



Universidade de Brasília

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Daniela Carrilho de Jesus

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS GLICÍDICOS
ACOPLADOS A BENZOTIAZOLAS PARA
APLICAÇÃO COMO MARCADORES CELULARES
FLUORESCENTES**

Orientador: Prof. Dr. José Raimundo Corrêa

Brasília, 2017.



Universidade de Brasília

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Daniela Carrilho de Jesus

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS GLICÍDICOS
ACOPLADOS A BENZOTIAZOLAS PARA
APLICAÇÃO COMO MARCADORES CELULARES
FLUORESCENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutora em Patologia Molecular

Brasília, 2017.

Quando o sol acena bate em mim

Diz valer a pena ser assim

Que no fundo é simples ser feliz

Difícil é ser tão simples

Fernando Anitelli

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai Maurilho Carrilho Silva (*in memoriam*) pelo seu legado de amor e por ter me ensinado a crer nos meus sonhos.

“O essencial é invisível aos olhos. Só se vê bem com o coração.”

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

Esta foi a parte do trabalho mais difícil de começar. Aqui, a última peça de um quebra-cabeça está sendo colocada. Será impossível colocar em termos tudo que eu gostaria de escrever. Mas uma palavra se fez tão presente na completude desse ciclo que preciso dizê-la

“Agradeço”

Ao universo, a Deus, a vida... Pela minha existência, pela minha feliz existência, gratidão!!!

A minha Mãe

Mãezinha, você é a razão por eu querer diariamente lutar pelos meus sonhos. Que um dia eu possa concretizar alguns dos seus. Eu não sei o quanto você se abdicou por mim, nunca vou poder mensurar, mas só em imaginar eu sei que sou muito, muito amada. Ahh, obrigada por cuidar da Minnie♥ e do Puff♥ por mim.

Ao meu Pai (*in memorian*)

Pai, você está nas minhas melhores lembranças. Os seus princípios de amor são a base na qual eu tenho fundamentado minha vida. Gratidão por ter sido meu pai.

A minha irmã Dayanne

Niguinha, você é o oposto que me completa, me complementa. E será sempre. Mesmo que o trópico de capricórnio divida os nossos espaços. Você não precisa estar junto de mim, por que está dentro de mim. Du, Gabi... amo vocês.

Ao meu amor

Fabrizio, você é o maior companheiro que a vida me proporcionou. Quero te agradecer por fazer tudo na minha vida ser melhor (tentei uma página de frases mas...). Gratidão por me ajudar (tanto) nesse trabalho. Obrigada por me icentivar a ser uma pessoa independente, por estar disposto (ou não) (e) me apoiar assim mesmo com (qualquer coisa) que eu precise. Por me ouvir, por encher minha paciência... Obrigada pelos Pupos♥ e pela Zildinha. Por ser o Fabrizio, simplesmente. Gratidão por permitir que a sua felicidade seja um conjunto com a minha.

Aos meus amigos

Pablo, Letícia, Sid, Arthur e Myla. Este trabalho é uma celebração à vossa existência em minha vida. Obrigada por serem a extensão da minha família aqui. Por me

proporcionarem momentos de alívio, de aconchego e de pura alegria. Amo cada um de vocês.

Ao meu orientador

Professor José Corrêa. Gratidão por ter me proporcionado a realização deste trabalho. A você, que com sincera amizade me passou valiosos ensinamentos, minha admiração e meu respeito, sempre.

Aos meus amigos do laboratório

Bruna e Diego. Vocês foram a personificação da palavra “anjos”. Se dedicaram ao meu trabalho e às minhas dificuldades. O que aprendi com vocês sobre auto respeito é uma das coisas mais valiosas que recebi e isso vai me acompanhar para a vida. Gratidão, muita gratidão.

Douglas. Você foi a pessoa que mais me ajudou a acreditar nesse trabalho. Gratidão pelo valor que você dá à nossa amizade. Você tem o mesmo de mim.

Lorena, Yasmin, Nábyla, Carol dos Anjos, Mayarinha, Joseilma, Naty, Cláudio, Núbia, Ingrid e Mhay. Obrigada pela amizade de vocês, por dividirem entre vocês, fardos do meu doutorado e das minhas escolhas.

Aos professores

Professora Sônia, Professor Bergman, Professor Vicente, Professora Kelly, Professora Diva Dusi e Ana Gomes (EMBRAPA). Gratidão por abrirem as portas de seus laboratórios para que eu pudesse desenvolver meus experimentos. Obrigada por cederem reagentes, por confiarem em mim emprestando seus equipamentos e por me inspirarem a fazer ciência, melhor, a (querer) ciência por princípio.

A instituição e ao Programa

UnB, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular. Gratidão por me proporcionarem o exercício do meu doutorado.

As agências de fomento à pesquisa

CAPES, CNPq, FAP-DF, FINATEC. Obrigada pelo financiamento deste projeto e pelo apoio financeiro, sem o qual seria impossível concluir esta etapa em minha vida.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES	5
RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. MARCADORES FLUORESCENTES: ASPECTOS GERAIS.....	9
1.2. APLICAÇÃO DE SONDAS FLUORESCENTES EM MODELOS BIOLÓGICOS	15
1.3. MODELOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO	18
1.3.1. CAENORHABDITIS ELEGANS E ESTUDOS DE ANATOMIA	18
1.3.2. BACULOVÍRUS E A INFECÇÃO CELULAR.....	21
1.4. DERIVADOS DE BEZOTIADIAZOL E SUAS APLICAÇÕES	24
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS	29
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. CÉLULAS DE MAMÍFEROS	30
4.2. CÉLULAS DE INSETOS	30
4.3. <i>C. ELEGANS</i>	31
4.4. REAGENTES	31
4.5. EQUIPAMENTOS	32
4.6. MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS.....	32
4.7. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	33
4.8. CONCENTRAÇÃO MÍNIMA DE G2 E DE X2 PARA MARCAÇÃO CELULAR E PADRONIZAÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO DOS COMPOSTOS.	33
4.9. MARCAÇÃO CELULAR COM OS COMPOSTOS FLUORESCENTES.....	34
4.10. COMARCAÇÃO DE CADA UM DOS DOIS DERIVADOS DO BTD COM O MARCADOR FLUORESCENTE DAPI	35
4.11. AQUISIÇÃO DE SÉRIES DE IMAGENS EM DIFERENTES PROFUNDIDADES NO EIXO Z E REALIZAÇÃO DO CORTE ORTOGONAL	35
4.12. MARCAÇÕES INDEPENDENTES DE CÉLULAS E DE <i>C. ELEGANS</i> COM O MARCADOR DE LIPÍDIOS NEUTROS BODIPY® OU COM G2	36
4.13. MARCAÇÃO DE OIL RED O EM CÉLULAS MCF-7 E EM <i>C. ELEGANS</i> E COMARCAÇÃO DE OIL RED O E G2 EM CÉLULAS MCF-7 E Bm5	36
4.14. TRATAMENTO DE <i>C. ELEGANS</i> IN VIVO COM OS COMPOSTOS G2 OU X2.....	37
4.15. COMARCAÇÃO DE X2 COM LYSOTRACKER® DEEP RED 647/688	37
4.16. ENSAIOS EM CÉLULAS DE INSETOS	38

4.17. CONTAGEM DOS CORPÚSCULOS LIPÍDICOS EM CÉLULAS BM5 TRATADAS COM G2.....	39
4.18. PLOTAGEM 3D DE IMAGENS PLANAS PARA ANÁLISE PANORÂMICA DAS CÉLULAS	40
4.19. ANÁLISE DE INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA POR CITOMETRIA DE FLUXO	40
4.20. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	40
5. RESULTADOS.....	41
5.1. AVALIAÇÃO DE AUTOFLUORESCÊNCIA DAS CÉLULAS DE MAMÍFEROS	41
5.2. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO COMPOSTO X2 POR ENSAIOS COM MTT OU COM AZUL DE TRIPAN 43	
5.3. SELETIVIDADE DO X2 PARA ESTRUTURAS INTRACELULARES EM CÉLULAS HUMANAS	46
5.4. AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DE MARCAÇÃO DO X2	49
5.5. COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DAS MARCAÇÕES FLUORESCENTES DE X2 E DE LYSOTracker® DEEP RED	53
5.6. AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DO SINAL FLUORESCENTE DE X2 POR CITOMETRIA DE FLUXO	55
5.7. APLICAÇÃO <i>IN VIVO</i> DE X2: <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i>	58
5.8. MARCAÇÕES DE X2 EM <i>C. ELEGANS</i>	60
5.9. APLICAÇÃO DO X2 EM ENSAIO DE INFECÇÃO VIRAL EM CÉLULAS DE INSETO.....	62
5.10. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO COMPOSTO G2 POR ENSAIOS COM MTT OU COM AZUL DE TRIPAN	68
5.11. ANÁLISE DE MARCAÇÃO DO FLUORÓFORO G2 EM CÉLULAS DE MAMÍFERO VIVAS E FIXADAS	70
5.12. ANÁLISE ORTOGONAL PARA LOCALIZAÇÃO DAS ESTRUTURAS MARCADAS PELO G2.....	73
5.13. COMPARAÇÃO DA MARCAÇÃO DO G2 EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS COM DIFERENTES CORANTES	75
5.14. COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DAS MARCAÇÕES DE G2 E DE BODIPY®	79
5.15. AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DO G2 POR CITOMETRIA DE FLUXO	81
5.16. APLICAÇÃO <i>IN VIVO</i> DE G2 EM <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i>	83
5.17. PADRÃO DA MARCAÇÃO DE G2, BODIPY E OIL RED O EM <i>C. ELEGANS</i>	85
5.18. COMPARAÇÃO ENTRE G2 E BODIPY® EM ENSAIO DE INFECÇÃO VIRAL EM CÉLULAS DE INSETO PARA AVALIAR DINÂMICA DE LIPÍDIOS	88
6. DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS	94
6.1. ESTUDOS COMUNS A G2 E X2: AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES DOS DERIVADOS DE BTB.....	94
6.2. ESTUDO DOS PADRÕES DE MARCAÇÃO DO X2	96
6.3. AVALIAÇÃO DA MARCAÇÃO DO X2 DURANTE A INFECÇÃO EM CÉLULAS DE INSETO	98
6.4. DETERMINAÇÃO DO ALVO INTRACELULAR DO G2.....	101
6.5. APLICAÇÃO DO G2 PARA AVALIAR O METABOLISMO ENERGÉTICO DURANTE A INFECÇÃO VIRAL	104
7. CONCLUSÕES	106
8. REFERÊNCIAS	108

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: DIAGRAMA DE ENERGIA DE FLUORESCÊNCIA DE JABLONSKI.	11
FIGURA 2: ESPECTROS DE EXCITAÇÃO E EMISSÃO DE UM FLUORÓFORO, DESVIO DE STOKES E CORRELAÇÃO ENTRE A O COMPRIMENTO DE ONDA DE EXCITAÇÃO E A INTENSIDADE DE EMISSÃO.	12
FIGURA 3: ESTRUTURA GERAL DE UM 2,1,3-BENZOTIADIAZOL (BTD)	15
FIGURA 4: ANATOMIA DO <i>C. ELEGANS</i>	19
FIGURA 5: DESCRIÇÃO DO PROGRESSO E OS EVENTOS PRINCIPAIS DA INFECÇÃO CELULAR POR BACULOVÍRUS.	21
FIGURA 6: ESTRUTURA ESPACIAL DOS DERIVADOS DE BTD G2 E X2.	27
FIGURA 7: AVALIAÇÃO DE AUTOFLUORESCÊNCIA EM SEIS TIPOS CELULARES TRATADOS COM 0,1% DO DILUENTE DMSO.....	42
FIGURA 8: AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR X2 EM LINHAGENS CELULARES TRATADAS COM O COMPOSTO	45
FIGURA 9: AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE MARCAÇÃO FLUORESCENTE DO COMPOSTO X2 EM CÉLULAS VIVAS	47
FIGURA 10: AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE MARCAÇÃO FLUORESCENTE DO COMPOSTO X2 EM CÉLULAS FIXADAS.....	48
FIGURA 11 COMPARAÇÃO ENTRE OS PERFIS DE MARCAÇÃO DE X2 E DE LYSOTRACKER® DEEP RED	51
FIGURA 12: AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DE MARCAÇÃO DO X2	52
FIGURA 13 COMPARAÇÃO ENTRE AS MARCAÇÕES FLUORESCENTES DE X2 E DE LYSOTRACKER® DEEP RED.	54
FIGURA 14: COMPARAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADES DE FLUORESCÊNCIA POR CÉLULA ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO.	57
FIGURA 15: AVALIAÇÃO DE AUTOFLUORESCÊNCIA EM <i>C. ELEGANS</i> E DEMONSTRAÇÃO DE APLICABILIDADE DO X2 <i>IN VIVO</i> PARA ESSA ESPÉCIE	59
FIGURA 16: MARCAÇÕES DE X2 EM <i>C. ELEGANS</i>	61
FIGURA 17: PROVA DE APLICAÇÃO DO X2 EM CÉLULAS DE INSETO Sf9 PERMISSIVAS A INFECÇÃO POR AcMNPV.....	63
FIGURA 18: PROVA DE APLICAÇÃO DO X2 EM CÉLULAS DE INSETO LD652Y SEMIPERMISSIVAS À INFECÇÃO POR AcMNPV.	65
FIGURA 19: PROVA DE APLICAÇÃO DO X2 EM CÉLULAS DE INSETO Bm5 NÃO PERMISSIVAS À INFECÇÃO POR AcMNPV.....	67
FIGURA 20: AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR G2 EM LINHAGENS CELULARES TRATADAS COM O COMPOSTO	69
FIGURA 21: AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE MARCAÇÃO FLUORESCENTE DO COMPOSTO G2 EM CÉLULAS VIVAS	71
FIGURA 22: AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE MARCAÇÃO FLUORESCENTE DO COMPOSTO G2 EM CÉLULAS FIXADAS.....	72
FIGURA 23: CONFIRMAÇÃO POR Z-STACK DE MARCAÇÃO DO G2 DENTRO DA CÉLULA.....	74
FIGURA 24: COMPARAÇÃO ENTRE OS PERFIS DE MARCAÇÃO DE G2, BODIPY® E OIL RED O.....	77
FIGURA 25: COLOCALIZAÇÃO DE G2 E OIL RED O.....	78
FIGURA 26: ESTUDO TOPOLÓGICO DAS MARCAÇÕES FLUORESCENTES DE G2 E DE BODIPY®	80

FIGURA 27: COMPARAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADES DE FLUORESCÊNCIA POR CÉLULA ENTRE OS COMPOSTOS G2 E BODIPY[®] ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO.....	82
FIGURA 28: DEMONSTRAÇÃO DE APLICABILIDADE DO G2 IN VIVO EM <i>C. ELEGANS</i>.	84
FIGURA 29: COMPARAÇÃO ENTRE O PERFIL DA MARCAÇÃO DO G2 COM OS PADRÕES DO BODIPY[®] E DO OIL RED O.	86
FIGURA 30: MARCAÇÕES DE G2 EM <i>C. ELEGANS</i>.....	87
FIGURA 31: AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DE LIPÍDIOS EM MODELO DE INFECÇÃO COM DIFERENTES VÍRUS EM CÉLULAS DE INSETO.....	91
FIGURA 32: ENSAIO DE INFECÇÃO VIRAL EM CÉLULAS DE INSETO PARA AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DE LIPÍDIOS POR G2 E BODIPY[®] BMNPV E TRATADAS COM BODIPY[®] ..	93

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

AcMNPV	<i>Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus</i>
BAPTA	1,2-bis-(2-aminofenol) etano-n,n,n',n',-tetracético
Bm5	Células derivadas de <i>Bombyx mori</i>
BmNPV	<i>Bombyx mori nucleopolyhedrovirus</i>
BODIPY	Boro dipirometeno
BTD	Benzotiadiazol
BV	Vírus extracelular
DANSYL	(dimetilamino)naftaleno-1-sulfonil cloreto
DAPI	4',6-diamidiino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
DsDNA	DNA fita dupla
GFP	Proteína verde fluorescente
HDL	High density lipoprotein
IDL	Intermediate low density lipoprotein
LB	Luria-Bertani
Ld652Y	Células derivadas de <i>Lymantria dispar</i>
LDL	Low density lipoprotein
M9	M9 Minimal Salts
mCherry	Proteína vermelha fluorescente
MDA-MB 231	Células epiteliais de carcinoma ductal da glândula mamária
MCF-7	Células epiteliais de adenocarcinoma glandular mamário
DU-145	Células epiteliais de câncer de próstata
CACO-2	Células epiteliais de adenocarcinoma colo-retal humano
HUVEC	Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana
NBD	Nitrobenzoxadiazol

NGM	Nematode Growth Medium
NIR	<i>Infravermelho próximo</i>
OB	Corpos de oclusão
ODV	Vírus derivado da oclusão
ORO	Oil red-O
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
Sf9	Células derivadas de <i>Spodoptera frugiperda</i>
UV	Ultravioleta
ATCC	American Type Culture Collection
SFB	Soro Fetal Bovino Inativado
PBS	Tampão Fosfato Salino
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT)
VLDL	Very low density lipoprotein

RESUMO

O conhecimento a respeito de complexas redes de comunicação e interação celular alcançou muitos avanços graças a estudos de fluorescência aplicados à biologia das células. Embora muito progresso tecnológico empregado no imageamento celular tenha sido alcançado, os fluorocromos continuam desempenhando papel central para análises de condições fisiológicas e patológicas. O desenvolvimento de agentes fluorescentes é um processo laborioso que visa a criação de moléculas providas simultaneamente de diversas características favoráveis, tais como, amplos desvios de Stokes, altos coeficientes de extinção molar, permeabilidade a membranas celulares, ausência de citotoxicidade e alta especificidade. Moléculas derivadas do núcleo fluorescente benzotiadiazol (BTD), por apresentarem muitos desses aspectos, encontram várias aplicações no âmbito do imageamento celular. Neste contexto, o presente trabalho inicia uma série de aplicações em modelos biológicos de duas estruturas inéditas derivadas de BTD. O fluoróforo 2,1,3- benzotiadiazol triazol galactose, ou G2, e a molécula 2,1,3- benzotiadiazol triazol xilose, ou X2. Algumas linhagens tratadas com os compostos apresentaram considerável redução de viabilidade celular. Esse fato revelou ação citotóxica dos fluorocromos para determinados tipos de células, o que dificulta aplicações dessas moléculas em células vivas. Contudo os resultados de aplicações em diferentes modelos biológicos fixados foram excelentes para a sonda G2. Esta apresentou alta especificidade, sinal fluorescente intenso e ausência de marcação de fundo. Sabe-se que a recomendação de sondas fluorescentes apenas para material fixado é um aspecto comum a muitos marcadores de referência no mercado. Já o fluoróforo X2 não teve sua especificidade definida pois apresentou possíveis marcações em organelas como complexo de golgi, lisossomos, vesículas do sistema endossomal entre outras. Contudo, a partir de estudos de comarcação com LysoTracker (específico para organelas ácidas), de experimentos em *C. elegans* e de ensaios utilizando um sistema “baculovírus – células de inseto” foi observada certa preferência do composto por organelas ácidas ou organelas com alta quantidade de membranas, levando-nos também à hipótese de que o X2 possui afinidade por um tipo / um grupo de fosfolipídios. O composto G2 apresenta especificidade para corpúsculos lipídicos. Esta constatação ficou bem determinada através de estudos de comparação ou de colocalização em diferentes modelos, como células de insetos e *C. elegans*, com os corantes de referência para essas organelas: Oil Red O e BODIPY®. Também demonstramos que esta sonda é eficaz para avaliar dinâmica de lipídios, para isso utilizamos o sistema “baculovírus – células de inseto” em conjunto com o composto G2. Os resultados levaram a hipótese de que o G2 pode marcar um grupo mais seletivo entre os lipídios, em comparação ao marcador BODIPY®. Por fim, este trabalho fundamenta a proteção intelectual e posterior divulgação da sonda G2 e ainda traz novos esclarecimentos para melhorias da molécula X2.

Palavras chave: Benzotiadiazol (BTD), sondas fluorescentes, aplicação biológica

ABSTRACT

The knowledge about cellular communications and complexes networks interactions has been constantly developing thanks to fluorescence studies applied to cell biology. Although a good technological progress has been achieved in cell imaging, fluorochromes continue to play a central role in the analysis of physiological and pathological conditions. The development of fluorescent dyes is a difficult process, which aims create molecules provided simultaneously with several favorable characteristics. This physical or chemical features include wide Stokes shift, high molar extinction coefficients, permeability to cell membranes, absence of cytotoxicity and high specificity. The fluorescent molecule benzothiadiazole (BTD) have been used as a core in the synthesis of fluorophores that usually presents the chemical and physical mentioned characters and have a large of applications in the field of cellular imaging. In this context, the present work initiates a series of applications in biological models of two unpublished structures derived from BTD. The fluorophore 2,1,3-benzothiadiazole triazole galactose, or G2, and the molecule 2,1,3-benzothiadiazole triazole xylose, or X2. Some cell lines treated with the compounds presented considerable reduction of cell viability. This fact revealed cytotoxic action of the fluorochromes for certain cell types, which makes it difficult to apply these molecules to living cells. However, the results of applications in different fixed biological models were excellent for the G2 probe. This showed high specificity, intense fluorescent signal and absence of background. For this reason, the G2 is a fluorophore with potential for commercial application, even if it is only used in fixed materials. But the fluorophore X2 did not have its specificity determined because it showed possible labeling in vesicles of the endosomal system, lysosomes, Golgi complex and other organelles. However, studies of colocalization between X2 and Lysotracker (which one is specific for acidic organelles), experiments in *C. elegans* and assays using a system "baculovirus - insect cells" revealed a certain preference of the compound by acidic organelles or organelles with a high amount of membranes, leading us to hypothesize that X2 has affinity for a type or a group of phospholipids. The fluorophore G2 has specificity for intracellular lipid droplets. This finding was well determined through comparative studies or fluorescence colocalization in different models, such as insect cells and *C. elegans*, using the specific dyes for these organelles: Oil Red O and BODIPY[®]. We also demonstrated that this probe is effective for evaluation of lipid dynamics, for which we use the "baculovirus - insect cells" system together with the compound G2. The results led to the hypothesis that G2 are selecting a group within the lipids, in comparison to the BODIPY[®] dye. Finally, this work bases the intellectual protection and subsequent disclosure of the G2 probe and still brings new clarifications for improvements of the molecule X2.

Key words: Benzothiadiazole (BTD), fluorescent probes, biological application

1. INTRODUÇÃO

1.1. Marcadores fluorescentes: aspectos gerais

Entre as diversas áreas da biologia celular, o conhecimento progrediu das preliminares determinações e caracterizações estruturais dos componentes celulares para a compreensão em profundidade das complexas redes de comunicação e interação celular. As células eucarióticas mantêm uma intensa relação com o seu ambiente, sendo expressa pela captação, transporte e estoque de macromoléculas, secreção de produtos, interações entre biomoléculas e transdução de sinais, os quais produzem e modulam as mais diversas respostas celulares (Apel e Hirt, 2004; Fernandez, Villalon e Verdugo, 1991; Yoshizumi *et al.*, 2016).

O uso de variados tipos de sondas para microscopia de células se tornou essencial e neste contexto os marcadores fluorescentes tem papel de destaque. As bases do imunodiagnóstico e da fenotipagem celular foram iniciadas a partir da marcação covalente de anticorpos em isocianato de fluoresceína (Coons, Creech e Jones, 1941).

Diversas outras metodologias se apoiaram na utilização de marcadores fluorescentes para aprimorar as análises celulares, como por exemplo, a citometria de fluxo (Perfetto, Chattopadhyay e Roederer, 2004). Tais metodologias vêm sendo sistematicamente aprimoradas, incorporando outras técnicas com destaque para as da área de informática, e podendo ser aplicadas tanto a amostras vivas quanto não vivas (fixadas). O emprego da fluorescência tem contribuído de forma decisiva para a confirmação e o esclarecimento de muitos eventos biológicos e por isso essa área vem se desenvolvendo cada vez mais rápido (Johnson, 1998).

De forma geral, as moléculas capazes de realizar transições eletrônicas que resultam em emissão fluorescente são conhecidas como sondas fluorescentes ou fluorocromos. Os fluorocromos quando conjugados a grandes moléculas como ácidos nucleicos, proteínas ou lipídios, seja através de adsorção ou de ligações covalentes são chamados de fluoróforos. Os fluoróforos são normalmente agrupados em duas grandes classes, denominadas intrínseca e extrínseca. Na classe intrínseca estão os fluoróforos que emitem naturalmente fluorescência (autofluorescência) como aminoácidos aromáticos, neurotransmissores, porfirinas e proteínas fluorescentes como a GFP (green fluorescent protein) (Tsien, 1998) (Prendergast e Mann, 1978). Na classe extrínseca estão os fluoróforos sintéticos ou os modificados bioquimicamente que são usados em diversos

tipos de amostras para produzir fluorescência com propriedades espectrais específicas (Wen *et al.*, 2013).

Uma vez que as sondas sintéticas intrínsecas são geralmente raras e de aplicações restritas, foi o contínuo desenvolvimento de sondas fluorescentes extrínsecas como ferramentas de detecção que possibilitou de forma cada vez mais específica a análise de amostras biológicas, impulsionando ainda a indústria da microscopia e de programas computacionais de análise e edição de imagens associados a esta área (Alonzo *et al.*, 2016; Lichtman e Conchello, 2005).

A principal aplicação de uma sonda fluorescente é detectar um alvo específico. Apesar de alguns fluoróforos intrínsecos e endógenos, tais como o triptofano, revelarem detalhes do metabolismo celular (Brancaleon *et al.*, 2001), a maior parte dos eventos intracelulares não são identificados a partir da emissão fluorescente de componentes endógenos. Para entender como um fluoróforo identifica o alvo é necessário compreender a estrutura básica de um fluoróforo. Uma sonda fluorescente é molecularmente constituída de duas porções: o segmento receptor que se liga ao alvo e o segmento núcleo capaz de fluorescer (Basabe-Desmonts, Reinhoudt e Crego-Calama, 2007).

A emissão de sinal fluorescente ocorre quando a molécula é excitada por fótons de luz de determinado comprimento de onda (por exemplo a partir de um laser de excitação), estes são absorvidos por um elétron da partícula fluorescente, o qual tem seu nível de energia elevado para um estado excitado. Durante este curto período de excitação, parte da energia é dissipada (por colisões moleculares ou transferida para uma molécula próxima) e parte é emitida como fótons, para que o elétron possa voltar ao seu estado fundamental. Como esses fótons emitidos geralmente carregam um somatório de energia menor do que a de excitação, normalmente possuem um comprimento de onda maior (Figura 1). A excitação e emissão de fótons de um fluoróforo é um processo cíclico, a menos que a molécula seja irreversivelmente danificada (*fotobleaching*) esta pode ser repetidamente excitada (Balzani *et al.*, 2007).

Uma sonda fluorescente desenvolvida com interesse comercial apresenta algumas propriedades ideais a serem discutidas a seguir, que são: I) especificidade para componentes celulares; II) elevado rendimento quântico; III) amplo desvio de Stokes; IV) fotoestabilidade molecular e baixo fotodecaimento; V) estabilidade em estoque (Fernández-Suárez e Ting, 2008; Karunakaran *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2005).

A especificidade é definida pela capacidade da molécula de se associar às moléculas-alvo que podem ser encontradas na superfície das células ou de suas organelas, bem como no interior das organelas ou dispersas pelo citoplasma (Wang, 1988)

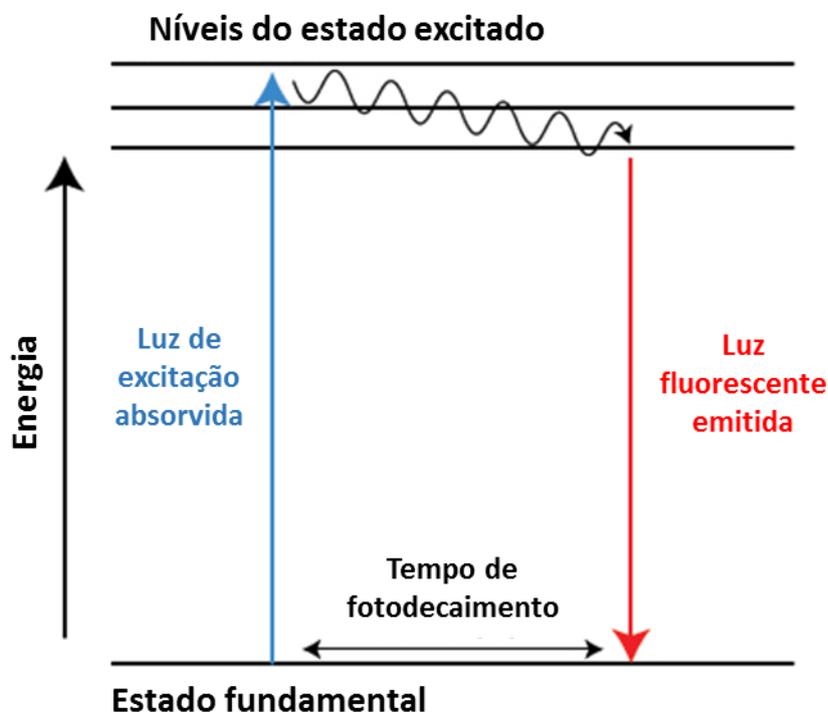


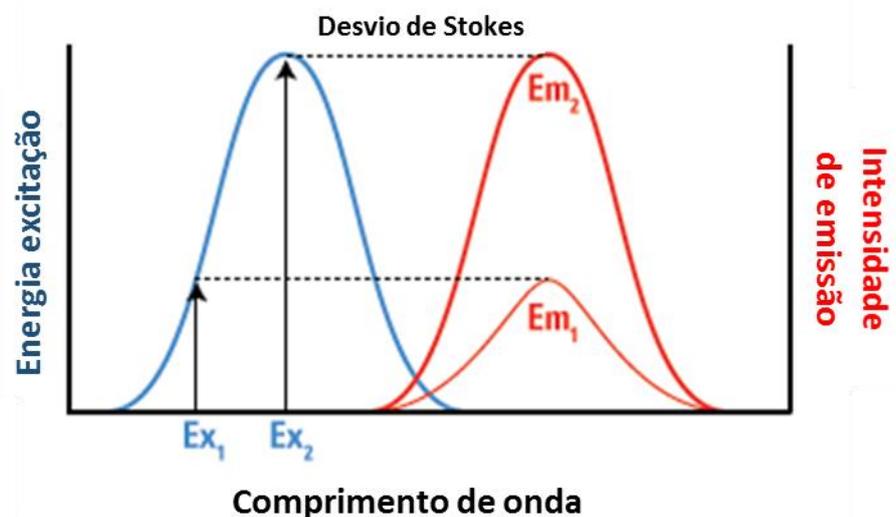
Figura 1: Diagrama de energia de fluorescência de Jablonski. (“ThermoFisher Scientific - Fluorescence Fundamentals”, Adaptado)

O coeficiente de extinção molar (ϵ) é definido pela capacidade de uma substância em absorver luz a um determinado comprimento de onda. Esta variável determina o quão fortemente um mol da substância absorve radiação em uma determinada faixa do comprimento de onda da excitação. Já o rendimento quântico (“*quantum yield*”, QY) é determinado pelo o número de fótons emitidos por um fluorocromo dividido pelo número de fótons que são absorvidos. Este dado fornece a eficiência de um fluoróforo e tem um máximo de 1. O brilho de um fluoróforo é então calculado como o produto do coeficiente de extinção molar e do rendimento quântico (Lakowicz, 2006)

A

Figura 2 mostra o desvio de Stokes e a correlação entre a amplitude de excitação e a intensidade de emissão de fluorescência. O desvio de Stokes corresponde à diferença entre o comprimento de onda máximo de excitação e o máximo de emissão de um agente fluorescente. Quando o pico do comprimento de onda de excitação de um fluoróforo é próximo ao pico de emissão, fica favorecida a rápida perda de fluorescência. Já a

intensidade de emissão de fluorescência é dependente do comprimento de onda de excitação do fluoróforo, de modo que quando a molécula é excitada com um feixe de onda distinto do comprimento de onda máximo de excitação a intensidade de emissão



será mais baixa (Lichtman e Conchello, 2005).

Figura 2: Espectros de excitação e emissão de um fluoróforo, desvio de Stokes e correlação entre a o comprimento de onda de excitação e a intensidade de emissão. A figura mostra que a intensidade de emissão 1 (Em_1) está para o comprimento de onda da excitação 1 (Ex_1) tal qual a intensidade de emissão 2 (Em_2) está para do comprimento de onda da excitação 2 (Ex_2). (“ThermoFisher Scientific - Fluorescence Fundamentals”, Adaptado).

Para estudos por microscopia de fluorescência é ideal que a sonda apresente alta absorção no comprimento de onda o qual é excitada e que também evidencie espectro de emissão bem separado, o que exige para essa sonda a apresentação simultaneamente de um alto coeficiente de extinção molar e de um elevado desvio de Stokes (Lakowicz, 1999).

Outra importante característica do *design* de um fluoróforo é a sua vida útil em estoque, sendo que uma arquitetura molecular estável é o que garante a durabilidade da molécula (Longin *et al.*, 1993).

Para o desenvolvimento de uma sonda fluorescente de aplicação biológica os principais critérios a serem considerados são: permeabilidade da membrana plasmática ao fluorocromo, seletividade para o alvo específico, rendimento quântico no microambiente celular, estabilidade estrutural da molécula no meio intracelular,

toxicidade e constância da intensidade de emissão de fluorescência (Johnson, 1998; Suzuki e Yokoyama, 2015).

A permeabilidade da membrana celular à sonda é o primeiro critério a ser considerado, por ser a etapa determinante da aplicação do agente em células vivas. Fluorocromos com características lipofílicas, em geral atravessam as membranas pela simples adição da solução estoque ao meio extracelular (Wu *et al.*, 2015). No entanto, estas moléculas apresentam baixa solubilidade em meio aquoso e elevada tendência de agregação ainda em solução (Ellen Bo Tu, Guo-Zhen Ji e Jiang, 1997).

Fluorocromos polares normalmente requerem intervenções para atravessar a barreira representada pela membrana plasmática e pelas membranas de organelas celulares. A sua passagem pelas membranas celulares pode ser mediada por agentes que aumentam a permeabilidade de membrana por estresse, como ácidos (Paola, Di *et al.*, 2006), ésteres acetoximetílicos (Tsien, 1980; Varghese Gupta *et al.*, 2011), choque hiposmótico (Márián *et al.*, 1993; Nolan e Lippard, 2009), ou por técnicas mais avançadas, tais como o empacotamento do fluorocromo em lipossomos catiônicos (Barber *et al.*, 1996) ou a permeabilização ATP induzida (Cutaia *et al.*, 1996). No entanto muitas destas estratégias comprometem a viabilidade celular e inviabilizam a sua utilização em amostras vivas.

A fim de possibilitar a ampla aplicação de uma sonda fluorescente em ensaios que busquem a compreensão de processos fisiopatológicos ou o seu emprego em métodos de diagnóstico, a especificidade é o critério fundamental a ser considerado durante o desenvolvimento da sonda fluorescente. O acoplamento de grupos químicos direcionadores a um alvo celular específico a núcleos químicos fluorescentes determina a especificidade de marcação. O *design* desta “quimera” resultante muitas vezes pode agir em contradição, isto é, um grupo direcionador pode garantir alta especificidade mas afetar o rendimento quântico do fluoróforo, ou o núcleo fluorescente pode interferir na especificidade buscada pelo grupo direcionador (Pan, Zhao e Brotto, 2012)

Outros dois parâmetros co-relacionados e que devem ser considerados na síntese de um bom fluoróforo são o desvio de Stokes e o coeficiente de extinção molar. Moléculas com amplos desvios de Stokes são mais fáceis de serem combinadas com outros agentes fluorescentes para uso em análises multiparamétricas (Lichtman e Conchello, 2005). Outro aspecto que deve ser buscado durante a fase de design de fluorocromos é a obtenção

do maior valor de rendimento quântico possível no solvente coerente com a aplicação biológica.

Quando o rendimento quântico é insatisfatório, é comum o aumento da intensidade da iluminação ou o tempo de exposição das amostras à luz de excitação. No entanto, estas estratégias também diminuem exponencialmente a intensidade de emissão de fluorescência do fluorocromo. A alta intensidade de iluminação dos equipamentos frequentemente causa a destruição ou alteração irreversível dos fluorocromos excitados, acelerando o fotodecaimento e diminuindo o sinal fluorescente total (Dittrich e Schwille, 2001). Neste contexto o uso de agentes que atuem na tentativa de manter constante a emissão de fluorescência do fluorocromo torna-se uma etapa obrigatória da preparação das amostras. Finalmente, a alta intensidade de iluminação somada a prolongados tempos de exposição das amostras biológicas pode ainda causar fototoxicidade em amostras vivas (Benninger e Piston, 2013).

Entre uma grande variedade de núcleos fluorescentes já validados, o heterociclo 2,1,3-benzotiadiazol (BTD) vem se destacando na química de compostos luminescentes (Carvalho *et al.*, 2014; Lopes *et al.*, 2014; Mancilha *et al.*, 2006) (Figura 3). Frente aos diversos derivados de núcleos fluorescentes utilizados, o núcleo BTD apresenta uma série de propriedades biológicas, químicas e físicas que o coloca em vantagem em relação a outros marcadores fluorescentes. BTDs descritos para imageamento celular provaram ser capazes de transpor a membrana com eficiência (Nadler e Schultz, 2013). Mesmo em estados excitados, os fluoróforos derivados de BTD são moléculas estáveis, além disso, derivados fluorescentes de BTD geralmente apresentam amplos desvios de Stokes (Alfonso *et al.*, 2014; Neto, Carvalho e Correa, 2015). Normalmente as sínteses desses biomarcadores possuem baixo custo, produção simplificada e reação facilmente escalonável. Outra vantagem é que fluoróforos derivados do núcleo de BTD podem ser armazenado por anos em temperatura ambiente, não necessitando de ciclos de congelamento e descongelamento, que facilitariam sua inativação (Neto, Carvalho e Correa, 2015). Finalmente, boa parte dos biomarcadores com o núcleo BTD é excitada no espectro de luz visível, o que possibilita a utilização do laser em níveis baixos, evita a elevação de temperatura e conseqüentemente, o estresse oxidativo, normalmente por isso são bons fluoróforos para células vivas (Neto, Carvalho e Correa, 2015).

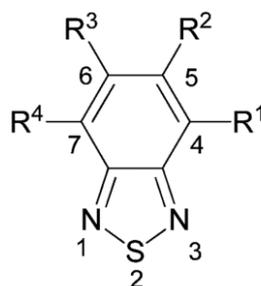


Figura 3: Estrutura geral de um 2,1,3-benzotriazol (BTD) e posições substituíveis em processos de sínteses de compostos fluorescentes. (Adaptado de Cruz *et al.*, 2014.)

