 – 40 min). A mistura foi então resfriada a 1 °C e HCl (37% v/v, 18 mol L^{-1}) foi adicionado até o pH atingir 1,5. A velocidade de adição foi controlada para evitar que a temperatura do sistema atingisse valores superiores a 5 °C. O eletrodo de pH foi então retirado e foram adicionados à mistura de cor alaranjada 50 mL de acetato de etila sob agitação. A mistura foi transferida para tubos de 15 mL e submetida a centrifugação (5.000 $\times g$, 5 °C, 2 min). As fases orgânicas contendo ácido betalâmico

foram coletadas com uma pipeta e reunidas. Não foi adicionado secante data a alta afinidade de ácido betalâmico com sais. A concentração de ácido betalâmico na solução em acetato de etila foi determinada espectrofotometricamente ($\lambda_{\text{abs}} = 380 \text{ nm}$, $\epsilon^{380 \text{ nm}} = 24.600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

5.3.3 Semissíntese e purificação de cBeet120 e cBeet450

Em um balão de reação munido de agitação magnética adicionaram-se uma solução de ácido betalâmico em acetato de etila (10 mL, $[\text{HBt}] > 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), cumarina (10 equiv, sólido) e *p*-TsOH (10 equiv, sólido). Ocorre a formação imediata de um precipitado. A mistura foi mantida a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ e no escuro por 48 h; o sobrenadante foi retirado cuidadosamente com uma pipeta e o precipitado marrom foi lavado com acetato de etila (suspensionado em 10 mL, centrifugado a $10.000 \times g$, $5 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 min, $3\times$) para retirar o excesso de cumarina 120. O solvente residual foi evaporado a pressão reduzida (20 mmHg, $25 \text{ }^\circ\text{C}$); o sólido resultante foi solubilizado em água (2 mL) e submetido a purificação por cromatografia de permeação em gel com Sephadex LH-20 como fase estacionária e água como eluente. As frações de cor salmão foram reunidas e submetidas a liofilização. A pureza do produto foi determinada por HPLC analítico com uma rampa 30–70% de B em 20 min e por análise espectrofotométrica em água ($\lambda_{\text{abs}} = 520 \text{ nm}$, $\epsilon^{520 \text{ nm}} = 66.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

5.4 Cultura de células

5.4.1 Cultivo

Todas as células foram mantidas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, sob atmosfera úmida com 5% de CO_2 . Os meios de cultivo foram usados conforme recomendações da ATCC. Todos os meios de cultura foram tamponados com NaHCO_3 (2 g L^{-1}) e suplementados com soro fetal bovino (10%), ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e estreptomicina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), exceto quando indicado. Os meios de cultura foram trocados a cada 2 dias. A estufa de cultivo foi mantida sempre sob umidificação contendo 0,1% de azida de sódio e 1% de SDS para evitar a proliferação de microorganismos.

U87-MG: Células de glioblastoma humano. Foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (código BCRJ 0241) e cultivadas em RPMI-1640 com HEPES (25 mmol L^{-1}). O repique das células foi feito sempre que a confluência celular era atingida.

KatoIII: Células tumorais estômago. Foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (código BCRJ 0318) e cultivadas em meio IMDM com 20% de soro fetal bovino. O repique das células (1:2) foi feito a cada sete dias.

ARPE-19: Célula do epitélio pigmentado de retina humana. Foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (código BCRJ 0041) e cultivadas em meio DMEM/F12. O repique das células (1:2) foi feito a cada cinco dias.

LLC-MK2: Células do epitélio do rim de *Macaca mulatto*. Foram cedidas pelo laboratório da Profª. Renata R. Tonelli (EPM-UNIFESP) e cultivadas em meio RPMI. O repique das células (1:2 a 1:5) foi feito a cada dois dias.

P3U1: Células de mieloma de rato. Foram cedidas pelo laboratório da Profª. Renata R. Tonelli (EPM-UNIFESP) e cultivadas em meio RPMI. O repique das células (1:2 a 1:3) foi feito a cada três dias .

HT-29: Células de adenocarcinoma de cólon humano. Foram cedidas pelo laboratório da Profª. Renata R. Tonelli (EPM-UNIFESP) e cultivadas em meio RPMI. O repique das células (1:2 a 1:3) foi feito a cada três dias.

5.4.2 Repique

As linhagens LLC-MK2, P3U1 e HT-29 foram mantidas em RPMI, enquanto KatoIII foi mantida em IMDM e ARPE-19 em DMEM/F12. As células foram lavadas com PBS (pH = 7,4, 10 mmol L⁻¹) para eliminar traços de soro fetal bovino que compromete a ação de tripsina. As células foram então incubadas com 1,0 mL de uma solução de tripsina (25 mg, 0,25% m/v) e EDTA (5,3 10⁻⁴ mol L⁻¹) 1 mL de 0,25% (m/v) de tripsina-0,53 mmol L⁻¹ EDTA durante 5 min ou até que as células estivessem totalmente desaderidas da superfície interna da garrafa, conforme visualização por microscopia ótica. Com as células totalmente desaderidas, foram adicionados 2 mL de meio de cultura (próprio para cada linhagem) para inibir a ação da tripsina. A suspensão de células resultante foi centrifugada (5 min, 2000 rpm, 5 °C) e o sobrenadante retirado com uma pipeta. As células foram então ressuspendidas nos seus respectivos meios de cultura e transferidas para as garrafas de cultivo.

Para a linhagem U87-MG, as células (mantidas em RPMI) foram desaderidas pela ação de PBS-EDTA (2 mmol L⁻¹) por 5 min a 37 °C após a etapa de lavagem com PBS. O repique com PBS-EDTA é menos agressivo comparado com a tripsina, e foi utilizado para esta linhagem dada sua conhecida propensão à diferenciação celular.

5.4.3 Congelamento e armazenamento

As células foram desaderidas da garrafa, centrifugadas (5 min, 2000 rpm, 5 °C) e ressuspendidas numa solução de DMSO (5% v/v) em soro fetal bovino. Os criotubos foram mantidos durante uma semana a -80 °C e posteriormente transferidas para o armazenamento a 77K sob nitrogênio líquido.

5.4.4 Contagem

A concentração de células em suspensão foi determinada empregando-se uma câmara de Neubauer. Esta câmara possui quadrantes de dimensões definidas que permitem a contagem de células por microscopia ótica. Uma alíquota de células em suspensão foi adicionada entre a grade de contagem da câmara e sua lamínula de forma a preencher todo o volume disponível e a Eq. E1 foi usada para determinar a concentração das células em cultura.

$$C = 10^4 \times N_C / N_Q \quad (E1)$$

onde, C é a concentração de células em cultura por mL de meio, N_C é o número de células contadas e N_Q é o número de quadrantes.

5.5 Microscopia e análise de imagem

5.5.1 Preparação das lamínulas/lâminas

As lamínulas (circulares, 12 × 12 × 0,11 mm, 20012, Ciencor) foram lavadas uma a uma com solução aquosa de detergente neutro, enxaguados abundantemente e, em seguida, ficaram submersas em solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ por 30 min. Após este período, as lamínulas foram enxaguadas até que o pH da água de enxague fosse próximo de 7, o que foi verificado com papel indicador de pH. Após secagem em estufa a 37 °C, as lamínulas foram acomodadas em uma placa de Petri e em seguida autoclavadas, sendo mantidas estéreis até o momento do experimento. As lâminas utilizadas (76 × 26 mm, Knittel Glass) foram previamente limpas com gaze (Cremer) umedecida com solução de éter etílico/etanol (1:1 v/v).

5.5.2 Preparo das células para microscopia

5.5.2.1 Células vivas

Em uma microplaca transparente com 24 poços (Falcon 24 Well Clear Flat Bottom TC-treated Multiwell Cell Culture Plate, 353047, Corning) foram colocadas as

lamínulas estéreis com uma pinça recém esterilizada. Após o repique e contagem de células, em cada poço foram depositadas $5,0 \times 10^4$ células e o volume foi completado para 2 mL com o meio de cultura apropriado para cada linhagem celular. As placas foram preparadas com 24 h de antecedência ao experimento para garantir total adesão das células à lamínula.

5.5.2.2 Células fixadas

Foram feitos experimentos com sondas fluorescentes empregando-se células fixadas. As células aderidas foram incubadas com a sonda ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS) durante 3 min e lavadas com PBS (3x, 25 mL) três vezes para remoção da sonda. As células foram, então, incubadas com o agente fixante conforme apresentado a seguir.

Paraformaldeído (poliacetal com 8 – 100 unidades de formaldeído): Solução de 3,7% de paraformaldeído em PBS foi preparada previamente a quente e as células foram incubadas por 10 min no escuro e lavadas com PBS (3x, 1 mL).

Formaldeído: Solução comercial (solução de formol em água 37% v/v) foi diluída 10x com PBS (concentração final: 3,7% v/v). As células foram incubadas durante 10 min no escuro e lavadas com PBS (3x, 1 mL).

Metanol: metanol foi gotejado lentamente sobre a suspensão de células em PBS de forma a dobrar o volume no poço. O sobrenadante foi retirado imediatamente após a adição de metanol e as células foram lavadas com PBS.