1.2. Aplicação de sondas fluorescentes em modelos biológicos

As primeiras amostras biológicas a serem observadas por fluorescência foram aquelas que espontaneamente apresentaram esse fenômeno: plantas, bactéria e tecido animal. Em 1914 foi realizada pela primeira vez a ligação de quimiosensores fluorescentes à células, capacitando essas a emitir luminosidade (Wittekind, 1983). Desde então, sondas fluorescentes têm sido empregadas no estudo de organelas e biomoléculas celulares por meio da microscopia de fluorescência, pois permitem a visualização dessas estruturas celulares que, em geral, não podem ser vistas nas análises por microscopia de luz tradicional (Terasaki *et al.*, 2001; Grienberger & Konnerth, 2012)

A maioria dos processos celulares é dependente da atuação de íons os quais estão envolvidos em eventos essenciais para a manutenção da vida das células como a polarização das membranas plasmáticas, controle osmótico, transdução de sinais, controle da expressão gênica, transporte de glicose, propagação de impulsos nervosos, dentre muitos outros processos (Ouyang *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2010). Sensores fluorescentes seletivos para íons têm sido amplamente empregados em modelos biológicos. Entre os que apresentam maior variedade de aplicações estão os fluoróforos seletivos para Ca²⁺, íon que tem papel fundamental como segundo mensageiro em óvulos, miócitos e neurônios, incluindo fluo-3, rhod-2, o ácido 1,2-bis-(2-aminofenol) etano-N,N,N',N',-tetracético (BAPTA) e a Oregon Green[®] 488 (Kim *et al.*, 2007; Minta, Kao e Tsien, 1989).

Partindo para aplicação em organelas, as sondas mais utilizadas são os marcadores nucleares. Estas podem ser empregadas na detecção do volume nuclear ou na análise quantitativa de material genético para determinação de fases do ciclo celular, também são empregados marcadores diferenciais de cromossomos em cariotipagem e como

marcadores para a detecção de moléculas de DNA em géis após separação eletroforética (Doan *et al.*, 2015; Kafri *et al.*, 2013; Padovan-Merhar *et al.*, 2015; Sambrook e Russell, 2003). Entre os principais exemplos desses fluorocromos incluem-se a sonda Hoestch, o iodeto de propídio, o Brometo de etídio e o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Kapusinski, 1995), além disso, por não ser permeável às membranas intactas das células vivas, esta característica o torna um bom indicador de viabilidade celular por exclusão (Cheng *et al.*, 2007).

Exemplos de sondas para organelas celulares incluem as que apresentam especificidade para a mitocôndria (Kawazoe *et al.*, 2011) ; (Carvalho *et al.*, 2014). O marcador comercial, mais amplamente utilizado para esta finalidade é o MitoTracker[®]. Esta sonda permeia a célula sendo oxidada no citoplasma e sequestrada pelas mitocôndrias, onde reage com grupos tióis de proteínas e peptídeos ali presentes formando conjugados fixados por aldeídos. Existem outros marcadores com diferentes mecanismos de associação à esta organela dentre os quais podemos citar a rodamina-123 e a tetrametilrodamina (Carvalho *et al.*, 2014; Wessendorf e Brelje, 1992; Wolf *et al.*, 1993).

Diferentes fabricantes vêm produzindo ao longo dos anos marcadores para virtualmente todos os compartimentos celulares. O retículo endoplasmático pode ser rastreado pelas sondas ER-Tracker Green, ER-Tracker Red (Shen *et al.*, 2011). Endossomos tardios e lisossomos podem ser identificadas pelo marcador fluorescente LysoTracker[®]. A molécula tende a sofrer protonação no interior destas organelas e nessa condição eletrônica se torna impermeável à membrana lipídica da organela, se acumulando no interior destas e produzindo intensa emissão fluorescente (Song *et al.*, 2008). A atividade de lisossomos tem sido pouco estudada, apesar de sua importante atuação biológica e de suas relações com diversas doenças, tais como, desordens musculares, doenças hepáticas, neurodegenerações e alguns tipos de câncer (Hesselink, 2003; Orr e Oddo, 2013; Shintani, 2004). Por esta razão as técnicas com emprego de fluorescência tem sido utilizadas rotineiramente no diagnóstico pré-natal de defeitos enzimáticos hereditários e, especialmente, de doenças de depósito lisossômico (Noorden, van, 1991; Raben *et al.*, 2009).

Outros eventos associados à atividade de lisossomos podem ser avaliados com o uso simultâneo de diferentes sondas. Na identificação da autofagia de organelas específicas por exemplo, tais como a mitofagia e a lipofagia são empregadas combinações

de marcadores, tais como o MitoTracker para mitocôndrias e sondas fluorescentes para corpúsculos lipídicos, como o NileRed. Estas sondas podem ser utilizadas conjuntamente com anticorpos conjugados a fluorocromos específicos contra proteínas associadas ao metabolismo lisossomal para a detecção de autofagossomas (Warnes, 2015).

A autofagia é um processo catabólico essencial à “reciclagem” de organelas da célula e dependente dos lisossomos para a degradação desses componentes. Abordagens utilizando citometria de fluxo permitem avaliações quantitativas de fluorescência em populações de células, de modo a mensurar esse processo de degradação de componentes celulares através da detecção de atividades enzimáticas (Noorden, van, 1991). Nesse caso, um substrato artificial que produz um produto final de reação fluorescente, é precipitado no local do seu alvo celular: no caso da avaliação de autofagia, essa reação de precipitação ocorre entre o substrato artificial e as enzimas lisossomais. Concomitantemente o autofagossoma é marcado por um anticorpo específico acoplado a um fluorocromo, o qual emite fluorescência em um comprimento de onda diferente do substrato artificial empregado, de modo que, a quantidade de produto é analisada nas células com dupla emissão de fluorescência, permitindo quantificar o processo de autofagia (Shvets e Elazar, 2009).

Os corpúsculos lipídicos são organelas contendo ácidos graxos e lipídios neutros que servem de reserva energética para as células. Os marcadores mais empregados para o estudo dessas organelas são os fluoróforos da família BODIPY, o nitrobenzoxadiazol (NBD) e o 5-(DimetilAmino) Naftaleno-1-Sulfonil cloro (Dansyl) (Sankaranarayanan *et al.*, 2011; Spangenburg *et al.*, 2011; Zhai *et al.*, 2014). Ácidos graxos são naturalmente anfifílicos e consistem de uma cadeia hidrofóbica e uma cabeça hidrofílica (Chemistry MSU, 2016), de modo que há duas regiões na molécula nas quais as sondas fluorescentes podem se associar. Quando um marcador se liga na região hidrofóbica do lipídio, a sonda irá modificar o balanço hidrofílico/hidrofóbico da molécula lipídica, dificultando ou mesmo impedindo avaliações de certos processos, como por exemplo, fusão de membrana (Maier, Oberle e Hoekstra, 2002).

A partir de abordagens combinatórias de química computacional uma “biblioteca” contendo 13 marcadores com afinidade para lipídios neutros foi desenvolvida (Ahn, Lee e Chang, 2007). Constituída como um grupo de moléculas com afinidade para lipídios neutros, a classe BODIPY compreende um conjunto de sondas não influenciáveis pelo pH, com baixa solubilidade em água e amplamente utilizadas para a marcação de

corpúsculos lipídicos celulares (Zhai *et al.*, 2012). Entretanto, essas sondas apresentam reduzida fotoestabilidade e produzem elevado ruído nas marcações, o que limita sua aplicação *in vivo* e em células vivas (Neto, Carvalho e Correa, 2015).

Os fluorocromos aqui citados estão agrupados na classe de "fluoróforos sintéticos pequenos" (Kobayashi e Choyke, 2011). Existe ainda a classe dos "marcadores de origem animal" constituída por moléculas grandes de até 50 kDa, que são proteínas como a mCherry (uma versão melhorada da "Red Fluorescent Protein" (RFP) (Shaner *et al.*, 2004) e a "Green Fluorescent Protein" (GFP) (Hoffman, 2015; Kalyanaraman *et al.*, 2012). Existe também uma classe de nanocristais fluorescentes (*quantum dots*) composta por estruturas nanométricas com propriedades como ultra brilho e resistência à fotodegradação (Chinen *et al.*, 2015; Pinaud *et al.*, 2010).

Neste trabalho, o foco foi direcionado para a classe de fluoróforos sintéticos pequenos, pois estes constituem a maior parte das sondas fluorescentes comerciais e estando na faixa de peso molecular (entre 300 a 2000 Da) e de amplo emprego em microanálises de amostras biológicas.

1.3. Modelos utilizados neste trabalho

1.3.1. *Caenorhabditis elegans* e estudos de anatomia

Os *Caenorhabditis elegans* são nematódeos de vida livre com um plano corporal simples e facilmente mantidos e manipulados no laboratório. A transparência do corpo, a constância da organização dos órgãos e células entre diferentes indivíduos e o genoma relativamente pequeno são vantagens que permitem o estudo elaborado do desenvolvimento deste organismo (Brenner, 1974; Ellis e Horvitz, 1986; Wood, 1988a). Muitos paralelos existem entre a os mecanismos moleculares destes nematódeos e mamíferos, como os mecanismos de regeneração de tecidos e a morte celular programada ou apoptose (Driscoll, 1996). Além disso, este organismo possui um comportamento complexo regulado por um sistema nervoso que não existe em modelos biológicos de cultivos celulares (Wicks e Rankin, 1995). O arcabouço de literatura sobre este organismo é extenso e permite um bom embasamento de novos experimentos. Desta forma, os *C. elegans* são excelentes modelos de estudos para avaliar a aplicação de fluoróforos sintéticos, sendo uma alternativa ao uso de células cultivadas *in vitro* (Riddle, 1997).

Os *C. elegans* (Figura 4) possuem um plano corporal que são basicamente dois tubos concêntricos separados por um fluido denominado de pseudoceloma. O tubo

externo é composto, de fora para dentro, por uma cutícula de colágeno secretado pela hipoderme e em seguida por uma camada de tecido muscular entremeada pelo sistema nervoso que se distribui ao longo do corpo, e ainda por um sistema secretor-excretor. O tubo interno é composto pelo sistema alimentar e sistema reprodutor (Wood, 1988b).

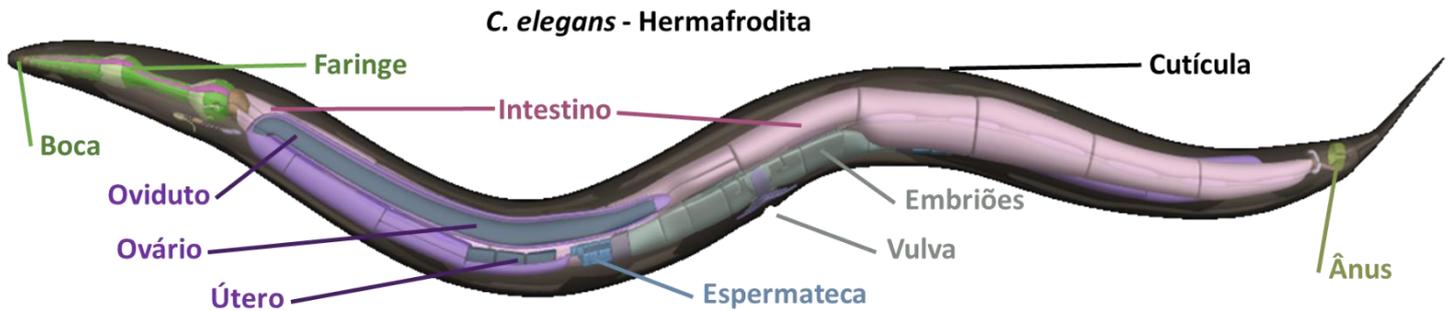


Figura 4: Anatomia do *C. elegans* (“OpenWorm”, [s.d.]) Adaptado.

O sistema alimentar (Figura 4) é composto pela faringe na região da cabeça, seguida pelo intestino que se estende ao longo do corpo até o ânus. A faringe é responsável pela filtração de bactérias do fluido ingerido, que são a fonte alimentar primária do animal. Na região final da faringe observa-se o órgão mastigador, que serve como uma válvula de controle da entrada de alimento no intestino. O intestino é um dos maiores órgãos do corpo do animal, sendo composto por um lúmen interno e o tecido intestinal ao redor deste. A mucosa do intestino é composta por células epiteliais colunares que são responsáveis pela absorção do alimento digerido (Riddle, 1997).

Existem múltiplas camadas subepiteliais contendo tipos celulares diversificados que realizam múltiplas funções associadas a alimentação, como a síntese de enzimas digestivas que são secretadas no lúmen do intestino para facilitar a digestão alimentar e a reserva de energia na forma de gorduras (triacilgliceróis e colesteróis) associadas a lisossomos em um tipo celular rico em organelas denominadas grânulos intestinais ou “*gut granules*” (Schroeder *et al.*, 2007). Outra função conhecida desses grânulos é manter uma reserva de zinco que é importante em processos de detoxificação do corpo do nematódeo (Roh *et al.*, 2012). Os grânulos intestinais são facilmente visualizados a partir da incidência de luz UV, sob a qual emitem fluorescência no espectro azul, aparecendo com abundância na região intestinal imediatamente posterior à faringe, mas também ocorrem ao longo de todo tubo intestinal (Coburn e Gems, 2013). Outra grande reserva

de energia são as gotículas de gordura ou “*lipid droplets*”, que são organelas contendo triacilgliceróis neutros. Estas podem (ou não) colocalizarem com grânulos intestinais. Os corpúsculos lipídicos também ocorrem em outros tecidos do nematódeo, como por exemplo nas camadas subdermais do epitélio cuticular (Zhang *et al.*, 2010).

Existem duas formas sexuais de *C. elegans*: hermafroditas (XX) e machos (XO). O sistema reprodutor de hermafroditas é composto por uma grande estrutura bilobada (“dois braços”) próximo ao intestino. Cada braço se estende a partir de uma região central do corpo, onde existe uma abertura para o lado externo do corpo, a vulva, que é utilizada na fecundação e liberação dos embriões formados dentro do útero. A maturação dos ovócitos ocorre da extremidade dos braços (ovários) em direção à vulva, passando pelo oviduto e região uterina (Wood, 1988b). A fecundação ocorre quando um indivíduo macho ou o próprio hermafrodita inserem a estrutura reprodutiva masculina dentro da vulva e então injetam os espermatozóides na região uterina. Parte do fluido seminal é retido em uma estrutura uterina denominada espermateca, onde os espermatozóides são mantidos para realizar a fecundação controlada de ovócitos ainda em maturação. Os ovos em formação são mantidos na região uterina, onde estes se desenvolvem até formarem embriões maduros, estes últimos então são liberados a partir da vulva para o meio externo onde se desenvolvem como indivíduos independentes (Riddle, 1997).

Os tecidos associados ao sistema reprodutor destes nematódeos apresentam uma grande quantidade de organelas associadas a reserva de lipídios, as quais são relevantes para o seu desenvolvimento embrionário (Mak, 2012; Hou e Taubert, 2012). Os *C. elegans* neonatos (L1) emergem de seus ovos após liberação e durante o seu desenvolvimento passam por 4 estágios larvais (L1 a L4) até atingir a fase adulta, cada estágio tendo duração média de aproximadamente 10 horas e terminando em uma troca de pele (*moulting*). A maior diferença entre os estágios larvais e adultos é o tamanho das gônadas, que é composto por 4 a 10 grandes células em L1 e gradualmente torna-se o segundo maior órgão de adultos hermafroditas (Sulston, 1976). Considerando as diferenças entre o metabolismo encontrado em cada fase do desenvolvimento larval e do nematódeo adulto (Hyun *et al.*, 2016), e também por esta espécie não possuir um tecido especializado em estoque de lipídios, como o tecido adiposo encontrado em mamíferos, estes organismos se tornaram excelentes modelos para o estudo de estoque, mobilização e dinâmica de lipídios (Jones e Ashrafi, 2009; Mullaney e Ashrafi, 2009)

1.3.2. *Baculovirus e a infecção celular*

Os baculovírus são vírus de DNA dupla fita circular que infectam a fase larval de artrópodes, em especial da ordem Lepidoptera que representam as borboletas e mariposas. Estes vírus de inseto tem ampla utilização comercial como agentes de controle biológico no campo para controlar pragas desfoliadoras (Moscardi, 1999) e como vetor de expressão de proteínas heterólogas de interesse (O'Reilly, Miller e Luckow, 1993).

Uma das principais características da infecção causada pelos baculovírus é a capacidade de formarem dois fenótipos virais infectivos (Figura 5): o primeiro ocorre na fase tardia em que o vírus é brotado pela membrana plasmática e contém o nucleocapsídeo e um envelope de membrana “*Budded Virus*” ou BV, o segundo fenótipo ocorre na fase muito tardia e é o vírus derivado de oclusão “*Oclusion Derived Virus*” ou ODV em que os capsídeos virais retidos no núcleo são envolvidos em um envelope de membrana, esta por sua vez produzida no núcleo mesmo, por mecanismos de controle viral. Ainda na fase muito tardia e dentro do núcleo, os ODVs envolvidos no envelope de membrana são embebidos em uma matriz cristalina formada pela hiperexpressão da proteína viral poliedrina (POLH), gerando então os corpos de oclusão ou poliedros “*Oclusion Bodies*” ou OB (Miller, 1997). Os corpos de oclusão são estruturas de resistência responsáveis por garantir a sobrevivência do vírus no campo na ausência de hospedeiros suscetíveis (O'Reilly, Miller e Luckow, 1993).

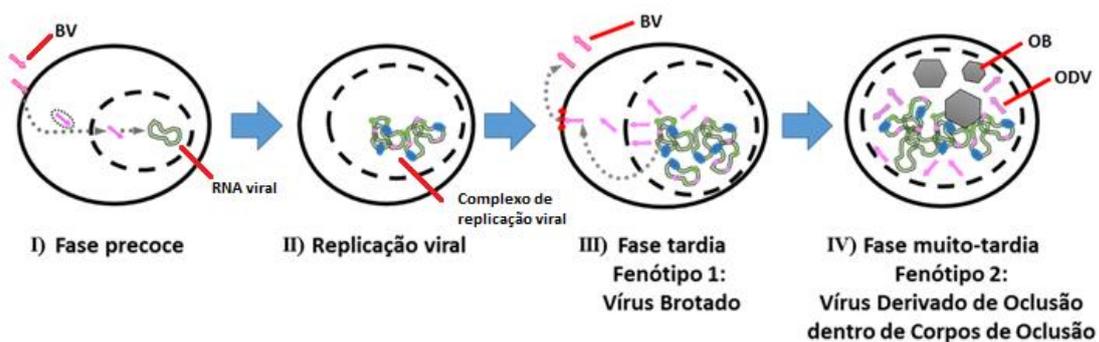


Figura 5: Descrição do progresso e os eventos principais da infecção celular por baculovírus. (I) Adsorção na membrana celular, entrada do vírus e trânsito ao núcleo. (II) Replicação viral, expressão da proteína viral poliedrina e acúmulo desta no núcleo. (III) Trânsito de vírions à membrana celular e liberação de BVs. (IV) Formação de envelope da partícula ODV e oclusão destes na matriz proteica com a formação de OBs.

No campo, o ciclo de infecção inicia-se com a ingestão de poliedros por uma larva de borboleta ou mariposa e a dissolução da matriz proteica dos OBs no intestino médio da larva, liberando o fenótipo viral ODV que irá realizar a infecção primária em células colunares do intestino. Estas primeiras células infectadas replicam e proliferam o baculovírus de forma sistêmica pelo corpo da larva através do fenótipo viral BV. O resultado final da infecção secundária é a abundante produção de OBs em diversos tecidos da larva que, após morrer, libera estes corpos de oclusão no meio ambiente para infectar novos hospedeiros larvais suscetíveis (Passarelli, 2011). Os baculovírus mais estudados no mundo são o *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) e o *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV), tendo como hospedeiros originais a larva da alfafa (*Autographa californica*, Noctuidae) e o bicho da seda (*Bombyx mori*, Bombycidae, Rohrmann, 2013), respectivamente. Existe uma enorme diversidade de mariposas e borboletas no campo e em contrapartida observa-se uma equivalente diversidade de baculovírus causando infecção em apenas uma espécie da ordem Lepidoptera, desta forma argumenta-se que os baculovírus possuem um limitado espectro de hospedeiros no campo (Herniou *et al.*, 2004; Jehle *et al.*, 2006).

A infecção de células derivadas de Lepidoptera e cultivadas *in vitro* pelos baculovírus é uma importante ferramenta nos estudos da interação entre patógeno e hospedeiro, o que permitiu elucidar inúmeros mecanismos moleculares da infecção baculoviral (Rohrmann, 2013). Um tema ainda pouco compreendido são as defesas celulares contra a infecção e os fatores determinantes da suscetibilidade à infecção de determinado baculovírus. Já é conhecido que os baculovírus possuem um tropismo específico em tecidos larvais, com preferência por células de gordura e da hemolinfa, onde produzem abundante progênie viral, e pouca infectividade a tecidos neuronais e túbulos de Malpighi (Passarelli, 2011; Wang *et al.*, 2008).

Além disto, os baculovírus possuem um espectro *in vitro* de células hospedeiras que varia de acordo com a espécie de baculovírus e a linhagem que este irá infectar. Assim, convencionou-se descrever células como permissivas (que permitem a replicação do DNA viral e formam abundantes fenótipos infectivos), semipermissivas (que permitem replicação do vírus mas formam apenas um dos fenótipos infectivos ou baixa quantidade de fenótipos) e não-permissivas (que bloqueiam a replicação viral e/ou não formam progênie infectiva) (Du e Thiem, 1997; Katou, Ikeda e Kobayashi, 2006; Mukherjee *et al.*, 1995).

Em células permissivas, a infecção resulta no controle do metabolismo energético da célula (Monteiro *et al.*, 2012) e seus mecanismos inatos de defesa antiviral durante a fase precoce da infecção, seguido pela replicação viral e ampla expressão de genes estruturais que irão formar as proteínas do capsídeo viral e demais estruturas da fase tardia (Morris e Miller, 1993; Rohrmann, 2013). Já em células semipermissivas e não-permissivas, o baculovírus entra na célula e expressa os genes da fase precoce mas estes falham em controlar completamente o metabolismo celular, resultando em eventos que reduzem a progênie viral, como a morte celular programada ou apoptose (Clem, 2007). Portanto, o progresso da infecção em determinado ambiente celular, requer a ação de fatores de virulência que sejam funcionais em hospedeiros específicos.

Um exemplo de fator determinante do espectro de hospedeiros é o gene *p35* encontrado em AcMNPV e BmNPV, que codifica uma proteína com atividade antiapoptótica, essencial para inibir a via de ativação das Caspases celulares que induzem a morte celular programada (Clem, 2007). Baculovírus com genes *p35* defectivos ou em infecções de células em que este gene não é eficaz resultam em apoptose, em detrimento da replicação viral e produção dos fenótipos virais (LaCount e Friesen, 1997). Desta forma, o mesmo baculovírus pode gerar uma infecção completa ou abortiva, dependendo da eficácia de seus genes de virulência contra uma mesma linhagem celular.

Na linhagem semipermissiva Ld652Y derivada de *Lymantria dispar*, ocorre um fenômeno peculiar durante a infecção pelo AcMNPV, em que a célula bloqueia ou reduz a síntese de proteínas tanto celulares quanto virais, inibindo ou atrasando o progresso da infecção viral (Morris e Miller, 1993). Neste caso, a replicação viral ocorre mas a produção de progênie viral é afetada drasticamente, reduzindo o título viral de BVs durante a fase tardia e abolindo a produção de corpos de oclusão em momentos muito tardios da infecção (Du e Thiem, 1997).

A infecção de células Bm5 derivadas de *Bombyx mori* pelo baculovírus AcMNPV resulta em uma infecção abortiva. Nesta linhagem celular não-permissiva a este vírus, ocorre a expressão de genes precoces, mas não ocorre a replicação do genoma viral, portanto a infecção não avança para a fase tardia onde ocorreria a produção dos fenótipos infectivos. O bloqueio da replicação está associado ao gene *helicase*, que é um elemento essencial do complexo proteico de replicação do DNA viral que não é funcional nesta linhagem (Argaud *et al.*, 1998). Desta forma, o vírus AcMNPV causa uma perturbação no ambiente celular de Bm5 que pode resultar em necrose da célula após 96 horas de

infecção (Castro *et al.*, 1997), mas não ativa a via apoptótica devido à presença do gene antiapoptótico *p35*. Por outro lado, a linhagem Bm5 é completamente permissiva à infecção pelo vírus BmNPV, produzindo os dois fenótipos virais de forma abundante (Xue *et al.*, 2012).

Um tema muito pouco estudado é a capacidade dos baculovírus em manipular o metabolismo celular de forma a maximizar o consumo das reservas energéticas como gorduras e glicogênio, acumulados nas células antes da infecção viral ocorrer. Sabe-se que os baculovírus são capazes de induzir aumento na taxa de respiração celular e consumo de glicose, ampliando a produção de ATP e NADH pela mitocôndria (Monteiro *et al.*, 2012). No entanto, pouco é conhecido sobre os efeitos da infecção celular sobre a captação e consumo de gorduras, uma reserva comum de energia química celular. Isto possui grande relevância para a área pois como foi comentado anteriormente, nas infecções de larvas os baculovírus possuem forte tropismo por tecidos gordurosos o que nos leva a pensar que podem existir mecanismos virais da infecção capazes de manipular o metabolismo de gorduras acumuladas neste tipo celular assim revertendo a energia resultante em maior produção da progênie viral.

Utilizamos o sistema baculovírus e células de inseto como um modelo manipulável, onde existem diferentes condições induzíveis dependendo da combinação entre vírus e célula hospedeira suscetível ou não. Desta forma, foi possível induzir distintas perturbações nas células através dos diferentes vírus utilizados e avaliar a marcação dos fluoróforos em condições normais, de estresse celular, apoptose e completamente infectadas.

1.4. Derivados de bezotiadiazol e suas aplicações

Derivados do núcleo BTB vêm apresentando resultados com ótimas perspectivas para suas aplicações. Além das características deste núcleo já descritas anteriormente, outras particularidades da molécula corroboram a aplicabilidade biológica para heterociclos sintéticos de BTB (Neto, Carvalho e Correia, 2015)

Nosso grupo vem produzindo e avaliando diversos compostos derivados de BTB que são biologicamente ativos (Guido *et al.*, 2015; Mota, 2015) e que também apresentam fluorescência, possibilitando aplicações em imageamento celular. O grupo já alcançou resultados bastante satisfatórios quanto a síntese, purificação e aplicação dos derivados

de BTD (Carvalho *et al.*, 2014; Neto, Carvalho e Correa, 2015; Neto, Corrêa e Silva, 2013; Oliveira *et al.*, 2010). Em 2007 foi publicado um estudo com a síntese de um heterociclo sintético de BTD com propriedade para marcar ácido desoxirribonucleico (DNA) podendo tanto ser usado como uma alternativa ao emprego do DAPI quanto para análises por PCR em tempo real (Brenno A. D. Neto *et al.*, 2007). No ano de 2010 o grupo publicou outro estudo demonstrando síntese e aplicação de dois biomarcadores, o BTD-BT e o BTD-BI, também bastante específicos para DNA nuclear (Oliveira *et al.*, 2010)

Em 2012 foi produzido o derivado BTD-Py-Me com alta afinidade para mitocôndrias, porém baixa intensidade de fluorescência. Logo após, através de algumas modificações em sua estrutura química, foram gerados a partir desse os derivados BTD-Shiny, BTD-H e BTD-Br com melhor intensidade de emissão de fluorescência (D. Neto *et al.*, 2012)

Também foi desenvolvido pelo nosso grupo o biomarcador BTD-AO, o qual apresentou como principal design estrutural sua natureza lipofílica. Esta característica favoreceu a captura de ácidos graxos em células vivas a baixas temperaturas (4 °C) nas quais as vias endocíticas estão completamente inibidas, elucidando o papel de processos dinâmicos de internalização deste lipídio (Lopes *et al.*, 2014).

Através de aplicação da química computacional foi possível criar outro derivado de BTD com alta seletividade para mitocôndrias em células vivas o que proporcionou a marcação dessas organelas durante a fase de divisão celular. Além disso, cálculos de *docking* molecular demonstraram que a seletividade desse derivado BTD está associada à sua interação com o translocador de nucleotídeos de adenina. A sonda sintetizada, denominada “*Splendor*”, foi comparada com o fluorocromo comercial MitoTracker, demonstrando maior especificidade mitocondrial, melhor intensidade de fluorescência e maior estabilidade química (Neto, Carvalho e Correa, 2015).

Outros grupos também alcançaram excelentes resultados com derivados de BTDs. Foi demonstrada marcação citoplasmática em células RAW 264.7 a partir de micelas contendo BTD com emissão em vermelho (Tian *et al.*, 2010). Em outro estudo publicado foi explorado o efeito sequestrador de energia ou “*quenching* molecular” como ferramenta de análise. Um derivado de BTD foi sintetizado para distinguir células normais de cancerígenas. Denominado BTD-NO₂, a presença de dois grupos nitro no núcleo de benzotiadiazol torna essa molécula não fluorescente, porém, em condições de hipóxia celular, a presença de BTD-NO₂ causa um aumento da expressão de nitroreductase,

a qual reduz os grupos nitro dentro da célula a BT-D-NH₂, essa por sua vez emite fluorescência em vermelho. O “*quenching*” foi aqui explorado de modo que a molécula não fluorescente pudesse identificar seletivamente células tumorais em hipóxia (Jiang *et al.*, 2013).

Um dos desafios em pesquisas com bioimageamento está nas limitações dos marcadores disponíveis, que dificultam estudos sobre a incorporação lipídica e o seu metabolismo. Apesar do uso de sondas como o BODIPY que são marcadoras de moléculas com base lipídica, a seletividade pode não ser satisfatória. Os quimiosensores NBDs, também voltados à marcação de lipídios, apresentam reduzida vida útil quando diluídos em solventes e por fim, os fluoróforos Dansyl se associam principalmente nas regiões de cabeça polar da bicamada lipídica; por essa razão, a sonda também pode se ligar a proteínas, e a seletividade esperada fica altamente comprometida (Goretta *et al.*, 2012; Jha *et al.*, 2015; Neto, Carvalho e Correa, 2015).

Até o momento não foram descritas marcações fluorescentes usando núcleos de BT-Ds específicas para lisossomos, endossomos e retículo endoplasmático. Entretanto o estado atual dos fluorocromos, derivados do núcleo BT-D já descritos, estão transitando do estágio de prova de princípio para a adoção pela comunidade científica.

A glicoconjugação é uma abordagem utilizada em síntese de moléculas quirais fluorescentes como parte de processos de desenvolvimento de fluorocromo (Hein *et al.*, 2009). Triazóis derivados de açúcar são substâncias frequentemente envolvidas em reações de glicoconjugação denominadas por cicloadição de azidas-alcinos catalizados por cobre (CuAAC) (Mamidyala e Finn, 2010). A tentativa de desenvolver fluorocromos derivados do núcleo BT-D ligados a esses glicoconjugados levou à síntese de duas moléculas denominadas aqui de G2 e X2 (Figura 6). Estas apresentaram excelente potencial de aplicação óptica ao combinarem alto coeficiente de extinção molar de absorção, amplo desvio de Stokes e alta emissão de fluorescência da molécula.

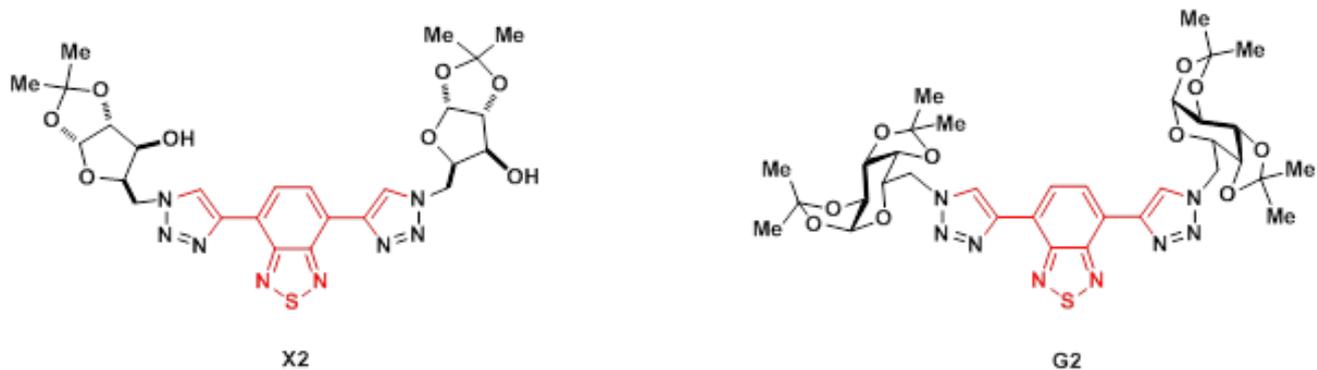


Figura 6: Estrutura espacial dos derivados de BTD G2 e X2 (Adaptado de Moro *et al.*, 2012). À esquerda observa-se o composto X2 constituído por duas moléculas de Xilose (em preto) acopladas por dois radicais triazóis a um núcleo BTD (em vermelho). À direita observa-se o composto G2 constituído por duas moléculas de Galactose (em preto) acopladas por dois radicais triazóis a um núcleo BTD (em vermelho).

Dadas as diversas possibilidades de aplicações para uma sonda fluorescente, tanto no campo da química quanto nas áreas biomédicas, o delineamento de uma sonda fluorescente através da química computacional, a sua síntese e finalmente a validação biológica (prova de conceito), são etapas essenciais ao processo de desenvolvimento de uma sonda fluorescente de potencial comercial. Este trabalho visou contribuir com o processo de produção de agentes fluorescentes através do estudo da especificidade e da determinação de aplicações dos fluoróforos derivados de BTD glicoconjugados: G2 e X2.

Através de diferentes modelos experimentais e simulando diversas condições biológicas foram realizados ensaios em células de mamíferos vivas e fixadas, em *C. elegans in vivo e in vitro* e em células de inseto cultivadas *in vitro* e infectadas com baculovírus. Esses estudos demonstram que fluorocromos derivados de BTD podem ser eficazes para aplicação em pesquisas que visam compreender fenômenos biológicos e de patologia molecular.

2. JUSTIFICATIVA

Embora muito progresso tecnológico aplicado ao imageamento celular tenha sido alcançado, os fluoróforos continuam desempenhando papel central para análises da arquitetura de elementos celulares e teciduais nas condições normais e patológicas. Além disso as aplicações destes agentes fluorescentes permeiam diversas áreas sendo usados em análises qualitativas e quantitativas de material genético, determinação de perfil de expressão de proteínas em géis bidimensionais, em estudos citogenéticos, dentre outros. O desenvolvimento de agentes fluorescentes é um processo lento, cujas moléculas devem apresentar diversas características favoráveis como solubilidade em água, permeabilidade às membranas celulares, ausência de citotoxicidade somadas a sua alta especificidade. Essas características são essenciais para o emprego desses agentes em amostras biológicas. O Brasil é um grande mercado consumidor para agentes fluorescentes, mas a produção destas moléculas em território nacional é incipiente. Nosso grupo vem trabalhando com os derivados do benzotiadiazol (BTD) há alguns anos, e temos produzido com sucesso moléculas que atendem a várias características essenciais que qualificam um ótimo agente fluorescente. Adicionalmente, as reações que geram tais produtos apresentam alto rendimento, são de baixo custo e podem ser facilmente escalonadas para produção destas moléculas em escala industrial. Nesse contexto, este trabalho apresenta a aplicação biológica de duas estruturas inéditas acopladas ao marcador fluorescente BTD.

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo determinar formas de aplicações e estudar a especificidade de dois fluoróforos derivados de benzotiadiazol glicoconjugados, denominados G2 e X2.

3.1. Objetivos Específicos

3.1.1. Investigar o potencial dos derivados de BTD G2 e X2 para aplicação em células através de microscopia de fluorescência.

3.1.2. Avaliar a citotoxicidade *in vitro* desses derivados do núcleo de BTD.

3.1.3. Estudar *in vitro* a especificidade dos derivados G2 e X2.

3.1.4. Comparar *in vitro* os perfis de fluorescência dos derivados G2 e X2 com sondas fluorescentes comerciais de referência.

3.1.5. Avaliar o potencial de aplicação *in vivo* dos derivados G2 e X2.

3.1.6. Avaliar a eficácia dos compostos para aplicação em pesquisa.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Células de mamíferos

As células de mamíferos utilizadas no experimento foram MDA-MB-231, MCF-7, CACO-2, DU-145, HUVEC e Fibroblastos de polpa dentária humana. Segundo a American Type Culture Collection (ATCC), separadamente, as células de linhagem podem ser definidas como: CACO-2, constituída por células epiteliais heterogêneas de adenocarcinoma colo-retal humano; DU-145, caracterizada por células epiteliais de câncer de próstata com moderado potencial metastático e que não expressam o Antígeno Prostático Específico (PSA); MCF-7, células epiteliais derivadas de sítio metastático pleural de adenocarcinoma glandular mamário, que apresentam receptor de estrógeno α (ER- α); MDA-MB-231, linhagem constituída por células epiteliais derivadas de carcinoma ductal invasivo da glândula mamária e, por fim, as células Endoteliais de Veia Umbilical Humana (HUVEC), não-tumorais e derivadas de tecido vascular do cordão umbilical que apresentam morfologia endotelial e são geralmente utilizadas em estudos de angiogênese. Os fibroblastos utilizados no experimento constituem células normais de cultivo primário, diferenciadas a partir de células tronco presentes em tecido vivo retirado da câmara pulpar dentária.

4.2. Células de insetos

As células de insetos empregadas nesse estudo foram: Sf9, Ld652Y e Bm5. Individualmente podem ser definidas como: linhagem Sf9 derivada da linhagem IPLB-Sf21-AE, a qual por sua vez deriva de ovário de pupas de *Spodoptera frugiperda*; células IPLB-Ld652Y (Ld652Y) derivadas de ovários de pupas de *Limantria dispar* e Bm5 derivada de ovários de pupas de *Bombyx mori* crescidas em meio Grace (Vaughn *et al.*, 1977; Goodwin *et al.*, 1978; Grace, 1967).

A linhagem Sf9 foi modificada no laboratório de Baculovírus da Universidade de Brasília (UnB) para expressar a proteína fluorescente mCherry e localizar esta de forma específica no núcleo pela fusão com a sequência de aminoácidos que forma o sinal de localização nuclear da proteína Polyhedrin (POLH) do baculovírus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV, Katsuma *et al.*, 2000). O gene mCherry modificado foi clonado sob o comando do promotor constitutivo de *Drosophila melanogaster* HSP70 em um plasmídeo contendo o gene de resistência à Puromicina. O

plasmídeo foi transfectado em células Sf9 cultivadas em meio contendo Puromicina, a população sobrevivente ao tratamento com Puromicina passou por sucessivas passagens até garantir uma linhagem estável onde todas as células expressam constitutivamente a proteína mCherry apenas no núcleo celular (Laboratório de Baculovírus, dados não publicados).

4.3. *C. elegans*

Os *Caenorhabditis elegans* foram cultivados em laboratório, mantidos a 20°C em placas de Petri semeadas com o meio de crescimento para nematódeos “*Nematode Growth Medium*” (NGM). Como fonte de alimento foi disponibilizada a cepa *E. coli* (NA22) em suspensão no meio líquido Luria-Bertani (LB), o qual é utilizado em laboratórios para o cultivo de cepas recombinantes de *Escherichia coli*. Conforme necessidade dos experimentos e a confluência de nematódeos no meio NGM os *C. elegans* eram transferidos para novas placas e as coletas dos nematódeos para utilização nos experimentos eram realizadas com solução tampão M9. As transferências de vermes para novas placas, as preparações da cepa bacteriana e do meio líquido LB, bem como, do meio de crescimento NGM e da solução tampão M9, foram realizadas seguindo-se o protocolo de cultivo e manutenção de *C. elegans* recomendado em: Stiernagle, T. Maintenance of *C. elegans* (February 11, 2006), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.101.1.

4.4. Reagentes

Os reagentes e outros materiais utilizados no cultivo e manutenção dos nematódeos foram: Ágar, Colesterol, Extrato de Levedura, Peptona, Triptona, Cloreto de Sódio (NaCl), Fosfato de potássio (KPO₄), (mono)Hidrogenofosfato de potássio (K₂HPO₄), (di)Hidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄), Sulfato de Magnésio (MgSO₄) e placas de Petri.

Ao longo do trabalho também foram utilizados: MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide), Molecular Probes – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA. Meio de montagem anti-decaimento da fluorescência ProLong Gold, ambos da Invitrogen – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA e DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA.

Para manutenção das culturas de células de mamíferos foram utilizados DMEM, RPMI, L-15, Soro Fetal Bovino – Gibco (FBS), Tripsina 0,25% em EDTA e solução de Piruvato de Sódio 100 µM – Sigma-Aldrich. As culturas de células de inseto foram mantidas nos meios de cultivo Grace e TC-100 suplementados com 10% de FBS

Para as marcações fluorescentes foram utilizados: os derivados do núcleo de BTB, aqui denominados de G2 e X2, sintetizados no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, (UFRGS); o marcador nuclear DAPI da Invitrogen – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA e as sondas comerciais BODIPY[®] 493/503 (Cat # D-3922) e LysoTracker[®] Deep Red 647/688 (Cat # L12492), ambas Molecular Probes[™] – ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA.

4.5. Equipamentos

As análises foram realizadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser SP5 (Leica, Wetzlar, HE, Germany). Para leitura das absorvâncias foi utilizado o equipamento Spectramax M5 e os dados numéricos analisados pelo programa SoftMax Pro 5.2, ambos da Molecular Devices, LLC, EUA. Para a quantificação da fluorescência foi utilizado o citômetro de fluxo BD Fortessa e para a análise dos dados o software FlowJo.

Análises estatísticas e gráficos foram produzidos no programa GraphPad Prism 5, GraphPad Software, Inc e as projeções 3D foram feitas pelo programa ImageJ Fiji. Para análise da morfologia celular em microscópio comum de fluorescência foi utilizado o Microscópio Axiovert e as imagens foram capturadas com o auxílio do software AxioVision 100, ambos, Zeiss, Oberkochen, BW, Germany.

4.6. Manutenção das células

As células de linhagem CACO-2, DU-145, HUVEC, MDA-MB-231 e MCF-7 foram obtidas do banco de Células do Rio de Janeiro e os fibroblastos de polpa dentária humana foram cedidos pelo Laboratório de Morfologia da Universidade de Brasília. A manutenção destas células foi feita segundo as recomendações para a cultivo celular da American Type Culture Collection (ATCC). Para os tipos celulares CACO-2, DU-145 e fibroblastos o meio de cultivo utilizado foi o Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM - Sigma Aldrich[®]) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB - GIBCO[®]) e 1% de antibiótico e antifúngico (Gibco[®] Antibiotic-Antimycotic), nas células MCF-7 e HUVEC foi utilizado o meio de cultivo Roswell Park Memorial Institute

Medium (RPMI - Sigma Aldrich®) suplementado com 20% e 10% de soro fetal bovino inativado (SFB - GIBCO®) para MCF-7 e HUVEC, respectivamente, e 1% de antibiótico e antifúngico (Gibco® Antibiotic-Antimycotic). Para a linhagem MDA-MB-231 o meio de cultivo utilizado foi o Leibovitz's (L-15 - Sigma Aldrich®) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB - GIBCO®), 1mM de Piruvato e 1% de antibiótico e antifúngico. As células foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂, exceto a linhagem MDA-MB-231 cultivada na ausência de CO₂. Para as linhagens celulares de inseto foram utilizados os meios de cultivo Grace's e TC-100 (Tissue Culture – 100 *insect medium*).

4.7. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade das amostras celulares incubadas com os compostos derivados de BTD foi determinada pelo ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) segundo as recomendações do fabricante. 3 x 10³ células de cada um dos tipos citados acima, foram semeadas por poço, em placas de 96 poços e incubadas overnight a 37°C. Após sua adesão, as células foram tratadas com diferentes concentrações (0,01 µM a 100 µM) do composto G2 ou do composto X2 em meio de cultivo a 37°C. Após 24 horas de tratamento as células foram incubadas por 4h, no escuro e a 37°C, com 150 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura) e em seguida esta solução foi retirada e 200 µL de DMSO foram adicionados à cada um dos poços para a dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas no espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA). O ensaio de MTT foi feito em triplicata para cada droga e concentração utilizada e três experimentos independentes foram realizados para cada tipo celular. A viabilidade celular foi calculada de acordo com a seguinte expressão: [Viabilidade % = [(Amostra tratada – Branco)/(Amostra controle – Branco)] x 100.

4.8. Concentração mínima de G2 e de X2 para marcação celular e padronização da solubilização dos compostos.

Os compostos X2 e G2 já purificados, foram pesados e diluídos em DMSO para uma concentração estoque de 100 mM. Posteriormente cada um foi respectivamente diluído em meio de cultivo L-15 nas seguintes concentrações: 100 µM, 10 µM e 1 µM. Esse teste inicial foi realizado em células da linhagem MDA-MB-231 para avaliação

quanto a presença ou ausência de emissão fluorescente no ambiente celular e, conseqüentemente, para a definição da concentração mínima necessária de cada fluoróforo para que houvesse emissão de sinal fluorescente detectável por microscopia confocal. A partir desse teste a concentração mínima de cada composto para marcações de células ou tecidos foi sincronicamente definida em 100 μM , tanto para o composto X2 quanto para o composto G2.

Inicialmente a diluição de cada composto ficou padronizada em 0,1% de DMSO. Para isso 1 μL da solução estoque (contendo 100 mM de G2 ou de X2 em DMSO puro) era diluído em 1 mL do meio de cultivo próprio da célula ou material biológico a ser trabalhado. A maior parte dos experimentos deste trabalho foi realizada empregando-se esta diluição (DMSO 0,1%). Entretanto, após dois anos utilizando o estoque inicial houve queda nos sinais fluorescentes as marcações com ambos os fluoróforos começaram a diminuir a intensidade do sinal fluorescente e a apresentar precipitados. Nestas condições, tornou-se necessário aumentar a concentração de DMSO nas soluções a fim de melhorar a solubilização tanto de G2 quanto de X2. Entre outros procedimentos testados (sonicador, aquecimento ou diferentes concentrações de DMSO), este foi o melhor procedimento de solubilização dos fluoróforos, possibilitando a manutenção do sinal fluorescente, os padrões de marcação já apresentados anteriormente por cada um dos compostos, ausência de marcação de fundo (para G2) e solubilização dos precipitados.

4.9. Marcação celular com os compostos fluorescentes

Para a realização das marcações fluorescentes nas amostras, as células foram plaqueadas na quantidade de 3×10^5 por poço sobre lamínulas de vidro redondas contidas em placas de 24 poços em triplicata e mantidas *overnight* para adesão. Após esse período as células foram incubadas por 30 minutos à 37°C e 5% CO_2 (com excessão da linhagem MDA-MB-231 incubada na ausência de CO_2) com o composto G2 ou com o composto X2. Cada um dos dois marcadores estava diluído na concentração de 100 μM em meio de cultivo específico para a linhagem utilizada. Após a incubação as células foram lavadas três vezes com tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 e fixadas em formaldeído 3,7% por 30 minutos à temperatura ambiente. Seguiram-se mais três lavagens com PBS e as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro com o agente anti decaimento *Prolong Gold Antifade* e as amostras foram devidamente identificadas

Para a marcação em células e organismos foi realizada a etapa de fixação em formaldeído 3,7% em PBS (para células) por 20 minutos ou em M-9 (para *C. elegans*) por 30 minutos seguindo-se por três passos de lavagem em PBS ou M-9 imediatamente antes da incubação com o fluoróforo desejado.

Para os nematódeos foi necessário realizar a quebra da cutícula por congelamento, conforme o WormBook, que consiste de 3 ciclos de imersão em nitrogênio líquido (segurando-se um criotubo contendo os *C. elegans* com uma pinça) seguidos de imersão em banho maria a 25°C.

O último passo se consitu da montagem das lamínulas contendo as células vivas ou fixadas sobre lâminas de vidro devidamente identificadas, no caso de células, ou da pipetagem de 5 gotas de 10 µL de solução contendo *C. elegans* em suspensão sobre lâminas de vidro identificadas, cobrindo-as com lamínulas contendo o agente anti decaimento *Prolong Gold Antifade*.

4.10. Comarcação de cada um dos dois derivados do BTB com o marcador fluorescente DAPI

Para a co-marcação com DAPI, no final de cada ensaio para marcação com os compostos G2 ou de X2 em células MDA-MB-231, imediatamente antes da montagem das lamínulas sobre lâminas de vidro com o *Prolong Gold Antifade* acrescentou-se mais duas etapas que consistiram em incubar essas células por 5 minutos com o marcador DAPI na concentração de 300 nM em PBS à temperatura ambiente e mais um passo de lavagem por três vezes com o com tampão PBS para, finalmente, fazer a montagem das lamínulas sobre lâminas de vidro. Na linhagem MDA-MB-231 as marcações foram realizadas em triplicata biológica. Todos os ensaios foram repetidos três vezes.

4.11. Aquisição de séries de imagens em diferentes profundidades no eixo Z e realização do corte ortogonal

Para a realização do corte ortogonal foi realizada uma sequência de imagens no eixo Z em diferentes profundidades da amostra através do Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica TCS SP5). Foram adquiridas aproximadamente 110 imagens em 2D das células aderidas e dispostas em sobreposição no eixo Z pelo software Leica Application Suite Advanced Fluorescence para a criação de uma projeção tridimensional

da amostra. Foram utilizados os campos de fluorescências e omitido o campo claro para possibilitar uma melhor visualização da distribuição das estruturas fluorescentes no interior das células e, a partir da pilha de imagens adquiridas no eixo Z, foram realizadas análises ortogonais (cortes em duas diferentes direções) a fim de se demonstrar o posicionamento espacial das marcações no interior das células

4.12. Marcações independentes de células e de *C. elegans* com o marcador de lipídios neutros BODIPY[®] ou com G2

Para a marcação com BODIPY[®] 493/503, células da linhagem celular MDA-MB-231 foram plaqueadas e fixadas conforme descrito anteriormente e em seguida incubadas com solução de BODIPY[®] 493/503 (Cat # D-3922) 1µg/mL em cada poço por 30 minutos ou com solução de G2 a 100 µM. Em seguida as células foram fixadas em formaldeído 3,7 %, lavadas 3X em PBS e as lamínulas montadas sobre lâminas de vidro conforme já descrito. As amostras foram identificadas e analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica TCS SP5).

Para a marcação de *C. elegans* com a sonda BODIPY[®] os nematódeos foram primeiramente fixados em formaldeído 3,7% por 30 minutos, lavados 3X em tampão M-9 e em seguida foi realizada a quebra da cutícula por congelamento com posterior incubação com solução de BODIPY[®] 493/503 (Cat # D-3922) 1µg/mL em solução tampão M-9 em cada poço por 30 minutos ou com G2 a 100 µM em solução tampão M-9.

4.13. Marcação de Oil Red O em células MCF-7 e em *C. elegans* e comarcação de Oil Red O e G2 em células MCF-7 e Bm5

Para a marcação de *C. elegans* com o corante Oil Red O primeiramente foi realizada a fixação dos nematódes em formaldeído 3,7% por 30 minutos, em seguida lavados 3X em tampão M-9 e efetuada a quebra da cutícula por congelamento, os *C. elegans* então foram tratados com propilenoglicol 100% por 2 minutos e incubados com Oil Red O 0,5% em propilenoglicol por 15 min, finalizando-se com 3 ciclos de lavagem em tampão M-9 e montagem em lâminas com *Prolong Gold Antifade*.

Para a comarcação de células com o marcador G2 e o corante Oil Red O as linhagens foram plaqueadas e fixadas conforme descrito anteriormente, lavadas 3X em

H₂O Mili-Q e tratadas com o BTB – G2 a 100 µM em H₂O Mili-Q com 10% de DMSO, posteriormente as células foram incluídas propilenoglicol 100% por 2 minutos e em seguida incubadas com Oil Red O 0,5% em propilenoglicol por 15 min, finalizando com 3 ciclos de lavagem em H₂O Mili-Q e montagem das lâminas com *Prolong Gold Antifade*. No caso do protocolo que usou propanodiol como diluente, inicialmente foi preparada uma solução estoque de Oil Red O a 5mg/ml em isopropanol. As células fixadas em formaldeído 3,7% foram lavadas 3X em PBS e tratadas com o BTB – G2 a 100 µM em PBS com 10% de DMSO. Para a marcação com Oil Red O, as células foram desidratadas em isopropanol a 60% por 2 minutos e em seguida incubadas com a solução corante de Oil Red O, a qual é equivalente à 60% da solução estoque de Oil Red O e 40% H₂O Mili-Q.

4.14. Tratamento de *C. elegans* in vivo com os compostos G2 ou X2

Os *C. elegans* foram mantidos em placa de NGM Agar contendo *E. coli* (NA22) a 20°C. Para os tratamentos foram separadamente adicionados às placas os fluoróforos G2 ou X2, cada qual a 500 µM em suspensão de *E. coli* (NA22) em meio LB. Os nematódeos foram incubados nos seguintes tempos: I) 12 horas com G2; II) 24 horas com G2 e III) 24 horas com X2. Após o período de incubação os nematódeos foram coletados da placa de cultivo fazendo lavagem superficial com 1,5 mL de tampão M9. Em seguida, o coletado foi transferido para um eppendorf de 1,5 mL e centrifugado por 2 minutos a 300g. Descartou-se o sobrenadante, restituindo o volume com o tampão M9, ressuspendendo o precipitado e realizando novamente a centrifugação (passo realizado três vezes para lavagem dos nematódeos e retirada das bactérias). Após o último ciclo de lavagem, os nematódeos foram incubados com 1mL de solução de formaldeído à 4% por 30 minutos à temperatura ambiente e em seguida submetidos a 3 ciclos de lavagem. Por fim, os *C. elegans* ressuspendidos em M-9 foram pipetados em lâminas e cobertos com lamínulas contendo *Prolong Gold Antifad*.

4.15. Comarcação de X2 com LysoTracker® Deep Red 647/688

Para a comarcação de células MDA-MB-231 com a sonda comercial LysoTracker® Deep Red (Cat # L12492), foi realizado o plaqueamento conforme descrito

anteriormente e posterior incubação com o marcador comercial na concentração de 75 nM em estufa a 37°C por 30 minutos e em ausência de CO². Em seguida as células foram lavadas 3X, fixadas com formaldeído 3,7% por 20 minutos, lavadas novamente e as lamínulas montadas sobre lâminas de vidro conforme já descrito.

Para a comarcação do derivado de BTD X2 com a sonda comercial LysoTracker® Deep Red (Cat # L12492), células da linhagem celular MDA-MB-231 foram tratadas com o marcador comercial de acordo com a descrição do parágrafo acima até a etapa anterior à fixação. Após, foram lavadas três vezes em PBS e incubadas com o composto X2 na concentração de 100 µM também em estufa a 37°C e por 30 minutos. Em seguida as células foram lavadas três vezes em PBS e fixadas em solução de formaldeído 3,7% seguindo-se mais três lavagens das amostras e por fim, a montagem das lamínulas sobre lâmina de vidro. As comarcações foram realizadas em triplicata biológica e as lâminas identificadas e analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica TCS SP5).

4.16. Ensaios em células de insetos

Neste trabalho foi utilizado o vírus AcMNPV e um recombinante derivado deste, construído pelo sistema BAC-to-BAC (Invitrogen) de construção de baculovírus recombinantes (Griffiths *et al.*, 1999) com uma substituição do gene antiapoptótico p35 pelo gene *cat* (Chloramphenicol Acetyl Transferase). Os vírus AcMNPV e AcMNPVΔP35 foram crescidos a partir da infecção de células Sf9 e coleta do meio de cultura derivado desta infecção após 120 horas pós infecção (h p.i.). A titulação destes vírus foi realizada em células Sf9 pelo método de diluição seriada (end point dilution, TCID₅₀) em placas de 96 poços (O'Reilly *et al.*, 1992). Também foi utilizado o baculovírus *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV) que foi cultivado pela infecção de células Bm5 e coleta do meio de cultura derivado desta infecção seguido por titulação do inóculo viral, similar ao citado anteriormente, mas utilizando a linhagem Bm5.

As células foram mantidas em meio de cultivo TC-100 (Sf9) ou Grace's (Ld652Y ou Bm5) e plaqueadas pela ressuspensão e contagem em câmara de Neubauer na concentração 0.5 x 10⁶/ml e semeadura de 1 ml por poço contendo lamínula de vidro. Após ocorrer a adesão das células na lamínula (3 h), suficiente inóculo viral foi adicionado sobre as células para atingir uma multiplicidade de infecção 10 (multiplicity

of infection, MOI), isto é, 10 partículas virais infectivas por célula, o que garantiu uma infecção inicial simultânea de todas células por poço (O'Reilly et al, 1992). Após 1 hora de adsorção do vírus às células, o meio de cultura é removido e meio de cultura novo é disposto sobre as células, este momento iniciou a contagem do tempo de infecção (0 h. p.i.). Em 96 h.p.i foi realizado o tratamento com G2 ou com X2 diluídos a 100 µM em meio TC-100 (Sf9) ou Grace's (Ld652Y ou Bm5) por 30 minutos de acordo com a metodologia descrita para marcação desses compostos em células de mamíferos.

4.17. Contagem dos corpúsculos lipídicos em células Bm5 tratadas com G2

A partir de imagens digitais de fluorescência de células Bm5 infectadas com AcMNPV ou BmNPV e células não infectadas tratadas com 100 µm do composto G2 foram realizadas análises semiautomatizadas de quantificação do número e área dos corpúsculos lipídicos utilizando o software ImageJ versão FIJI (Schindelin et al., 2012).

O procedimento de realização da análise inicia pela conversão da imagem do canal de fluorescência verde em um documento 8-bit em preto e branco (Image – Type 8-bit). Em seguida, é realizado um corte do sinal basal da imagem (Image – Adjust – Threshold em modo Default) de tal forma que apenas a marcação forte dos corpúsculos lipídicos permaneça. Em preparo para a quantificação das áreas dos objetos, a barra de erro da imagem original foi utilizada para calibrar o software em termos de pixel da imagem por µm (selecione a barra de erro usando a ferramenta de linha – Analyze – Set Scale). Utilizando a ferramenta de retângulo, cada célula é isolada e quantificada individualmente utilizando um plugin de reconhecimento de formatos (Analyze – Analyze Particles, com parâmetros Size: 0.5 – 200, Circularity: 0.2-1). Isto gera uma tabela contendo as áreas de cada objeto reconhecido por célula. Desta forma, obtemos o número de vesículas e tamanhos respectivos em 10 células contadas individualmente. Estes resultados foram plotados em gráficos de dispersão e os desvios entre tratamentos com infecção e os controles sem infecção foram comparados por teste T.

4.18. Plotagem 3D de imagens planas para análise panorâmica das células

Para estimar o nível de fluorescência dos compostos G2 e X2 em comparação aos marcadores comerciais BODIPY[®] 493/503 e LysoTracker[®] Deep Red 647/688 e também analisar o padrão da marcação fluorescente de cada fluoróforo, foram utilizadas imagens fluorescentes adquiridas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica TCS SP5) representativas do padrão de marcação que foi encontrado na maioria das imagens obtidas para cada composto. As imagens foram analisadas através do software ImageJ versão Fiji, pela ferramenta "Plot Profile" e pelo plugin "Interactive 3D Surface Plot" o que possibilitou conversão da intensidade de fluorescência em gráfico de três dimensões sobreposto às imagens celulares.

4.19. Análise de intensidade média de fluorescência por citometria de fluxo

Para analisar quantitativamente a fluorescência emitida nas linhagens celulares testadas, 1×10^5 células da linhagem HUVEC foram semeadas em placas de 24 poços. Após a adesão, as células foram incubadas com os derivados fluorescentes por 30 minutos na concentração de 100 μ M, lavadas em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 e fixadas em formaldeído 3,7% por 20 minutos. Em seguida as amostras foram levadas ao citômetro de fluxo BD Fortessa para a quantificação da fluorescência emitida. No citômetro foram coletados dados morfológicos das populações celulares e dentro da faixa mais homogênea destas populações foi quantificada a emissão fluorescente para dez mil eventos (células) em cada condição experimental. Posteriormente, os dados foram analisados no software FlowJo. O experimento foi realizado em monocultiva.

4.20. Análises Estatísticas

Os dados das análises quantitativas foram submetidos ao teste t de Student para amostras não pareadas (entre dois grupos) ou à análise de variância simples (ANOVA) (entre três ou mais grupos). As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o *Software GraphPad Prism* versão 6, os resultados foram expressos como Média \pm SEM. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação de autofluorescência das células de mamíferos

Experimentos de bioimageamento por fluorescência foram realizados em células humanas, sendo quatro linhagens tumorais: MDA-MB-231; MCF-7; CACO-2 e DU-145; um tipo celular de linhagem, porém, não tumoral: HUVEC; e por fim, células de cultura primária, Fibroblastos de polpa dentária.

Para o controle negativo todas as linhagens celulares foram incubadas vivas ou após fixação com o veículo diluente de ambos os compostos (DMSO) com a maior concentração utilizada nos tratamentos (0,1%) em nossas avaliações, diluído nos respectivos meios de cultivo de cada linhagem celular. Posteriormente, estas células foram avaliadas por microscopia confocal quanto a apresentação de autofluorescência.

A Figura 7 mostra as linhagens tratadas com DMSO 0,1% vivas ou após a fixação. Foi observado um sinal fluorescente muito fraco nas células CACO-2, entretanto apenas quando as amostras eram excitadas com luz no comprimento de onda 405 nm não comprometendo o registro fluorescente tanto do G2 quanto do X2, visto que a excitação destes compostos é provocada por feixes de luz nos comprimentos de onda entre 488 e 458 nm. As emissões de fluorescência dos compostos G2 e X2 apresentam seus picos dentro do intervalo de 500 a 570 nm do espectro de luz visível.

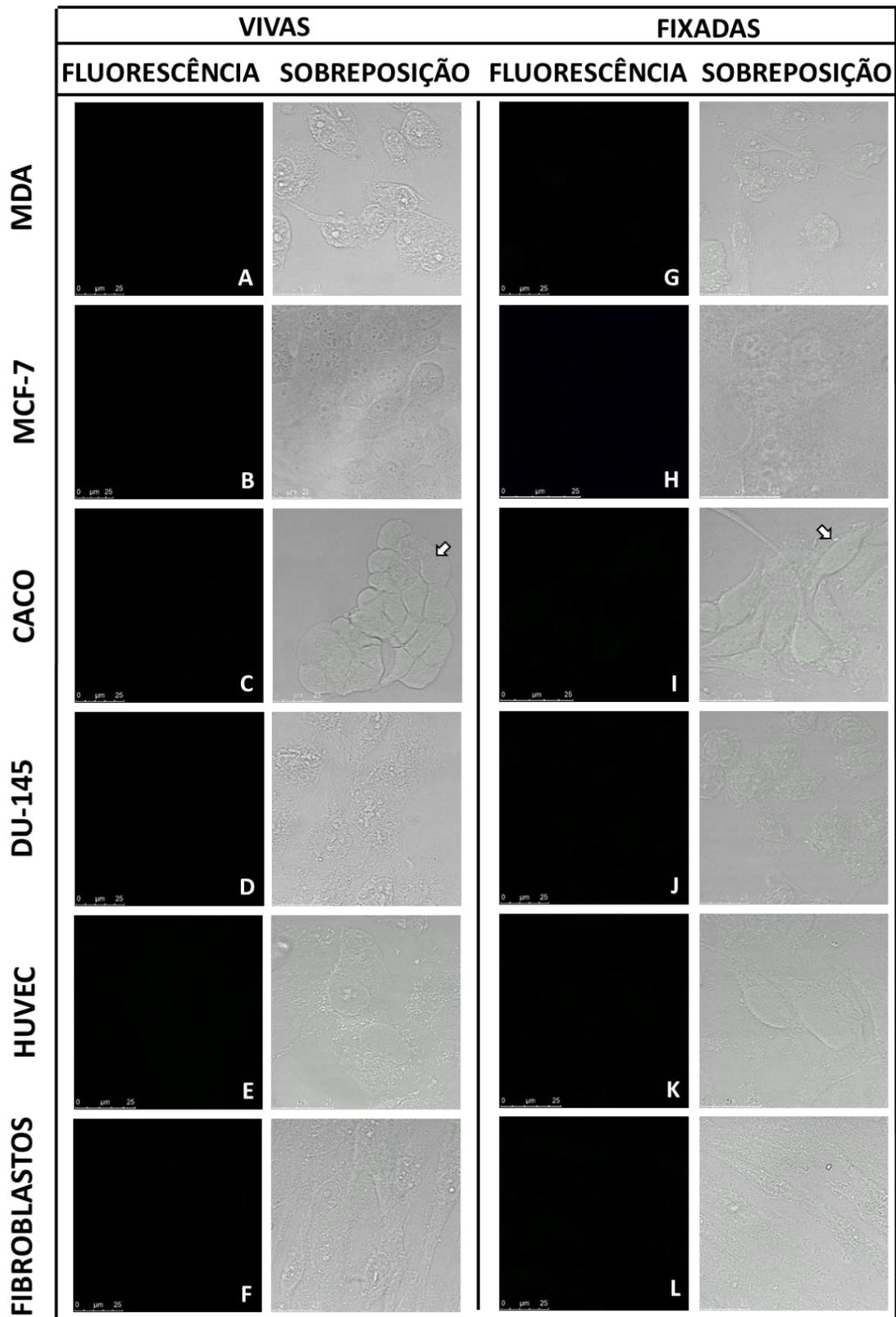


Figura 7: Avaliação de autofluorescência em seis tipos celulares tratados com 0,1% do diluente DMSO vivas (A-F) e fixadas (G-L). Células MDA- MB-231, MCF-7, CACO-2, DU-145, HUVEC e Fibroblastos tratadas vivas ou após a fixação. As linhagens apresentaram baixa ou nenhuma autofluorescência, detectável apenas pela sobreposição do canal fluorescente com o campo claro (setas em C e I) quando excitadas com laser a 458 nm.

5.2. Avaliação da citotoxicidade do composto X2 por ensaios com MTT ou com azul de tripan

Para identificar possível citotoxicidade provocada pelo composto X2 em células tumorais, foram realizados experimentos com MTT medindo-se a quantidade de células viáveis após tratamento com o fluoróforo por 24 horas ou por 30 minutos nas linhagens MDA-MB-231, MCF-7, CACO-2, DU-145 e HUVEC e nas seguintes concentrações: 100 μM ; 10 μM ; 1 μM ; 0,1 μM e 0,01 μM . Devido a alta precipitação do X2, e ainda por se tratar de um estoque bastante limitado, não foram testadas concentrações mais altas que 100 μM (de toda forma, nenhum resultado de microscopia confocal foi obtido por incubação com o composto acima dessa concentração). Também foram realizados ensaios com azul de tripan determinando-se a mortalidade em Fibroblastos incubados por 24 horas com o derivado de BTB.

Comparando-se a viabilidade de células tratadas com diferentes concentrações de X2 em relação ao controle negativo (NT), a incubação por 30 minutos com 100 μM do composto provocou moderada redução na quantidade de células viáveis da linhagem MDA-MB-231 e acentuada queda da viabilidade nas células DU-145, porém com diferença estatisticamente significativa ($P < 0.001$) apenas para esta última linhagem citada (

Figura 8 A). Quando o tempo de tratamento foi aumentado para 24 horas, o fluoróforo X2 na concentração de 100 μM provocou redução da viabilidade em todas as linhagens celulares, com diferença estatisticamente significativa ($P < 0.001$) em comparação às células não tratadas da mesma linhagem. Em concentrações abaixo de 100 μM apenas as células CACO-2 e HUVEC revelaram queda de sua viabilidade, com significância estatística ($P < 0.001$) em relação ao controle, entretanto a redução foi pequena e mais de 90% das células permaneceram viáveis.

Por se tratar de uma sonda fluorescente, supomos que este marcador poderia interferir com o resultado do ensaio colorimétrico por MTT. Deste modo, selecionamos Fibroblastos para o teste de exclusão por azul de tripan pelo fato de esta célula ser obtida de cultivo primário e não de linhagem. Neste ensaio foram contabilizadas, através de microscopia de luz em câmara de Neubauer, as células vivas e as células mortas após incubação com X2 por 24 horas. Foram consideradas viáveis aquelas que apresentavam citoplasma claro e inviáveis as que estavam com o citoplasma corados com o azul tripan.

Fibroblastos incubados com 10 μM de X2 apresentaram morfologia semelhante à daqueles incubados apenas com DMSO 0,1% (

Figura 8 C_I), enquanto os tratados com 100 μM do fluoróforo apresentaram aspectos morfológicos sugestivo de danos celulares, estas células continham reduzida ou nenhuma extensão citoplasmática, comum de células aderentes. Apesar de exibirem um citoplasma claro, o formato destes Fibroblastos era semelhante ao daqueles marcados com azul de tripan (

Figura 8 C_II).

Já a contagem das células não revelou mortalidade alta entre os Fibroblastos tratados com 10 μM ou 100 μM de X2 (

Figura 8 C_III). Os valores foram 9% ($\pm 1,9$ SEM) e 9% ($\pm 0,9$ SEM) para os tratamentos a 100 μM e 10 μM , respectivamente. Também não houve diferença estatisticamente significativa em qualquer das taxas de mortalidade em relação ao controle ($p > 0.05$ ou $p > 0.001$).

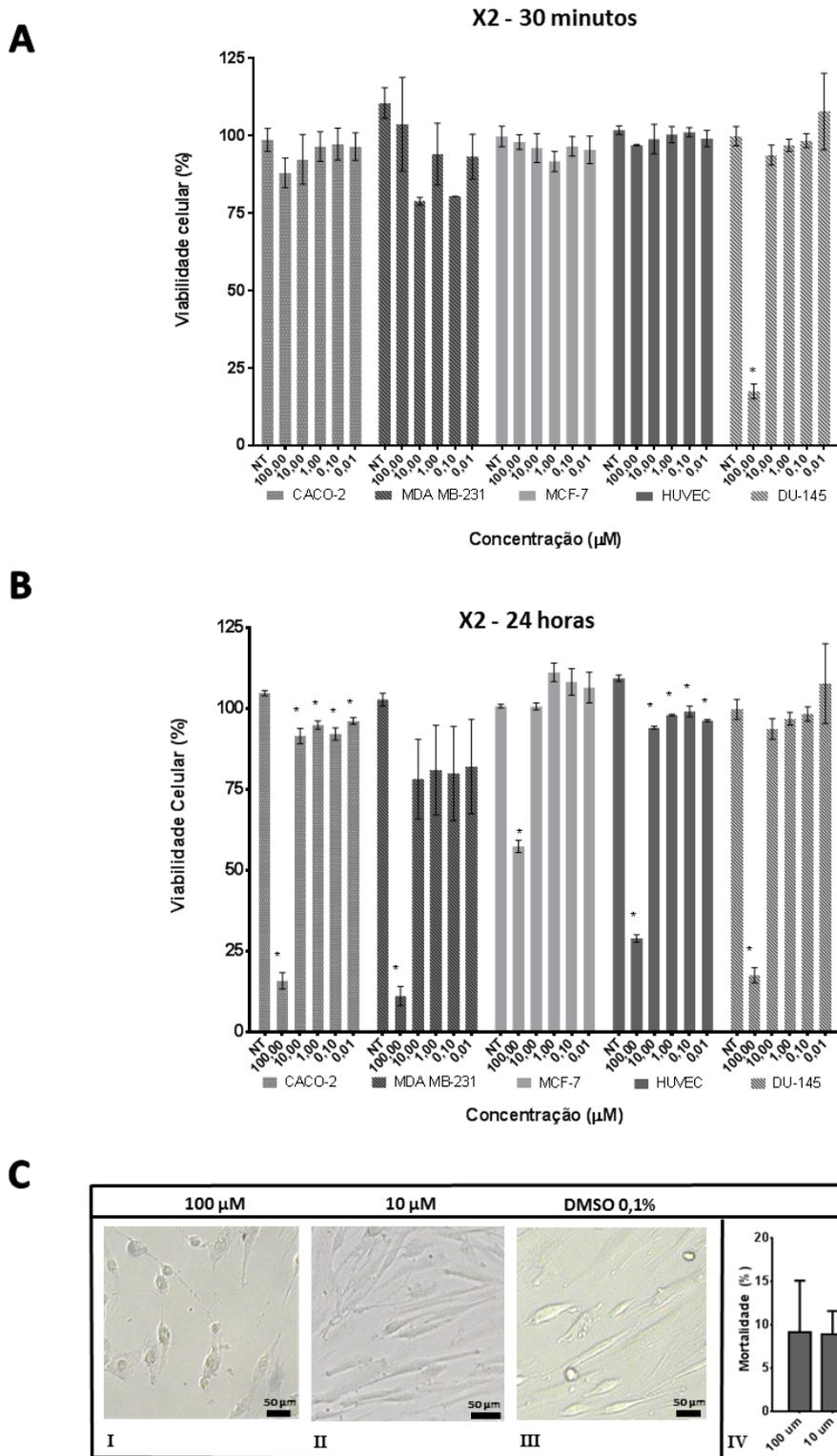


Figura 8: Avaliação de citotoxicidade induzida por X2 em linhagens celulares tratadas com o composto por 30 minutos (A) ou 24 horas (B). (C) Análise morfológica de Fibroblastos incubados por 24 horas com 100 μM de X2 (I), 10 μM de X2 (II), DMSO 0,1 % (III) e média da mortalidade avaliadas por azul de tripan (IV). O símbolo * representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (NT) da mesma linhagem com $P < 0,001$.

5.3. Seletividade do X2 para estruturas intracelulares em células humanas

Para o tratamento das células humanas com o composto X2 foram utilizadas as linhagens MDA-MB-231, MCF-7, CACO-2, DU-145 e HUVEC. O tratamento consistiu na incubação de células vivas ou fixadas por 30 minutos com o derivado de BTB à concentração de 100 μ M.

As células tratadas com o composto X2 emitiram fluorescência no espectro de cor verde com nenhuma fluorescência observável nas faixas do azul ou do vermelho. Com relação aos aspectos que devem ser levados em consideração para o aprimoramento do fluoróforo notou-se: presença de tênue ruído de fundo e marcação inespecífica por todo o citoplasma celular. Entretanto, positivamente, a sonda também apresentou alguns perfis de marcação a serem explorados (Figura 9), os quais podem ser descritos como: I) marcação de pequenas regiões dispersas ao longo do citoplasma celular com a forma de um “salpicado” de pontos, dando a este uma aparência de “granulado”, sobretudo nas amostras MDA-MB-231 e HUVEC; II) fluorescência de estruturas circulares alongadas (isoladas ou em conjunto), distribuídas na região perinuclear das células, especialmente em CACO-2 e DU-145 fixadas; III) concentração de sinal fluorescente em regiões perinucleares, normalmente polarizado para um lado da célula, demonstrado em MCF-7 e HUVEC, o que pode ser interpretado como provável marcação do sistema retículo endoplasmático / aparato de Golgi; e IV) seletividade do X2 para regiões próximas da membrana delimitando uma marcação linear na borda da célula, principalmente nas células MDA-MB-231 fixadas. Normalmente esses padrões se repetiram para células vivas e fixadas entre uma mesma linhagem, mas com maior intensidade de sinal fluorescente naquelas tratadas após fixação.

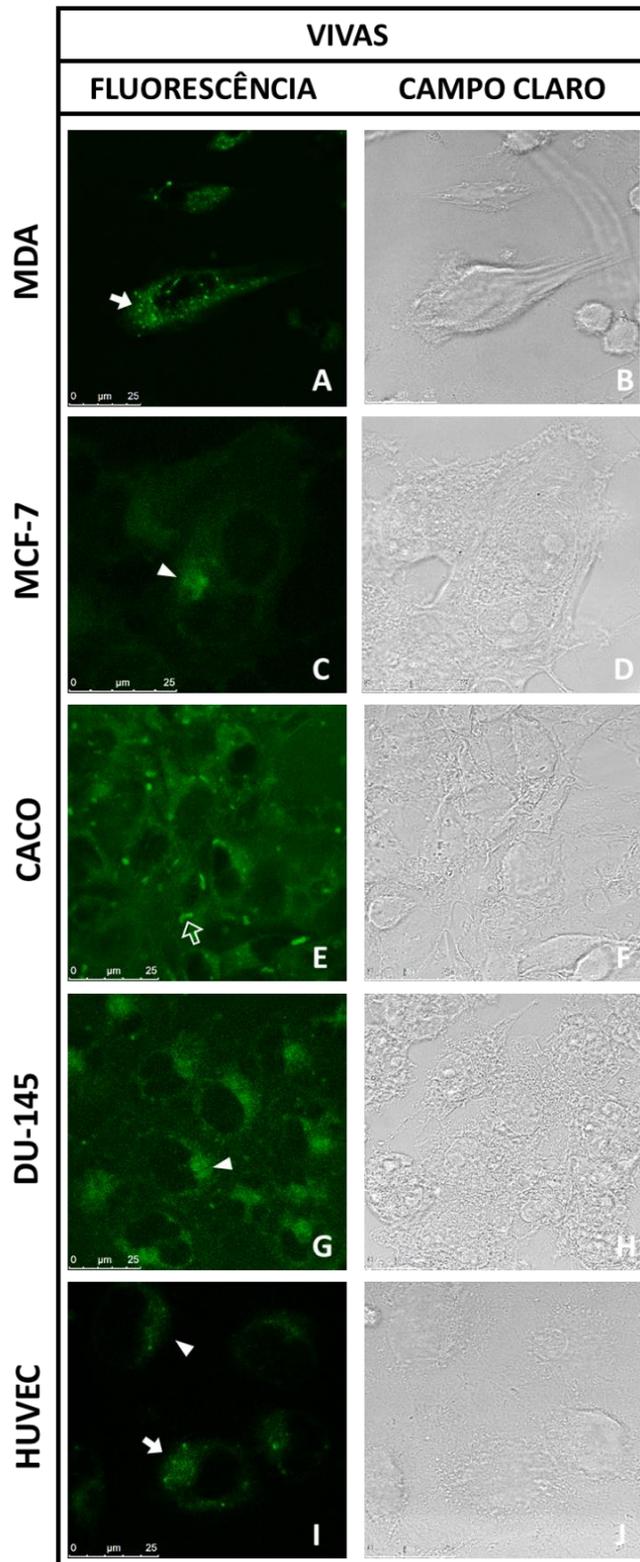


Figura 9: Avaliação do padrão de marcação fluorescente do composto X2 em células vivas (A-J). Células MDA-MB-231, MCF-7, CACO-2, DU-145 e HUVEC incubadas vivas com o composto X2 a 100 μ M por 30 minutos. Seta cheia indica marcação fluorescente com característica multipontilhada. Cabeças de seta apontam acúmulo de fluorescência perinuclear, normalmente polarizada para um dos lados da célula e seta vazia mostra estruturas alongadas distribuídas em regiões próximas ao núcleo. Barra de referência de 25 μ m.