Após a fixação das células, pode-se realizar a incubação com outras sondas/compostos ou simplesmente realizar a aquisição da imagem das células anteriormente incubadas com cBeet120. A montagem da lâmina e lamínula são feitas como descrito anteriormente, porém é utilizado um meio de montagem próprio para células fixadas (Fluoromount Aqueous Mounting Medium, F4680, Sigma).

5.5.3 Imagens de epifluorescência

Imediatamente antes da observação no microscópio, o meio de cultura foi retirado do poço, a lamínula lavada com PBS e incubada com a sonda de interesse (cBeet120: $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 3 minutos; Hoechst 33342: $8 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 5 minutos; LysoTracker Red DND99: 50 nmol L^{-1} por 30 minutos). Para que as imagens pudessem ser adquiridas no microscópio de fluorescência vertical, a lamínula foi colocada com a face

contendo as células para baixo numa lâmina para microscopia com 10 μL de PBS entre elas. Primeiramente foram adquiridas as imagens de campo claro e logo em seguida foi tampada a fonte de luz branca e, a amostra irradiada por luz UV, azul ou verde com lâmpada de mercúrio através de filtros. Para medidas com o microscópio confocal (invertido), a lamínula contendo as células já tratadas ou incubadas, conforme o experimento, foi selada com esmalte imediatamente antes da aquisição de imagens, mesmo para células vivas.

5.5.4 Medidas ON/OFF com cBeet120 em U87-MG

As imagens de *time-lapse* foram adquiridas em um microscópio Olympus BX51 equipado com a objetiva Olympus UPlanFL N 40x/0.75/FN26.5 (LBD filter) e utilizando-se um *snapshot* automático do seu próprio software (Image-Pro Plus, Olympus) a cada 30 segundos, sempre no mesmo conjunto de condições (500 ms de exposição à luz, burner Olympus U-RFL-T, ganho: 1, gamma: 1, offset: 0). Para as medidas ON/OFF, as imagens foram feitas a cada 30 s, mudando-se do filtro FITC para o DAPI para “desligar” a sonda e ao contrário para “liga-la”. Como controle, foram feitas imagens a cada 30 segundos ligando-se e desligando-se o *shutter* do FITC (presença e ausência de luz, respectivamente).

5.5.5 Microscopia confocal na presença de RNase e DNase

Células vivas foram incubadas com cBeet120 nas mesmas condições descritas acima e posteriormente fixadas com 3,7% de paraformaldeído em PBS durante 10 minutos. Após as lavagens necessárias, as células foram incubadas com RNase ou DNase (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) durante 10 minutos, as lâminas/lamínulas foram montadas como descrito acima e seladas com esmalte.

5.5.6 Microscopia confocal com detecção espectral

As células foram preparadas como descrito anteriormente. Da mesma forma que para os outros microscópios de configuração invertida utilizados, as lamínulas contendo células vivas incubadas com cBeet120 foram montadas utilizando PBS e seladas com esmalte. As amostras foram excitadas com um laser de argônio a 488 nm (compatível com o filtro FITC do microscópio de epifluorescência) e a aquisição das imagens foi feita em *lambda mode*, *i.e.*, com detecção espectral. Os espectros de emissão de

fluorescência dentro das células U87-MG foram obtidos a partir da seleção de regiões selecionadas na imagem recém adquirida, sempre em quintuplicata.

5.5.7 Microscopia de tempo de vida de fluorescência (FLIM)

As células foram preparadas como descrito para as microscopias de fluorescência anteriormente. Após incubação com cBeet120 ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) por 3 minutos, as células foram lavadas três vezes com PBS, as lamínulas foram montadas e seladas com esmalte.

5.5.8 Análise de imagens

5.5.8.1 Deconvolução de imagens

Para diminuir o background foi utilizado tratamento de imagens utilizando o programa ImageJ 1.48v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). As imagens, obtidas no formato RGB, foram transformadas em imagens de 8 bits. Foi, então, utilizado o plug-in Iterative Deconvolution com um número padronizado para todas as imagens apresentadas nessa tese de 8 iterações. Após todos os processos foram transformadas novamente em RGB.

5.5.8.2 Tratamento de imagens

As imagens obtidas no microscópio de fluorescência Olympus BX51 foram submetidas à tratamento apenas de ajuste de brilho e contraste, sempre nas mesmas condições por razões comparativas utilizando o programa Adobe Photoshop CC. Para as imagens obtidas nos microscópios confocais Zeiss LSM-780-NLO e Zeiss LSM-510-META foi utilizado o software Zen Black 2.3 (Zeiss, 2016). Para o tratamento de FLIM foi usado o software SymPhoTime 64 (PicoQuant). A montagem de pranchas e esquemas foram feitas utilizando também o Adobe Photoshop CC.

5.6 Ensaio de viabilidade celular

Células U87-MG foram desaderidas da garrafa de cultura celular com uma solução PBS-EDTA ($2 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$) por 5 minutos à 37°C , centrifugadas (5 minutos, 2000 rpm, 20°C), ressuspensas em tampão PBS e incubadas com cBeet120 ou c120 ($100 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$) por 5 ou 60 minutos, de acordo com o experimento. Para cada ensaio foram utilizadas 10^7 células. Após o tempo de incubação, as células foram novamente centrifugadas e lavadas com PBS três vezes na mesma condição de centrifugação descrita anteriormente. Então, 7-aminoactinomicina D (7AAD, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi

adicionado nas células de acordo com as instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific) durante 30 minutos na ausência de luz à temperatura ambiente. As suspensões foram gentilmente homogenizadas e analisadas utilizando-se um citômetro de fluxo (BD FACS CantoII) numa contagem de 50.000 eventos e observando-se a fluorescência de 7AAD no filtro PerCP-Cys5.5 (FL-3, vermelho).

5.7 Extração e dosagem de proteínas celulares

5.7.1 Proteínas totais

Para extração total das proteínas celulares, cerca de 10^7 células foram desaderidas com solução de tripsina-EDTA, centrifugadas por 5 min a 2000 rpm a 5 °C, lavadas com tampão PBS e então novamente centrifugadas nas mesmas condições. O pellet de células foi então resuspendido e incubado com 1 mL de tampão RIPA (Radioimmunoprecipitation assays buffer: 10 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 8,0; 1 mmol L⁻¹ EDTA; 0,5 mmol L⁻¹ EGTA; 1% Triton X-100; 0,1% desoxicolato de sódio; 0,1% SDS; 140 mmol L⁻¹ NaCl e 1 mmol L⁻¹ PMSF, este último adicionado somente antes do uso) contendo 0,1% de inibidor de protease durante 30 minutos no gelo, agitando a solução em um vórtex a cada 10 minutos. Após este período, ainda em banho de gelo, foi utilizada uma seringa de 1 mL de agulha fina para sugar e ejetar a solução diversas vezes para desintegrar o DNA. Então, a solução foi centrifugada a 12800 rpm a 4 °C durante 15 minutos. O sobrenadante foi mantido em banho de gelo e o pellet descartado.

5.7.2 Proteínas Citosólicas

Cerca de 10^7 células foram desaderidas com tripsina-EDTA, centrifugadas por 5 min a 2000 rpm a 5 °C, lavadas com tampão Tris-HCl pH7,4 e então novamente centrifugadas nas mesmas condições. Para a extração diferencial de proteínas solúveis foi utilizado o tampão de extração (10 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 7,4; 100 mmol L⁻¹ NaCl; 300 mmol L⁻¹ sacarose; 3 mmol L⁻¹ MgCl₂; 50 mmol L⁻¹ NaF; 1 mmol L⁻¹ Na₃VO₄; 0,5 mmol L⁻¹ PMSF; 0,1% Triton X-100 e coquetel de inibidores de protease Roche). Cerca de 10^7 células foram ressuspensas em 100 µL de tampão de extração e incubadas no gelo por 10 minutos, agitando com um auxílio de um vórtex durante a metade deste tempo. Em seguida, a solução foi centrifugada (10.000 ×g, 10 min, 4 °C). O sobrenadante foi recolhido como fração I de proteínas solúveis. Ao pellet foram novamente adicionados 100 µL de tampão de extração, incubado no gelo por mais 10

min e centrifugado novamente nas mesmas condições. O sobrenadante foi recolhido como fração II de proteínas solúveis e o pellet descartado.