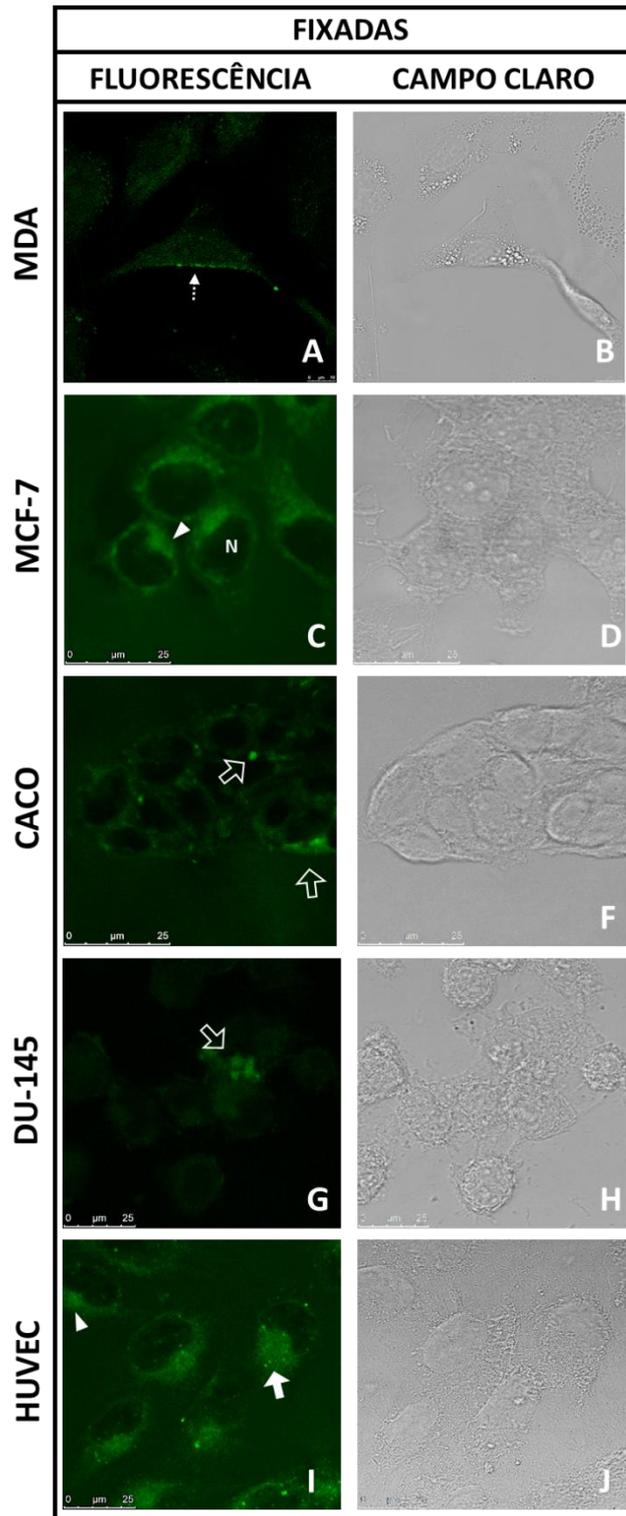


Figura 10: Avaliação do padrão de marcação fluorescente do composto X2 em células fixadas (A-J). Células MDA-MB-231, MCF-7, CACO-2, DU-145 e HUVEC incubadas com o composto X2 a 100 μ M por 30 minutos, após fixação. Seta pontilhada indica marcação fluorescente linear na borda da célula. Cabeças de seta apontam marcação fluorescente acumulada em regiões perinucleares. Seta cheia indica marcação fluorescente com característica multipontilhada e seta vazia mostra estruturas circulares alongadas distribuídas em regiões próximas ao núcleo. Barra de referência de 25 μ m.

5.4. Avaliação da especificidade de marcação do X2

Devido ao aspecto morfológico das estruturas celulares marcadas, foram realizadas análises comparativas entre o composto X2 e o marcador comercial fluorescente LysoTracker[®] Deep Red 647/688, o qual apresenta afinidade por organelas ácidas (endossomos tardios, lisossomos e/ou autofagossomos). As primeiras avaliações mostraram que o derivado de BTM não apresenta a mesma seletividade observada com o uso da sonda comercial, embora haja uma sobreposição de sinais em algumas regiões do citoplasma das células. Conforme apresentado na Figura 11 (E – G) estruturas alongadas aparecem em conjunto, justapostas à região nuclear. Este perfil de marcação também foi demonstrado anteriormente nas células CACO-2 e DU-145 (Figura 9).

Com isso, estes resultados sugerem que os padrões de marcação entre o composto X2 e o LysoTracker[®] Deep Red embora se sobreponham em alguns pontos, são bastante distintos. A Figura 11 mostra marcações do derivado de BTM nas bordas das membranas de algumas células ou ainda fluorescência de minúsculas estruturas ao longo da célula na forma de “salpicado” de pontos, perfis estes não obtidos com as marcações com LysoTracker[®] Deep Red. Entretanto outras marcações de X2 e de LysoTracker[®] Deep Red apresentam semelhanças. Conforme apresentado na Figura 11 (E – H) em que estruturas circulares alongadas aparecem em conjunto, justapostas à região nuclear.

Como o marcador comercial apresenta pico ótimo de emissão de fluorescência em 647 nm, foi realizada um ensaio de co-marcação entre o LysoTracker[®] Deep Red e o composto X2. Além das marcações inespecíficas produzidas pelas duas sondas no citoplasma celular, ocorreu co-marcação entre X2 e LysoTracker[®] em determinadas regiões próximas ao núcleo (polarizadas para um dos lados da célula como descrito no tópico 1.4) (A – C). Esta marcação pode estar associada com o retículo endoplasmático ou aparato de Golgi devido sua abundância de membranas celulares e sua contribuição com a biogênese dos endossomos. Também foram identificadas estruturas esféricas próximas ao núcleo, marcadas em conjunto pelo LysoTracker[®] Deep Red e pelo X2, mas com predominância do derivado de BTM. E ainda foram observadas marcações com predomínio da fluorescência vermelha sobre a verde em regiões próximas ao núcleo, o que indica associação majoritária da sonda comercial a estas áreas da célula (E – F). Portanto, o X2 e LysoTracker[®] embora apresentem marcações comuns em algumas regiões também exibem um perfil de marcações marcadamente exclusivas.

A ausência do composto X2 dentro do núcleo é sugestiva de que este composto não se associa ácidos nucleicos (DNA ou RNA) ou proteínas nucleares. Por outro lado, a difusão e eventual concentração, em estruturas vesiculares pelo citoplasma ou região perinuclear sugere que o X2 possua afinidade por algum componente abundante pelo citoplasma celular, possivelmente um grupo de ou um fosfolípido específico abundantemente presente em estruturas vesiculares e também difuso em demais organelas celulares.

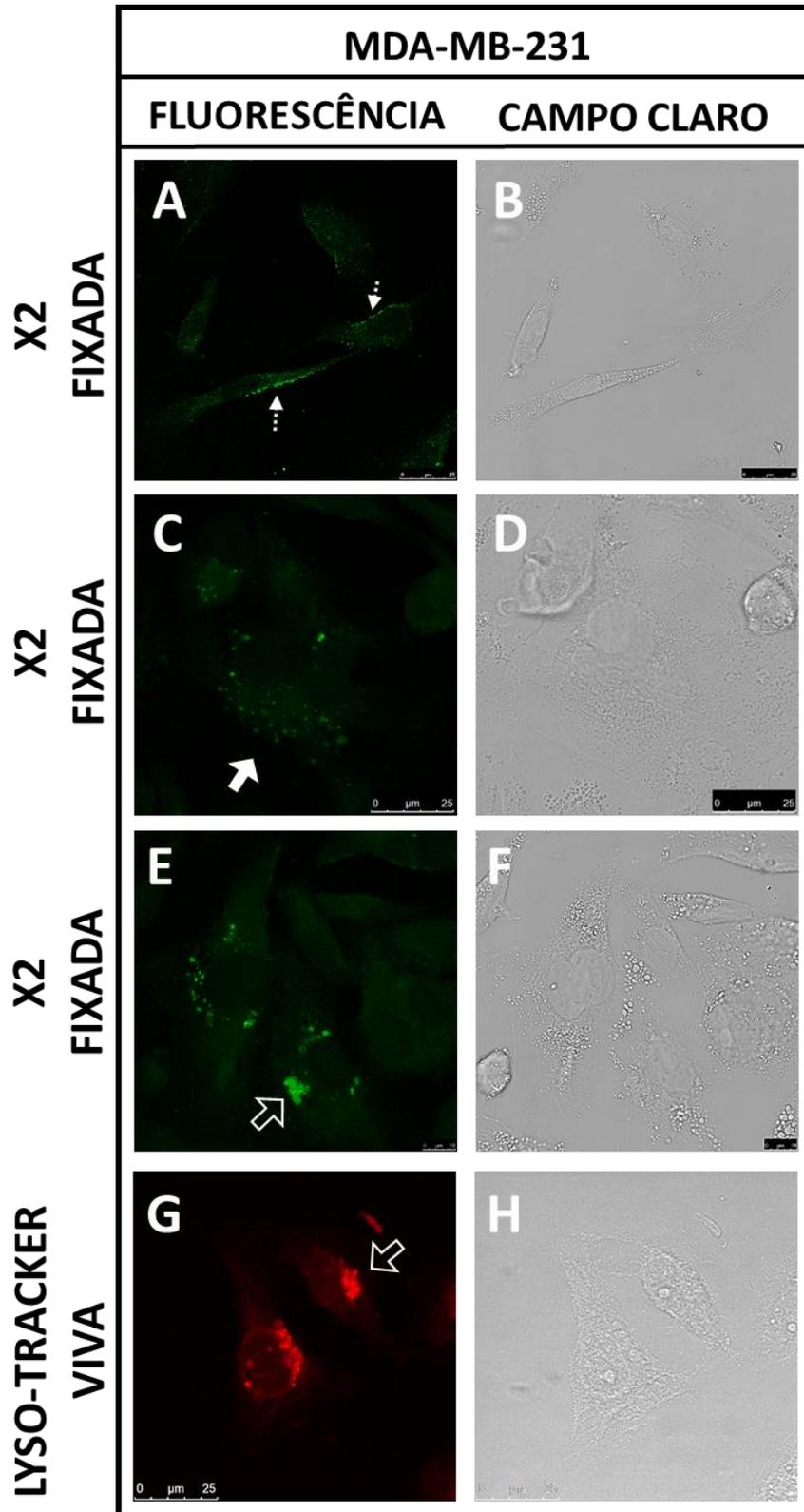


Figura 11 Comparação entre os perfis de marcação de X2 e de LysoTracker® Deep Red (A – H). Células MDA-MB-231 incubadas vivas com LysoTracker® Deep Red ou após fixação com X2. (A) Marcação de X2 na extremidade da membrana (setas pontilhadas) e (C) marcação de minúsculos pontos ao longo do citoplasma celular (seta cheia). (E – G) Estruturas circulares alongadas na região perinuclear de células tratadas com o derivado de LTD (E) ou em células incubadas com LysoTracker® Deep Red (G) (setas vazias). Barra de referência de 25 µm.

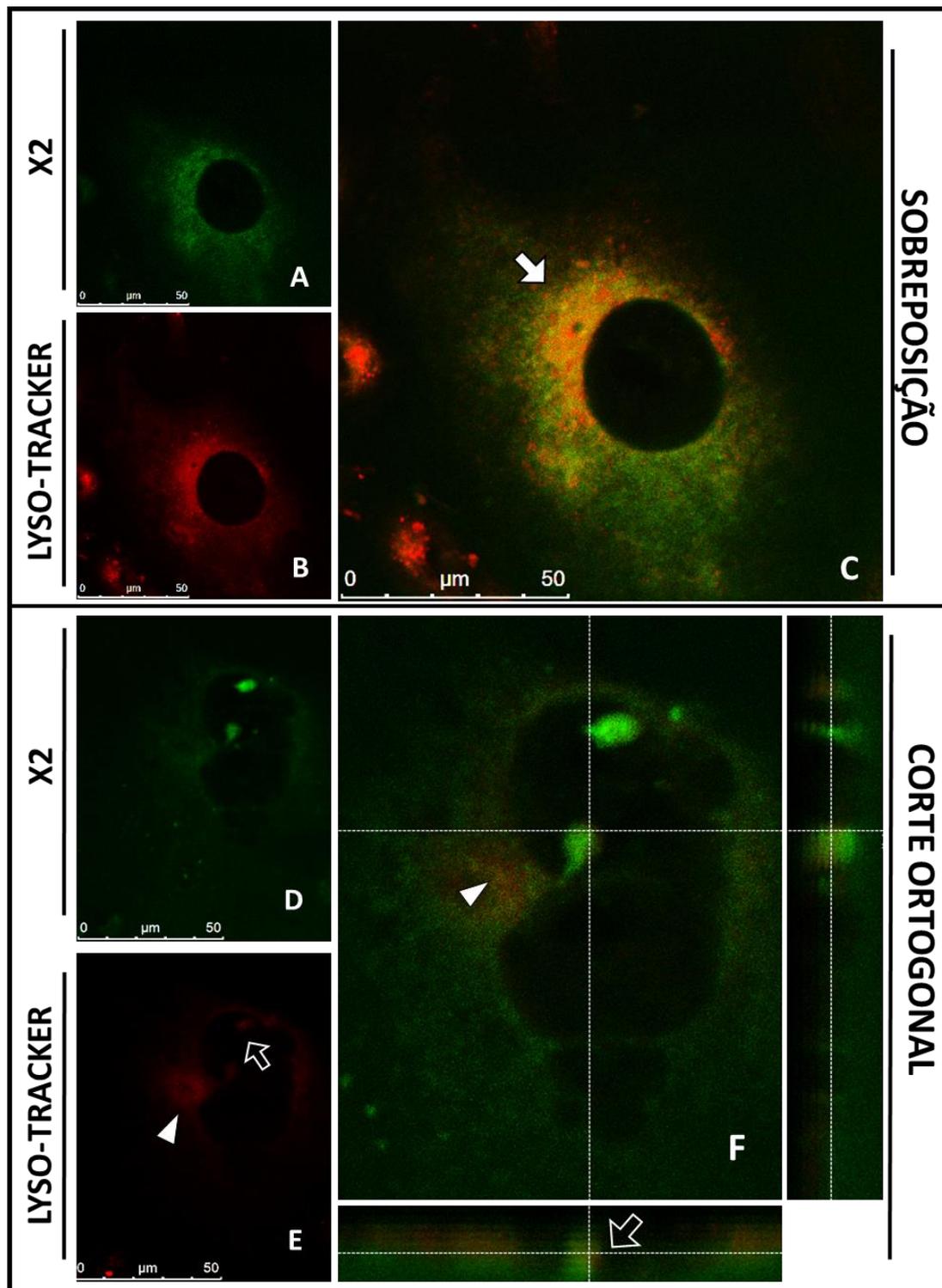


Figura 12: Avaliação da especificidade de marcação do X2 (A – F). Células MDA-MB-231 tratadas vivas com os marcadores LysoTracker[®] Deep Red 647/688 a 75 nM por 30 minutos e em seguida com o composto X2 a 100 μM pelo mesmo período. (A – C). Comarcação entre X2 e LysoTracker[®] mostrando aquisição no canal verde (A), no canal vermelho (B) e sobreposição entre as duas sondas (C) em regiões próximas ao núcleo (seta cheia). (E e F) Estruturas circulares próximas ao núcleo comarcadas por X2 e por LysoTracker[®] Deep Red com predominância de marcação pelo derivado de BTD (setas vazias). (E e F) Predomínio de fluorescência vermelha apontada por cabeças de seta. Barra de referência de 50 μm.

5.5. Comparação da distribuição das marcações fluorescentes de X2 e de LysoTracker® Deep Red

Para comparação entre as marcações fluorescentes do derivado de BTB e da sonda comercial, foram realizadas análises digitais de imagens adquiridas por microscopia confocal através do *software* ImageJ versão Fiji (Schindelin et al., 2012). A renderização da imagem fluorescente gera um gráfico XYZ em que os eixos XY determinam a posição de cada elemento na imagem e Z a intensidade de fluorescência relativa a cada um desses elementos. As imagens foram obtidas de MDA-MB-231 tratadas exclusivamente com X2 ou com LysoTracker® Deep Red.

Como os parâmetros de aquisição da imagem são diferentes para cada sonda, a intensidade do sinal fluorescente não será comparada por esta ferramenta. A intenção foi usar o *software* para realçar a visualização das estruturas marcadas nas células e realizar um estudo panorâmico da morfologia, da quantidade e da distri

buição dessas estruturas marcadas pelos fluoróforos.

Gráficos XYZ de imagens planas, referentes a tratamentos com LysoTracker® Deep Red ou com X2, possibilitaram a melhor visualização do perfil de marcação dessas sondas nas células. Mostrando que o perfil de marcação e a seletividade de LysoTracker® Deep Red por organelas celulares é muito diferente daqueles obtidos com o composto X2 (Figura 13 C e G). Quando o gráfico foi colocado horizontalmente mostrando a intensidade da fluorescência pela lateral, observou-se na figura referente ao tratamento com LysoTracker® Deep Red, pequenos picos restritos em uma região da célula, condizentes com o seu alvo (endossomos tardios e lisossomos) (Figura 13 D). Já o gráfico referente ao X2 mostra uma distribuição homogênea pelo citoplasma com picos minúsculos em grande quantidade por toda a extensão celular que pode ser facilmente observado na visão XYZ (Figura 13 H). Sendo assim, esta análise confirma de forma inequívoca que estes dois fluoróforos não possuem um perfil similar de distribuição de suas marcações.

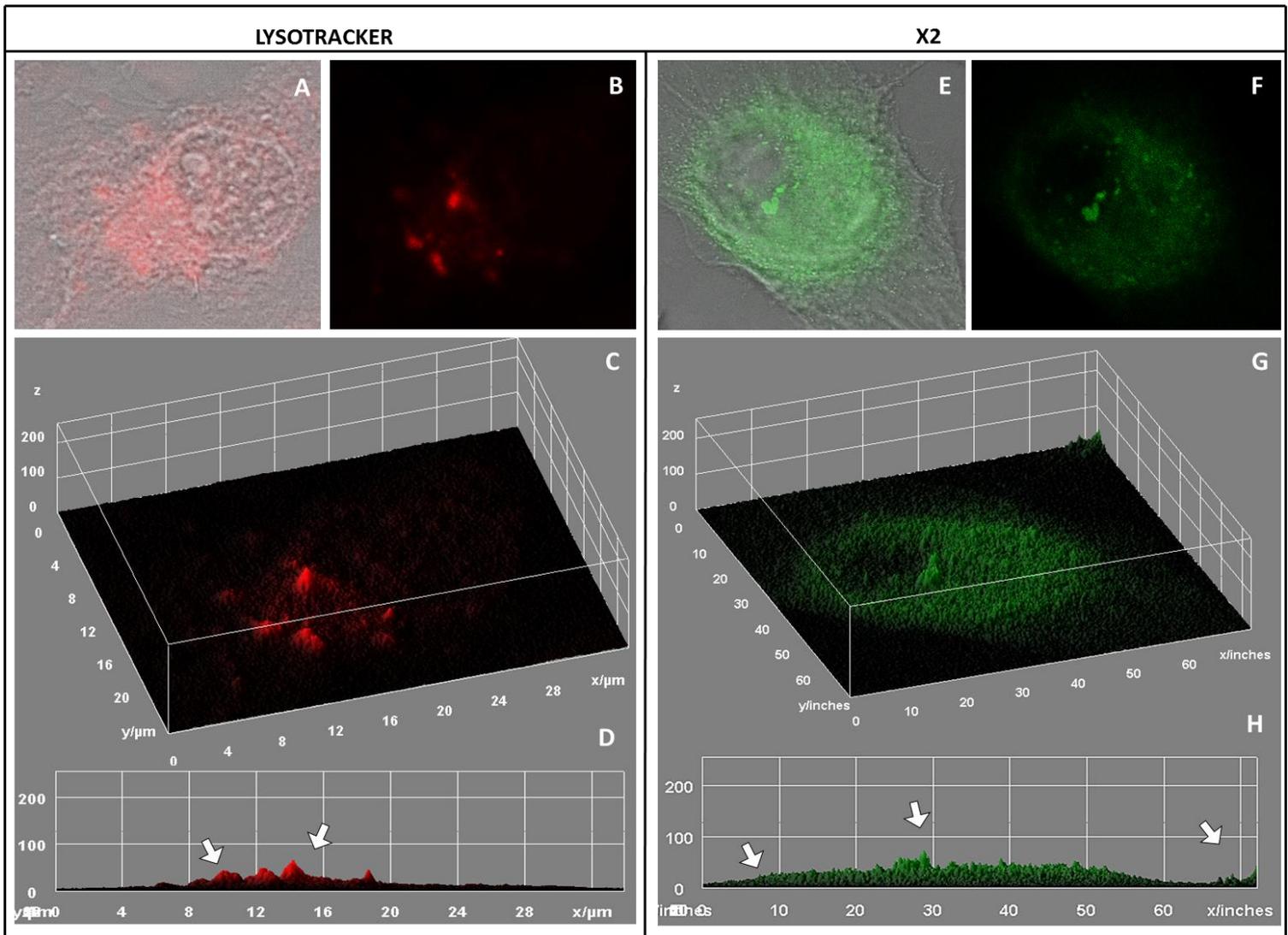


Figura 13 Comparação entre as marcações fluorescentes de X2 e de LysoTracker® Deep Red. Imagens de células MDA-MB-231 incubadas vivas com o marcador comercial LysoTracker® Deep Red (A e B) ou com o derivado de BTB (E e F). (C e G). Plotagem XYZ das imagens referentes aos tratamentos com LysoTracker® Deep Red ou com X2 possibilitando melhor visualização das mesmas. (C) Panorama geral mostrando a marcação de LysoTracker® Deep Red, mais específica e (G) a de X2, inespecífico. (D e H) Perfil de XYZ mostrando intensidade da fluorescência vista pela lateral. Setas apontam pequenos picos em uma região da célula no ensaio feito com LysoTracker® Deep Red e grande quantidade desses espalhados por toda a célula, inclusive em tamanhos menores, no tratamento com X2.

5.6. Avaliação da intensidade do sinal fluorescente de X2 por citometria de fluxo

Foram realizadas comparações entre as intensidades de fluorescência por célula do derivado de BTD e do marcador comercial LysoTracker[®] Deep Red através de citometria de fluxo de células HUVEC vivas tratadas com 100 μ M, 10 μ M e 1 μ M de X2, por 30 minutos ou com 75 nM, 7,5 nM, ou 0,75 nM de LysoTracker[®] Deep Red, pelo mesmo período (Figura 15).

Nesta análise foram avaliados dez mil eventos (células) e os resultados foram plotados em histogramas nos eixos X e Y, em que a fluorescência é a variável X e a contagem dos eventos é a variável Y. A calibragem do equipamento para determinação da fluorescência basal foi feita utilizando-se como controle células não tratadas com nenhum dos dois compostos. A partir da fluorescência estabelecida pelo controle foi definido um nível de corte (*threshold*) delimitando o mínimo correspondente à fluorescência basal da célula HUVEC. Como o LysoTracker[®] Deep Red fluoresce no vermelho e o X2 fluoresce no verde, dois histogramas referentes ao controle foram gerados: um deles dando a referência de fluorescência basal no vermelho (APC) e o outro determinando a fluorescência basal no verde (FITC).

Uma observação geral neste ensaio foi a correlação entre a intensidade de fluorescência e concentração das sondas marcadoras, de modo que à medida que se reduz a concentração do marcador a intensidade de fluorescência por célula também reduz (pico desloca para a esquerda)

O histograma referente ao tratamento com X2 a 100 μ M mostra que este fluoróforo marca tanto as células HUVEC com alta intensidade de fluorescência quanto aquelas com baixa intensidade de fluorescência, identificando-as praticamente na mesma proporção, visto que os picos no histograma apresentam correspondências muito próximas no eixo Y. As células HUVEC marcadas por X2 a 100 μ M e com baixa intensidade de fluorescência apresentam um pico muito próximo ao da fluorescência basal, enquanto aquelas que possuem alta intensidade de sinal fluorescente exibem um pico relativamente distante. Desse modo, a presença dos dois picos demonstrando diferentes intensidades de sinal fluorescente em apenas uma linhagem celular, indica que esse fluoróforo não apresenta boa seletividade para estruturas/moléculas celulares específicas.

Já o histograma referente à marcação com LysoTracker® Deep Red a 75 nM mostra que a sonda identifica apenas um grupo de células HUVEC com alta intensidade de fluorescência. Existe também uma pequena quantidade de células que apresentou fluorescência mais fraca, a qual está demonstrada no histograma por um pico bem mais baixo e à esquerda (Figura 14). Contudo, como esses dois picos estão tão próximos que quase se sobrepõem, é provável que o menor deles esteja indicando aquelas células do grupo que apresentam menor quantidade de moléculas/estruturas celular específicas.

Comparando-se os sinais fluorescentes de X2 a 100 μ M com o de LysoTracker® Deep Red a 75 nM, que são as respectivas concentrações utilizadas em microscopia confocal para cada um dos fluoróforos, observa-se que ambos apresentam intensidades próximas, entretanto o sinal de LysoTracker® Deep Red é ligeiramente mais forte. No entanto a marcação de dois grupos de células dentro de uma mesma população, um com fraca intensidade e outro com forte intensidade de fluorescência, o diferencia do perfil obtido com o LysoTracker® Deep Red; o qual detecta apenas uma população majoritária com forte sinal fluorescente, novamente diferenciando as marcações destes dois compostos. Na marcação de X2 a 100 μ M, é possível que o grupo de células com baixa intensidade do sinal seja correspondente apenas àquelas células com marcação difusa citoplasmática enquanto o grupo de células com alta intensidade do sinal corresponda àquelas que apresentam, além da fluorescência difusa, a marcação das estruturas que ele seleciona.

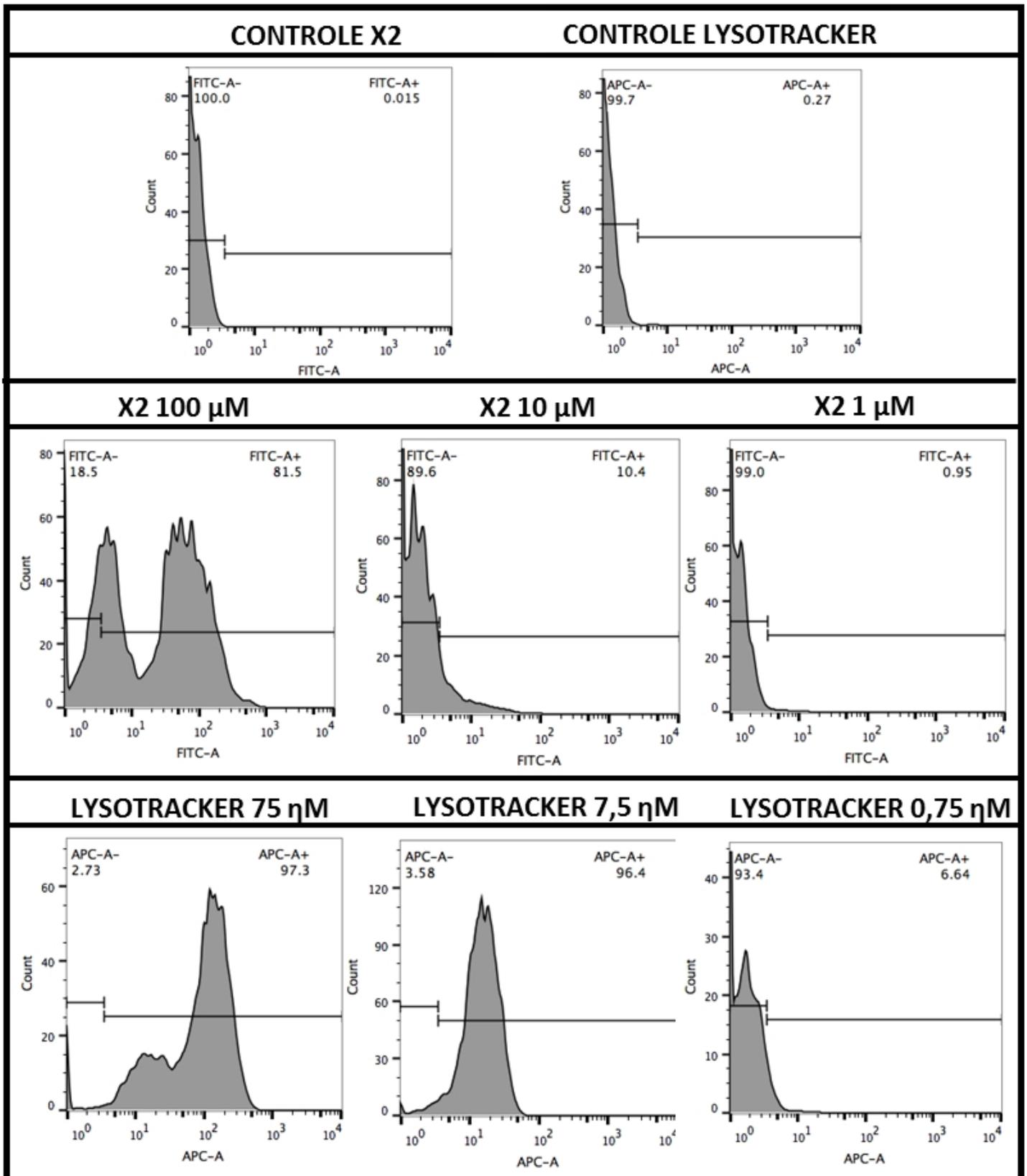


Figura 14: Comparação entre as intensidades de fluorescência por célula através de citometria de fluxo. Histogramas de intensidade de sinal fluorescente por células nas seguintes condições: I) não tratadas (controle); II) incubadas vivas com 100 μM, 10 μM e 1 μM de X2 por 30 minutos e III) tratadas vivas com LysoTracker® Deep Red a 75 nM, 7,5 nM e 0,75 nM pelo mesmo período

5.7. Aplicação *in vivo* de X2: *Caenorhabditis elegans*

Com o objetivo de buscar um produto que possa ser aplicável para uso comercial o X2 foi testado quanto a marcação em amostras complexas. Foi escolhido o nematódeo *Caenorhabditis elegans* pela facilidade de manipulação e por ser um importante modelo para estudos em biologia, com a finalidade de: I) avaliar a possibilidade de aplicação do X2 em novas espécies; II) estudar como se comporta a marcação desse fluoróforo em tecidos; III) verificar a capacidade de aplicação *in vivo*.

Imagens obtidas de *C. elegans* não incubados com X2 (Figura 15, A, B e C) mostram que o nematódeo apresenta um pouco de autofluorescência difusa no canal verde, entretanto a fraca intensidade do sinal não atrapalhou o estudo da marcação com o derivado de BTB, que apresentou um sinal muito mais intenso do que a autofluorescência.

Foi realizado um ensaio com os *C. elegans* vivos que foram incubados com o composto X2 por 24 horas, juntamente com as bactérias das quais o nematódeo se alimenta. Confirmou-se com esse ensaio a possibilidade de aplicação do X2 *in vivo* para essa espécie, visto que a maioria dos nematódeos que foram colocados em contato com a sonda apresentaram marcação fluorescente de numerosas estruturas esféricas distribuídas ao longo do intestino. No entanto foi também observado uma marcação inespecífica por todo o corpo do animal. Este experimento também demonstrou que o composto não degradou completamente após ser distribuído nas placas de cultivo e mantidos por todo período de tratamento. Notou-se também que o X2 não marcou as bactérias (*E. coli* NA22) que o animal consome.

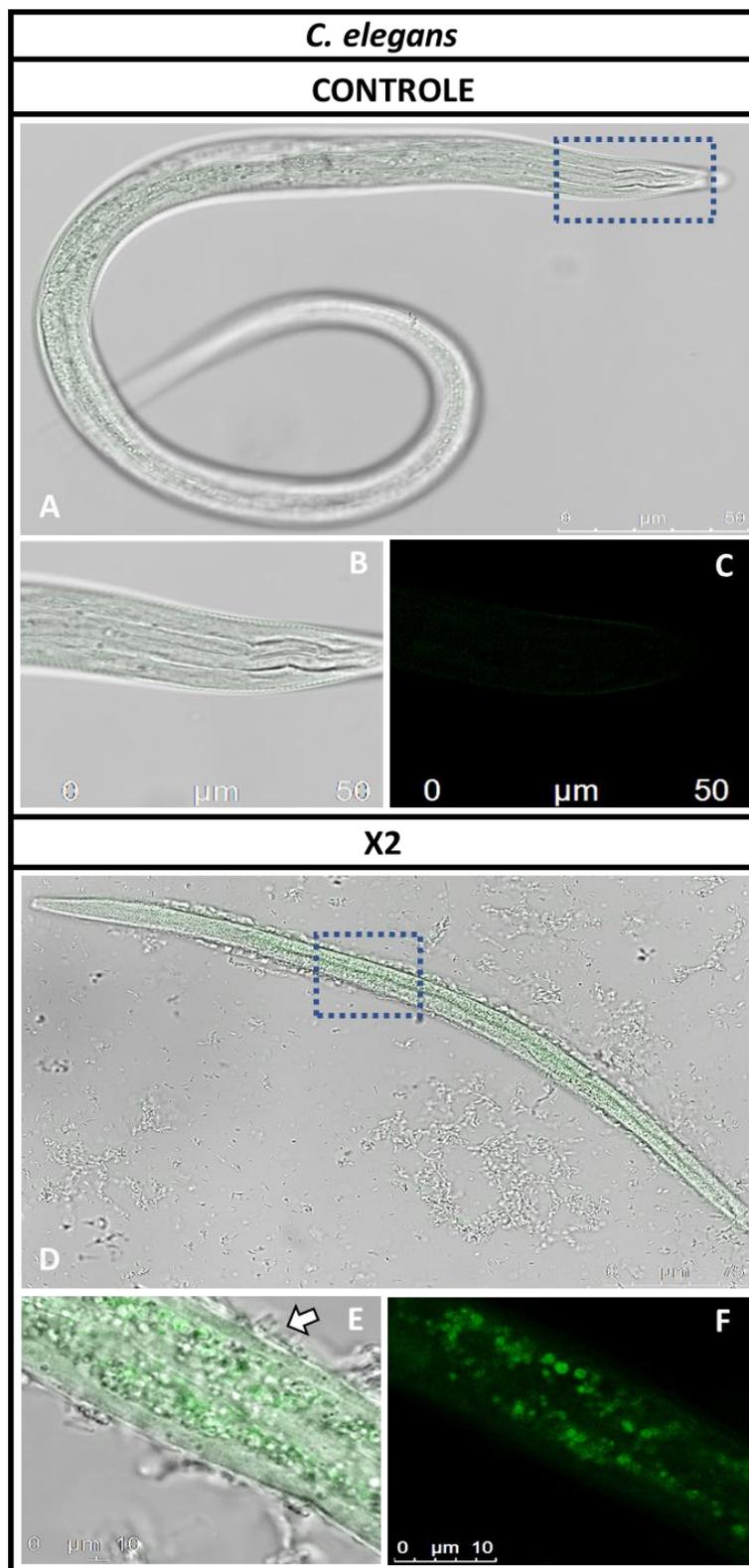


Figura 15: Avaliação de autofluorescência em *C. elegans* e demonstração de aplicabilidade do X2 *in vivo* para essa espécie (A – F). (A – C) Imagens de um *C. elegans* fixado mostrando uma tênue autofluorescência do nematódeo. (D – F). Imagens do nematódeo tratado vivo com o X2 revelando marcação fluorescente de organelas esféricas distribuídas ao longo de seu intestino. Seta aponta bactérias não marcadas pelo derivado de BTB, visíveis somente na sobreposição com o campo claro (E). Barras de referência de 10 e 50 μm .

5.8. Marcações de X2 em *C. elegans*

Com o objetivo de estudar como se comporta a marcação desse fluoróforo em tecido de *C. elegans* foram feitas avaliações do padrão de marcação do X2 nos tecidos do nematódeo com base em comparações anatômicas. De acordo com a anatomia do sistema alimentar as células do intestino contêm diversas organelas, entre elas endossomos de reciclagem e autofagossomos. Ao longo de toda a região intestinal encontram-se também os grânulos intestinais, os quais apresentam-se em maior quantidade na região do intestino proximal à faringe.

Conforme já descrito no tópico anterior o X2 marcou diversas estruturas esféricas na região intestinal dos *C. elegans*. A figura (Figura 16 A e B) mostra essas estruturas em maior frequência no intestino proximal à faringe conferindo maior intensidade de marcação fluorescente nessa área e sugerindo que o derivado de BTD tenha afinidade pelos grânulos intestinais. Ao redor de toda a região intestinal a marcação continua, porém com menor intensidade (Figura 16 C e D), o que reforça a hipótese de marcação desses grânulos intestinais. Entretanto, ainda é possível que X2 esteja se acumulando também em outras organelas que se encontram em abundância nas células do intestino desse nematódeos, tais como os endossomos e os autofagossomos.

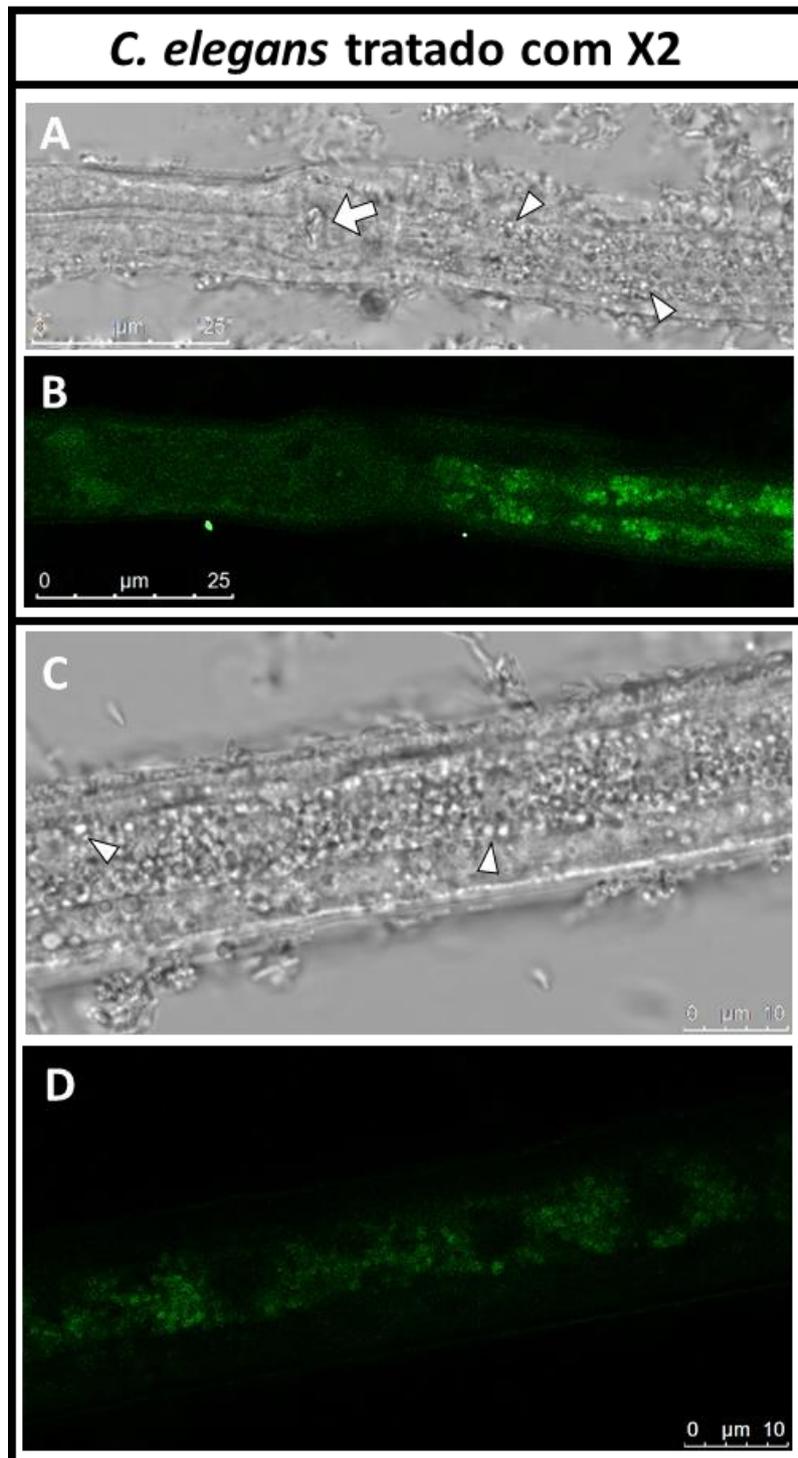


Figura 16: Marcações de X2 em *C. elegans* (A – D). Imagens de campo claro em (A) revelando dente córneo na faringe (seta) e estruturas circulares birrefringentes (cabeças de seta). (B) Captura demonstrada na figura (A) agora captada no canal de fluorescência verde revelando estruturas esféricas com alta intensidade de sinal fluorescente na região do intestino proximal à faringe. (C) imagem de campo claro mostrando estruturas circulares birrefringentes (cabeças de seta). (D) Captura demonstrada na figura (C) agora captada no canal de fluorescência verde revelando continuidade da marcação ao longo do intestino e intensidade de sinal fluorescente um pouco mais baixa que a da região próxima à faringe, já demonstrada em (B). Barra de referência de 10 μm.

5.9. Aplicação do X2 em ensaio de infecção viral em células de inseto

Para explorar as possibilidades de aplicação do X2 foi realizado um ensaio de marcação do derivado de BTD em células de inseto incubadas por 96 horas após a infecção inicial com dois vírus: um baculovírus “selvagem” (AcMNPV) e um baculovírus recombinante que possui o gene anti-apoptótico *p35* deletado (AcMNPV Δ P35). Para o experimento foi idealizado um painel com células permissiva (Sf9), semipermissiva (Ld652Y) e não-permissiva (Bm5) à infecção viral pelo AcMNPV em três diferentes condições: I) não tratadas com nenhum dos vírus; II) incubadas com o vírus AcMNPV; III) expostas ao vírus que induz apoptose AcMNPV Δ P35.

Células permissivas à infecção viral (Sf9), não tratadas com nenhum dos vírus apresentam formato arredondado e núcleo circular ocupando cerca 50% do volume celular. Em vermelho observou-se o núcleo da célula Sf9 modificada a qual possui a proteína mCherry contendo sinal de localização nuclear marcando-o de vermelho. O X2 se difundiu pelo citoplasma de forma inespecífica com eventuais células contendo marcações mais intensas em estruturas alongadas pelo citoplasma (Figura 17 A e B).

Após 96 horas de infecção com AcMNPV, o núcleo aumentou de tamanho avançando sobre o citoplasma que tornou-se mais compacto. Observou-se uma maior quantidade de células contendo marcação forte de estruturas esféricas e alongadas próximas ao núcleo em comparação às células não infectadas, além disto a fluorescência perinuclear torna-se mais intensa em relação ao resto do citoplasma (Figura 17 C e D).

Nas células infectadas com o vírus que não possui o gene anti-apoptótico *p35* (AcMNPV Δ P35) a fluorescência do X2 tornou-se mais dispersa e intensa pela região perinuclear, poucas estruturas esféricas com forte marcação foram observadas. No campo claro observou-se que a membrana plasmática começa a apresentar sinais da fase tardia da apoptose com a formação de vesículas em brotamento pela membrana plasmática. Além disto, observa-se que o X2 começa a penetrar no núcleo, indicando que a membrana nuclear foi comprometida e o conteúdo citoplasmático está invadindo o núcleo, o que é outro sinal de progresso da morte celular programada (Figura 17 E e F).

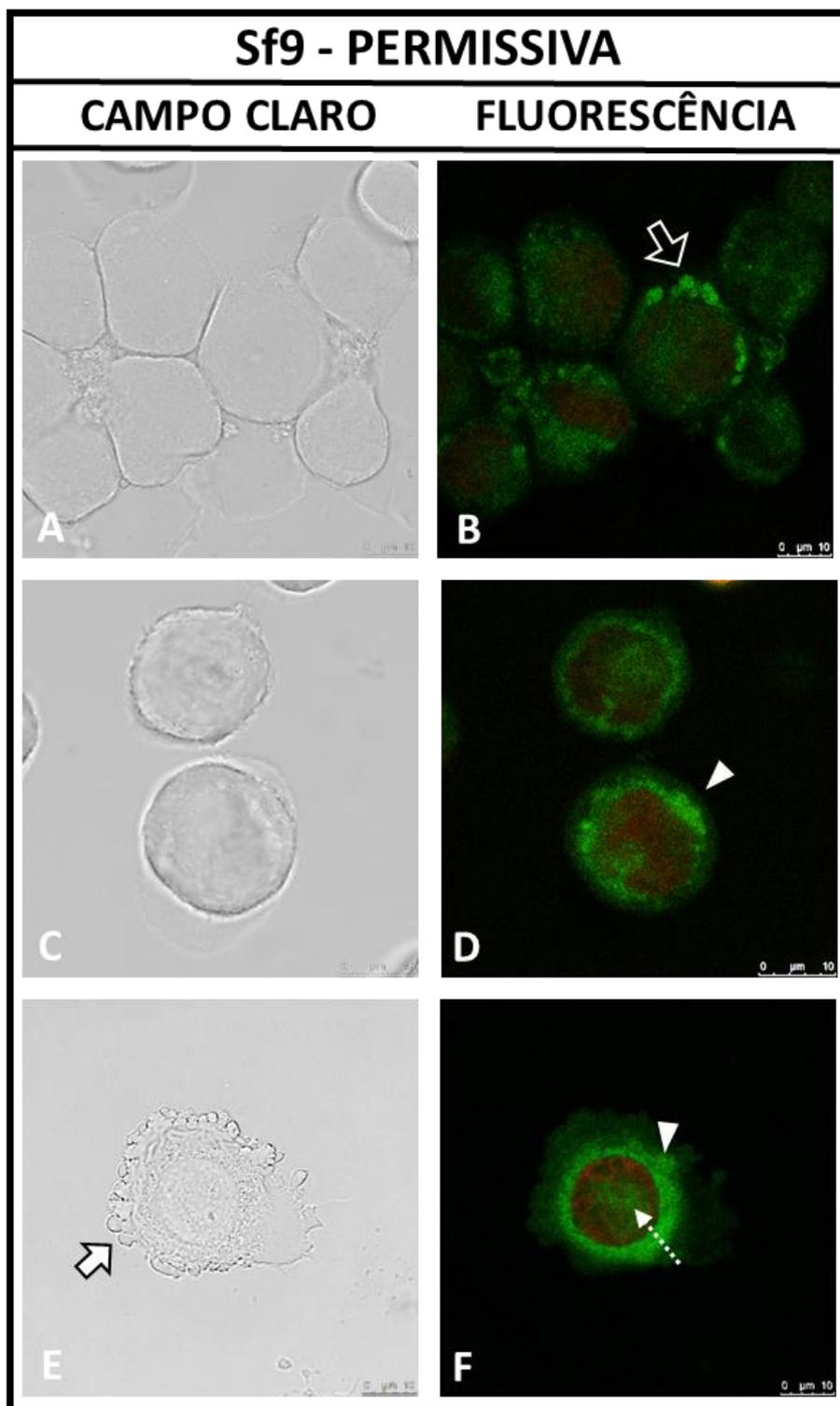


Figura 17: Prova de aplicação do X2 em células de inseto Sf9 permissivas a infecção por AcMNPV. (A – F) Células Sf9 permissivas à infecção por AcMNPV fixadas e tratadas com X2 a 100 μ M após serem submetidas à três condições: I) não incubadas com vírus; II) infectadas com AcMNPV ou III) infectadas com AcMNPV Δ P35, indutor de apoptose. (A – B) Marcação de estruturas circulares alongadas próximas ao núcleo (seta vazia). (C – D) Concentração de sinal fluorescente de X2 na região perinuclear (cabeça de seta). (E – F) Vesículas em formação na periferia da célula sinalizando fase tardia da apoptose (seta cheia), concentração de X2 na região perinuclear (cabeça de seta), invasão do BTD para dentro do núcleo. Barra de referência de 10 μ m

Na linhagem celular semipermissiva Ld652Y, as células não infectadas possuem uma morfologia arredondada ou elipsoide, algumas com longas extensões citoplasmáticas. O X2 apresentou marcação difusa pelo citoplasma e levemente concentrada em regiões próximas ao núcleo, mas em geral a marcação foi difusa pelo citoplasma (

Figura 18 A e B).

Quando esta linhagem foi infectada pelo AcMNPV o núcleo aumentou seu volume e observa-se um acúmulo de vesículas em regiões perinucleares em um dos polos da célula (

Figura 18 C e D). A marcação difusa pelo citoplasma permanece, mas as vesículas tornam-se preponderantes.

Quando a Ld652Y foi incubada com AcMNPV Δ P35, muitas células entram em apoptose conforme avança a infecção viral, adquirindo um formato irregular. As células apresentaram aumento do volume nuclear e a fluorescência do BTB se concentrou nas regiões próximas ao núcleo similar a infecção por AcMNPV. São observadas células na fase final da apoptose constituindo-se majoritariamente por corpos apoptóticos, os quais também são marcados de forma difusa pelo X2 (

Figura 18 E e F).

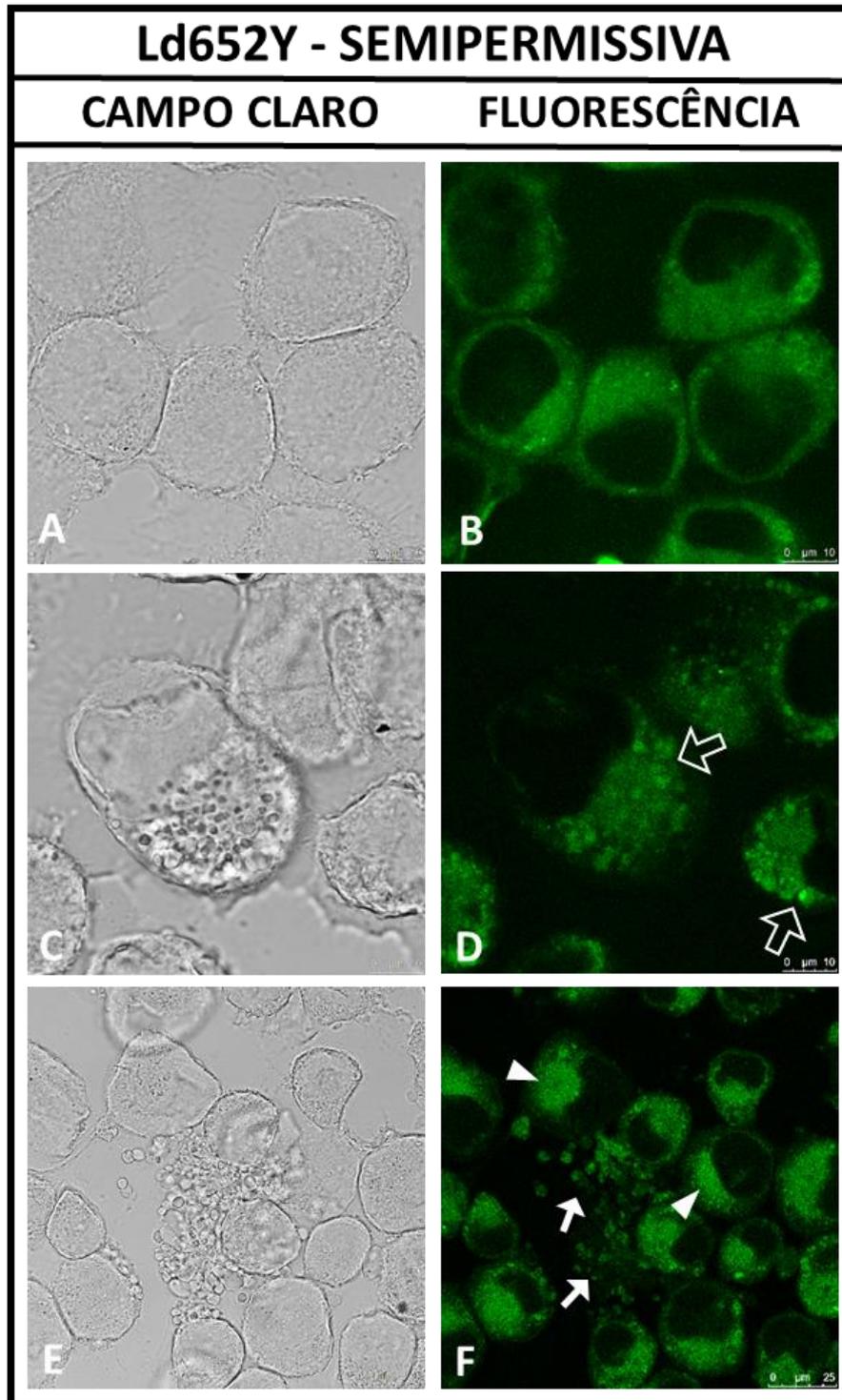


Figura 18: Prova de aplicação do X2 em células de inseto Ld652Y semipermissivas à infecção por AcMNPV. (A – F) Células Ld652Y semi-permissivas à infecção por AcMNPV fixadas e tratadas com X2 a 100 μ M após serem submetidas à três condições: I) não incubadas com vírus; II) infectadas com AcMNPV ou III) infectadas com AcMNPV Δ P35, indutor de apoptose. (A – B) Marcação inespecífica do X2 levemente concentrada em regiões próximas ao núcleo. (C – D) Acúmulo de vesículas iniciando a partir da região perinuclear (setas vazias). (E – F) Marcação concentrada de X2 em regiões próximas ao núcleo (cabeças de seta) e difusa dentro de corpos apoptóticos (setas cheias) indicando que X2 está disperso no citoplasma. Barras de referência de 10 e 25 μ m.

Nas células não-permissivas Bm5 observou-se em campo claro uma morfologia elipsoidal contendo estruturas arredondadas e birrefringentes em seu citoplasma (muito provavelmente corpúsculos lipídicos) e o núcleo ocupando cerca de 50% do volume celular. Na fluorescência verificou-se que a marcação do X2 foi difusa por todo o citoplasma, sem qualquer sinal fluorescente concentrado ao redor do núcleo. Observa-se também algumas estruturas citoplasmáticas com formato arredondado que não são marcadas pelo X2, estas são as mesmas estruturas birrefringentes do citoplasma indicadas como potencial corpúsculos lipídicos. O núcleo também não foi marcado pelo X2 (Figura 19 A e B).

Após 96 horas de incubação com AcMNPV, observou-se uma certa distorção do formato elipsoidal da célula para um formato irregular. Também há um leve aumento do sinal fluorescente na região perinuclear, entretanto não se observa muita diferença em comparação às células não incubadas com vírus (Figura 19 C e D). Conforme esperado, o núcleo não aumentou seu volume, visto que o vírus AcMNPV não se replica nessa célula.

Nas células Bm5 tratadas com o vírus AcMNPV Δ P35, a maior parte das células entrou em apoptose. As Figura 19 E e F mostram uma célula em fase final de apoptose com formato irregular, com forte marcação na região perinuclear. A área interior do núcleo com formato irregular possui marcação difusa pelo derivado de BTB, indicando fragilização da membrana nuclear e invasão de conteúdo citoplasmático dentro do núcleo.

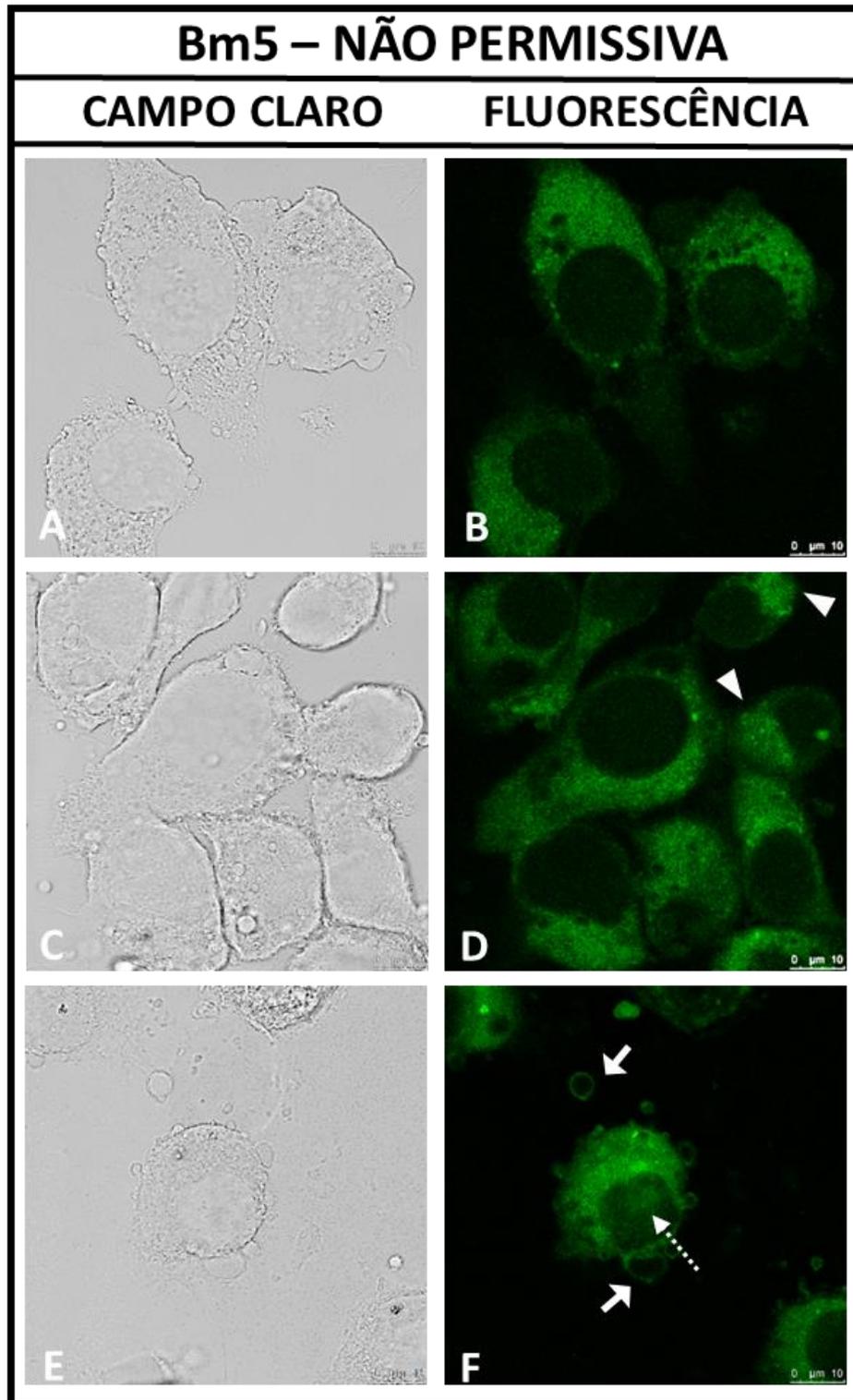


Figura 19: Prova de aplicação do X2 em células de inseto Bm5 não permissivas à infecção por AcMNPV. (A – F) Células Bm5 não permissivas à infecção por AcMNPV fixadas e tratadas com X2 a 100 μ M após serem submetidas à três condições: I) não incubadas com vírus; II) infectadas com AcMNPV ou III) infectadas com AcMNPV Δ P35, indutor de apoptose. (A – B) Marcação do X2 difusa por todo o citoplasma. (C – D) Distorção do formato elipsoidal da célula e leve aumento do sinal fluorescente na região perinuclear (cabeças de seta). (E – F) Célula em fase final de apoptose com formato irregular e corpos apoptóticos brotando da membrana (setas cheias). Núcleo com formato irregular e parcialmente marcado pelo derivado de BTB (seta pontilhada). Barra de referência de 10 μ m.

5.10. Avaliação da citotoxicidade do composto G2 por ensaios com MTT ou com azul de tripan

Foram realizados testes para avaliar a viabilidade celular com a intenção de identificar possível citotoxicidade em células marcadas com os compostos G2. A atividade citotóxica do fluoróforo foi testada por ensaios com azul de tripan (mortalidade) em Fibroblastos e com MTT (viabilidade) nos seguintes tipos celulares humanas: MDA-MB-231, MCF-7, CACO-2, DU-145 e HUVEC. Os tempos de tratamento foram 24 horas ou 30 minutos, cada qual com as seguintes concentrações: 100 μM ; 10 μM ; 1 μM ; 0,1 μM e 0,01 μM . Não foram testadas concentrações mais altas que 100 μM devido à insolubilidade deste composto nos veículos utilizados.

Pela análise do gráfico referente à incubação com o composto G2 durante 30 minutos (A) verificou-se uma redução da viabilidade celular nas linhagens CACO-2 e MDA-MB-231 quando tratadas com 100 μM desse fluoróforo, em relação aquelas não tratadas (teste t, $P < 0.001$). O gráfico referente à incubação por 24 horas apresentou um resultado semelhante (B), acrescenta-se aqui que as células HUVEC, além das linhagens CACO-2 e MDA-MB-231, também foram suscetíveis ao tratamento com 100 μM de G2 por 24 horas, em comparação àquelas não incubadas com o fluoróforo.

No teste de exclusão por azul de tripan em Fibroblastos, foram contabilizadas células vivas e células mortas após incubação com G2 por 24 horas através de microscopia de luz, considerando aquelas que apresentavam citoplasma azul como células mortas e as de citoplasma claro como células viáveis. Morfologicamente, os Fibroblastos tratados com G2 a 10 μM são muito semelhantes àqueles incubados apenas com DMSO 0,1% (C_I) enquanto os grupos de fibroblastos incubados com 100 μM do fluoróforo apresentaram aspecto morfológicos que sugerem danos celulares (C_II). Essas células perderam a conformação fusiforme e adquiriram uma morfologia arredondada, entretanto, pela avaliação de mortalidade não foi observada alta mortalidade para o tratamento com maior a concentração testada (100 μM) de G2 (C_III). Nas amostras de fibroblastos incubadas com 100 μM do composto G2 a mortalidade foi de cerca de 10% ($\pm 1,2$ SEM), e para aqueles tratados com 10 μM do fluoróforo foi de cerca de 8% ($\pm 1,5$ SEM). Também não houve diferença estatisticamente significativa para qualquer das taxas de mortalidade em relação ao controle ($p > 0.05$ ou $p > 0.001$).

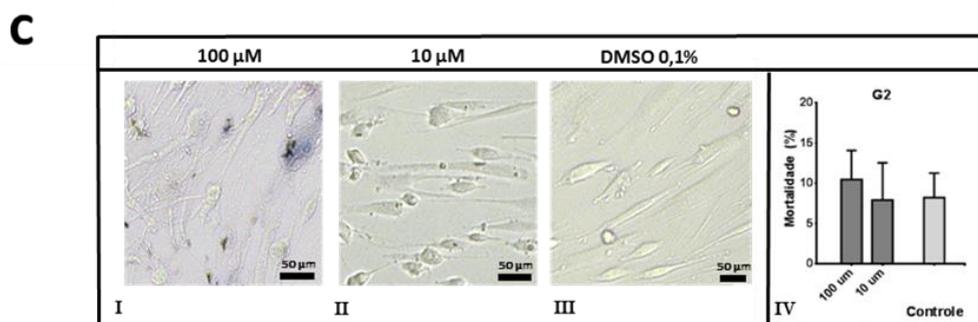
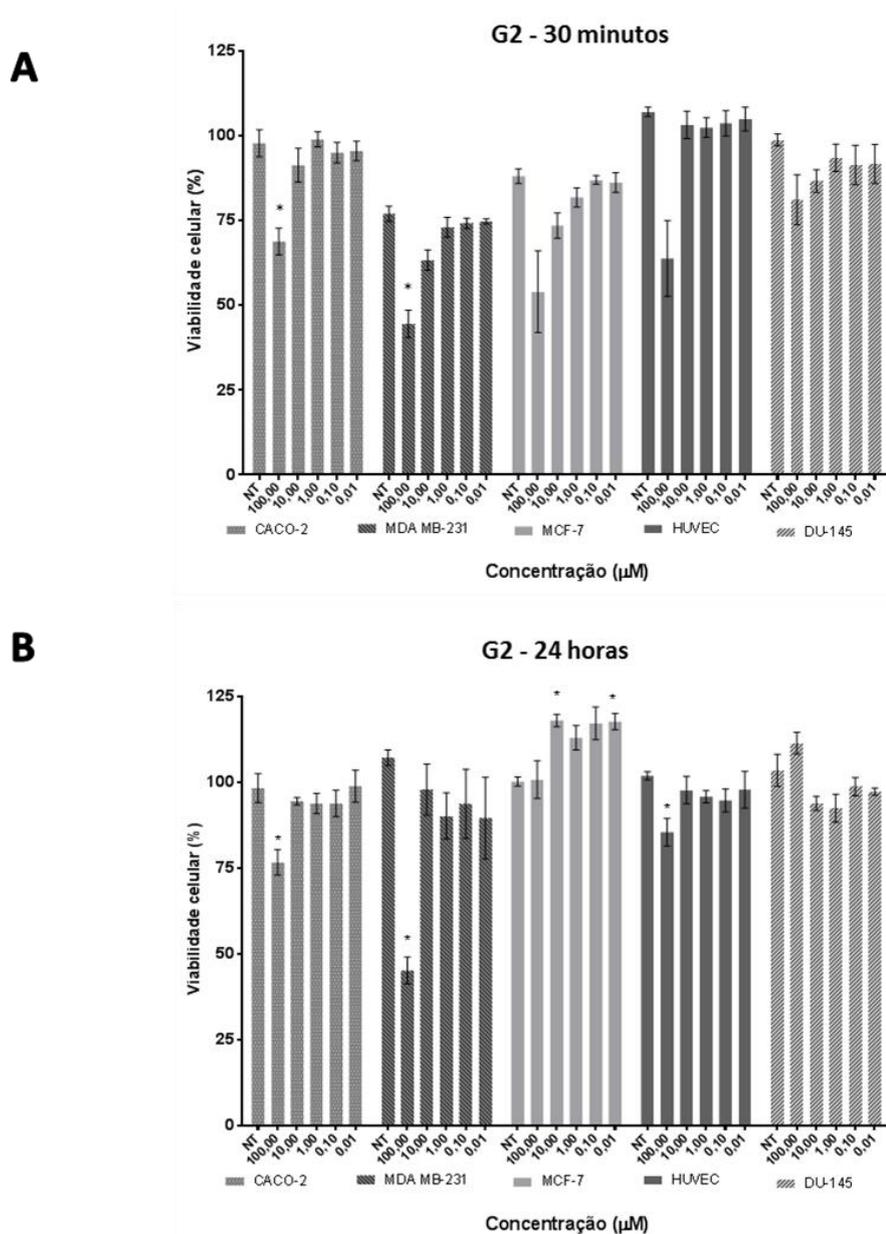


Figura 20: Avaliação de citotoxicidade induzida por G2 em linhagens celulares tratadas com o composto por 30 minutos (A) ou 24 horas (B). (C) Análise morfológica de Fibroblastos incubados por 24 horas com 100 μ M de G2 (I), 10 μ M de G2 (II), DMSO 0,1 % (III) e média da mortalidade avaliadas por azul de tripan (IV). O símbolo * representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (NT) da mesma linhagem com $P < 0,001$.

5.11. Análise de marcação do fluoróforo G2 em células de mamífero vivas e fixadas

As linhagens celulares humanas tratadas com o composto G2 foram MDA-MB-231, MCF-7, CACO-2, DU-145 e Fibroblastos derivados de cultivo primário humano. As incubações foram realizadas em células vivas ou após a fixação incubadas por 30 minutos com o composto à concentração de 100 μ M.

O composto G2 apresentou uma forte emissão fluorescente no canal verde e nenhuma fluorescência vermelha ou azul. As marcações com esse fluorocromo foram altamente específicas e apresentaram pouco ou nenhum ruído de fundo. As células tratadas com o composto G2, tanto vivas quanto fixadas, apresentaram marcação intensa de componentes citoplasmáticos com formato semelhante ao de corpúsculos lipídicos distribuídos pelo citoplasma. De acordo com o seu volume aparente, quantidade e distribuição provavelmente correspondem a gotículas lipídicas, as quais são amplamente encontrados em células de mamíferos (Figura 21 e Figura 22). Este perfil de marcação foi altamente consistente tendo sido obtido nos cinco tipos celulares testados. Notavelmente, as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 apresentaram um maior número de vesículas marcadas que as demais linhagens (Figura 21 A e C, Figura 22 A e C).

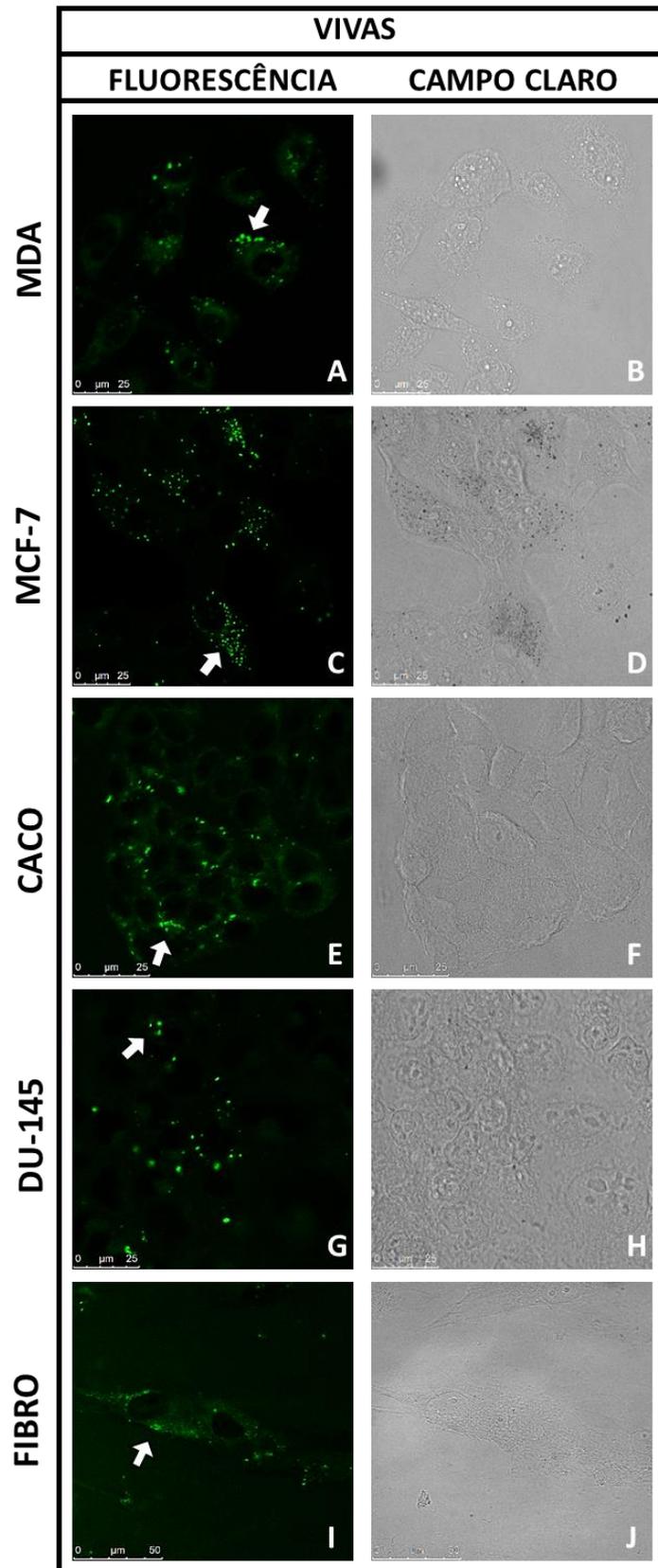


Figura 21: Avaliação do padrão de marcação fluorescente do composto G2 em células vivas (A-J). Células MDA-MB-231, MCF-7, CACO-2, DU-145 e Fibroblastos incubadas vivas com o composto G2 a 100 μ M por 30 minutos. Setas indicam marcação fluorescente de componentes citoplasmáticos com aspecto semelhante ao de corpúsculos perfeitamente lipídicos. Barras de referência 25 e 50 μ m.

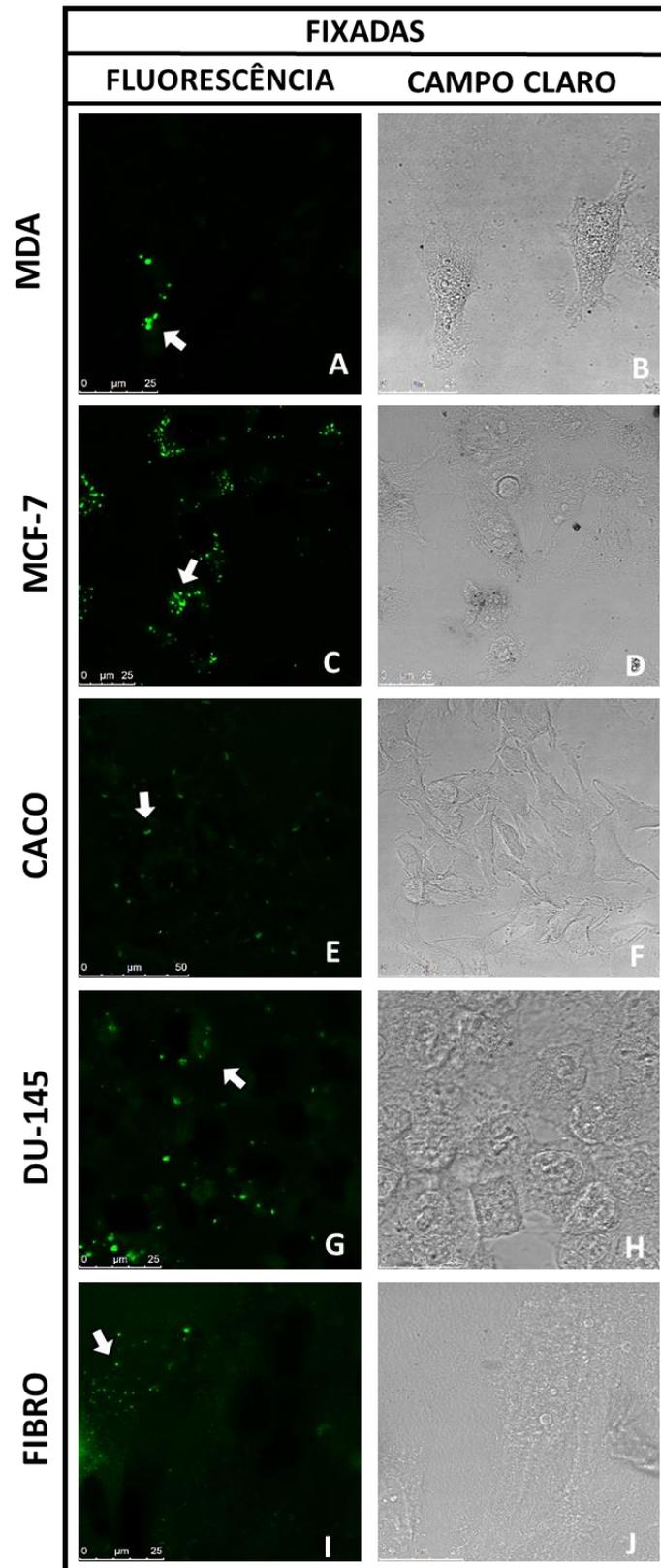


Figura 22: Avaliação do padrão de marcação fluorescente do composto G2 em células fixadas (A-J). Células MDA-MB-231, MCF-7, CACO-2, DU-145 e Fibroblastos incubadas após fixação com o composto G2 a 100 μ M por 30 minutos. Setas indicam marcação fluorescente de componentes citoplasmáticos com aspecto semelhante ao de corpúsculos lipídicos. Barras de referência 25 e 50 μ m.

5.12. Análise ortogonal para localização das estruturas marcadas pelo G2

Conforme descrito para o derivado de BTB X2, foi realizada a renderização 3D das imagens de células tratadas com o composto G2 por *Z-stack* e em seguida foi realizado o corte ortogonal a fim de determinar se os corpúsculos fluorescentes se encontravam no citoplasma ou adsorvidos na superfície celular. Neste ensaio, células MDA-MB-231 foram tratadas vivas com o composto X2 a 100 μM por 30 minutos e posteriormente incubadas com DAPI por 5 minutos, após a fixação. Este experimento demonstrou de forma inequívoca que as estruturas marcadas pelo composto G2 estão contidas no interior das células. A Figura 23 C mostra as secções da célula (corte ortogonal) nos eixos X e Y nesses cortes observa-se claramente um corpúsculo marcado pelo G2 no mesmo horizonte do núcleo celular.

Como essas análises foram feitas no mesmo período para os dois derivados de BTB estudados neste trabalho, o laser de Argônio estava inoperante, portanto foi necessário excitar o G2 com o laser 405 nm. Desta forma, as imagens no canal de fluorescência verde também apresentaram marcações na região nuclear, referente ao amplo sinal (vazamento) do DAPI sendo capturado nesse canal (Figura 23 B).