5.7.3 Proteínas ligadas ao DNA

Cerca de 10^7 células foram desaderidas, centrifugadas (5 min, 2000 rpm, 5 °C), lavadas com PBS e então novamente centrifugadas nas mesmas condições. O pellet foi ressuspendido num volume de 5× o volume do pellet (aproximadamente 250 µL) com Tampão A (10 mmol L⁻¹ HEPES pH 7,9; 1,5 mmol L⁻¹ MgCl₂; 10 mmol L⁻¹ KCl; 0,5 mmol L⁻¹ DTT) e incubado durante 10 min em banho de gelo. Em seguida, a solução foi centrifugada (3200 rpm, 4 °C, 10 min) e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 2 vezes o novo volume de pellet (cerca de 200 µL) de Tampão A gelado na presença de 0,1% de Triton X-100 e então as células foram maceradas com pistilo de teflon, acompanhando sempre a solução no microscópio até observar apenas os núcleos isolados. Após mais uma centrifugação nas mesmas condições anteriores, e mais duas lavagens com o Tampão A, o sobrenadante foi descartado e o pellet centrifugado novamente numa centrífuga Sorvall a 25000 x g a 4 °C durante 20 minutos. Os núcleos foram, então, lisados com tampão RIPA nas mesmas condições da extração de proteínas totais, isto é, incubando-se o pellet no tampão contendo EDTA e inibidor de proteases durante 30 minutos em banho de gelo e vortexando a cada 5 minutos, e depois homogeneizando com uma seringa de agulha fina de 1 mL. Finalmente, a solução foi novamente centrifugada a 10000 x g durante 10 minutos a 4 °C.

Para a confirmação dos núcleos isolados no microscópio de fluorescência, foi utilizada uma alíquota de 20 µL da solução de núcleos e 20 µL de solução de 4% de paraformaldeído em PBS. A solução foi mantida durante 15 min e então centrifugadas a 21000 x g durante 3 min a 4 °C e então coradas com DAPI. As lâminas foram, então, preparadas e observadas no microscópio de fluorescência para aquisição da Figura 1.

5.7.4 Dosagem de proteínas

As proteínas obtidas foram quantificadas utilizando-se o BCA Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Scientific), na qual há uma mistura de reagentes levando à formação de um complexo colorido com BCA (ácido bicinonínico), pela redução do Cu²⁺ a Cu¹⁺ em meio alcalino na presença de proteínas. O complexo, de coloração roxa, é solúvel em água e absorve em 562 nm e é preciso fazer uma curva padrão de calibração de

concentrações conhecidas de albumina para quantificar os extratos proteicos de interesse.

5.8 Extração de gDNA e gRNA

DNA e RNA genômicos foram extraídos pelo Sr. Douglas Moraes, doutorando do grupo do Prof. Carlos Hotta (QBQ, IQUSP). O procedimento será descrito brevemente nesta Tese para fins de referência.

As extrações de material genético foram feitas utilizando RNeasy Plant Mini Kit e DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) seguindo exatamente os procedimentos recomendados pelo fabricante. No caso do RNA, as amostras foram submetidas à um processo de limpeza para a remoção de contaminantes da extração, de acordo com o protocolo RNA Cleanup.

5.8.1 Interação entre cBeet120 e peptídeos ou proteínas comerciais

Para determinação do efeito de proteínas na emissão de fluorescência de cBeet120, a sonda foi mantida constante e a concentração de proteínas foi variada. Foi utilizada uma concentração de $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cBeet120 para quantidades crescentes (0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e $2 \mu\text{mol L}^{-1}$) de pepsina, poli lisina, histona HIIIa e protamina. Todas as medidas foram feitas em pH 3, 5 e 7, em tampões fosfato, acetato e novamente fosfato, respectivamente, todos 100 mmol L^{-1} . As medidas foram feitas em cubetas de quartzo de 1,5 mL, na qual para cada concentração era obtido um espectro UV/Vis ($\lambda_{\text{MAX}} = 520 \text{ nm}$) e espectros de emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 510/\lambda_{\text{EM}} = 570 \text{ nm}$) e excitação ($\lambda_{\text{EM}} = 570 \text{ nm}$).

Para medidas cinéticas no fluorímetro, foram utilizadas as concentrações máximas de proteína ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cBeet120 para cada pH. Foram obtidos os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{EX}} = 510/\lambda_{\text{EM}} = 570 \text{ nm}$) em função do tempo (a cada 20 minutos) até completa degradação de cBeet120.

5.8.2 Proteínas de U87MG

5.8.2.1 SDS-Page

- Formação do gel de poli(acrilamida): O gel de eletroforese é formado após a polimerização de acrilamida. É dividido em duas partes: um gel inferior de separação no qual a amostra é efetivamente separada e o gel stacking, que é uma versão menos polimerizada e, portanto, mais frouxa que fica em cima e abriga a

amostra em poços antes do procedimento de separação. Assim que o gel de separação (gel 10%: 30% poliacrilamida; 1,5 mol L⁻¹ Tris pH 8,8; 10% SDS; água; 10% de persulfato de amônio e TEMED) se polimeriza, é formado acima o gel stacking (gel 5%: 30% poliacrilamida; 1,5 mol L⁻¹ Tris pH 6,8; 10% SDS; água; 10% de persulfato de amônio e TEMED) e coloca-se o pente para formação dos poços de adição de amostra.

- Diluição das amostras: As amostras são diluídas no Tampão de amostra (50 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 1% β-mercaptoetanol; 12,5 mmol L⁻¹ EDTA; 0,02% azul de bromofenol) e fervidas por 5 min a 95 °C e centrifugadas a 12000 x g por 5 minutos.
- SDS-PAGE: As amostras são aplicadas nos poços formados no gel stacking, com o gel já na cuba de eletroforese e com Tampão de corrida adicionado (25 mmol L⁻¹ Tris base; 192 mmol L⁻¹ glicina e 0,1% SDS). Conecta-se a fonte de energia no equipamento e utiliza-se uma voltagem mais baixa até a amostra passar pelo stacking gel e quando atingir o gel de separação pode-se aumentar a voltagem. A corrida acaba quando a banda azul referente ao corante azul de bromofenol, que atua como referência, chega na base do gel.
- Coomassie Blue: O corante Coomassie Brilliant Blue R-250 (1 g em 1 L de solução 50% de metanol; 10% ácido acético glacial em água, previamente filtrado) interage com proteínas e portanto é utilizado para revelar o perfil de bandas do extrato aplicado no gel. Para descorar o gel, é utilizada uma solução de 40% de metanol, 10% de ácido acético glacial em água.

5.8.2.2 Western blotting

- Eletrotransferência: Para transferir as proteínas separadas no gel para a membrana de nitrocelulose, foi preparado um “sanduíche” entre o gel, a membrana e papéis de filtro e esponjas no aparato de eletrotransferência. Para evitar a ocorrência de bolhas de ar, tanto o gel, membrana, como papéis de filtro e esponjas devem ser molhados no Tampão de transferência (25 mmol L⁻¹ Tris base; 190 mmol L⁻¹ glicina; 0,1% SDS, ajuste de pH = 8,3, se necessário). O aparato de transferência é colocado na cuba contendo Tampão de transferência, agora com 20% de metanol e gelado, e ligar a fonte. É importante ressaltar que a membrana sempre fica entre o gel e o eletrodo positivo para que haja

transferência. Todos os blottings realizados foram feitos com uma voltagem de 120 V durante 1 hora.

- Ponceau: Para visualizar se a transferência de proteínas foi realmente realizada, é utilizada uma solução de um corante denominado Ponceau que se liga às proteínas transferidas à membrana (0,2% Ponceau (m/v); 5% ácido acético glacial). Para descorar a membrana utiliza-se uma solução de TBS-T (Tris Buffer Saline with Tween 20: 20 mmol L⁻¹; 150 mmol L⁻¹ NaCl; 0,1% Tween 20).
- Bloqueio da membrana: Para ensaios incubando a membrana com alguma solução ou anticorpo, é necessário garantir que a membrana não estará livre para interação. Por isso, a membrana é bloqueada com uma solução de 3% de albumina bovina em TBS-T durante 1 hora. Para retirar qualquer excesso de albumina depois do bloqueio, deve-se lavar 3 vezes a membrana com TBS-T, cada lavagem durante 10 minutos.

5.8.2.3 Incubação com anticorpos

Após o bloqueio, a membrana é incubada com um anticorpo primário específico para o objetivo do experimento numa solução de 5% de albumina bovina em TBS-T e manter a membrana em solução a 4 °C overnight. Então, a membrana passa por uma lavagem com TBS-T por 10 minutos por 3 vezes e, finalmente, é incubada com o anticorpo secundário conjugado à HRP (Horse Radish Peroxydase) compatível por 1 hora. A membrana é lavada 3 vezes com TBS-T por 5 minutos. A membrana é então lavada com uma solução reveladora de Luminol e peróxido de hidrogênio (1:1) e as imagens são adquiridas em um fotodocumentador de quimioluminescência.

5.8.2.4 Incubação com cBeet120

Quando incubada com cBeet120 (1 μmol L⁻¹), a membrana é lavada com PBS por três vezes e então observada no filtro verde do fotodocumentador (com excitação em 488 nm).

5.8.3 gRNA e gDNA

O efeito da adição de RNA ou DNA sobre a emissão de fluorescência de cBeet120 foi observado da mesma forma descrita para as proteínas acima.

5.9 Ensaios de transporte

Células U87MG em cultura foram desaderidas como previamente descrito e 4×104 células foram adicionadas a cada poço de uma placa de 96 poços própria para cultivo celular e para medidas espectrofotométricas (Corning 96 Well Plate Flat Clear Bottom Black Polystyrene TC-treated Microplates, 3904, Corning) 24 h antes das medidas para garantir completa adesão das células.