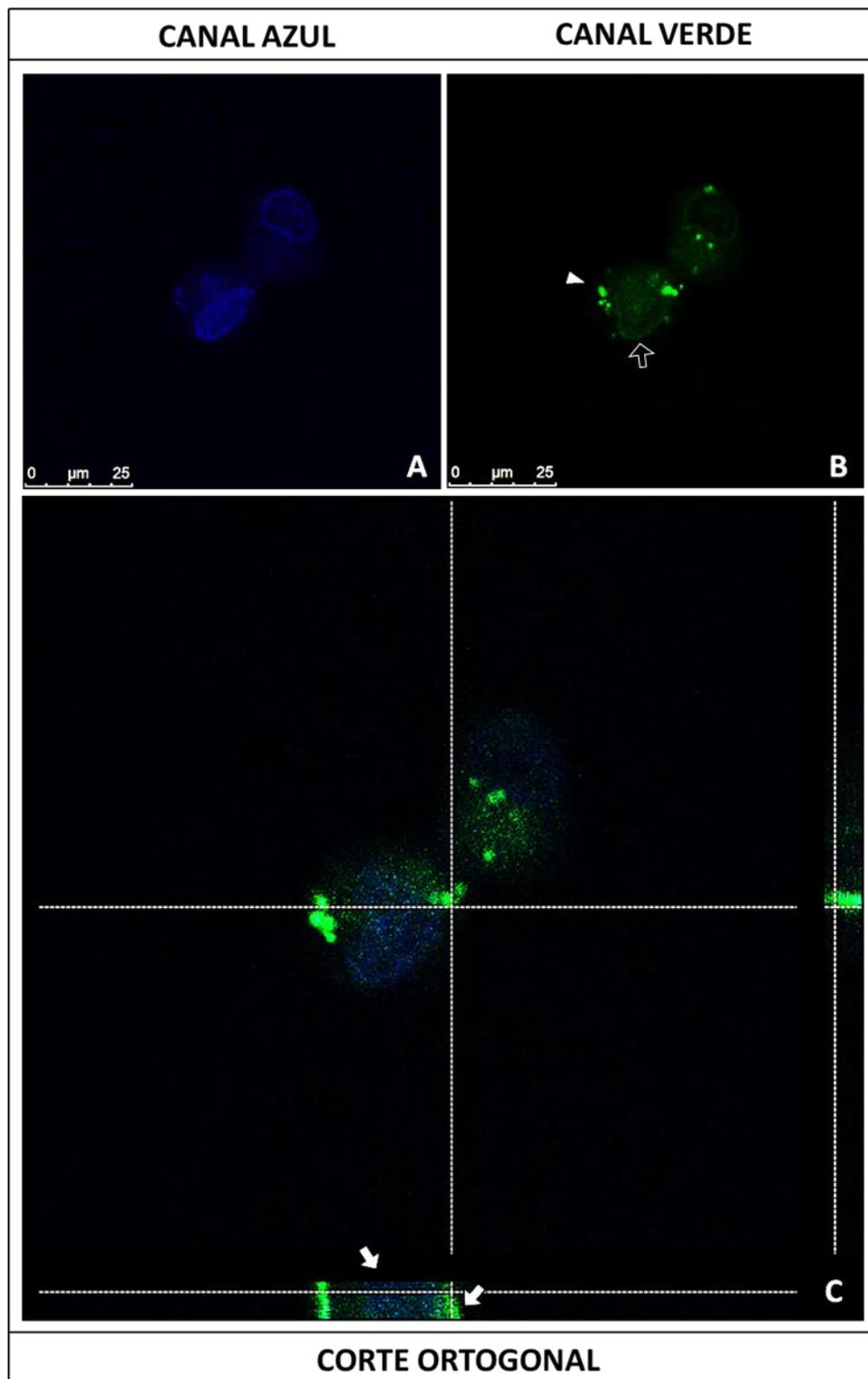


Figura 23: Confirmação por *Z-stack* de marcação do G2 dentro da célula. (A-C) Células MDA-MB-231 tratadas vivas com o composto G2 a 100 μM por 30 minutos e incubadas com DAPI por 5 minutos, após a fixação. (A) Canal de fluorescência azul demonstrando marcação com a sonda comercial DAPI na região nuclear. (B) Canal de fluorescência verde contendo a marcação do G2 em estruturas esféricas dispersas pelo citoplasma (cabeças de seta) e sinal-ruído na região nuclear referente ao vazamento de sinal do DAPI (seta vazia). (C) Corte ortogonal da célula mostrado em secções no eixo X e no eixo Y. Estruturas vesiculares e núcleo encontram-se no mesmo horizonte celular (setas cheias). Barra de referência com 25 μm .

5.13. Comparação da marcação do G2 em células de mamíferos com diferentes corantes

A sonda comercial fluorescente BODIPY[®] 493/503 é amplamente utilizada para a marcação de fosfolipídios neutros, óleos e outros lipídios apolares. Entretanto ela apresenta pico ótimo de emissão de fluorescência no intervalo entre 493 – 503 nm. Como a faixa de emissão deste marcador comercial (503 nm – 540 nm) é ocupada pelo espectro de emissão do BTD G2 (500 nm – 570 nm) não foi possível realizar ensaio de comarcação com esses compostos. Outros marcadores amplamente utilizados para marcar lipídios neutros são o Nile Red[®], fluorescente no vermelho e Oil Red O, utilizado em microscopia de luz, marcando lipídios com uma cor vermelha.

Pela necessidade de confirmação dos indícios de que as marcações do G2 se tratavam de fluorescência em corpúsculos lipícos, o marcador Oil Red O foi testado para uso em microscopia de luz e fluorescência em conjunto ao G2.

As primeiras avaliações foram realizadas em células MDA-MB-231 ou MCF-7 fixadas e incubadas com G2, com BODIPY[®] ou com Oil Red O. Os resultados mostraram alta semelhança entre os perfis de marcação exibidos por cada sonda, de modo que os três marcadores mostraram preferência por corpúsculos esféricos distribuídos através do citoplasma. Corpúsculos de tamanhos pequenos e maiores foram positivamente marcados com os três marcadores testados G2, de BODIPY[®] e Oil Red O. Como esperado foram observados, em imagens de campo claro das células tratadas com Oil Red O, pequenos pontos escuros nos locais correspondentes à marcação das vesículas fluorescentes onde ocorreu a acumulação do marcador. No entanto, de forma não esperada um padrão semelhante e mais tênue foi observado em imagens de campo claro de células incubadas com o composto G2 (Figura 24).

As gotículas lipídicas marcadas por Oil Red O e as estruturas circulares do G2 foram colocalizadas pela sobreposição das imagens dos canais de fluorescência verde e vermelha. Entretanto o composto G2 e o marcador Oil Red O tiveram desempenhos distintos em termos de marcação fluorescente quando empregados em diluentes distintos. A primeira solução foi preparada utilizando-se o diluente mais empregado para o uso do Oil Red O em células: o Propilenoglicol. Nesta solução, a marcação com Oil Red O ficou perfeita, inclusive apresentando uma marcação mais escura no campo claro (Figura 25 A e C). No entanto, o emprego do G2 nesta solução produziu emissão de fluorescência com sinal muito mais fraco do que o usual, desse modo, a sobreposição das imagens mostrando

a colocalização ficou na cor laranja com predominância do vermelho sobre o verde. Portanto, o propilenoglicol não é um bom veículo para diluir ou infiltrar o composto G2 para uso em amostras biológicas.

A segunda solução foi preparada utilizando-se outro diluente também citado para marcação com Oil Red O, o álcool isopropílico (Isopropanol). Neste procedimento, a marcação fluorescente com Oil Red O ficou fraca, os pontos escuros apresentados no campo claro referentes à acumulação do composto nas regiões alvas não puderam ser identificados (Figura 25 E e G). Contudo, o composto G2 produziu uma emissão fluorescente mais intensa neste ensaio. Em contrapartida, a marcação inespecífica deste fluoróforo sobre o citoplasma celular, que costuma ser quase inexistente, aumentou. A sobreposição das imagens mostrando a colocalização para esse tratamento fica na cor amarela, que seria o tom esperado produto da sobreposição de cores com emissões em intensidades equivalentes (Figura 25).

Mesmo com as dificuldades técnicas de comarcação entre G2 e Oil Red O, é evidente a similaridade e colocalização no padrão de marcação de vesículas ou gotículas contendo lipídios. O mesmo pode ser observado comparando BODIPY® e o composto G2, no entanto o BODIPY® apresentou um sinal de fundo maior que o G2. Como estes corantes comerciais bem estabelecidos marcam especificamente lipídios apolares, é possível concluir que o G2 também tem afinidade por este grupo de moléculas.

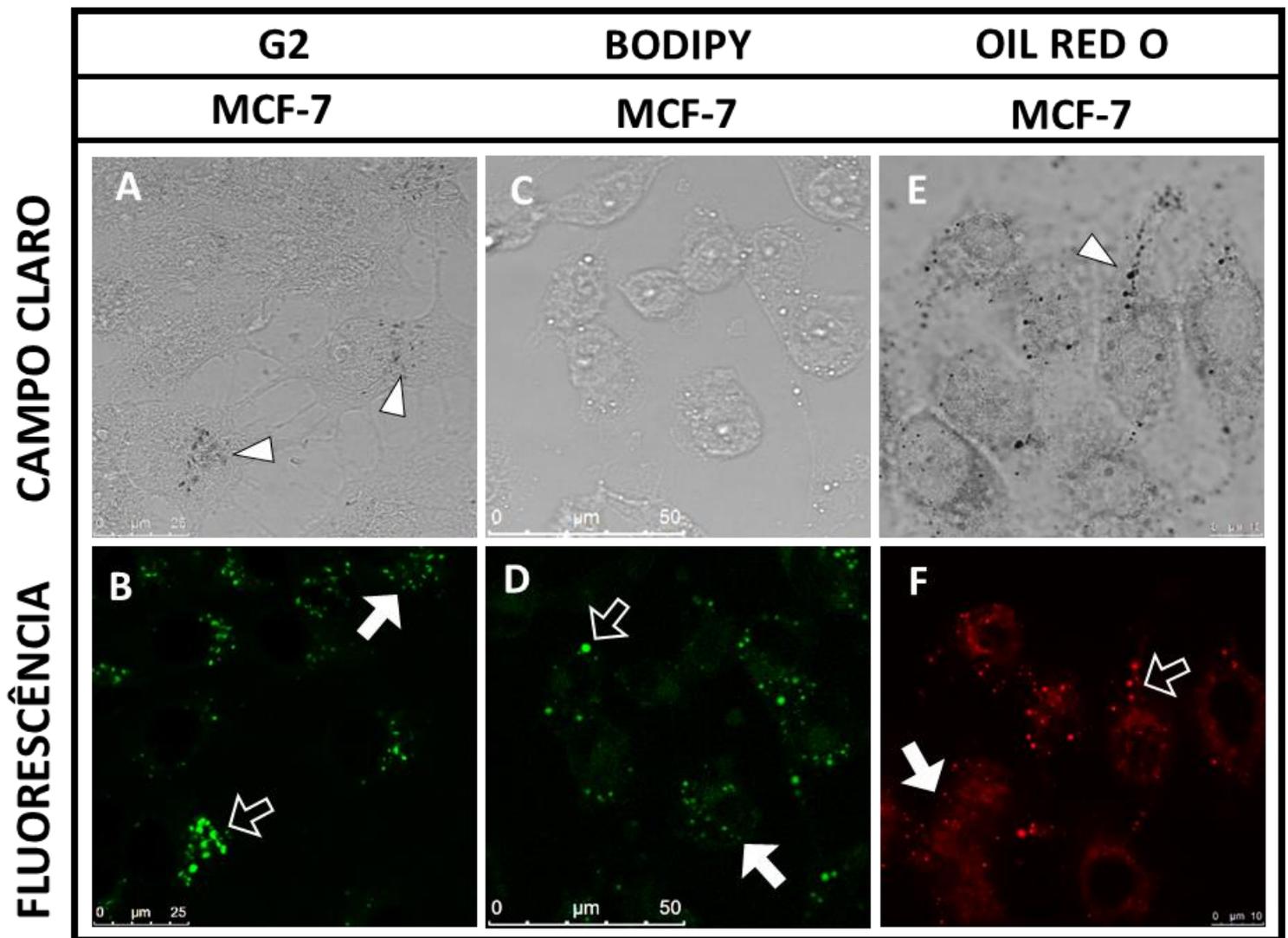


Figura 24: Comparação entre os perfis de marcação de G2, BODIPY[®] e Oil Red O. Células MCF-7 incubadas com G2, BODIPY[®] ou com Oil Red O após fixação (A – F). Setas cheias apontam marcação de várias estruturas esféricas distribuídas através do citoplasma de células incubadas com G2 (B), BODIPY[®] (D), ou por Oil Red O (F). Marcação de corpúsculos ligeiramente maiores, indicada por setas vazias em células incubadas com G2 (B), mas que também é correspondente em células incubadas com BODIPY[®] (D) em células incubadas com Oil Red O (F). Cabeças de seta apontam acúmulo do composto G2 ou do marcador de lipídios Oil Red O, visto em campo claro, que correspondem aos corpúsculos lipídicos no citoplasma. Barras de referência com 10 e 25 e 50 μm .

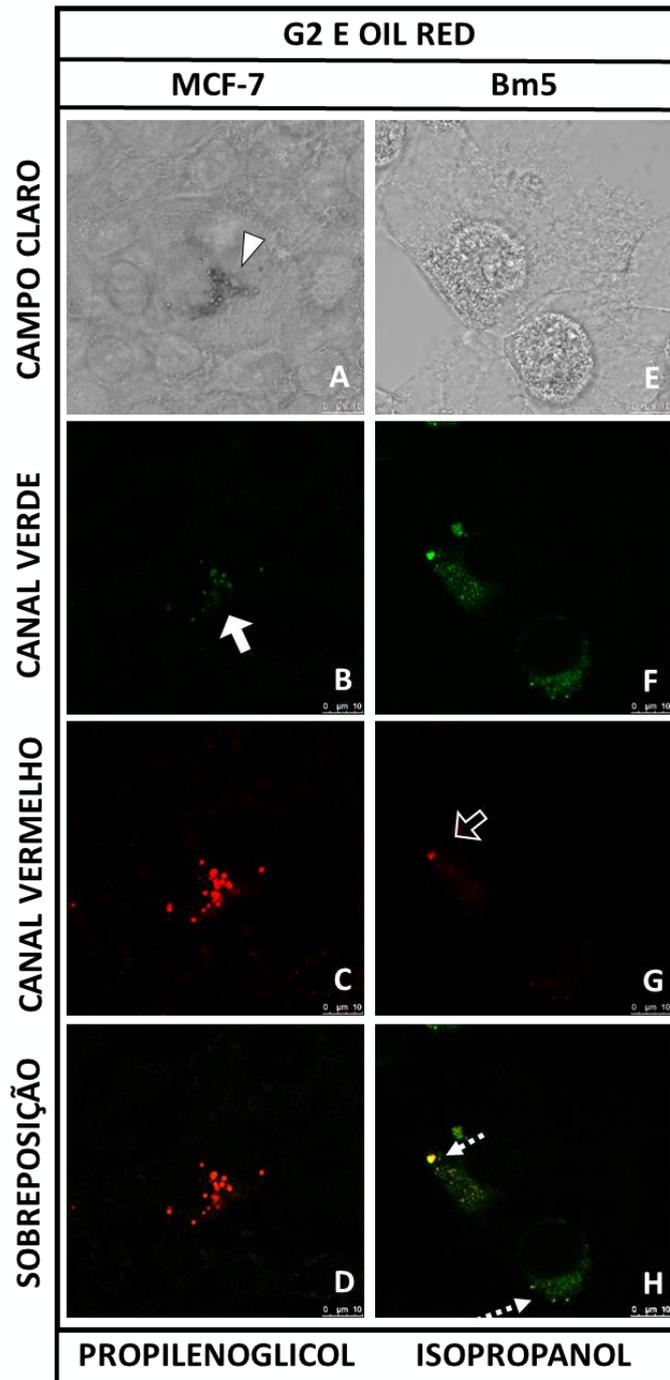


Figura 25: (A – H) Colocalização de G2 e Oil Red O confirmando seletividade do composto por corpúsculos lipídicos e comparação entre dois diluentes (propilenoglicol e isopropanol) para tratamentos de comarcação de G2 com Oil Red O. (A – D) Células MCF-7, previamente incluídas em propilenoglicol 100%, incubadas com Oil Red O a 0,5% e posteriormente incubadas com G2 a 100 μ M. (A) Cabeça de seta aponta os marcadores acumulados nas regiões alvo da célula, vistos pelo campo claro. (B) Seta cheia indica marcação fraca de G2. (C) Comarcação entre G2 e Oil Red O com prevalência do sinal fluorescente de Oil Red O. (E – H) Células Bm5 fixadas previamente, desidratadas em isopropanol 60%, incubadas com Oil Red O a 0,5% e posteriormente incubadas com G2 a 100 μ M. (G) Figura indicando marcação fraca de Oil Red O (seta vazia). (H) Colocalização entre G2 e Oil Red O com equivalência da intensidade dos sinais de G2 e de Oil Red O (setas pontilhadas). Barra de referência com 10 μ m.

5.14. Comparação da distribuição das marcações de G2 e de BODIPY®

Para analisar e comparar a morfologia, quantidade e distribuição dos corpúsculos lipídicos marcados pelo derivado de BTG G2 e pela sonda comercial BODIPY® foi realizado um estudo panorâmico das marcações por esses fluorocromos. Tal qual descrito para o composto X2, foram realizadas análises digitais através do *software* ImageJ versão Fiji em imagens adquiridas por microscopia confocal de células MDA-MB-231 tratadas exclusivamente com G2 ou com BODIPY®, para realçar a visualização da marcação fluorescente das estruturas celulares. Como os parâmetros não foram exatamente os mesmos para a aquisição das imagens, neste tópico a intensidade do sinal fluorescente será comparada apenas de forma qualitativa.

Observações importantes obtidas nessa análise foram: I) a sonda comercial BODIPY® identificou uma proporção maior de corpúsculos lipídicos de pequeno porte (Figura 26 C); II) e o derivado de BTG marcou uma proporção maior de gotas lipídicas de médio e grande porte (Figura 26 G). Quando observamos o perfil de distribuição ao longo da célula em termos da intensidade da fluorescência, nota-se maior quantidade de picos pequenos espalhados por toda a célula referente a incubação com BODIPY®. O padrão de marcação do G2 é facilmente visualizado, com uma menor quantidade de organelas marcadas no espaço citoplasmático (Figura 26 H), como já havia sido notado nos ensaios com células vivas ou células fixadas tratadas com este fluoróforo.

Como o BODIPY® empregado nos ensaios possui afinidade por um amplo grupo de biomoléculas com características apolares, é possível que o G2 tenha afinidade por um grupo de moléculas mais restrito que o BODIPY®.

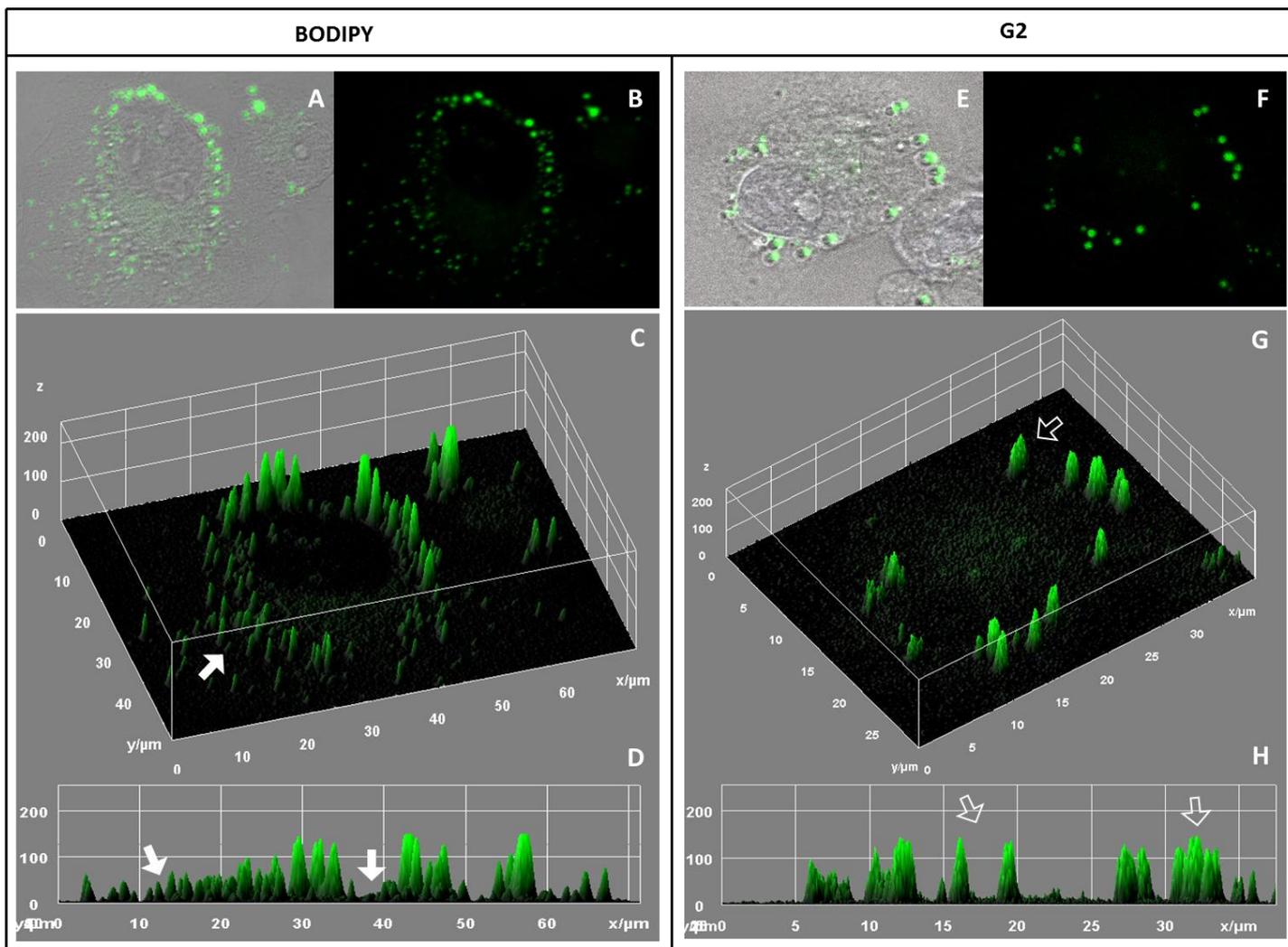


Figura 26: Estudo topológico das marcações fluorescentes de G2 e de BODIPY®. Imagens de células MDA-MB-231 incubadas após fixação com o marcador comercial BODIPY® (A e B) ou com o derivado de BTD G2 (E e F). (C e G). Mostram a plotagem XYZ das imagens referentes as incubações com BODIPY® ou com G2 possibilitando melhor visualização da topologia celular. (C) Marcação proporcionalmente maior de corpos lipídicos menores (seta cheia) em comparação com (G) que aponta proporção maior de corpúsculos lipídicos de tamanho médio (seta vazia). (D e H) Intensidade da fluorescência, setas cheias apontam pequenos picos distribuídos no citoplasma celular quando empregado BODIPY® e setas vazias mostram picos médios para o emprego do composto G2.

5.15. Avaliação da intensidade de fluorescência do G2 por citometria de fluxo

As comparações entre as intensidades de fluorescência por célula do marcador G2 e da sonda comercial BODIPY[®] foram realizadas através de citometria de fluxo de células HUVEC vivas tratadas com 100 μM , 10 μM e 1 μM de G2, por 30 minutos ou com 1 $\mu\text{g/ml}$, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ ou 0,01 $\mu\text{g/ml}$ de BODIPY[®] pelo mesmo período. Os resultados seguem descritos abaixo e estão apresentados na figura 29.

Uma observação geral que pode ser feita dos histogramas em conjunto é que a intensidade de emissão fluorescente foi diretamente relacionada a concentração empregada. O histograma relativo à intensidade de fluorescência por célula tratada com G2 a 100 μM mostra uma faixa contínua (platô), o qual provavelmente refere-se a gradiente de células com baixa a alta fluorescência. Este composto aparentemente seleciona desde eventos com baixa fluorescência (células com poucas gotículas lipídicas dentro) a eventos com alta intensidade de sinal (células com muitos corpúsculos lipídicos).

Na marcação com o G2 a 10 μM também foi observado sinal fluorescente acima do limiar de corte de 38% dos eventos, contudo o citômetro de fluxo identifica poucos eventos de alta fluorescência. O que mostra que esta concentração não é aplicável com eficiência para citometria de fluxo. Células tratadas com G2 a 1 μM ou incubadas com BODIPY[®] a 0,1 $\mu\text{g/ml}$ ou 0,01 $\mu\text{g/ml}$ não apresentaram sinal de fluorescência detectáveis acima do limiar basal determinado.

O histograma referente a incubação com BODIPY[®] a 1 $\mu\text{g/ml}$ mostrou um pico estreito à direita relativamente distante do nível de corte que corresponde à fluorescência basal da célula, esse resultado revelou que o BODIPY[®] seleciona eventos com alta fluorescência. Comparando os sinais fluorescentes de G2 a 100 μM com o de BODIPY[®] a 1 $\mu\text{g/ml}$, que são as respectivas concentrações utilizadas em microscopia confocal para cada um desses marcadores, observa-se que ambos apresentaram intensidades máximas similares, no entanto o BODIPY[®] possui uma maior eficiência que o G2, permitindo a detecção de 99% dos eventos com alta fluorescência. O G2 por outro lado captou apenas 72 % dos eventos totais acima do nível de corte.

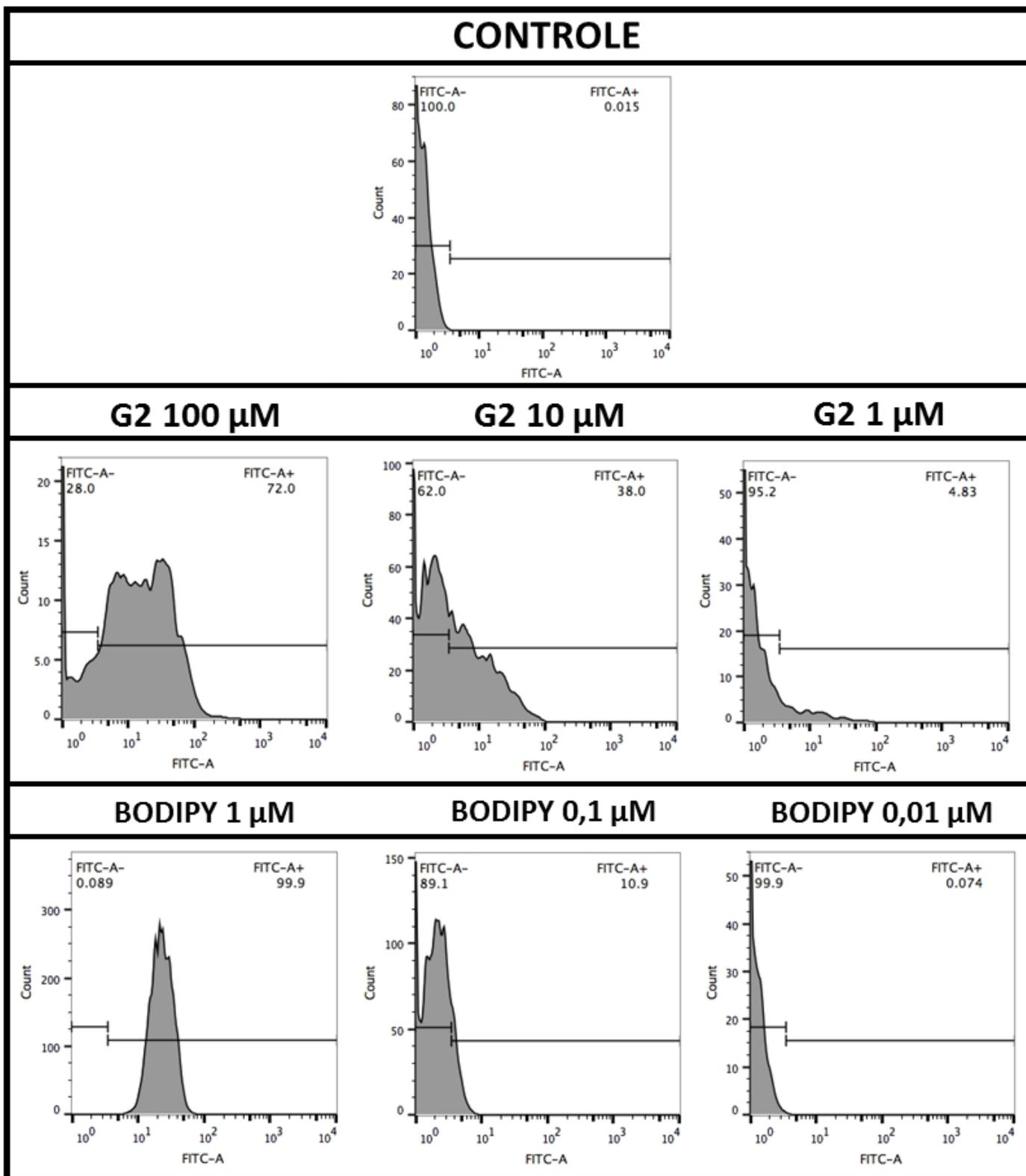


Figura 27: Comparação entre as intensidades de fluorescência por célula entre os compostos G2 e BODIPY[®] através de citometria de fluxo. Histogramas de intensidade de sinal fluorescente por células nas seguintes condições: I) Não tratadas (controle); II) Incubadas vivas com 100 μ M, 10 μ M e 1 μ M de G2 por 30 minutos e III) Tratadas vivas com 1 μ g/ml, 0,1 μ g/ml ou 0,01 μ g/ml de BODIPY[®] pelo mesmo período.

5.16. Aplicação *in vivo* de G2 em *Caenorhabditis elegans*

Foi realizada marcação em *C. elegans* com G2 objetivando-se: I) avaliar a possibilidade de aplicação desse fluoróforo em novas espécies; II) estudar como se comporta a marcação de G2 nos tecidos desses nematódeos; III) verificar a capacidade de aplicação *in vivo* para o derivado de BTB em questão.

A Figura 28 mostra a aplicação do G2 em *C. elegans* vivo e fixado, bem como o tratamento controle, no qual o nematódeo foi apenas fixado sem incubação com o fluoróforo. A fraca e difusa autofluorescência do nematódeo está apresentada na Figura 28 A e não interferiu nos experimentos.

Quando realizado o tratamento dos nematódeos com o fluoróforo G2 após fixação, o resultado observado foi uma marcação fluorescente intensa de células e corpúsculos distribuídos essencialmente em torno do intestino (Figura 28 B).

Quando o composto foi apresentado para ingestão pelos nematódeos vivos por 12 horas (Figura 28 C) o fluoróforo permaneceu no lúmen do intestino do nematódeo. Quando o tempo de disponibilidade de ingestão foi prolongado para 24 h ocorreu uma maior penetração e distribuição do composto pelos tecidos (Figura 28 D), ou seja, houve a marcação dos corpúsculos esféricos distribuídos ao redor do intestino do nematódeo observados no tratamento com *C. elegans* fixados. O tempo de 24 h de exposição do composto ao ar, a temperatura de incubação dos nematódeos (20 °C) e o agressivo ambiente químico do intestino não foram suficientes para degradar o fluoróforo, o que atesta a alta estabilidade deste composto para aplicações *in vivo* no modelo *C. elegans*.

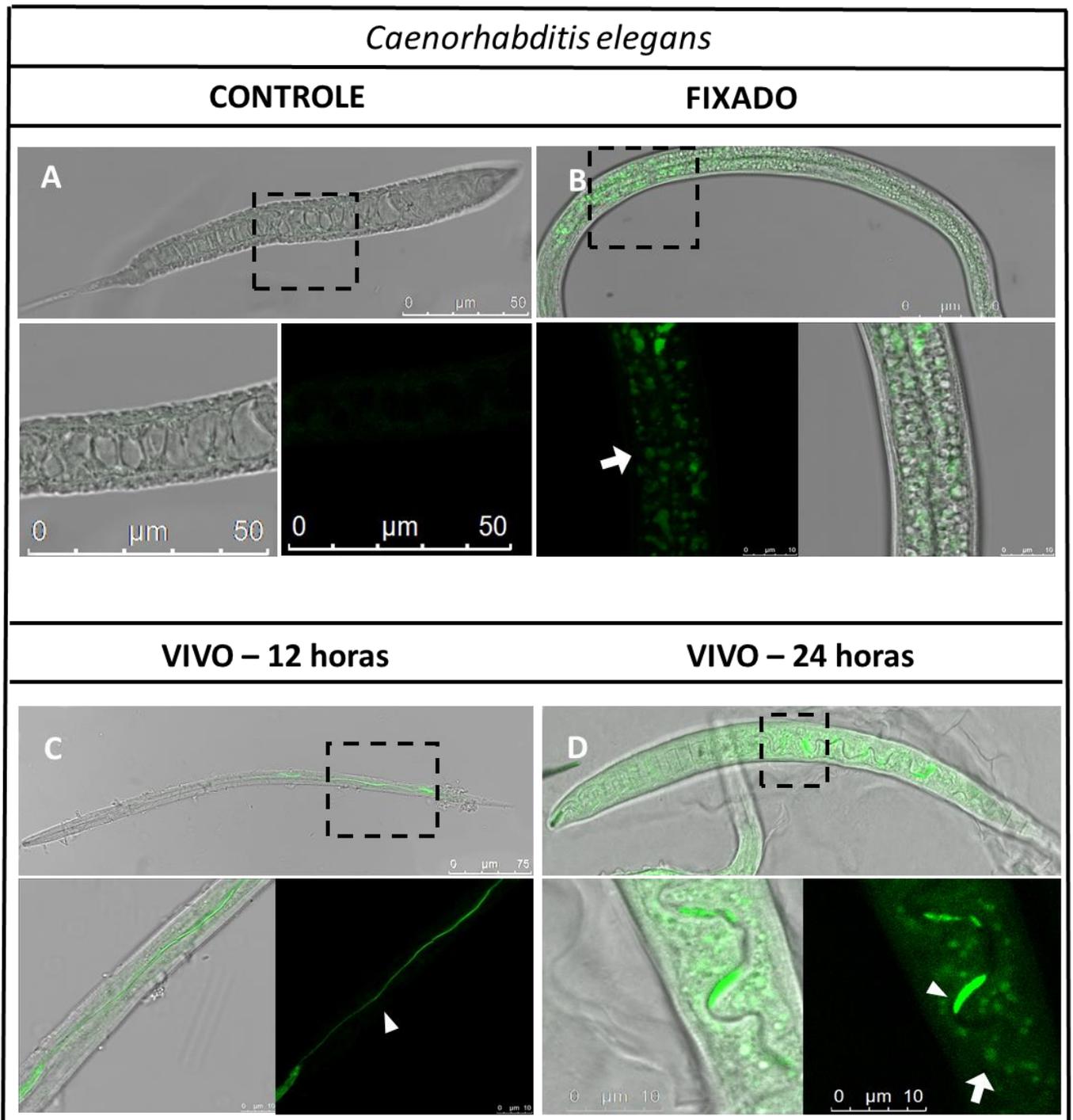


Figura 28: Demonstração de aplicabilidade do G2 in vivo em *C. elegans* (A – D). (A) Imagens de sobreposição e fluorescência de um *C. elegans* fixado mostrando fraca autofluorescência do nematódeo. (B) *C. elegans* tratado com G2 a 100 μ M após fixação. Seta aponta numerosos corpúsculos esféricos fluorescentes, os quais encontram-se distribuídos especialmente ao redor do intestino. (C) *C. elegans* tratado vivo com G2 a 500 μ M por 12 horas. Cabeça de seta mostra o composto G2 ingerido pelo nematódeo, localizado de maneira restrita ao longo do sistema alimentar do animal. (D) *C. elegans* tratado vivo com G2 a 500 μ M por 24 horas. Seta aponta corpúsculos esféricos distribuídos no intestino do nematódeo e cabeça de seta mostra o próprio fluoróforo contido dentro do sistema digestório desses nematódeos. Barras de referência com 10, 50 e 75 μ m.

5.17. Padrão da marcação de G2, BODIPY e Oil Red O em *C. elegans*

O padrão de marcação do G2 em *C. elegans* foi comparado com o perfil das sondas comerciais para lipídios. Os ensaios foram realizados com *C. elegans* fixados e incubados separadamente com G2, BODIPY® ou Oil Red O. O resultado observado foi semelhante nos três tipos de tratamentos e o padrão mais comum apresentado nas três marcações foi a marcação de células ao redor do intestino. Essas estruturas foram marcadas com alta intensidade de fluorescência verde nos nematódeos tratados com G2 (Figura 29 A e B). O BODIPY® apresentou uma marcação mais fraca e difusa que o do derivado de BTB (Figura 29 C e D). Nematódeos incubados com Oil Red O tiveram marcação das gotículas lipídicas fluorescentes no vermelho com alta intensidade, entretanto a marcação inespecífica e de fundo foi maior que naqueles marcados com G2 (Figura 29 E e F).

Também foi realizada uma avaliação do padrão de marcação desse fluoróforo nos tecidos de *C. elegans* em diferentes áreas anatômicas do nematódeo. Nestas comparações foram utilizados os nematódeos tratados vivos com G2 a 500 µM por 12 e por 24 h, bem como os fixados e incubados com G2 a 100 µM.

Conforme já descrito, este fluoróforo marcou uma grande quantidade de células na região intestinal dos *C. elegans*. As imagens A, B, I e J mostram marcações de G2 na região intestinal dos nematódeos, fluorescência que possivelmente ocorreu por marcação das organelas ácidas ricas em lipídios, denominadas de grânulos intestinais, e/ou gotículas de lipídios neutros contidas em células do intestino.

Outras marcações de G2 em reservas lipídicas foram: no tecido subcutâneo próximo a boca (F, N) e em embriões (D e L). Com os nematódeos tratados vivos o G2 acumulou-se na faringe delineando o órgão internamente (G, H, O e P). Este foi um padrão raro de marcação, porém interessante do ponto de vista do órgão marcado, o qual está relacionado ao desenvolvimento do nematódeo.

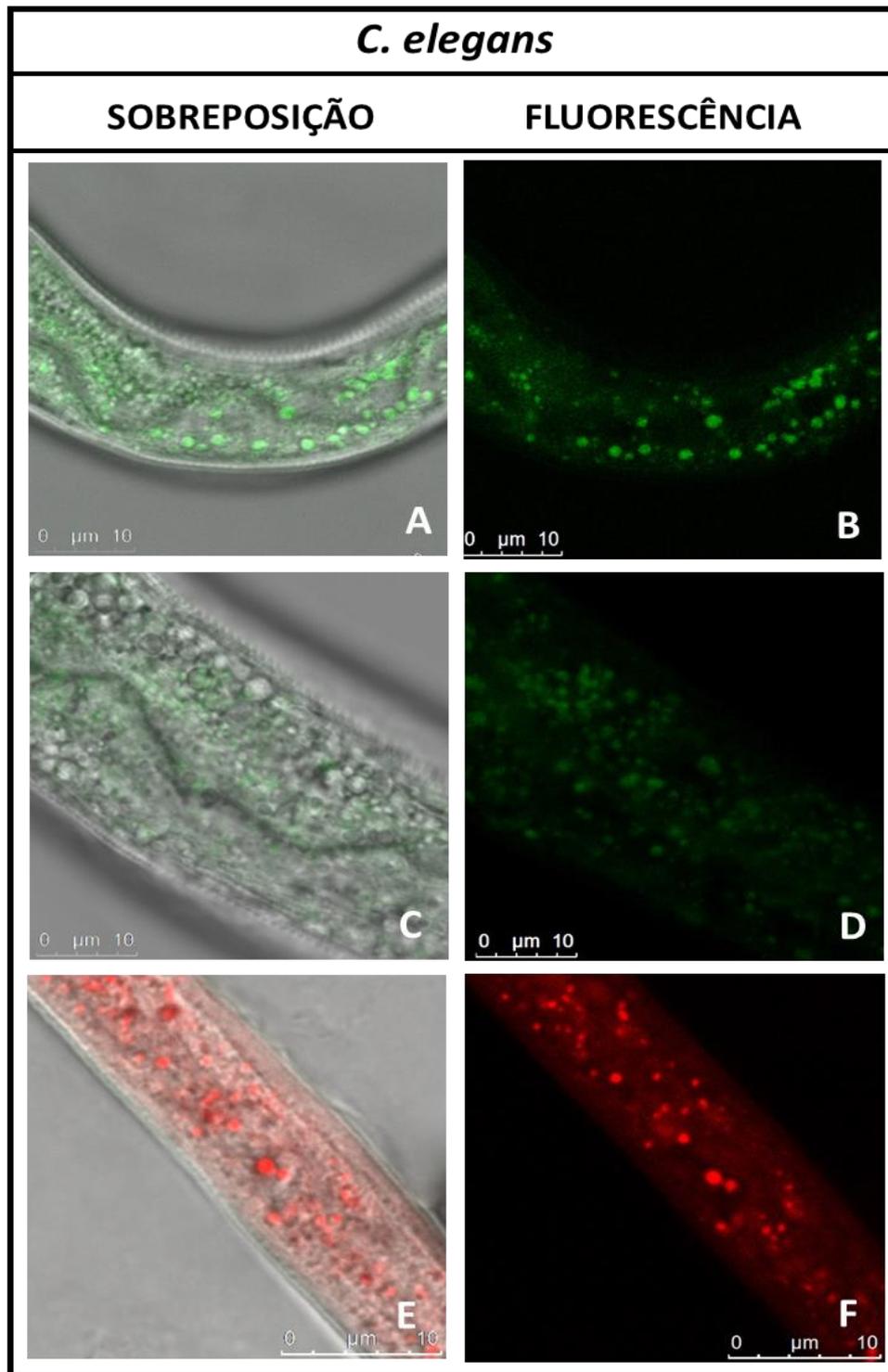


Figura 29: Comparação entre o perfil da marcação do G2 com os padrões do BODIPY® e do Oil Red O. *C. elegans* fixados e incubados separadamente com G2 a 100 μM , com BODIPY® a 1 $\mu\text{g/ml}$ e com Oil Red O a 0,5% (A – F). Imagens mostram coerência as marcações para os três tratamentos: corpúsculos lipídicos distribuídos ao redor do intestino do nematódeo. (A e B) Corpúsculos marcados com intensidade de fluorescência alta em nematódeos tratados com G2. (C e D) Gotículas marcadas com intensidade de fluorescência mais baixa em nematódeos incubados com BODIPY®. (E e F) Fluorescência em vermelho de estruturas circulares contendo lipídeo e marcação inespecífica de Oil Red O no corpo dos *C. elegans*. Barra de referência de 10 μm .

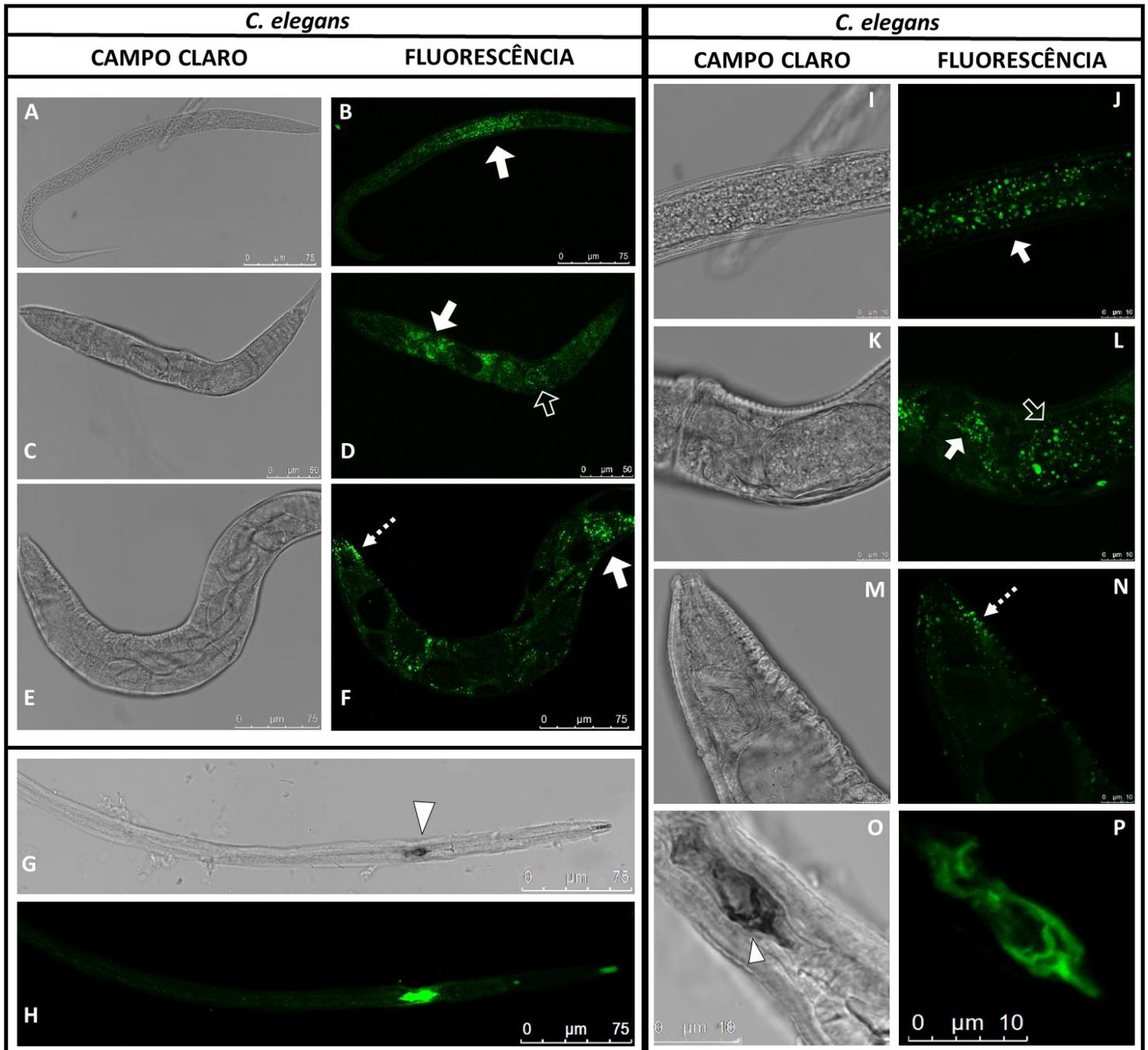


Figura 30: Marcações de G2 em *C. elegans* em menor aumento (A – H) e em maior aumento (I – P). Setas cheias em B, D e F apontam marcação fluorescente de corpúsculos redondos em regiões do intestino em menor aumento. Essas estruturas também são mostradas em maior aumento, também por setas cheias em J e L. Setas vazias nas imagens D (menor aumento) e L (maior aumento) indicam marcação corpuscular em embriões de *C. elegans* hermafroditas. Setas pontilhadas em F (menor aumento) e em N (maior aumento) mostram marcação de corpúsculos lipídicos no tecido subcutâneo próximo à boca. Cabeças de seta em G e H apontam acúmulo de G2 na faringe de *C. elegans* tratado vivo por 12 h em menor aumento. Essa sedimentação pode ser melhor observada em maior aumento em (O e P).

5.18. Comparação entre G2 e BODIPY® em ensaio de infecção viral em células de inseto para avaliar dinâmica de lipídios

Com o objetivo de comparar os desempenhos de G2 e BODIPY® em um modelo de estudo da dinâmica de lipídios foi realizado um ensaio utilizando células de inseto Bm5 infectadas com os vírus BmNPV e vírus AcMNPV respectivamente, em uma alta multiplicidade de infecção (10 vírus por célula). Para o experimento foi idealizado um painel que reúne as seguintes situações: I) células Bm5 não infectadas, II) células Bm5 infectadas com o vírus AcMNPV (resultando em uma infecção abortiva) e III) células Bm5 infectadas com o vírus BmNPV (resultando em uma infecção bem-sucedida, observada pela abundante produção dos corpos de oclusão no núcleo celular). Após exposição a essas três situações as células foram incubadas separadamente com G2 a 100 μM e com BODIPY® a 1 $\mu\text{g/ml}$ por 30 minutos (Figura 34).

Das imagens obtidas referentes ao tratamento com G2 foram realizadas contagens e determinação da área dos corpúsculos lipídicos para cada situação. Foram avaliadas dez células por tratamento. Os resultados foram plotados em um gráfico de dispersão usando GraphPad Prism e usados para validar o resultado da marcação pelo derivado de BTB. O teste T foi utilizado para avaliar a diferença significativa entre as médias das áreas dos objetos avaliados. A marcação com BODIPY® não foi quantificada por uma questão técnica, que foi a alta marcação difusa citoplasmática, o que dificultou o processamento das imagens.

No tratamento referente às células não infectadas observou-se em campo claro que elas têm um formato elipsoidal com um núcleo redondo ocupando cerca de 50% do seu volume. Em campo claro é possível observar a existência de estruturas redondas birrefringentes (corpúsculos lipídicos). Quando essas células foram tratadas com o composto G2, apresentaram marcação específica nas gotículas lipídicas dispersas pelo citoplasma (Figura 32 A e B). O gráfico mostra que a quantidade de gotículas lipídicas foi, em média, 12 por célula e a área média por objeto foi de aproximadamente 4 μm^2 (

Figura 31). No tratamento com BODIPY® não foram observadas diferenças no perfil dos corpúsculos marcados em comparação ao G2. Observou-se apenas que a marcação difusa no citoplasma feita pelo BODIPY® foi maior que a do G2 nessas células (Figura 32 C e D).

Células Bm5 infectadas por AcMNPV após 96 h de incubação com o vírus começaram a apresentar distorção do formato elipsoidal da célula assumindo uma forma mais irregular, porém o núcleo manteve-se intacto, circular e com o mesmo tamanho. Isto era esperado pois o vírus não é capaz de replicar nesta célula, portanto não seria observada a expansão do núcleo, onde a replicação ocorre. Na marcação com o composto G2 observou-se já no campo claro pontos escuros referentes ao acúmulo do composto nas gotículas de lipídios (Figura 32 E). Na fluorescência foi visto de maneira clara o aumento do tamanho dos corpúsculos lipídicos e da quantidade dessas gotículas por célula (Figura 32 F). No gráfico, observa-se que a quantidade média de gotículas lipídicas para esse tratamento foi de 32 por célula (

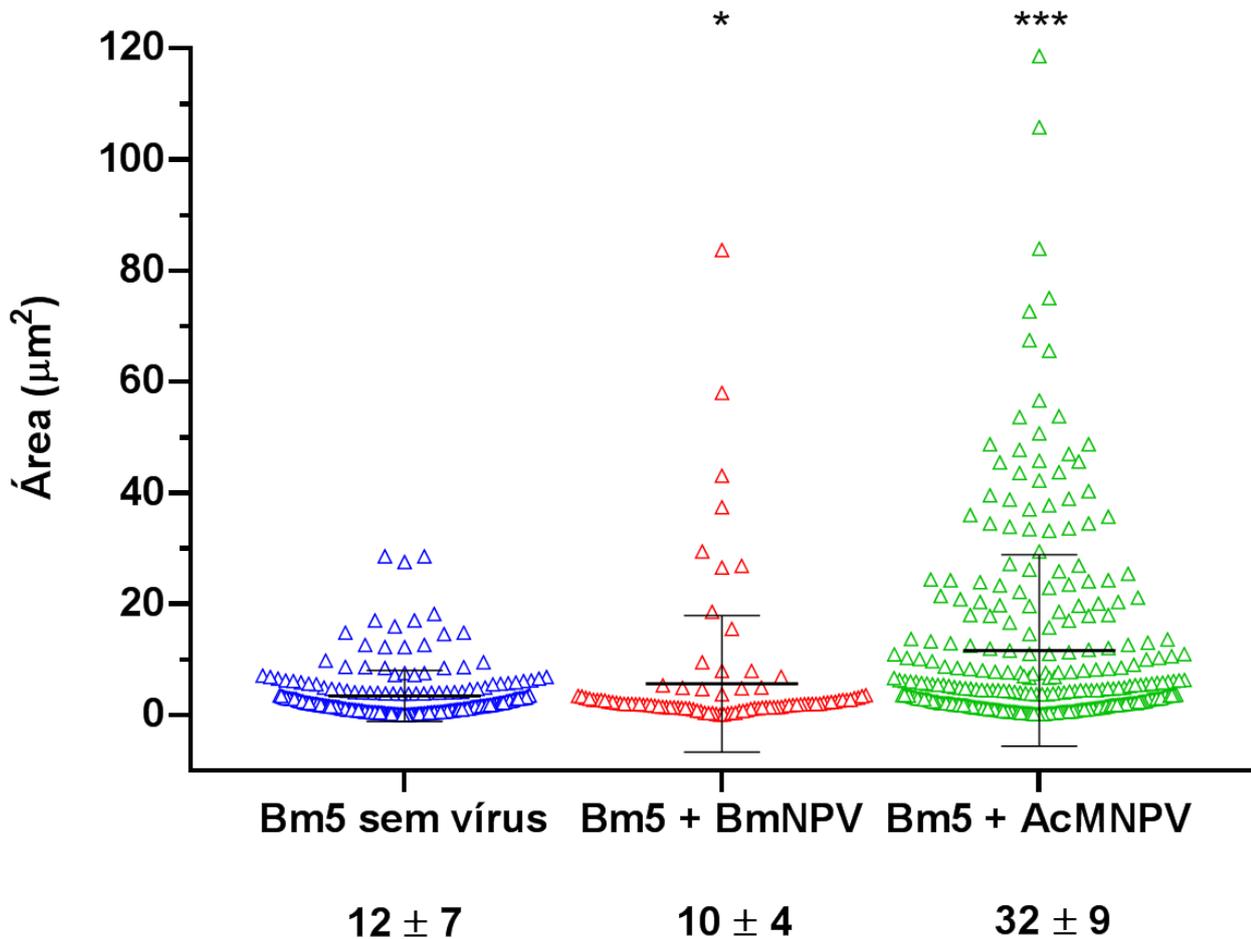
Figura 31). A área mediana dessas organelas também aumentou para $12 \mu\text{m}^2$. Quando tratadas com BODIPY[®] nessas condições observou-se o mesmo perfil de acréscimo da quantidade e do tamanho dessas vesículas por célula. Contudo esta última sonda apresentou uma fluorescência relativamente baixa nesse tratamento, portanto a intensidade do sinal nessas gotículas ficou mais fraco (Figura 32 G e H).

Quando as células Bm5 foram infectadas pelo BmNPV, sua morfologia ficou completamente distorcida, com células arredondadas apresentando poucas extensões citoplasmáticas, conforme vistas pelo campo claro. Outra observação comum é que o núcleo aumentou de volume, avançando sobre o citoplasma, além da presença dos evidentes e abundantes cristais ou corpos de oclusão virais contidos no núcleo (Figura 32 I). Na maior parte das células, a quantidade das organelas marcadas reduziu drasticamente, em outras, não houve grande redução mas o tamanho das gotículas aumentou (Figura 32 J). A contagem de gotículas lipídicas foi, em média dez por célula e a área média foi de aproximadamente $7 \mu\text{m}^2$ (

Figura 31). No tratamento com BODIPY[®] a marcação dos lipídios seguiu o descrito para G2, novamente com uma maior marcação difusa pelo citoplasma, mas ainda demarcando uma menor proporção de gotículas lipídicas.

A quantificação das estruturas marcadas em verde pelo G2 revelou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos de infecção em relação às células não infectadas (

Figura 31). Estes resultados são sugestivos de que o vírus BmNPV foi capaz de mobilizar e consumir a reserva de energia intracelular. Em contraponto, o AcMNPV causou uma perturbação celular onde a célula formou mais corpos lipídicos mas não foi capaz de consumir esta fonte de energia.



MÉDIA DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS POR CÉLULA

Figura 31: Avaliação da dinâmica de lipídios em modelo de infecção com diferentes vírus em células de inseto. Gráfico de dispersão da quantidade de vesículas pela área em células não infectadas, infectadas com BmNPV ou com AcMNPV. Barras centrais indicam a média da área e as barras acima e abaixo da média indicam o desvio padrão em relação à média. Teste t comparando médias das áreas dos objetos em relação a célula não infectada, onde: * = valor $P < 0.05$, * = $P < 0.001$. No gráfico também é exposto o número médio de corpúsculos lipídicos por célula em cada tratamento. A figura ao lado mostra a fluorescência basal das células Bm5. Barra de referência com 10 µm.**

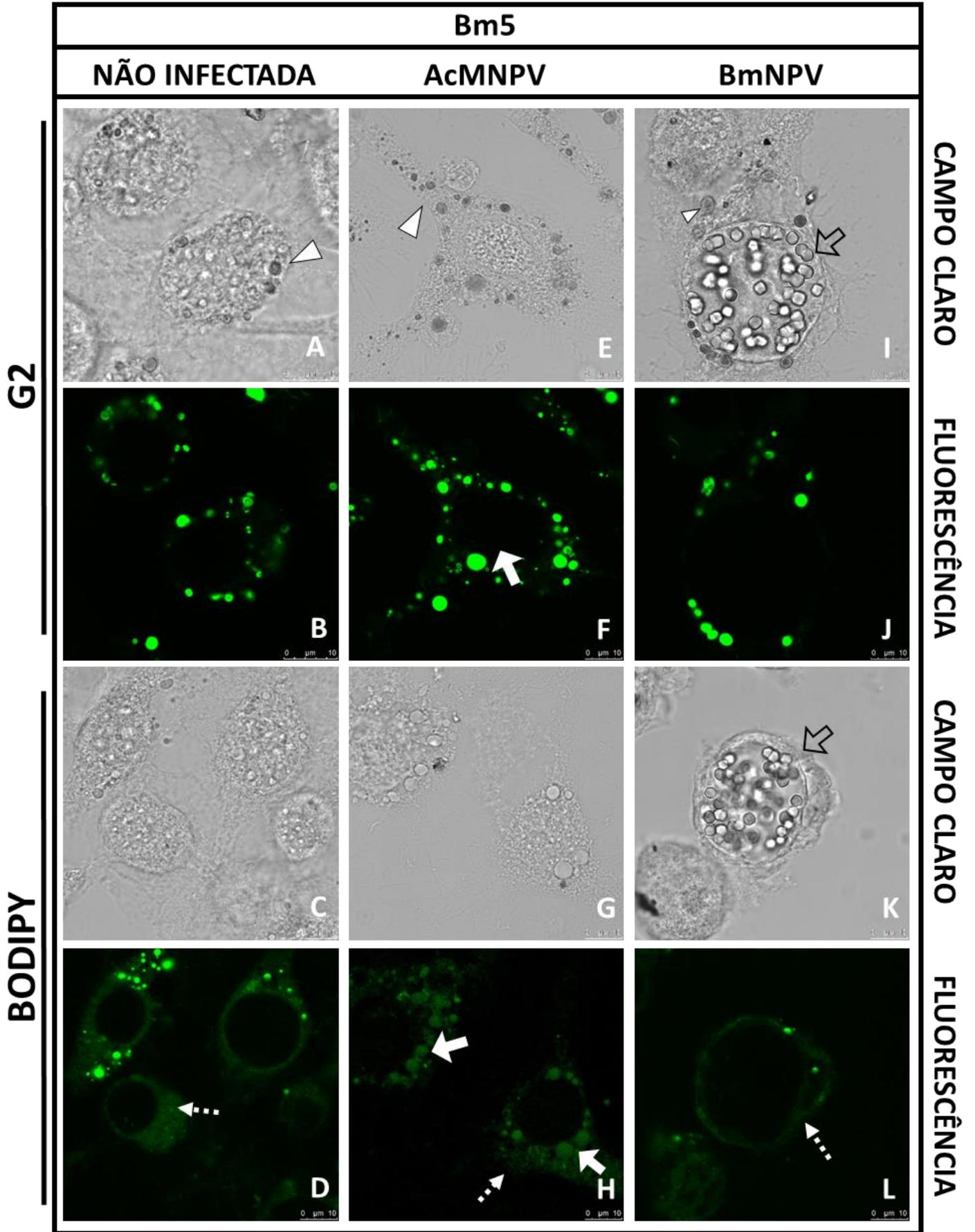


Figura 32: Ensaio de infecção viral em células de inseto para avaliação da dinâmica de lipídios por G2 e BODIPY® (A – L). (A e B) Células não infectadas apresentando marcação por G2 de corpúsculos lipídicos dispersos no citoplasma. (C e D) Marcação de corpúsculos lipídicos por BODIPY® em células Bm5 não infectadas com padrão de seleção semelhante ao apresentado em A e B. (E e F) Células Bm5 infectadas com o vírus AcMNPV e tratadas com G2 mostrando aumento do tamanho e número de corpúsculos lipídicos. (G e H) Infecção de Bm5 por AcMNPV e tratamento com BODIPY® mostrando mesmo perfil de aumento da quantidade e do tamanho dos corpúsculos apresentado em E e F, porém com baixa intensidade de fluorescência. (I e J) Células Bm5 infectadas com BmNPV tratadas com G2. Imagens mostram aumento no tamanho dos corpúsculos lipídicos em comparação ao apresentado em A e B. (K e L) Células Bm5 infectadas com BmNPV e tratadas com BODIPY®. Imagens mostram redução da quantidade de corpúsculos lipídicos nessas células. Cabeças de seta indicam corpúsculos lipídicos no campo claro. Setas pontilhadas mostram marcações da sonda BODIPY® no citoplasma celular. Setas cheias apontam gotas lipídicas grandes e setas vazias apontam poliedros no núcleo celular. Barra de referência 10 µm.

6. DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

Todos os resultados obtidos foram estudados buscando-se investigar três parâmetros associados aos compostos G2 e X2 e que precisam ser definidos para qualquer fluoróforo de interesse comercial, esses critérios foram: I) as propriedades do composto, como por exemplo citotoxicidade; II) a especificidade do derivado de BTB em questão e III) a eficiência da sonda para aplicação em diferentes modelos de estudo.

6.1. Estudos comuns a G2 e X2: avaliação das propriedades dos derivados de BTB

O estudo das propriedades dos compostos G2 e X2 mostra que os derivados de BTB apresentam particularidades indesejáveis para uma sonda de interesse comercial. Entretanto, o composto G2 revela várias características que também são encontradas entre as melhores sondas disponíveis no mercado.

Nos ensaios com MTT para avaliar a citotoxicidade do composto G2 foi observada considerável redução da viabilidade celular nas linhagens MDA-MB-231, MCF-7, CACO-2 e HUVEC tratadas com o fluoróforo a 100 μ M. Por microscopia de luz também identificamos que nesta concentração ele altera morfológicamente fibroblastos de cultivo primário, contudo, a mortalidade medida por ensaio de exclusão com azul de tripan foi baixa. Nos mesmos testes com o composto X2 quando usado a 100 μ M foram observadas menos alterações morfológicas nas células tratadas com azul de tripan e a mortalidade, medida por este teste também foi baixa, por outro lado, o fluoróforo produziu uma considerável redução da viabilidade celular de todas as linhagens avaliadas, pelo ensaio do MTT, principalmente após 24 horas.

A discrepância entre os resultados dos testes com MTT e com azul de tripan (para ambos os compostos) se deve aos parâmetros que os diferentes ensaios são capazes de avaliar. No caso do MTT avalia-se a reação enzimática da oxireductase e, no caso da exclusão por tripan avalia-se a integridade de membrana (Mosmann, 1983; Strober, 2001). O fato de a membrana celular estar íntegra não indica de forma definitiva que a célula esteja viável. Por exemplo, durante a morte celular por apoptose a membrana celular continua íntegra mesmo em fases tardia da morte celular (Elmore, 2007). É possível supor que a concentração de 100 μ M de G2 e de X2 provavelmente não provoca rompimentos na membrana celular, porém afeta o metabolismo da célula. Portanto, o

ensaio de MTT indicando alterações da atividade mitocondrial provavelmente apresenta dados mais completos em termos da citotoxicidade do fluoróforo. Conclui-se então que a concentração de 100 μ M, necessária para marcação fluorescente para qualquer dos dois compostos, não é a ideal para tratamentos com células vivas, mas ainda pode ser utilizado em células fixadas.

Um ponto negativo em relação às propriedades dos compostos G2 e X2 foi a precipitação de ambos, em média após 2 anos de uso. No entanto, é importante esclarecer que esse evento só teve início após 6 anos da síntese dessas sondas e que no período de trabalho com o fluoróforo os estoques foram submetidos a vários ciclos de descongelamento. Garber *et al.*, 2010 afirmam que em geral fluoróforos derivados do núcleo BTB podem ser armazenados por anos em temperatura ambiente, não necessitando de ciclos para congelamento e descongelamento, que facilitariam sua inativação. Nesse sentido, se o composto G2 que produziu melhores resultados puder ser sintetizado para uso comercial é ideal recomendar sua conservação no estado sólido, em temperatura ambiente e distribuído na forma de pequenas alíquotas para sua diluição nos momentos de uso.

Outro aspecto a ser considerado relativo às propriedades químicas do G2 e do X2 foi a baixa solubilidade dos compostos em soluções aquosas (que são os principais tipos de soluções dos meios de cultivo de células). O procedimento inicial de manipulação foi a dissolução do pó em DMSO absoluto formando um estoque a 100 mM de cada fluoróforo e a dissolução do derivado de BTB em estoque no meio de cultura em uma diluição 1:1000. Mesmo com baixa solubilidade, tanto o composto G2 quanto o composto X2 se mostraram capazes de atravessar membranas celulares e atingir o seu alvo, que, no caso do composto X2 esteve distribuído em diferentes perfis de marcação e, no caso do G2 foi específico e consistente em todos os modelos aplicados.

Outro resultado que demonstra a capacidade do X2 em atravessar membranas trata-se da aplicação do composto por 24 horas em *C. elegans* (*in vivo*). Este fluoróforo atravessou os tecidos do nematódeo e marcou estruturas circulares ao redor de seu intestino. Igualmente, o BTB G2 se mostrou apto a penetrar a mucosa intestinal (em nematódeos tratados vivos ou após fixação) marcando de forma específica os tecidos pelo qual tem afinidade. Nos tratamentos com qualquer dos marcadores se observou alterações morfológicas apresentadas nos *C. elegans* por microscopia confocal. No entanto, não foram realizados ensaios para avaliar a citotoxicidade dos compostos nos nematódeos.

Um dado interessante seria a obtenção da mortalidade de *C. elegans* induzida pelos BTDS em questão. Segundo Yang e Hinner (2015) moléculas pequenas e moderadamente polares podem se difundir passivamente através da membrana celular. Neto *et al.*, (2015) citam uma série de derivados de benzotiadiazol aptos a atravessar a membrana plasmática e até mesmo a membrana nuclear.

Por fim, o composto G2 produziu marcação fluorescente de alta intensidade em estruturas intracelulares, sem sinal de fundo disperso pelo citoplasma no caso de células, ou disperso pelos tecidos no caso de *C. elegans* tratados após fixação. A alta intensidade do sinal fluorescente e a ausência de marcação de fundo apresentadas pelo G2 facilitam a aquisição de imagens com boa resolução bem como a automatização do processo de análise de imagens digitais. Já o fluoróforo X2 produziu marcação fluorescente de relativa intensidade em estruturas intracelulares, entretanto não apresentou um padrão específico e também revelou sinal de fundo disperso pelo citoplasma no caso de células, ou disperso pelos tecidos no caso de *C. elegans*.

6.2. Estudo dos padrões de marcação do X2

A marcação com o composto X2 em células de mamíferos vivas ou após fixação, mostrou diversos perfis de seletividade intracelular para a sonda de BTDS. Em células MDA-MB-231 e HUVEC foram observadas minúsculas estruturas por todo o citoplasma ficando este com uma aparência multipontilhada. Esse padrão é condizente com marcação de vesículas do sistema endossomal. Bananis *et al.* (2003) mostram num estudo sobre regulação de vias endocíticas precoces que a distribuição dessas vesículas se dá por toda a célula com minúsculas estruturas fluorescentes deixando-a com aparência de multipontilhada. Em células CACO-2 e DU-145 foram identificadas estruturas circulares alongadas e distribuídas em regiões próximas ao núcleo. Perfil semelhante ao de seletividade para pelo menos três organelas, que são: endossomos tardios (Wallabregue *et al.*, 2016), lisossomos (Grossi *et al.*, 2016) e autofagossomos (Takashima *et al.*, 2015). Acreditamos que este composto possa estar se aglomerando no sistema endossomo/lisossomo devido às elevadas taxa de endocitose observada em células tumorais (revisado por Mellman e Yarden, 2013). Outro padrão identificado nas marcações do X2 foi a concentração de sinal fluorescente em regiões perinucleares, normalmente polarizado para um dos lados da célula, em MCF-7 e HUVEC, perfil este sugestivo de seletividade para aparato de Golgi ou para retículo endoplasmático, como

mostrado nos trabalhos com microscopia por fluorescência de Fukasawa *et al.*, (1999) e de Yang *et al.*, (2014). Por fim observamos uma marcação linear do X2 na borda da célula, especialmente em MDA-MB-231 fixadas, que é uma característica própria de marcação em cavéolas, a qual é reconhecida por ser predominante na membrana plasmática (Wang *et al.*, 2010). Na tentativa de esclarecer esta dúvida, outros ensaios foram realizados e serão discutidos na sequência.

A comarcação de X2 com LysoTracker foi realizada para esclarecer se o composto apresenta seletividade para lisossomos, devido aos resultados de marcação em células de mamíferos e do tratamento de células MDA-MB-231 com LysoTracker® Deep Red ou com X2 mostrando conjuntos de estruturas circulares alongadas em ambos os ensaios. A comarcação mostrou semelhanças e diferenças entre os perfis das duas sondas, de modo que há colocalizações de estruturas marcadas por X2 e por LysoTracker® Deep Red, no entanto também há marcações exclusivas de X2 e marcações restritas ao LysoTracker® Deep Red. Desse modo, não foi possível concluir com estas análises exatamente a que o composto X2 tem afinidade, sendo possível apenas afirmar que o derivado de BTB se acumula em vesículas ácidas. Outro dado que corrobora esta hipótese foram os resultados obtidos do tratamento *in vivo* em *C. elegans* apresentando um perfil de distribuição muito sugestivo de marcação em grânulos intestinais. Sabe-se que essas organelas são reconhecidas por serem ácidas e com conteúdo lipídico (Zhang *et al.*, 2010).

Essa marcação do X2 em *C. elegans* levanta um ponto importante do composto em termos de perspectivas pois suas características parecem ser apropriadas para a inserção de modificações na sua estrutura, como a adição de substituintes com propriedades de base fraca, que poderiam contribuir com a especificidade da sonda para marcação de organelas ácidas.

Tooze & Yoshimori, (2010) mostram alta concentração de membranas em organelas ácidas, tais como autofagossomos. Esse dado também nos chamou atenção pois considerando-se todos os perfis de marcação do X2 em células de mamíferos, e supondo que ele esteja marcando simultaneamente todas essas organelas, é razoável buscar algo comum a todas essas estruturas intracelulares que neste caso seria as membranas de organelas. Lembrando também que este fluoróforo não marca núcleo, como foi mostrado nos resultados, muito provavelmente ele não apresenta afinidade por ácidos nucleicos nem por proteínas. Levando em consideração sua afinidade por membranas é possível que este BTB esteja apresentando especificidade por um grupo de ou por algum tipo de

fosfolipídio abundante na célula. Na possibilidade de o X2 marcar realmente fosfolipídios uma modificação na arquitetura atômica da molécula, buscando direcionar a sua especificidade para um fosfolipídio raro por exemplo, poderia trazer novos rumos para este composto (Sato *et al.*, 2014).

6.3. Avaliação da marcação do X2 durante a infecção em células de inseto

Para avaliar os padrões de marcação do X2, buscamos utilizar três linhagens celulares de inseto com diferentes respostas à infecção viral de AcMNPV. Também utilizamos um baculovírus recombinante contendo deleção no gene antiapoptótico p35, para induzir a apoptose nas três linhagens celulares testadas.

A linhagem Sf9 é comumente utilizada para crescer o vírus AcMNPV, desta forma é considerada permissiva a este vírus favorecendo replicação viral e ampla formação de progênie (INVITROGEN, 2015). A linhagem Ld652Y é considerada semi-permissiva com reduzida produção de progênie viral (Goodwin, Tompkins e McCawley, 1978). Esta célula possui um mecanismo de defesa ao AcMNPV que não está associado à apoptose, de modo que a síntese de proteínas celulares e virais fica limitada após a infecção (Du e Thiem, 1997), porém sob infecção por AcMNPV Δ P35 entra em apoptose. A linhagem Bm5 não é permissiva ao AcMNPV devido à incompatibilidade do maquinário de replicação viral com componentes intracelulares portanto a infecção é abortiva, induzindo apenas a expressão de genes precoces sem causar alterações na morfologia celular (Argaud *et al.*, 1998). Quando infectada por um vírus deficiente em inibidores de apoptose esta célula também entra em apoptose (Prikhod'ko e Miller, 1996).

A apoptose provocada pela célula ocorre a partir do reconhecimento celular de eventos da fase precoce, produzidos pelo vírus, tais como a expressão de genes estimuladores da expressão gênica, quanto por eventos da fase tardia da infecção, como exemplo a replicação do DNA viral no núcleo (LaCount e Friesen, 1997; Prikhod'ko e Miller, 1996). Por outro lado os genes antiapoptóticos presentes no vírus que são expressos na fase precoce da infecção viral, irão inibir a via de caspases a qual leva à apoptose, impedindo que a célula inicie esse processo e controlando-a para produção de progênie viral (Clem, 2007; Du e Thiem, 1997).

Autofagia e Apoptose são eventos celulares distintos de modo de que o primeiro é um processo de degradação dos componentes celulares que ocorre em autofagossomos,

enquanto o segundo é caracterizado por todos os processos celulares relacionadas à morte celular, incluindo a autofagia entre esses processos (Fuchs e Steller, 2015).

De acordo com Franzetti *et al.* (2012) a autofagia precede a apoptose. Considerando este aspecto sabíamos que a infecção de células com um vírus indutor de apoptose (como o AcMNPV Δ P35) iria levar à formação de autofagossomos (organelas ácidas) e posteriormente de corpos apoptóticos (vesículas originadas de membrana das organelas e ricas em fosfolipídios). Esperando marcação de X2 em organelas ácidas ou em fosfolipídios de membranas realizamos um ensaio com células permissivas (Sf9), semipermissivas (Ld652Y) e não-permissivas (Bm5) à infecção viral pelo AcMNPV em três diferentes condições: I) não tratadas com nenhum dos vírus; II) incubadas com o vírus AcMNPV; III) expostas ao vírus que induz apoptose AcMNPV Δ P35.

Em todas as células não infectadas era esperado a obtenção de uma referência do que é o padrão de marcação de autofagossomos para uma célula normal. Também era esperado ser observado o perfil de marcação de organelas como retículo endoplasmático e aparato de Golgi, quando normais.

Nas células permissivas (Sf9) infectadas com o vírus AcMNPV era esperado ver uma menor quantidade de autofagossomos pois o vírus inibe a apoptose. Também buscávamos observar alterações citoplasmáticas em organelas específicas, como por exemplo no retículo endoplasmático, no aparato de Golgi ou no sistema de síntese de proteínas (Rohrmann, 2013). Após a infecção as células apresentaram núcleo inchado com marcação verde no seu interior e forte marcação de grandes estruturas circulares concentradas no citoplasma. A invasão de verde no núcleo é indicativa do processo de formação do envelope de membrana dos ODVs que ocorre dentro do núcleo (Rohrmann, 2013). Como era esperado uma menor proporção de autofagossomos nessas células, acreditamos que as grandes estruturas circulares marcadas pelo X2 não se tratavam dessas organelas. Nesse sentido poderiam ser retículo endoplasmático ou aparato de Golgi.

Na mesma linhagem, quando infectada com o vírus AcMNPV Δ P35 esperávamos ver marcação de X2 em autofagossomos e/ou marcação do composto em corpos apoptóticos e entrada da sonda no núcleo devido à degradação do mesmo. Após a incubação com AcMNPV Δ P35 observou-se o núcleo marcado de verde no seu interior, porém nesse caso a marcação do BTB revela degradação nuclear devido ao quadro de apoptose tardia iniciando com alterações na membrana plasmática similar ao início de formação dos corpos apoptóticos.

Nas células semi permissivas (Ld652Y) infectadas com o AcMNPV esperávamos o mesmo padrão que seria apresentado pelas células permissivas, no entanto com características de uma infecção menos eficiente. Após a infecção com o AcMNPV o núcleo aparentava-se inchado, célula irregular e haviam muitos corpúsculos marcados.

Na infecção por AcMNPV Δ P35 nessa linhagem era provável que ocorresse os mesmos eventos programados para as células permissivas. Os resultados mostraram células em fase final de apoptose, forte marcação perinuclear, corpos apoptóticos com marcação mais forte na membrana destes, núcleo com invasão da marcação verde representativo da degradação nuclear indicativo do processo de formação do envelope de membrana dos ODVs que ocorre dentro do núcleo (Rohrmann, 2013).

Na linhagem não permissiva (Bm5), quando infectada com o AcMNPV esperávamos marcação parecida com o padrão apresentado pelas células não infectadas. Foram observadas células com poucas alterações nucleares, o que era esperado pois AcMNPV não replica nesta linhagem (Argaud et al., 1998). E sob infecção por AcMNPV Δ P35, eram previstos os mesmos eventos já descritos para as linhagens permissiva e semi-permissiva. Foram observadas células em fase final de apoptose com corpos apoptóticos marcando fortemente a membrana destes e núcleo com invasão da marcação verde representativo da degradação nuclear.

Esses resultados nos permitiram concluir que, como marcador fluorescente, o X2 trouxe apenas respostas parciais em relação ao quadro infectivo que estava ocorrendo nas células. Desse modo, o composto não permitiu, por exemplo, o estabelecimento da dinâmica de organelas do sistema endossomal/lisossomal durante o processo de infecção. Essas respostas, por não serem completas, nos mostram que o composto ainda precisa de ajustes, principalmente no que diz respeito à sua especificidade.

Os resultados que mostraram seletividade do X2 para a membrana de corpos apoptóticos em células Bm5 indicam possível especificidade por um grupo de / um tipo de fosfolipídio abundante e disponíveis nestas estruturas. Avaliações adicionais poderão ser feitas no sentido de esclarecer a classe de lipídio a que este composto se associa e poderia delinear novos rumos ao marcador. Como é o caso de marcadores que identificam apoptose pela dosagem de fosfatidilserina (Vermes *et al.*, 1995).

6.4. Determinação do alvo intracelular do G2

Para determinar o alvo intracelular do G2, primeiro serão descritas as estruturas que ele não marca. O núcleo celular nunca é marcado por este fluoróforo, indicando que não possui afinidade por ácidos nucleicos ou proteínas. De forma similar, a membrana plasmática ou membrana nuclear e estruturas adjacentes como o retículo endoplasmático não são marcados de forma definitiva, indicando que o G2 não possui uma afinidade direta por fosfolipídios.

A marcação de G2 em células de mamíferos e de inseto revelou estruturas esféricas distribuídas pelo citoplasma. Em Bm5, estas estruturas esféricas marcadas são birrefringentes quando observadas em campo claro, indicando alta densidade do conteúdo, característico de gorduras. De acordo com DiAugustine *et al.*, (1973) corpúsculos lipídicos são vesículas globulares formadas a partir do retículo endoplasmático, contendo lipídios em seu interior (ácidos graxos, triglicerídeos e esteróis) e possuem diâmetro entre 0.5 e 2.0 µm. Estas dimensões foram predominantes na quantificação das áreas dos corpúsculos de células Bm5.

Comparando o padrão das marcações de G2 com os apresentados pelos marcadores de lipídios já validados comercialmente BODIPY® e Oil Red O, foram observados padrões morfológicos similares nas organelas marcadas. Ao comparar a morfologia, quantidade e distribuição de estruturas marcadas em células MDA-MB-231, foi observado que o marcador comercial de referência para marcação de lipídios neutros BODIPY® se associou a uma proporção maior de corpúsculos de pequenos tamanhos quando comparado ao composto G2, que marcou apenas corpúsculos de tamanho médio a grande. Já nos perfis de marcação entre G2, BODIPY® e do Oil Red O em MCF-7 e em *C. elegans*, identificou-se uma maior proporção de gotículas muito pequenas marcadas nos tratamentos com BODIPY® enquanto G2 e Oil Red O marcaram proporcionalmente menos dessas pequenas estruturas e mais organelas de tamanho médio a grande. Devido às similaridades, é possível sugerir que o BODIPY® marcou as mesmas estruturas de maiores dimensões que o G2 marcou, mas também marcou estruturas de pequeno porte que este último não marcou.