5.9.1 Obtenção do espectro de emissão de fluorescência intracelular

As células foram plaqueadas conforme descrito previamente em uma placa de 96 poços preta de fundo transparente 24 h antes do experimento. Para aquisição do espectro de emissão de fluorescência de cBeet120 no interior das células U87MG, as células foram incubadas com a sonda durante três minutos ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e então lavadas com PBS três vezes e mantidas no mesmo tampão. Foi adicionado ao poço sempre o mesmo volume de PBS e a leitura do espectro foi realizada a 37°C em um espectrofluorímetro (SpectraMax i3, Molecular Devices) mantendo-se o comprimento de onda fixado em 510 nm (bottom scanning; densidade de pontos: 21; espaçamento de $0,31 \mu\text{m}$; total de 356 pontos por poço).

5.9.2 Quantificação de cBeet120 intracelular

A partir da curva de emissões de fluorescência de cBeet120 intracelular e da construção de uma curva padrão de emissão de fluorescência (0; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; 20; $100 \mu\text{mol L}^{-1}$) com a sonda na ausência de células no mesmo equipamento, pôde-se correlacionar a emissão de fluorescência com a concentração de cBeet120 no interior das células ($\lambda_{\text{EX}} = 488/\lambda_{\text{EM}} = 520 \text{ nm}$, equivalente ao filtro FITC do microscópio).

5.9.3 Otimização das medidas de transporte

Para determinar as condições ideais para a caracterização do transporte de cBeet120 para dentro das células, foram feitos dois experimentos cruciais: determinação do tempo ótimo para entrada da sonda e determinação da concentração ótima para incubação.

5.9.3.1 Tempo

Manteve-se a concentração de cBeet120 constante ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e variou-se o tempo de incubação nas células: 0; 0,17; 0,5; 1; 2; 3; 5; 10 minutos.

5.9.3.2 Concentração

Manteve-se o tempo de incubação constante (3 min) e variou-se as concentrações de sonda utilizadas nas células: 0; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 70; 80; 90; $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Todas as medidas foram feitas a 37°C em um espectrofluorímetro SpectraMax i3 (Molecular Devices, $\lambda_{\text{EX}} = 488/\lambda_{\text{EM}} = 520 \text{ nm}$, equivalente ao filtro FITC do microscópio) em modo de bottom scanning (densidade de pontos: 21 e espaçamento aproximado de $0,31 \mu\text{m}$; total de 356 pontos por poço). Todas as medidas foram feitas em triplicata.

5.9.4 Medidas de inibição/competição

As células foram inicialmente lavadas com PBS e, então mantidas durante 30 minutos com o sal (em tampão colina 150 mmol L^{-1} ajustado a pH 7,4 e tamponado com 50 mmol L^{-1} de Tris) (Galvez-Rojas, et al. JEM, 2015) ou inibidor (em meio RPMI) a 37°C e 5% de CO_2 . Cada um dos compostos foi testado em uma concentração máxima e, caso fosse observado algum efeito, também em uma faixa de concentrações para averiguar seu efeito sobre a entrada de cBeet120 nas células:

- Nigericina: 0; 10; 50; 100; 200; $300 \mu\text{mol L}^{-1}$
- Valinomicina: 0; 10; 50; 100; 300; $500 \mu\text{mol L}^{-1}$
- Monensina: 0; 10; 50; 100; 200; $300 \mu\text{mol L}^{-1}$
- Ouabaína: 0; 10; 50; 100; 300; $500 \mu\text{mol L}^{-1}$
- Oligomicina: $100 \mu\text{mol L}^{-1}$
- Artemisinina: 0; 10; 50; 100; 300; $500 \mu\text{mol L}^{-1}$
- Evans Blue: 0; 10; 50; 100; 300; $500 \mu\text{mol L}^{-1}$
- Trans-2,4-PDC: 0; 10; 50; 100; 300; $500 \mu\text{mol L}^{-1}$
- Ácido kaínico: 0; 10; 50; 100; 300; $500 \mu\text{mol L}^{-1}$
- Sódio: 0; 0,5; 1; 5; 10; 25; 50; $100 \mu\text{mol L}^{-1}$
- Potássio: 0; 0,5; 1; 5; 10; 25; 50; $100 \mu\text{mol L}^{-1}$
- Cálcio: 0; 0,5; 1; 5; 10; 25; 50; $100 \mu\text{mol L}^{-1}$

- Glutamato: 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 15 mmol L⁻¹
- Aspartato: 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 15 mmol L⁻¹
- GABA: 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 15 mmol L⁻¹
- α -cetogluturato: 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 15 mmol L⁻¹

Após o período de incubação com o sal ou inibidor, as células foram incubadas com 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ cBeet120 durante 3 minutos. A sonda foi removida do poço e as células foram, então, lavadas três vezes e mantidas em tampão colina. A placa foi inserida em um espectrofluorímetro (SpectraMax i3, Molecular Devices) termostaticada a 37 °C e submetida à leitura da emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{EX}} = 488/\lambda_{\text{EM}} = 520$ nm, equivalente ao filtro FITC do microscópio). Cada medida foi feita no modo bottom scanning (densidade de pontos: 21 e espaçamento aproximado de 0,31 μm ; total de 356 pontos por poço). Como controles foram feitas também as mesmas medidas nas mesmas condições em poços sem células em tampão colina e com células em tampão colina. Todas as medidas foram feitas em triplicata.

5.9.5 Imagens de microscopia após a inibição da entrada de cBeet120

Foram adquiridas imagens de microscopia de fluorescência de células U87-MG previamente incubadas com os sais e inibidores em suas concentrações máximas e posteriormente incubadas com 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cBeet120 durante 3 minutos. As imagens foram realizadas no microscópio Olympus BX51 com objetiva UPlanFL N 40x/0.75/FN26.5 (LBD filter) e sempre no mesmo conjunto de condições para posterior comparação (500 milissegundos de exposição à luz, burner Olympus U-RFL-T, ganho: 1, gamma: 1, offset: 0).

5.9.6 Efeito do pH sobre o transporte de cBeet120

O meio extracelular teve seu pH variado numa faixa de acordo com a estabilidade de cBeet120 (pH 4,5; 5,5; 6,5; 7,5). Os experimentos foram realizados em tampão PBS ajustado para cada pH estabelecido. As células foram lavadas com PBS de pH ajustado e incubadas com cBeet120 (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) durante 3 minutos, lavadas e mantidas novamente em PBS de pH ajustado e sua emissão de fluorescência foi adquirida por espectrofluorimetria (SpectraMax i3, Molecular Devices) a 37 °C ($\lambda_{\text{EX}} = 488/\lambda_{\text{EM}} = 520$ nm, bottom scanning; densidade de pontos: 21; espaçamento de 0,31 μm ; total de 356 pontos por poço).

5.9.7 Medidas de potencial zeta

As células foram desaderidas como já descrito e centrifugadas (2000 rpm, 2 min, 20 °C). O pellet de células foi lavado com PBS, centrifugado novamente e ressuspendido em cBeet120. Após 3 minutos de incubação com a sonda, as células foram novamente centrifugadas para retirada do sobrenadante e lavadas três vezes com PBS. As medidas foram feitas sempre com $7,5 \times 10^6$ células mL⁻¹ em PBS em um equipamento DTS Nano (Zeta Sizer Nano Series, Nano-ZS, Malvem Instruments). Foram adquiridos dados de potencial zeta e mobilidade para concentrações crescentes de cBeet120 (10; 20; 55; 60; 100 µmol L⁻¹). O controle foi feito com as células ressuspendidas em PBS sem incubação prévia com cBeet120. O experimento foi realizado sempre em triplicata.

5.10 Ensaio de viabilidade celular

Células da linhagem U87MG (10^7 células) foram desaderidas de seus frascos de cultura com PBS-EDTA (2 mmol L⁻¹, 5 min, 37 °C), centrifugadas (5810R, Eppendorf) durante 5 minutos (2000 rpm, 20 °C), ressuspendidas em PBS e incubadas com cBeet120 ou c120 (100 µmol L⁻¹) durante 5 e 60 minutos. Após o tempo de incubação, as células foram centrifugadas e lavadas com PBS e centrifugadas da mesma forma que descrito anteriormente por três vezes. Então, as células foram incubadas com 7-AAD (1 µg mL⁻¹, A1310, Thermo Fischer Scientific) durante 30 min no escuro e à temperatura ambiente. As suspensões foram homogenizadas gentilmente e analisadas utilizando-se um citômetro de fluxo (BD FACS CantoII, Filter PerCP-Cys5.5, FL-3, red).

5.11 Análise de resultados

Os resultados obtidos foram analisados utilizando os programas Origin 8.0 (OriginLab, 2007), Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2010) e Fityk 0.9.7 (Marcin Wojdyr, 2011).