Os resultados da colocalização entre G2 e Oil Red O em células MCF-7 e Bm5, demonstrou a presença das duas sondas em corpúsculos lipídicos. No entanto, a comarcação não foi a ideal pois cada marcador (G2/ Oil Red O) possui um diluente ideal para inclusão na amostra, os quais são diferentes entre si, de modo que a utilização de um

dos protocolos para ambos os compostos resulta na marcação intensa de apenas um destes, reduzindo a intensidade de sinal do outro. A realização de ensaios em conjunto entre G2 e Nile Red seria mais apropriada, já que este último marcador apresenta seletividade para lipídios neutros, exatamente como o BODIPY[®] (Cheung *et al.*, 2010). A comarcação com Nile Red possibilitaria não só um melhor resultado em termos de colocação, mas também poderia esclarecer se o G2 marca um grupo mais restrito de moléculas lipídicas, dentro da classe dos lipídios neutros.

O Oil Red O apresentou um padrão de marcação muito similar ao do G2, marcando apenas estruturas com grande porte. BODIPY[®] 493/503, conforme catálogo do produto, é conhecido por apresentar afinidade por triglicerídeos e por ésteres de esteróis, enquanto o Oil Red O apresenta afinidade por triglicerídeos e lipídios neutros (Mehlem *et al.*, 2013; Ramírez-Zacarías, Castro-Muñozledo e Kuri-Harcuch, 1992). Portanto, como o G2 apresenta maior similaridade com Oil Red O que com BODIPY[®] é provável que esteja marcando triglicerídeos e lipídios neutros. Por extensão, as organelas marcadas por G2 seriam corpúsculos lipídicos ricos em triglicerídeos.

A literatura sobre a anatomia de *C. elegans* corrobora esta conclusão pois Nile Red, Oil Red O e BODIPY[®] marcam dois tipos de estruturas ricas em lipídios: os grânulos intestinais e gotículas de armazenamento de gorduras ou gotículas lipídicas (Zhang *et al.*, 2010, O'Rourke *et al.*, 2009). Os grânulos intestinais são organelas ricas em gorduras (como gotículas lipídicas) associadas a lisossomos e estão presentes exclusivamente em células do intestino, especialmente abundantes logo após a faringe, na região inicial do referido órgão. As gotículas lipídicas são organelas ricas em gorduras com uma monocamada de fosfolipídios que se distribuem de forma diversificada pelo corpo dos *C. elegans*, com abundância em tecidos do intestino, no subcutâneo, e em embriões (Zhang *et al.*, 2010). Assim como os marcadores citados, o G2 foi capaz de marcar todos os tecidos ricos em lipídios, tanto os grânulos intestinais quanto os demais.

O G2 também apresentou resultados que sugerem afinidade por um tipo específico de lipídio. Assim como o Oil Red O que marca grandes gotículas lipídicas nas células e possui forte afinidade por triglicerídeos e pouca afinidade por ésteres de colesterol, o derivado de BTB com padrão de marcação semelhante pode ter o mesmo tipo de afinidade.

Segundo Martin & Parton (2006), lipoproteínas de baixa densidade (VLDL) captadas na membrana plasmática através do receptor de LDL trafegam no citoplasma a

partir do sistema endossomal inicial para endossomos tardios, onde é hidrolisada liberando ácidos graxos (a partir de triglicerídeos) e colesterol livre (a partir de ésteres de colesterol). Simultaneamente os corpúsculos lipídicos são formados no retículo endoplasmático em resposta ao aumento do nível de ácidos graxos, contidos apenas por uma monocamada de fosfolipídios com proteínas associadas tais como as fosfolipases, muitas dessas proteínas são relacionadas ao transporte vesicular, à fusão de membranas e à motilidade do citoesqueleto (Farese e Walther, 2009). Nesse sentido corpúsculos lipídicos podem trafegar pelo citoplasma tanto como organelas independentes como associadas ao sistema endossomal

As LDLs são proporcionalmente ricas em triglicerídeos e pobres em ésteres de colesterol sendo que as HDLs são ricas em ésteres de colesterol e ácido graxos e pobres em triglicerídeos (Feingold e Grunfeld, 2000).

Hipoteticamente, utilizando-se de um perfil lipídico sanguíneo BODIPY[®], que marca corpúsculos lipídicos pequenos e grandes e apresenta afinidade por triglicerídios e ésteres de esteróis, apresentaria um espectro de alvos lipídicos condizente com a marcação tanto de grandes lipoproteínas (VLDL) quanto de pequenas lipoproteínas (HDLs).

Também hipoteticamente, utilizando-se da mesma amostra de perfil lipídico para tratamento com G2, o derivado de BTD marcaria preferencialmente as lipoproteínas de baixa densidade (VLDLs, IDLs e LDLs).

Os resultados obtidos mostraram que o G2 pode ser aplicável para diferentes tipos de análises, como por exemplo, estudos de fatores relacionados à resposta imunológica que estejam correlacionados com o metabolismo lipídico ou estudos que investiguem a dinâmica do metabolismo de triglicerídeos em modelos celulares.

6.5. Aplicação do G2 para avaliar o metabolismo energético durante a infecção viral

A aplicação do G2 na avaliação da dinâmica do metabolismo de gorduras foi testada utilizando o modelo de infecção de células Bm5 por dois baculovírus: o BmNPV capaz de infectar esta linhagem e o AcMNPV que gera uma infecção abortiva. Este modelo com a linhagem Bm5 foi selecionado por esta apresentar abundantes corpúsculos lipídicos o que simplificou a análise.

O sucesso da infecção celular por um vírus é determinado pela habilidade deste em controlar o metabolismo celular de forma a inibir as defesas celulares antivirais (como a apoptose) e aumentar a atividade das vias metabólicas associadas à respiração celular e à síntese de nucleotídeos e proteínas no sentido de promover a replicação viral e formação de progênie viral (Monteiro *et al.*, 2012; Xue *et al.*, 2012). Já uma infecção abortiva ocorre quando o vírus é incapaz de inibir as defesas celulares através de seu arsenal gênico de controle celular, desse modo ocorre uma infecção pouco produtiva quando o controle da célula pelo vírus é incompleto ou ineficiente, resultando em uma fraca produção de progênie viral (Castro *et al.*, 1997). Neste último caso, mesmo com as defesas celulares desarmadas, o controle do metabolismo energético pelo vírus pode falhar resultando em uma menor quantidade de recursos para o vírus executar a replicação e formação de víriões (Clem, 2007; Clem e Miller, 1993; Passarelli, 2011).

Os estudos sobre o metabolismo energético durante a infecção viral *in vitro* são importantes pois modelos manipuláveis geralmente elucidam mecanismos essenciais para uma infecção produtiva, sugerindo então novas formas de combater estes microorganismos e essas contribuições também acrescentam para a área médica pois muitos desses mecanismos se repetem em infecções virais de células de mamíferos. Um ótimo exemplo foi a observação que vírus infectivos a seres humanos, como o Influenza A, inicialmente estimulam a célula hospedeira a acelerar o ciclo de Krebs para “alimentar” a via de biossíntese de ácidos graxos e triglicerídeos. Portanto, ao inibir quimicamente a via de síntese de triglicerídeos também se bloqueia a replicação viral (Munger *et al.*, 2008).

Os estudos de bioenergética celular durante a infecção viral são raros, em especial em relação aos baculovírus (Monteiro *et al.*, 2012). Os poucos trabalhos existentes na literatura possuem um foco voltado para o aumento da eficiência e produtividade de proteínas quando o baculovírus é utilizado como vetor de expressão de proteínas

heterólogas de interesse. Nestes casos, apenas busca-se otimizar a expressão gênica pela modificação dos componentes do meio de cultura ou parâmetros de cultivo como a multiplicidade de infecção e concentração de células (Bernal *et al.*, 2009; Carinhas *et al.*, 2010).

Na infecção de Bm5 por BmNPV a expressão de genes da célula associados ao metabolismo energético ocorre em duas fases: I) durante as primeiras 12 h de infecção ele aumenta a expressão de genes do hospedeiro que são associados a respiração celular realizada em mitocôndrias (fase precoce); II) após 12 h ocorre um bloqueio na expressão da maioria dos genes do hospedeiro e um aumento drástico na expressão de todos os genes virais, especialmente dos genes associados à replicação e formação dos capsídeos virais (fase tardia) (Xue *et al.*, 2012). Em uma infecção abortiva de Bm5, o vírus é capaz de expressar genes da fase precoce, mas não expressa os genes da fase tardia e a replicação viral não ocorre (Morgado, Ardisson-Araújo e Ribeiro, 2017).

É possível que a infecção por baculovírus induza uma perturbação na expressão gênica do hospedeiro durante a fase precoce e em consequência aumente a biossíntese de ácidos graxos, portanto ocorrerá um maior acúmulo de lipídios neutros na célula. Isto ocorre em preparo à fase tardia, na qual as reservas de energia serão consumidas para serem utilizadas na replicação viral e na síntese de proteínas estruturais. A infecção abortiva de Bm5 pelo AcMNPV realiza então apenas um destes passos, forçando a célula a acumular mais lipídios, como observado no aumento do número e tamanho das gotículas 96 horas após a infecção, no entanto em consumir estes elementos pois a fase tardia nunca ocorre.

A infecção bem-sucedida do BmNPV nesta linhagem celular resulta então em uma redução no número de gotículas lipídicas de pequeno tamanho por célula, as quais existiam em momentos iniciais da infecção, mas provavelmente foram consumidas mais rápido que as gotículas maiores, que foram as observadas 96 horas após a infecção. Desta forma, a dinâmica dos corpúsculos lipídicos observada durante a infecção completa com a utilização do nosso marcador pôde ser definida, promovendo inicialmente um aumento no tamanho e número destas estruturas e na sequência uma drástica redução que pode ser interpretada como mobilização e consumo.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho até o momento nos permitem concluir que os fluoróforos derivados de BTD, investigados neste estudo: G2 e X2, podem ser aplicados em diferentes ensaios e em modelos biológicos bastante variados. Também conseguimos avaliar a especificidade desses marcadores e para um deles (G2) conseguimos definir uma classe de moléculas pelas quais o marcador possui afinidade (lipídios). Concluimos ainda, que o marcador G2 pode apresentar afinidade por um grupo específico de lipídio dentro da classe de lipídios. No entanto estudos adicionais devem ser realizados para a confirmação inequívoca desta observação e uma alternativa seria a microscopia de Raman. Essa possibilidade nos permite selecionar uma sonda com características superiores aos marcadores fluorescentes convencionais para lipídios atualmente utilizados, visto que, ao apresentar seletividade para um grupo específico de moléculas este composto pode trazer respostas mais consistentes em estudos relacionados ao metabolismo lipídico. A especificidade do marcador X2 foi estudada, porém, devido aos diferentes perfis de marcação apresentado por esse composto, a identificação de uma molécula ou um grupo de moléculas pelo qual o fluoróforo apresenta afinidade não pode ser feita. Contudo hipotetizamos que este marcador possa apresentar afinidade para um grupo de fosfolipídios ou um tipo de fosfolipídio abundante no ambiente intracelular. Da mesma forma, mais estudos precisam ser feitos a fim de esclarecer os fundamentos da sua afinidade. O composto G2 se mostrou apto para aplicação em células e até mesmo para organismos mais complexos, conforme mostrado em resultados apresentados em células de mamíferos, células de inseto e em *C. elegans*, em que corpúsculos lipídicos são marcados por G2 em todos esses modelos. Foram realizados estudos in vivo com os compostos e estruturas importantes como as gut granules foram identificadas pelos fluoróforos, no entanto, como revelado pelas análises de viabilidade celular, os compostos apresentaram citotoxicidade, por isso foi recomendado sua utilização apenas em organismos fixados. O sistema baculovírus – células de inseto se mostrou uma importante ferramenta de avaliação da eficácia desses compostos para aplicação em pesquisa, possibilitando um estudo da dinâmica de lipídios com aplicação do composto G2 e trazendo alguns esclarecimentos sobre a seletividade de X2. Estes ensaios permitiram delinear caminhos para a modificação dos compostos visando a sua melhoria no aspecto da especificidade. Por fim, este trabalho lança as bases para a produção de documento

de requisição da proteção intelectual e posterior divulgação do composto G2. Por outro lado, trouxe esclarecimentos quanto a atividade do composto X2 dentro do ambiente celular o que direcionará nossos esforços para produzir novas gerações de moléculas com modificações que possa contribuir para a melhoria do composto X2.

8. REFERÊNCIAS

- AHN, Y. H.; LEE, J. S.; CHANG, Y. T. Combinatorial rosamine library and application to in vivo glutathione probe. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 15, p. 4510–4511, 2007.
- ALFONSO, M. *et al.* Multifunctional benzothiadiazole-based small molecules displaying solvatochromism and sensing properties toward nitroarenes, anions, and cations. **ChemistryOpen**, v. 3, n. 6, p. 242–249, dez. 2014.
- ALONZO, C. A. *et al.* Two-photon excited fluorescence of intrinsic fluorophores enables label-free assessment of adipose tissue function. **Scientific Reports**, v. 6, n. August, p. 31012, 5 ago. 2016.
- APEL, K.; HIRT, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 373–399, 2 jun. 2004.
- ARGAUD, O. *et al.* Two key mutations in the host-range specificity domain of the p143 gene of Autographa californica nucleopolyhedrovirus are required to kill Bombyx mori larvae. **Journal of General Virology**, v. 79, n. 4, p. 931–935, abr. 1998.
- BALZANI, V. *et al.* Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds: Overview and General Concepts. *In: Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds I*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 1–36.
- BANANIS, E. *et al.* Regulation of early endocytic vesicle motility and fission in a reconstituted system. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 13, 2003.
- BARBER, K. *et al.* Delivery of membrane-impermeant fluorescent probes into living neural cell populations by lipotransfer. **Neuroscience Letters**, v. 207, n. 1, p. 17–20, 1996.
- BASABE-DESMONTS, L.; REINHOUDT, D. N.; CREGO-CALAMA, M. Design of fluorescent materials for chemical sensing. **Chemical Society reviews**, v. 36, n. 6, p. 993–1017, 2007.
- BENNINGER, R. K. P.; PISTON, D. W. Two-Photon Excitation Microscopy for the Study of Living Cells and Tissues. **Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]**, v. 04, p. Unit-4.1124, jun. 2013.
- BERNAL, V. *et al.* Cell density effect in the baculovirus-insect cells system: A quantitative analysis of energetic metabolism. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 1, p. 162–180, set. 2009.
- BRANCALEON FURKIN, A., KOLLIAS, N. ET AL., L. In vivo Fluorescence Spectroscopy of Nonmelanoma skin Cancer. **J. Photochem. Photobiol.**, v. 73, n. 2, p. 178–183, 2001.
- BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, n. 1, p. 71–94, maio 1974.
- BRENNO A. D. NETO, *,† *et al.* New Sensitive Fluorophores for Selective DNA

Detection. 2007.

CARINHAS, N. *et al.* Improving baculovirus production at high cell density through manipulation of energy metabolism. **Metabolic Engineering**, v. 12, n. 1, p. 39–52, jan. 2010.

CARVALHO, P. H. P. R. *et al.* Designed Benzothiadiazole Fluorophores for Selective Mitochondrial Imaging and Dynamics. **Chemistry - A European Journal**, v. 20, n. 47, p. 15360–15374, 2014.

CASTRO, M. E. *et al.* Replication of Anticarsia gemmatalis nuclear polyhedrosis virus in four lepidopteran cell lines. **Journal of invertebrate pathology**, v. 69, n. 1, p. 40–45, jan. 1997.

Chemistry msu. Disponível em:
<<https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/lipids.htm>>.

CHENG, H. *et al.* Evaluation of new ion exchange membranes for direct borohydride fuel cells. **Journal of Membrane Science**, v. 288, n. 1–2, p. 168–174, 2007.

CHEUNG, W. *et al.* Rotaviruses associate with cellular lipid droplet components to replicate in viroplasm, and compounds disrupting or blocking lipid droplets inhibit viroplasm formation and viral replication. **Journal of virology**, v. 84, n. 13, p. 6782–98, 1 jul. 2010.

CHINEN, A. B. *et al.* Nanoparticle Probes for the Detection of Cancer Biomarkers, Cells, and Tissues by Fluorescence. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 19, p. 10530–10574, 14 out. 2015.

CLEM, R. J. Baculoviruses and apoptosis: a diversity of genes and responses. **Current drug targets**, v. 8, n. 10, p. 1069–1074, out. 2007.

CLEM, R. J.; MILLER, L. K. Apoptosis reduces both the in vitro replication and the in vivo infectivity of a baculovirus. **Journal of virology**, v. 67, n. 7, p. 3730–3738, jul. 1993.

COBURN, C.; GEMS, D. The mysterious case of the *C. elegans* gut granule: death fluorescence, anthranilic acid and the kynurenine pathway. **Frontiers in Genetics**, v. 4, p. 151, 2013.

COONS, A. H.; CREECH, H. J.; JONES, N. R. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. **Proceedings of the Society ...**, n. 47, p. 200–202, 1941.

CUTAIA, M. *et al.* Effect of ATP-induced permeabilization on loading of the Na⁺ probe SBFI into endothelial cells. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 81, n. 1, p. 509–15, jul. 1996.

D. NETO, B. A. *et al.* Selective and efficient mitochondrial staining with designed 2,1,3-benzothiadiazole derivatives as live cell fluorescence imaging probes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 4, p. 770–781, abr. 2012.

DIAUGUSTINE, R. P.; SCHAEFER, J. M.; FOUTS, J. R. Hepatic lipid droplets. Isolation, morphology and composition. **The Biochemical journal**, v. 132, n. 2, p. 323–7, fev. 1973.

DITTRICH, P. S.; SCHWILLE, P. Photobleaching and stabilization of fluorophores used for single-molecule analysis with one- and two-photon excitation. **Applied Physics B: Lasers and Optics**, v. 73, n. 8, p. 829–837, 2001.

DOAN, P. H. *et al.* Two-Photon Spectroscopy as a New Sensitive Method for Determining

the DNA Binding Mode of Fluorescent Nuclear Dyes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 29, p. 9198–9201, 29 jul. 2015.

DRISCOLL, M. Cell death in *C. elegans*: molecular insights into mechanisms conserved between nematodes and mammals. **Brain pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 6, n. 4, p. 411–425, out. 1996.

DU, X.; THIEM, S. M. Responses of insect cells to baculovirus infection: protein synthesis shutdown and apoptosis. **Journal of virology**, v. 71, n. 10, p. 7866–7872, out. 1997.

ELLEN BO TU; GUO-ZHEN JI, AND; JIANG*, X.-K. Two Types of Salt Effects: For Aggregate Formation and for Electrostatically Stabilized Aggregate Formation. 1997.

ELLIS, H. M.; HORVITZ, H. R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. **Cell**, v. 44, n. 6, p. 817–29, 28 mar. 1986.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, jun. 2007.

FARESE, R. V.; WALTHER, T. C. Lipid Droplets Finally Get a Little R-E-S-P-E-C-T. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 855–860, 25 nov. 2009.

FEINGOLD, K. R.; GRUNFELD, C. **Introduction to Lipids and Lipoproteins**. [s.l.] MDText.com, Inc., 2000.

FERNÁNDEZ-SUÁREZ, M.; TING, A. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 12, p. 929–943, 12 dez. 2008.

FERNANDEZ, J. M.; VILLALON, M.; VERDUGO, P. Reversible condensation of mast cell secretory products in vitro. **Biophysical Journal**, v. 59, n. 5, p. 1022–1027, maio 1991.

FRANZETTI, E. *et al.* Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut. **Apoptosis**, v. 17, n. 3, p. 305–324, mar. 2012.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 16, n. 6, p. 329–344, jun. 2015.

GOODWIN, R. H.; TOMPKINS, G. J.; MCCAWLEY, P. Gypsy moth cell lines divergent in viral susceptibility. I. Culture and identification. **In vitro**, v. 14, n. 6, p. 485–494, 1978.

GORETTA, S. A. *et al.* Effects of chemical modification of sphingomyelin ammonium group on formation of liquid-ordered phase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 13, p. 4012–4019, 2012.

GUIDO, B. C. *et al.* Impact of kinesin Eg5 inhibition by 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one derivatives on various breast cancer cell features. **BMC cancer**, v. 15, p. 283, 2015.

HEIN, J. E. *et al.* Copper(I)-catalyzed cycloaddition of organic azides and 1-iodoalkynes. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 48, n. 43, p. 8018–21, 2009.

HERNIOU, E. A. *et al.* Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. **Journal of virology**, v. 78, n. 7, p. 3244–3251, abr. 2004.

HESSELINK, R. Lysosomal dysfunction in muscle with special reference to glycogen storage disease type II. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1637, n. 2, p. 164–170, 2003.

HOFFMAN, R. M. Application of GFP imaging in cancer. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 95, n. 4, p. 432–52, 16 abr. 2015.

HOU, N. S.; TAUBERT, S. Function and Regulation of Lipid Biology in *Caenorhabditis elegans* Aging. **Frontiers in physiology**, v. 3, p. 143, 2012.

HYUN, M. *et al.* Fat Metabolism Regulates Satiety Behavior in *C. elegans*. **Scientific reports**, v. 6, p. 24841, 21 abr. 2016.

JEHLE, J. A. *et al.* On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. **Archives of virology**, v. 151, n. 7, p. 1257–1266, jul. 2006.

JHA, G. *et al.* Fluoride ion sensing in aqueous medium by employing nitrobenzoxadiazole-postgrafted mesoporous silica nanoparticles (MCM-41). **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 17, n. 5, p. 3525–33, 2015.

JIANG, Q. *et al.* A novel nitro-substituted benzothiadiazole as fluorescent probe for tumor cells under hypoxic condition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 24, p. 7735–7741, dez. 2013.

JOHNSON, I. Fluorescent probes for living cells. **Histochemical Journal**, v. 30, n. 3, p. 123–140, 1998.

JONES, K. T.; ASHRAFI, K. *Caenorhabditis elegans* as an emerging model for studying the basic biology of obesity. **Disease models & mechanisms**, v. 2, n. 5–6, p. 224–9, 2009.

KAFRI, R. *et al.* Dynamics extracted from fixed cells reveal feedback linking cell growth to cell cycle. **Nature**, v. 494, n. 7438, p. 480–483, 27 fev. 2013.

KALYANARAMAN, B. *et al.* Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 1, p. 1–6, 2012.

KAPUSCINSKI, J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. **Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission**, v. 70, n. 5, p. 220–33, 1995.

KARUNAKARAN, V. *et al.* Large dynamic Stokes shift of DNA intercalation dye Thiazole Orange has contribution from a high-frequency mode. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 9, p. 2954–2962, 2006.

KATOU, Y.; IKEDA, M.; KOBAYASHI, M. Abortive replication of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus in Sf9 and High Five cells: defective nuclear transport of the virions. **Virology**, v. 347, n. 2, p. 455–465, abr. 2006.

KAWAZOE, Y. *et al.* A mitochondrial surface-specific fluorescent probe activated by bioconversion. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, n. 24, p. 5478–5481, 2011.

KIM, H. M. *et al.* A two-photon fluorescent probe for calcium waves in living tissue.

Angewandte Chemie - International Edition, v. 46, n. 39, p. 7445–7448, 2007.

KOBAYASHI, H.; CHOYKE, P. L. and in Vivo Applications. **Strategy**, v. 44, n. 2, p. 83–90, 2011.

LACOUNT, D. J.; FRIESEN, P. D. Role of early and late replication events in induction of apoptosis by baculoviruses. **Journal of virology**, v. 71, n. 2, p. 1530–1537, fev. 1997.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy - Google Books**. Disponível em:
<https://books.google.com.br/books?hl=en&lr=&id=1bLVBwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA19&dq=topics+in+fluorescence+spectroscopy&ots=h_5FnXfsDp&sig=qk2qbqymfwOpYw5nW0t9sZ_Xl1E#v=onepage&q=topics+in+fluorescence+spectroscopy&f=false>.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. [s.l: s.n.].

LICHTMAN, J. W.; CONCHELLO, J. Fluorescence microscopy. **Nature Methods**, v. 2, n. 12, p. 910–919, 2005.

LONGIN, A. *et al.* Comparison of anti-fading agents used in fluorescence microscopy: image analysis and laser confocal microscopy study. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 41, n. 12, p. 1833–1840, 1993.

LOPES, T. O. *et al.* Designed non-symmetrical 4,7-pi-extended-2,1,3-benzothiadiazole derivatives: Synthesis guided by DFT predictions. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 27, n. 4, p. 303–309, 2014.

MAIER, O.; OBERLE, V.; HOEKSTRA, D. Fluorescent lipid probes: Some properties and applications (a review). **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 116, n. 1–2, p. 3–18, 2002.

MAK, H. Y. Lipid droplets as fat storage organelles in *Caenorhabditis elegans*: Thematic Review Series: Lipid Droplet Synthesis and Metabolism: from Yeast to Man. **Journal of lipid research**, v. 53, n. 1, p. 28–33, jan. 2012.

MAMIDYALA, S. K.; FINN, M. G. In situ click chemistry: probing the binding landscapes of biological molecules. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 4, p. 1252, abr. 2010.

MANCILHA, F. S. *et al.* Are molecular 5,8-??-extended quinoxaline derivatives good chromophores for photoluminescence applications? **European Journal of Organic Chemistry**, n. 21, p. 4924–4933, 2006.

MÁRIÁN, T. *et al.* Hypo-osmotic shock induces an osmolality-dependent permeabilization and structural changes in the membrane of carp sperm. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 41, n. 2, p. 291–297, fev. 1993.

MARTIN, S.; PARTON, R. G. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 5, p. 373–378, 8 maio 2006.

MEHLEM, A. *et al.* Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. **Nature Protocols**, v. 8, n. 6, p. 1149–1154, 23 maio 2013.

MELLMAN, I.; YARDEN, Y. Endocytosis and cancer. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 12, p. a016949, 1 dez. 2013.

- MILLER, L. **The Baculoviruses (Google eBook)**. [s.l.] Springer, 1997.
- MINTA, A.; KAO, J. P. Y.; TSIEN, R. Y. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 14, p. 8171–8178, 15 maio 1989.
- MONTEIRO, F. *et al.* Toward system-level understanding of baculovirus-host cell interactions: from molecular fundamental studies to large-scale proteomics approaches. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 391, 2012.
- MORGADO, F.; ARDISSON-ARAÚJO, D.; RIBEIRO, B. Real-Time Expression Analysis of Selected *Anticarsia gemmatilis* multiple nucleopolyhedrovirus Gene Promoters during Infection of Permissive, Semipermissive and Nonpermissive Cell Lines. **Viruses**, v. 9, n. 6, p. 132, jun. 2017.
- MORRIS, T. D.; MILLER, L. K. Characterization of productive and non-productive AcMNPV infection in selected insect cell lines. **Virology**, v. 197, n. 1, p. 339–348, nov. 1993.
- MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual review of entomology**, v. 44, p. 257–289, jan. 1999.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- MOTA, A. DE A. R. **Benzotiadiazolas Fluorescentes Planejadas : Aplicações em Biologia Molecular e Celular**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2015.
- MUKHERJEE, B. *et al.* Transcriptional regulation of cell line-dependent, baculovirus-mediated expression of foreign genes. **DNA and cell biology**, v. 14, n. 1, p. 7–14, jan. 1995.
- MULLANEY, B. C.; ASHRAFI, K. C. *elegans* fat storage and metabolic regulation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1791, n. 6, p. 474–478, jun. 2009.
- MUNGER, J. *et al.* Systems-level metabolic flux profiling identifies fatty acid synthesis as a target for antiviral therapy. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1179–1186, out. 2008.
- NADLER, A.; SCHULTZ, C. The Power of Fluorogenic Probes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 9, p. 2408–2410, 25 fev. 2013.
- NETO, B. A. D.; CARVALHO, P. H. P. R.; CORREA, J. R. Benzothiadiazole Derivatives as Fluorescence Imaging Probes: Beyond Classical Scaffolds. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 6, p. 1560–1569, 16 jun. 2015.
- NETO, B. A. D.; CORRÊA, J. R.; SILVA, R. G. Selective mitochondrial staining with small fluorescent probes: importance, design, synthesis, challenges and trends for new markers. **RSC Advances**, v. 3, n. 16, p. 5291–5301, 2013.
- NOLAN, E. M.; LIPPARD, S. J. Small-molecule fluorescent sensors for investigating zinc metalloneurochemistry. **Accounts of Chemical Research**, v. 42, n. 1, p. 193–203, 2009.
- NOORDEN, C. J. VAN. Assessment of lysosomal function by quantitative histochemical and cytochemical methods. **The Histochemical journal**, v. 23, n. 10, p. 429–35, out. 1991.

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual**. [s.l.] Oxford University Press, USA, 1993.

OLIVEIRA, F. F. D. *et al.* On the use of 2,1,3-benzothiadiazole derivatives as selective live cell fluorescence imaging probes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 20, p. 6001–6007, out. 2010.

OpenWorm. Disponível em: <<http://www.openworm.org/>>. Acesso em: 23 ago. 2017.

ORR, M. E.; ODDO, S. Autophagic/lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 5, n. 53, p. 53, 2013.

OUYANG, M. *et al.* Visualization of polarized membrane type 1 matrix metalloproteinase activity in live cells by fluorescence resonance energy transfer imaging. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 25, p. 17740–8, 20 jun. 2008.

PADOVAN-MERHAR, O. *et al.* Single Mammalian Cells Compensate for Differences in Cellular Volume and DNA Copy Number through Independent Global Transcriptional Mechanisms. **Molecular Cell**, v. 58, n. 2, p. 339–352, 2015.

PAN, Z.; ZHAO, X.; BROTTTO, M. Fluorescence-based measurement of store-operated calcium entry in live cells: from cultured cancer cell to skeletal muscle fiber. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 60, p. 1–6, 2012.

PAOLA, M. DI *et al.* Arachidonic acid induces specific membrane permeability increase in heart mitochondria. **FEBS Letters**, v. 580, n. 3, p. 775–781, 6 fev. 2006.

PASSARELLI, A. L. Barriers to success: how baculoviruses establish efficient systemic infections. **Virology**, v. 411, n. 2, p. 383–392, mar. 2011.

PERFETTO, S. P.; CHATTOPADHYAY, P. K.; ROEDERER, M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. **Nature reviews. Immunology**, v. 4, n. 8, p. 648–655, ago. 2004.

PINAUD, F. *et al.* Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 1679–1687, 2010.

PRENDERGAST, F. G.; MANN, K. G. Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forskalea*. **Biochemistry**, v. 17, n. 17, p. 3448–3453, 22 ago. 1978.

PRIKHOD'KO, E. A.; MILLER, L. K. Induction of apoptosis by baculovirus transactivator IE1. **Journal of virology**, v. 70, n. 10, p. 7116–7124, out. 1996.

RABEN, N. *et al.* Chapter 21 Monitoring Autophagy in Lysosomal Storage Disorders. **Methods in Enzymology**, v. 453, n. C, p. 417–449, 2009.

RAMÍREZ-ZACARÍAS, J. L.; CASTRO-MUÑOZLEDO, F.; KURI-HARCUCH, W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. **Histochemistry**, v. 97, n. 6, p. 493–7, jul. 1992.

RIDDLE, D. L. **C. elegans II**. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.

ROH, H. C. *et al.* Lysosome-Related Organelles in Intestinal Cells Are a Zinc Storage Site

in *C. elegans*. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 1, p. 88–99, jan. 2012.

ROHRMANN, G. F. **Baculovirus Molecular Biology** National Center for Biotechnology Information (US), , 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114593/>>

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning : a laboratory manual**. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.

SANKARANARAYANAN, S. *et al.* A sensitive assay for ABCA1-mediated cholesterol efflux using BODIPY-cholesterol. **Journal of lipid research**, v. 52, n. 12, p. 2332–40, 1 dez. 2011.

SATO, K. *et al.* *C. elegans* as a model for membrane traffic. **WormBook : the online review of C. elegans biology**, p. 1–47, 2014.

SCHINDELIN, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676–682, jun. 2012.

SCHROEDER, L. K. *et al.* Function of the *Caenorhabditis elegans* ABC Transporter PGP-2 in the Biogenesis of a Lysosome-related Fat Storage Organelle. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, n. 3, p. 995–1008, jan. 2007.

SHANER, N. C. *et al.* Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1567–1572, 21 dez. 2004.

SHEN, P. *et al.* Selective labeling of the endoplasmic reticulum in live cells with silicon quantum dots. **Chemical communications (Cambridge, England)**, v. 47, n. 29, p. 8409–11, 2011.

SHINTANI, T. Autophagy in Health and Disease: A Double-Edged Sword. **Science**, v. 306, n. 5698, p. 990–995, 2004.

SHVETS, E.; ELAZAR, Z. Chapter 9 Flow Cytometric Analysis of Autophagy in Living Mammalian Cells. **Methods in Enzymology**, v. 451, n. C, p. 131–141, 2009.

SONG, J. W. *et al.* Lysosomal Activity Associated with Developmental Axon Pruning. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 36, p. 8993–9001, 3 set. 2008.

SPANGENBURG, E. E. *et al.* Use of BODIPY (493/503) to visualize intramuscular lipid droplets in skeletal muscle. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2011, p. 598358, 25 set. 2011.

STROBER, W. Monitoring Cell Growth. *In*: **Current Protocols in Immunology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001. .

SULSTON, J. E. Post-embryonic development in the ventral cord of *Caenorhabditis elegans*. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 275, n. 938, p. 287–297, ago. 1976.

SUN, Y.-T. *et al.* Deficiency of electroneutral K⁺-Cl⁻ cotransporter 3 causes a disruption in impulse propagation along peripheral nerves. **Glia**, v. 58, n. 13, p. n/a-n/a, 14 jun. 2010.

SUZUKI, Y.; YOKOYAMA, K. Development of functional fluorescent molecular probes

for the detection of biological substances. **Biosensors**, v. 5, n. 2, p. 337–363, 18 jun. 2015.

TAKASHIMA, I. *et al.* Development of an AND Logic-Gate-Type Fluorescent Probe for Ratiometric Imaging of Autolysosome in Cell Autophagy. **Chemistry - A European Journal**, v. 21, n. 5, p. 2038–2044, 26 jan. 2015.

ThermoFisher Scientific - Fluorescence Fundamentals. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/introduction-to-fluorescence-techniques.html>>. Acesso em: 24 out. 2016.

TIAN, Y. *et al.* Utilization of micelles formed from poly(ethylene glycol)-block-poly(epsilon-caprolactone) block copolymers as nanocarriers to enable hydrophobic red two-photon absorbing emitters for cells imaging. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 93, n. 3, p. 1068–79, 1 jun. 2010.

TSIEN, R. Y. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. **Biochemistry**, v. 19, n. 11, p. 2396–404, 1980.

TSIEN, R. Y. THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, n. 1, p. 509–544, 28 jun. 1998.

VARGHESE GUPTA, S. *et al.* Enhancing the intestinal membrane permeability of zanamivir: A carrier mediated prodrug approach. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 6, p. 2358–2367, 5 dez. 2011.

VERMES, I. *et al.* A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v. 184, n. 1, p. 39–51, jul. 1995.

WALLABREGUE, A. *et al.* Selective Imaging of Late Endosomes with a pH-Sensitive Diazaoxatriangulene Fluorescent Probe. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 6, p. 1752–1755, 17 fev. 2016.

WANG, L. *et al.* Slow cell infection, inefficient primary infection and inability to replicate in the fat body determine the host range of *Thysanoplusia orichalcea* nucleopolyhedrovirus. **The Journal of general virology**, v. 89, n. Pt 6, p. 1402–1410, jun. 2008.

WANG, Y. *et al.* A role for caveolin-1 in mechanotransduction of fetal type II epithelial cells. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 298, n. 6, 2010.

WANG, Y. L. Chapter 1 Fluorescent Analog Cytochemistry: Tracing Functional Protein Components in Living Cells. **Methods in Cell Biology**, v. 29, n. C, p. 1–12, 1988.

WARNES, G. Flow cytometric assays for the study of autophagy. **Methods**, v. 82, p. 21–28, 1 jul. 2015.

WEN, X. *et al.* Intrinsic and Extrinsic Fluorescence in Carbon Nanodots: Ultrafast Time-Resolved Fluorescence and Carrier Dynamics. **Advanced Optical Materials**, v. 1, n. 2, p. 173–178, fev. 2013.

WESSENDORF, M. W.; BRELJE, T. C. Which fluorophore is brightest? A comparison of the staining obtained using fluorescein, tetramethylrhodamine, lissamine rhodamine, texas red,

and cyanine 3.18. **Histochemistry**, v. 98, n. 2, p. 81–85, set. 1992.

WICKS, S. R.; RANKIN, C. H. Integration of mechanosensory stimuli in *Caenorhabditis elegans*. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 15, n. 3 Pt 2, p. 2434–2444, mar. 1995.

WITTEKIND, D. H. On the nature of Romanowsky-Giemasa staining and its significance for cytochemistry and histochemistry: an overall view. **The Histochemical Journal**, v. 15, n. 10, p. 1029–1047, 1983.

WOLF, N. S. *et al.* In vivo and in vitro characterization of long-term repopulating primitive hematopoietic cells isolated by sequential Hoechst 33342-rhodamine 123 FACS selection. **Exp Hematol**, v. 21, n. 5, p. 614–622, maio 1993.

WOOD, W. B. **The Nematode *Caenorhabditis elegans***. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory, 1988a.

____. **The Nematode *Caenorhabditis elegans***. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory, 1988b.

WU, D. *et al.* Synthesis and assessment of a maleimide functionalized BF₂ azadipyrromethene near-infrared fluorochrome. **Chem. Commun.**, v. 51, n. 93, p. 16667–16670, 2015.

____. Strained alkyne substituted near infrared BF₂ azadipyrromethene fluorochrome. **RSC Adv.**, v. 6, n. 90, p. 87373–87379, 2016.

XUE, J. *et al.* Dynamic interactions between *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus and its host cells revealed by transcriptome analysis. **Journal of virology**, v. 86, n. 13, p. 7345–7359, jul. 2012.

YANG, N. J.; HINNER, M. J. Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1266, p. 29–53, 2015.

YIN, J. *et al.* Cyanine-based fluorescent probe for highly selective detection of glutathione in cell cultures and live mouse tissues. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 14, p. 5351–5358, 9 abr. 2014.

YOSHIZUMI, Y. *et al.* Programmed Transport and Release of Cells by Self-Propelled Micromotors. **Langmuir**, v. 32, n. 37, p. acs.langmuir.5b04206, 20 set. 2016.

YU, S. J. *et al.* Bright fluorescent nanodiamonds: No photobleaching and low cytotoxicity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 50, p. 17604–17605, 2005.

ZHAI, D. *et al.* Synthesis of a novel BODIPY library and its application in the discovery of a fructose sensor. **ACS Combinatorial Science**, v. 14, n. 2, p. 81–84, 2012.

ZHAI, X. *et al.* Nanoscale packing differences in sphingomyelin and phosphatidylcholine revealed by BODIPY fluorescence in monolayers: physiological implications. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 30, n. 11, p. 3154–64, 25 mar. 2014.

ZHANG, S. O. *et al.* Lipid droplets as ubiquitous fat storage organelles in *C. elegans*. **BMC Cell Biology**, v. 11, n. 1, p. 96, 8 dez. 2010.