6 Referências

- (1) Lakowicz, J. R. (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy. *New York :Kluwer Academic/Plenum.*
- (2) Lavis, L. D., and Raines, R. T. (2008) Bright ideas for chemical biology. *ACS Chem. Biol.* 3, 142–155.
- (3) Drummen, G. P. C. (2012) Fluorescent probes and fluorescence (microscopy) techniques-illuminating biological and biomedical research. *Molecules* 17, 14067–14090.
- (4) Ha, T., and Tinnefeld, P. (2012) Photophysics of Fluorescence Probes for Single Molecule Biophysics and Super-Resolution Imaging. *Annu Rev Phys Chem* 63, 595–617.
- (5) Webb, D. J., and Brown, C. M. (2013) Epi-Fluorescence Microscopy, in *Cell Imaging Techniques*, pp 29–57.
- (6) Terai, T., and Nagano, T. (2013) Small-molecule fluorophores and fluorescent probes for bioimaging. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 465, 347–359.
- (7) Kobayashi, H., Ogawa, M., Alford, R., Choyke, P. L., and Urano, Y. (2010) New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging. *Chem Rev* 110, 2620–2640.
- (8) Hanson, G. T., and Hanson, B. J. (2008) Fluorescent probes for cellular assays. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 11, 505–513.
- (9) Chozinski, T. J., Gagnon, L. A., and Vaughan, J. C. (2014) Twinkle, twinkle little star: Photoswitchable fluorophores for super-resolution imaging. *FEBS Lett.* 588, 3603–3612.
- (10) García-Plazaola, J. I., Fernández-Marín, B., Duke, S. O., Hernández, A., López-Arbeloa, F., and Becerril, J. M. (2015) Autofluorescence: Biological functions and technical applications. *Plant Sci.* 236, 136–145.
- (11) Roshchina, V. V. (2012) Vital Autofluorescence: Application to the Study of Plant Living Cells. *Int. J. Spectrosc.* 2012, 1–14.
- (12) Chen, R. F. (1967) Fluorescence Quantum Yields of Tryptophan and Tyrosine. *Anal. Lett.* 1, 35–42.
- (13) Chen, R. F. (1972) Fluorescence Spectroscopy. *J. Res. Notional Bur. Stand. - A. Phys. Chem.* 76, 593–606.
- (14) Duan, Y., Liu, M., Sun, W., Wang, M., Liu, S., and Li, Q. X. (2009) Recent Progress on Synthesis of Fluorescein Probes. *Mini. Rev. Org. Chem.* 6, 35–43.
- (15) Sjöback, R., Nygren, J., and Kubista, M. (1995) Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 51, 7–21.
- (16) Vodolazkaya, N. A., Shakhova, P. V., and Mchedlov-Petrosyan, N. O. (2009) Acid–Base and Tautomeric Equilibria of Fluorescein Dyes in Water Micellar Solutions of Zwitterionic Sulfobetaine Surfactant. *Russian Journal of General Chemistry*, 79, 1070–3632.

- (17) Martin, M. M., and Lindqvist, L. (1975) The pH dependence of fluorescein fluorescence. *J. Lumin.* *10*, 381–390.
- (18) Bhunia, S. K., Saha, A., Maity, A. R., Ray, S. C., and Jana, N. R. (2013) Carbon nanoparticle-based fluorescent bioimaging probes. *Sci. Rep.* *3*, 1473.
- (19) Chudakov, D., Matz, M., Lukyanov, S., and Lukyanov, K. (2010) Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. *Physiol. Rev.* *90*, 1103–1163.
- (20) Chan, J., Dodani, S. C., and Chang, C. J. (2012) Reaction-Based Small-Molecule Fluorescent Probes for Chemoselective Bioimaging. *Nat. Chem.* *4*, 973–984.
- (21) Reth, M. (2013) Matching cellular dimensions with molecular sizes. *Nat. Immunol.* *14*, 765–7.
- (22) Mooi, S. M., and Heyne, B. (2012) Size does matter: how to control organization of organic dyes in aqueous environment using specific ion effects. *Langmuir* *28*, 16524–30.
- (23) Kremers, G., Gilbert, S. G., Cranfill, P. J., Davidson, M. W., and Piston, D. W. (2011) Fluorescent proteins at a glance. *J. Cell Sci.* *124*, 157–160.
- (24) Zhang, J., Campbell, R. E., Ting, A. Y., Ting, A. Y., and Tsien, R. Y. (2002) Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 906–918.
- (25) Tsien, R. Y., and Waggoner, A. (1995) Fluorophores for Confocal Microscopy. *Handb. Biol. Confocal Microsc.* 267–279.
- (26) Fernández-Suárez, M., and Ting, a. (2008) Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 929–943.
- (27) Zheng, Q., Jockusch, S., Rodríguez-Calero, G. G., Zhou, Z., Zhao, H., Altman, R. B., Abruña, H. D., and Blanchard, S. C. (2016) Intra-molecular triplet energy transfer is a general approach to improve organic fluorophore photostability. *Photochem. Photobiol. Sci.* *15*, 196–203.
- (28) Haraldsdóttir, H. S., Thiele, I., and Fleming, R. M. T. (2012) Quantitative Assignment of Reaction Directionality in a Multicompartmental Human Metabolic Reconstruction. *Biophys. J.* *102*, 1703–1711.
- (29) Mellman, I., Fuchs, R., and Helenius, A. (1986) Acidification of the Endocytic and Exocytic Pathways. *Ann. Rev. Biochem.* *55*, 663–700.
- (30) Filipe, H. A. L., Salvador, A., Silvestre, J. M., Vaz, W. L. C., and Moreno, M. J. (2014) Beyond Overton 's Rule: Quantitative Modeling of Passive Permeation through Tight Cell Monolayers. *Mol. Pharm.* *11*, 3696–3706.
- (31) Al-awqati, Q. (1999) One hundred years of membrane permeability : does Overton still rule ? *Nat. Cell Biol.* *1*.
- (32) Missner, A., and Pohl, P. (2009) 110 Years of the Meyer – Overton Rule : Predicting Membrane Permeability of Gases and Other Small Compounds. *ChemPhysChem* *10*, 1405–1414.
- (33) Quest, A. F. G., Leyton, L., and Párraga, M. (2004) Caveolins, caveolae, and lipid

- rafts in cellular transport, signaling, and disease. *Biochem. Cell Biol.* *144*, 129–144.
- (34) Whitam, R., and Wheeler, K. P. (1970) Transport across Cell Membranes. *Annu. Rev. Physiol.* 1038–1060.
- (35) Ussing, H. H., and Erlj, D. (1974) Transport Pathways in Biological Membranes. *Annu. Rev. Physiol.* *36*, 17–49.
- (36) Horobin, R. W., Stockert, J. C., and Rashid-Doubell, F. (2006) Fluorescent cationic probes for nuclei of living cells: Why are they selective? A quantitative structure-activity relations analysis. *Histochem. Cell Biol.* *126*, 165–175.
- (37) Wang, R., Yu, C., Yu, F., Chen, L., and Yu, C. (2010) Molecular fluorescent probes for monitoring pH changes in living cells. *TrAC - Trends Anal. Chem.* *29*, 1004–1013.
- (38) Broeke, J. H. P., Ge, H., Dijkstra, I. M., Taylan, A., Riedl, J. A., Cornelisse, L. N., Toonen, R. F., Verhage, M., and Fitzgerald, W. J. (2009) Automated quantification of cellular traffic in living cells. *J. Neurosci. Methods* *178*, 378–384.
- (39) Chazotte, B. (2012) Labeling Mitochondria with MitoTracker Dyes. *Cold Spring Harb. Protoc.* 990–992.
- (40) Kholmukhamedov, A., Schwartz, J. M., and Lemasters, J. J. (2013) Isolated Mitochondria Infusion Mitigates Ischemia-Reperfusion Injury of the Liver in Rats: Mitotracker Probes and Mitochondrial Membrane Potential. *Schock* *39*, 2013.
- (41) Rexach, M. F., Latterich, M., Schekman, R. W., Rexach, M. R., Latterich, M., and Schekman, R. W. (2014) Characteristics of Endoplasmic Reticulum-derived Transport Vesicles. *J. Cell Biol.* *126*, 1133–1148.
- (42) Cole, L., Davies, D., Hyde, G. J., and Ashford, A. E. (2000) ER-Tracker dye and BODIPY-brefeldin A differentiate the endoplasmic reticulum and Golgi bodies from the tubular- vacuole system in living hyphae of *Pisolithus tinctorius*. *J. Microsc.* *197*, 239–248.
- (43) Zhitomirsky, B., and Assaraf, Y. G. (2014) Lysosomal sequestration of hydrophobic weak base chemotherapeutics triggers lysosomal biogenesis and lysosome- dependent cancer multidrug resistance. *Oncotarget* *6*, 1143–1156.
- (44) Goldman, S. D. B., Funk, R. S., Rajewski, R. A., and Krise, J. P. (2009) Mechanisms of amine accumulation in , and egress from , lysosomes. *Bioanalysis* *1*, 1445–1459.
- (45) Schnell, S. A., and Wessendorf, M. W. (1995) Bisbenzimidazole: a fluorescent counterstain for tissue autoradiography. *Histochem. Cell Biol.* *103*, 111–114.
- (46) Perl, D. P., and Little, B. W. (1980) Acridine orange-nucleic acid fluorescence. Its use in routine diagnostic muscle biopsies. *Arch. Neurol.* *37*, 641–644.
- (47) Portugal, J., and Waring, M. J. (1988) Assignment of DNA binding sites for 4,6-diamidino-2-phenylindole and bisbenzimidazole (Hoechst 33258). A comparative footprinting study. *BBA - Gene Struct. Expr.* *949*, 158–168.

- (48) Yamaguchi, S. T., Sugawara, Y., Tamaki, T., and Yamaguchi, T. (2014) DNA molecular recognition of intercalators affects aggregation of a thermoresponsive polymer. *Polym. Chem.* *5*, 4612–4616.
- (49) Paul, A., and Bhattacharya, S. (2012) Chemistry and biology of DNA-binding small molecules. *Curr. Sci.* *102*, 212–231.
- (50) Saini, A. K., Sharma, V., Mathur, P., Shaikh, M. M., Rivera-Fuentes, P., Lippard, S. J., Carter, K. P., Young, A. M., Palmer, A. E., Chyan, W., Zhang, D. Y., Lippard, S. J., Radford, R. J., Xu, R., Sharma, V., Saini, A. K., Mobin, S. M., Kim, S., Fasman, G. D., Nayak, P., Cronan, C. S., Walker, W. J., Bloom, P. R., Berthon, G., Valeur, B., Leray, I., Gupta, V. K., Shoorra, S. K., Kumawat, L. K., Jain, A. K., Sen, S., Liu, S., Gill, M. R., Kang, Y.-F., Fang, Y.-W., Li, Y.-H., Li, W., Yin, X.-B., Wang, X., Maity, D., Govindaraju, T., Wang, Y.-W., Samanta, S., Goswami, S., Hoque, M. N., Ramesh, A., Das, G., Boyer, P. D., Kong, W., Ai, J., Liu, W., Zhou, B., Yu, J., Parker, D., Pal, R., Poole, R. A., Cann, M. J., Zhang, K. Y., Shen, R., Li, D., Saini, A. K., Srivastava, M., Sharma, V., Mishra, V., Mobin, S. M., Mobin, S. M., Mishra, V., Chaudhary, A., Kwon, J. E., Ashokkumar, P., Ramakrishnan, V. T., Ramamurthy, P., Zhang, J. F., Zhou, Y., Yoon, J., Kim, J. S., Benesi, H. A., Hildebrand, J. H., Shiraishi, Y., Sumiya, S., Kohno, Y., Hirai, T., Rajamalli, P., Prasad, E., Lin, Q., Lin, Q., Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Mitchell, J. B., Wallrabe, H., Periasamy, A., Suhling, K., French, P. M. W., Phillips, D., wang, L., Zhou, H. S., and Lu, Y.-J. (2016) The development of fluorescence turn-on probe for Al(III) sensing and live cell nucleus-nucleoli staining. *Sci. Rep.* *6*, 34807.
- (51) McGinty, R. K., and Tan, S. (2015) Nucleosome structure and function. *Chem. Rev.* *115*, 2255–2273.
- (52) Halford, S. E., and Marko, J. F. (2004) How do site-specific DNA-binding proteins find their targets? *Nucleic Acids Res.* *32*, 3040–3052.
- (53) Kolomeisky, A. B. (2013) Mechanisms of protein binding to DNA: Statistical interactions are important. *Biophys. J.* *104*, 966–967.
- (54) Gonçalves, L. C. P., Tonelli, R. R., Bagnaresi, P., Mortara, R. A., Ferreira, A. G., and Bastos, E. L. (2013) A Nature-Inspired Betalainic Probe for Live-Cell Imaging of Plasmodium-Infected Erythrocytes. *PLoS One* *8*.
- (55) Härd, T., Fan, P., and Kearns, D. R. (1990) Hoechst 33258 and DAPI to Halogenated DNAs. *Photochemistry Photobiol.* *51*, 77–86.
- (56) Mocharla, R., Mocharla, H., and Hodes, M. E. (1987) A novel , sensitive fluorometric staining technique for the detection of DNA in RNA preparations. *Nucleic Acids Res.* *15*, 46223.
- (57) Latt, S. A., and Stetten, G. (1976) Spectral Studies on 33258 Hoechst and Related Bisbenzimidazole Dyes Useful for Fluorescent Detection of Deoxyribonucleic Acid Synthesis. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *24*, 24–33.
- (58) Bakshi, S., Choi, H., Rangarajan, N., Barns, K. J., Bratton, B. P., Weisshaar, J. C., Bakshi, S., Choi, H., Rangarajan, N., Barns, K. J., Bratton, B. P., and Weisshaar, C. (2014) Nonperturbative Imaging of Nucleoid Morphology in Live Bacterial Cells during an Antimicrobial Peptide Attack. *Appl. Environ. Microbiol.* *80*,

4977–4986.

- (59) Pornprasert, S., and Sukunthamala, K. (2010) SYTO9 and SYBR GREEN1 with a high-resolution melting analysis for prenatal diagnosis of β^0 -thalassemia / hemoglobin-E. *Eur. J. Haematol.* 85, 424–429.
- (60) Park, T., Park, Y., and Lee, Y. (2009) Development of a SYTO9 based real-time PCR probe for detection and quantification of toxic dinoflagellate *Karlodinium veneficum* (Dinophyceae) in environmental samples. *Phycologia* 48, 32–43.
- (61) Monis, P. T., Giglio, S., and Saint, C. P. (2005) Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Anal. Biochem.* 340, 24–34.
- (62) Kapuscinski, J., and Darzynkiewicz, Z. (1987) Interactions of Pyronin Y(G) With Nucleic Acids. *Cytometry* 8, 129–137.
- (63) Kapuscinski, J., and Darzynkiewicz, Z. (1987) Interactions of Acridine Orange with Double Stranded Nucleic Acids . Spectral and Affinity Studies. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 5, 37–41.
- (64) Traganos, F., and Darzynkiewicz, Z. (1994) Lysosomal Proton Pump Activity : Supravital Cell Staining with Acridine Orange Differentiates Leukocyte Subpopulations. *Methods Cell Biol.* 41, 185–194.
- (65) Darzynkiewicz, Z. (1990) Differential Staining of DNA and RNA in Intact Cells and Isolated Cell Nuclei with Acridine Orange. *Methods Cell Biol.* 33, 285–298.
- (66) Allison, A. C., and Young, M. R. (1984) Uptake of Dyes and Drugs by Living Cells in Culture. *Life Sci.* 3, 1407–1414.
- (67) Deitch, A. D., Law, H., and White, R. D. (1982) A Stable Propidium Iodide Staining Procedure for Flow Cytometry. *J. Histochem. Cytochem.* 30, 967–972.
- (68) Krishan, A. (1975) Rapid Flow Cytofluorometric Analysis of Mammalian Cell Cycle by Propidium Iodide Staining. *Br. Notes* 66, 188–193.
- (69) Riccardi, C., and Nicoletti, I. (2006) Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat. Protoc.* 1, 1458–1461.
- (70) Smith, P. J., Blunt, N., Wiltshire, M., Hoy, T., Teesdale-spittle, P., Craven, M. R., Watson, J. V., Amos, W. B., Errington, R. J., and Patterson, L. H. (2000) Characteristics of a Novel Deep Red / Infrared Fluorescent Cell-Permeant DNA Probe , DRAQ5 , in Intact Human Cells Analyzed by Flow Cytometry , Confocal and Multiphoton Microscopy. *Cytometry* 291, 280–291.
- (71) Darzynkiewicz, Z. (2011) Critical aspects in analysis of cellular DNA content. *Curr. Protoc. Cytom.* 7.2, 1–9.
- (72) Schmitt, A. D., Hu, M., and Ren, B. (2016) Genome-wide mapping and analysis of chromosome architecture. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 743–755.
- (73) Wang, Q., Sawyer, I. a, Sung, M.-H., Sturgill, D., Shevtsov, S. P., Pegoraro, G., Hakim, O., Baek, S., Hager, G. L., and Dundr, M. (2016) Cajal bodies are linked to genome conformation. *Nat. Commun.* 7, 10966.

- (74) Clarke, H. J. (1992) Nuclear and chromatin composition of mammalian gametes and early embryos. *Biochem. Cell Biol.* 70, 856–866.
- (75) Chazotte, B. (2011) Labeling nuclear DNA using DAPI. *Cold Spring Harb. Protoc.* 6, 80–83.
- (76) Bazhulina, N. P., Nikitin, a M., Rodin, S. a, Surovaya, a N., Kravatsky, Y. V., Pismensky, V. F., Archipova, V. S., Martin, R., and Gursky, G. V. (2009) Binding of Hoechst 33258 and its derivatives to DNA. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 26, 701–718.
- (77) Shaw, P., and Brown, J. (2012) Nucleoli: Composition, Function, and Dynamics. *Plant Physiol.* 158, 44–51.
- (78) Shav-Tal, Y. (2005) RNA localization. *J. Cell Sci.* 118, 4077–4081.
- (79) Bao, G., Rhee, W. J., and Tsourkas, A. (2009) Fluorescent Probes for Live-Cell RNA Detection. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 11, 25–47.
- (80) Gagnon, M., Berner, A. Z., Chervet, N., Chassard, C., and Lacroix, C. (2013) Comparison of the Caco-2 , HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate Salmonella adhesion and invasion. *J. Microbiol. Methods* 94, 274–279.
- (81) Allen, M., Bjerke, M., Edlund, H., Nelander, S., and Westermarck, B. (2016) Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news. *Sci. Transl. Med.* 354, 1–4.
- (82) Dolgin, E. (2016) Mystery surrounds cells. *Nature* 537, 149.
- (83) Maqsood, M. I., Matin, M. M., Bahrami, A. R., and Ghasroldasht, M. M. (2013) Immortality of cell lines: Challenges and advantages of establishment. *Cell Biol. Int.* 37, 1038–1045.
- (84) Capes-Davis, A., Theodosopoulos, G., Atkin, I., Drexler, H. G., Kohara, A., MacLeod, R. A. F., Masters, J. R., Nakamura, Y., Reid, Y. A., Reddel, R. R., and Freshney, R. I. (2010) Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int. J. Cancer* 127, 1–8.
- (85) Roberts, A.-C., Barallon, R., Bauer, S. R., Butler, J., Capes-Davis, A., Dirks, W. G., Elmore, E., Furtado, M., Kerrigan, L., C.Kline, M., Kohara, A., and Los, G. V. (2010) Cell line misidentification: the beginning of the end. *Nat. Rev. Cancer* 10, 441–448.
- (86) Kim, J. Y., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Cha, S. H., Matsuo, H., Kim, D. K., Inatomi, J., Sawa, H., Ida, Y., and Endou, H. (2001) Human cystine/glutamate transporter: cDNA cloning and upregulation by oxidative stress in glioma cells. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1512, 335–344.
- (87) Alexander, M. D., Burkart, M. D., Leonard, M. S., Portonovo, P., Liang, B., Ding, X., Joullié, M. M., Gullledge, B. M., Aggen, J. B., Chamberlin, A. R., Sandler, J., Fenical, W., Cui, J., Gharpure, S. J., Polosukhin, A., Zhang, H. R., Evans, P. A., Richardson, A. D., Harper, M. K., Ireland, C. M., Vong, B. G., Brady, T. P., Theodorakis, E. A., and La Clair, J. J. (2006) A central strategy for converting natural products into fluorescent probes. *ChemBioChem* 7, 409–416.

- (88) Tesoriere, L., Attanzio, A., Allegra, M., and Livrea, M. A. (2015) Dietary indicaxanthin from cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill) fruit prevents eryptosis induced by oxysterols in a hypercholesterolaemia-relevant proportion and adhesion of human erythrocytes to endothelial cell layers. *Br. J. Nutr.* 1–8.
- (89) Tesoriere, L. B. D. A. M. F. M. L. M. A. (2005) Distribution of Betalain Pigments in Red Blood Cells after Consumption of Cactus Pear Fruits and Increased Resistance of the Cells to ex Vivo Induced Oxidative Hemolysis in Humans. *J. Agric. Food Chem.* 1266–1270.
- (90) Tesoriere, L., Gentile, C., Angileri, F., Attanzio, A., Tutone, M., Allegra, M., and Livrea, M. A. (2013) Trans-epithelial transport of the betalain pigments indicaxanthin and betanin across Caco-2 cell monolayers and influence of food matrix. *Eur. J. Nutr.* 52, 1077–1087.
- (91) Allegra, M., Carletti, F., Gambino, G., Tutone, M., Attanzio, A., Tesoriere, L., Ferraro, G., Sardo, P., Almerico, A. M., and Livrea, M. A. (2015) Indicaxanthin from *Opuntia ficus-indica* crosses the blood-brain barrier and modulates neuronal bioelectric activity in rat hippocampus at dietary-consistent amounts. *J. Agric. Food Chem.* 63, 7353–7360.
- (92) Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F., and Escribano, J. (2005) Botany: floral fluorescence effect. *Nature* 437, 334.
- (93) Gonçalves, L. C. P., Marcato, A. C., Rodrigues, A. C. B., Pagano, A. P. E., De Freitas, B. C., De Machado, C. O., Nakashima, K. K., Esteves, L. C., Lopes, N. B., and Bastos, E. L. (2015) Betalainas: Das cores das beterrabas à fluorescência das flores. *Rev. Virtual Quím.* 7, 292–309.
- (94) Tanaka, Y., Sasaki, N., and Ohmiya, A. (2008) Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J.* 54, 733–749.
- (95) Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., and Paredes-López, O. (2000) Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*
- (96) Azeredo, H. M. C. (2009) Betalains: Properties, sources, applications, and stability - A review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44, 2365–2376.
- (97) Goncalves, L. C. P., Trassi, M. A. D. S., Lopes, N. B., Dörr, F. A., Santos, M. T. Dos, Baader, W. J., Oliveira, V. X., and Bastos, E. L. (2012) A comparative study of the purification of betanin. *Food Chem.* 131, 231–238.
- (98) Gandía-Herrero, F., Escribano, J., and García-Carmona, F. (2010) Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta* 232, 449–460.
- (99) Gandía-Herrero, F., and García-Carmona, F. (2013) Biosynthesis of betalains: Yellow and violet plant pigments. *Trends Plant Sci.* 18, 334–343.
- (100) Kobayashi, N., Schmidt, J., Nimtz, M., Wray, V., and Schliemann, W. (2000) Betalains from *Christmas cactus*. *Phytochemistry* 54, 419–426.
- (101) Khan, M. I. (2016) Stabilization of betalains: A review. *Food Chem.* 197, 1280–1285.

- (102) Kobayashi, N. (2002) Contributions to betalain biochemistry. New structures, condensation reactions, and vacuolar transport. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- (103) Cai, Y., Sun, M., Schliemann, W., and Corke, H. (2001) Chemical stability and colorant properties of betaxanthin pigments from *Celosia argentea*. *J. Agric. Food Chem.* *49*, 4429–4435.
- (104) von Elbe, J. H., Maing, I.-Y., and Amundson, C. H. (1974) Color stability of betanin. *J. Food Sci.* *39*, 334–337.
- (105) Tesoriere, L., Allegra, M., Butera, D., Gentile, C., and Livrea, M. a. (2006) Cytoprotective effects of the antioxidant phytochemical indicaxanthin in beta-thalassemia red blood cells. *Free Radic. Res.* *40*, 753–761.
- (106) Tesoriere, L., Butera, D., D'Arpa, D., Di Gaudio, F., Allegra, M., Gentile, C., and Livrea, M. A. (2003) Increased resistance to oxidation of betalain-enriched human low density lipoproteins. *Free Radic. Res.* *37*, 689–696.
- (107) Tesoriere, L., Fazzari, M., Allegra, M., and Livrea, M. A. (2005) Biothiols, taurine, and lipid-soluble antioxidants in the edible pulp of sicilian cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruits and changes of bioactive juice components upon industrial processing. *J. Agric. Food Chem.* *53*, 7851–7855.
- (108) Khan, M. I. (2016) Plant Betalains: Safety, Antioxidant Activity, Clinical Efficacy, and Bioavailability. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* *15*, 316–330.
- (109) Gentile, C., Tesoriere, L., Allegra, M., Livrea, M. A., and D'Alessio, P. (2004) Antioxidant betalains from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) inhibit endothelial ICAM-1 expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1028*, 481–486.
- (110) Allegra, M., Ianaro, A., Pleurisy, C. R., Tersigni, M., Panza, E., Tesoriere, L., and Livrea, M. A. (2014) Indicaxanthin from Cactus Pear Fruit Exerts Anti-Inflammatory Effects in Carrageenin-Induced Rat Pleurisy. *J. Nutr.* 185–192.
- (111) Foti, M., Piattelli, M., Baratta, M. T., and Ruberto, G. (1996) Flavonoids, Coumarins, and Cinnamic Acids as Antioxidants in a Micellar System. Structure–Activity Relationship †. *J. Agric. Food Chem.* *44*, 497–501.
- (112) Kanner, J., Harel, S., and Granit, R. (2001) Betalains - A new class of dietary cationized antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* *49*, 5178–5185.
- (113) Tesoriere, L., Allegra, M., Butera, D., and Livrea, M. A. (2004) Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: Potential health effects of betalains in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* *80*, 941–945.
- (114) Stintzing, F. C., and Carle, R. (2004) Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.* *15*, 19–38.
- (115) Liveri, M. L. T., Sciascia, L., Allegra, M., Tesoriere, L., and Livrea, M. A. (2009) Partition of indicaxanthin in membrane biomimetic systems. A kinetic and modeling approach. *J. Agric. Food Chem.* *57*, 10959–10963.
- (116) Naselli, F., Tesoriere, L., Caradonna, F., Bellavia, D., Attanzio, A., Gentile, C., and Livrea, M. A. (2014) Anti-proliferative and pro-apoptotic activity of whole

extract and isolated indicaxanthin from *Opuntia ficus-indica* associated with re-activation of the onco-suppressor p16INK4a gene in human colorectal carcinoma (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450, 652–658.

- (117) Allegra, M., Furtmüller, P. G., Jantschko, W., Zederbauer, M., Tesoriere, L., Livrea, M. A., and Obinger, C. (2005) Mechanism of interaction of betanin and indicaxanthin with human myeloperoxidase and hypochlorous acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 837–844.
- (118) Herbach, K. M., Stintzing, F. C., and Carle, R. (2006) Betalain stability and degradation - Structural and chromatic aspects. *J. Food Sci.* 71, 41–50.
- (119) Saguy, I., Kopelman, I. J., and Mizrahi, S. (1978) Thermal kinetic degradation of betanin and betalamic acid. *J. Agric. Food Chem.* 26, 360–362.
- (120) Cabanes, J., Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F., and Jiménez-Atiénzar, M. (2014) One-step synthesis of betalains using a novel betalamic acid derivatized support. *J. Agric. Food Chem.* 62, 3776–3782.
- (121) Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F., and Escribano, J. (2006) Development of a protocol for the semi-synthesis and purification of betaxanthins. *Phytochem. Anal.* 17, 262–269.
- (122) Fernando Gandía-Herrero, * Ana Simón-Carrillo, Josefa Escribano, and F. G.-C. (2012) Determination of Beet Root Betanin in Dairy Products by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *J. Chem. Educ.* 89, 660.
- (123) Cabanes, J., Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F., and Jiménez-Atiénzar, M. (2016) Fluorescent bioinspired protein labeling with betalamic acid. Derivatization and characterization of novel protein-betaxanthins. *Dye. Pigment.* 133, 458–466.
- (124) Valgimigli, L., Banks, J. T., Ingold, K. U., and Lusztyk, J. (1995) Kinetic solvent effects on hydroxylic hydrogen atom abstractions are independent of the nature of the abstracting radical. Two extreme tests using vitamin E and phenol. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 9966–9971.
- (125) Kirk, K. (2001) Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. *Physiol. Rev.* 81, 495–537.
- (126) Nishimura, Y., Shimojima, M., Tano, Y., Miyamura, T., Wakita, T., and Shimizu, H. (2009) Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat. Med.* 15, 794–7.
- (127) Aschenbrenner, L., Naccache, S. N., and Hasson, T. (2004) Uncoated Endocytic Vesicles Require the Unconventional Myosin, Myo6, for Rapid Transport through Actin Barriers. *Mol. Biol. Cell* 15, 2254–2263.
- (128) Zembruksi, N. C. L., Stache, V., Haefeli, W. E., and Weiss, J. (2012) 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Anal. Biochem.* 429, 79–81.
- (129) Johnson, I. (1998) Fluorescent probes for living cells. *Histochem. J.* 30, 123–140.
- (130) Howat, W. J., and Wilson, B. A. (2014) Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods* 70, 12–19.

- (131) Thavarajah, R., Mudimbaimannar, V. K., Elisabeth, J., Rao, U. K., and Ranganathan, K. (2012) Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *Journal of Oral Maxillofacial Pathology*. 16, 400–405.
- (132) Hoffman, E. A., Frey, B. L., Smith, L. M., and Auble, D. T. (2015) Formaldehyde crosslinking: A tool for the study of chromatin complexes. *J. Biol. Chem.* 290, 26404–26411.
- (133) Fox, C. H., Johnson, F. B., Whiting, J., and Roller, P. P. (1985) Formaldehyde fixation. *J. Histochem. Cytochem.* 33, 845–853.
- (134) Van De Weert, M. (2010) Fluorescence quenching to study protein-ligand binding: Common errors. *J. Fluoresc.* 20, 625–629.
- (135) Yaguchi, T., and Nishizaki, T. (2010) Extracellular high K⁺ stimulates vesicular glutamate release from astrocytes by activating voltage-dependent calcium channels. *J. Cell. Physiol.* 225, 512–518.
- (136) Tian, J., and Xie, Z. (2008) The Na-K-ATPase and Calcium-Signaling Microdomains. *Physiology* 23, 205–211.
- (137) De Pitt, M., and Brunel, N. (2016) Modulation of Synaptic Plasticity by Glutamatergic Gliotransmission: A Modeling Study. *Neural Plast.* 2016.
- (138) Malarkey, E. B. and Parpura, V. (2008) Mechanisms of Glutamate Release from Astrocytes. *Neurochem. Int.* 52, 142–154.
- (139) Chen, J. G., Backus, K. H., and Deitmer, J. W. (1997) Intracellular calcium transients and potassium current oscillations evoked by glutamate in cultured rat astrocytes. *J. Neurosci.* 17, 7278–7287.
- (140) Cornish-Bowden, a J., and Knowles, J. R. (1969) The pH-dependence of pepsin-catalysed reactions. *Biochem. J.* 113, 353–362.
- (141) Lin, Y., Fusek, M., Lin, X., Hartsuck, J. A., Kezdy, F. J., and Tang, J. (1992) pH dependence of kinetic parameters of pepsin, rhizopuspepsin, and their active-site hydrogen bond mutants. *J. Biol. Chem.* 267, 18413–18418.
- (142) Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105–132.
- (143) Volodkin, D., Ball, V., Schaaf, P., Voegel, J. C., and Mohwald, H. (2007) Complexation of phosphocholine liposomes with polylysine. Stabilization by surface coverage versus aggregation. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1768, 280–290.
- (144) Hyldgaard, M., Mygind, T., Vad, B. S., Stenvang, M., Otzen, D. E., and Meyer, R. L. (2014) The antimicrobial mechanism of action of epsilon-poly-L-lysine. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 7758–7770.

7 Súmula Curricular

7.1 Dados pessoais

Nathana Barbosa Lopes

08 de julho de 1988

São José dos Campos, SP

7.2 Educação

Universidade Federal do ABC, Santo André, 2011

Bacharelado em Ciência e Tecnologia

Universidade Federal do ABC, Santo André, 2012

Bacharelado em Química

7.2.1 Formação complementar

Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2015

Microscopia Confocal Básica

7.3 Ocupação

Bolsista de Doutorado, CAPES, vigência até 02/2017

7.4 Publicações

7.4.1 Artigos completos

Gonçalves, L. C. P.; Marcato, A. C.; Rodrigues, A. C. B.; Pagano, A. P. E.; Freitas, B. C. De; Machado, C. De O.; Nakashima, K. K.; Esteves, L. C.; **Lopes, N. B.**; Bastos, E. L. (2015) Betalainas: das cores das beterrabas à fluorescência em flores. *Revista Virtual de Química*, v. 7, p. 292-309.

Gonçalves, L. C. P.; Trassi, M. A. S.; **Lopes, N. B.**; Door, F. A.; Santos, M. T.; Baader, W. J.; Oliveira, V. X. Jr.; Bastos, E. L. (2012) A comparative study of the purification of betanin. *Food Chemistry*, v. 131, p. 231-238.

7.4.2 Resumos de congressos e apresentações

Lopes, N. B.; Tonelli, R. R.; Bastos, E. L. (2015) Nature-inspired fluorescent probe for live cell nucleus imaging. 14th Conference on Methods and Applications of Fluorescence, Würzburg, Alemanha (apresentação oral).

Lopes, N. B.; Bernardes, E. S.; Di Genova, B. M.; Bastos, E. L. **(2014)** Floral fluorescence dyes and derivatives for cell staining. 2014 Tsukuba Global Science Week, Tsukuba, Japão (apresentação oral).

Lopes, N. B.; Gonçalves, L. C. P.; Bastos, E. L. **(2012)** Semissíntese e efeito do pH sobre a absorção de betalaínas fenólicas. 35ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, Brasil.

Gonçalves, L. C. P.; **Lopes, N. B.;** Weiss, D.; Beckert, R.; Bastos, E. L. **(2011)** Study of the fluorescence of semisynthetic betalains. FluoroFest Workshop, Munique, Alemanha.

Gonçalves, L. C. P.; **Lopes, N. B.;** Di Genova, B. M.; Ciscato, L. F. M. L.; Bastos, E. L. **(2011)** Effect of the 130luent pH on the fluorescence of betalains. 12th Conference on Methods and Applications of Fluorescence, Strasbourg, França.

Gonçalves, L. C. P.; **Lopes, N. B.;** Suffredini, H. B.; Baader, W. J.; Bastos, E. L. **(2011)** Study on the antiradical capacity of betalains. 17th European Symposium on Organic Chemistry, Creta, Grécia.

Bastos, E. L.; Gonçalves, L. C. P.; **Lopes, N. B.;** Santos, M. T. **(2011)** Theoretical insights on the color of betalains. 17th European Symposium on Organic Chemistry, Creta, Grécia.

Lopes, N. B.; Gonçalves, L. C. P.; Bastos, E. L. **(2011)** Semissíntese de um novo antirradical betalâmico. 34ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis, Brasil.

Lopes, N. B.; Gonçalves, L. C. P.; Baader, W. J.; Bastos, E. L. **(2010)** Efeito do pH sobre a atividade antirradicalar de betalaínas. 33ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, Brasil.