UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

FERNANDO MASSAYUKI TSUTAE

Espectroscopia de correlação de fluorescência aplicada em estudos
de sistemas moleculares, biológicos e celulares

São Carlos
2016

FERNANDO MASSAYUKI TSUTAE

Espectroscopia de correlação de fluorescência aplicada em estudos
de sistemas moleculares, biológicos e celulares

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Orientador: Prof. Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães

.Versão Original

São Carlos
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Tsutae, Fernando Massayuki

Espectroscopia de correlação de fluorescência aplicada em estudos de sistemas moleculares, biológicos e celulares / Fernando Massayuki Tsutae; orientador Francisco Eduardo Gontijo Guimarães -- São Carlos, 2016.
96 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

1. Espectroscopia de correlação de fluorescência. 2. Marcadores fluorescentes. 3. Microscopia confocal. I. Guimarães, Francisco Eduardo Gontijo, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernando Massayuki Tsutae

Tese apresentada ao Instituto de Física
de São Carlos da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de Concentração:
Física Aplicada.

Aprovado(a) em: 24/05/2016

Comissão Julgadora

Dr(a). Francisco Eduardo Gontijo Guimarães

Instituição: (IFSC/USP)

Dr(a). Carlos Frederico de Oliveira Graeff

Instituição: (UNESP/Bauru)

Dr(a). Ernesto Chaves Pereira de Souza

Instituição: (UFSCar/São Carlos)

Dr(a). Amando Siuiti Ito

Instituição: (FFCLRP/USP)

Dr(a). Antonio Riul Júnior

Instituição: (UNICAMP/Campinas)

À minha namorada Michelle, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e persistência e incansável apoio ao longo período de elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que me ajudaram muito, de todas as formas, neste estado delicado de saúde em que me encontro. Obrigado pelo amor, pela ajuda financeira e pelos inúmeros sacrifícios que fizeram para que nada me faltasse.

A minha namorada Michelle pelo amor, pela alegria que trouxe à minha vida e por seus cuidados profissionais de enfermeira, necessários à minha recuperação, assim como pela ajuda financeira. Muito obrigado pela ajuda e companheirismo nestes sete anos de namoro.

Aos meus amigos, Sebastião, Anderson, Netto, Jeison, Regina, Lilian, Edna. Obrigado pelos bons momentos, pelo apoio e amizade.

Aos meus amigos de grupo Raphael, Juliana e Gustavo e José. Obrigado pela companhia, ajuda e sincera amizade.

Ao grupo de polímeros pela estrutura laboratorial e boas condições de trabalho.

Ao grupo de Biofotônica do IFSC pela parceria e colaboração.

À professora Ana Paula Ulian de Araujo e sua doutoranda Helene Hellen Teixeira por fornecer e preparar grande parte das amostras do meu trabalho. Muito obrigado mesmo.

Ao professor Richard John Ward e seu dedicado aluno Gustavo Avelar Molina pelos experimentos sugeridos, preparação de amostras, análise dos resultados e pela paciência nas medidas. Sou muito grato pela colaboração que creio eu gerarão bons frutos no futuro.

Aos professores Cristina Kurachi, Paulo Barbeitas Miranda e Amando Siuiti Ito pelas críticas construtivas na minha qualificação.

Ao meu orientador, Prof. Francisco, que nos anos de convivência, muito me ensinou, sobre a pesquisa, meio acadêmico e sobre a vida.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

E, finalmente, ao IFSC e a USP pela estrutura, qualidade e aprimoramento a mim concedido.

*“Nada é tão maravilhoso que não possa existir,
se admitido pelas leis da Natureza.”*

Michael Faraday

RESUMO

TSUTAE, F. M. **Espectroscopia de correlação de fluorescência aplicada em estudos de sistemas moleculares, biológicos e celulares**. 2016. 96 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

A espectroscopia de correlação de fluorescência (FCS) é uma das diferentes técnicas de análise por imagens de alta resolução espacial e temporal de biomoléculas em concentrações extremamente baixas. Ela se tornou uma técnica extremamente poderosa e sensível em áreas como bioquímica e biofísica. Como uma técnica bem estabelecida, ela é utilizada para medir concentrações locais de biomoléculas, através da marcação com moléculas fluorescentes. Coeficientes de difusão e constantes cinéticas também podem ser medidos através de FCS assim como detecção de molécula única. Ela também pode dar informação precisa sobre interações de antígeno-anticorpo, ácidos nucleicos e proteínas. Através de uma combinação de marcadores de alto rendimento quântico, fontes de luz estável (lasers), detecção ultrassensível e microscopia confocal, é possível realizar medidas de FCS em volumes de fentolitros (fL) e em concentrações de nanomolar (nM) em soluções aquosas ou em células vivas. Em contraste com outras técnicas de fluorescência, a sensibilidade da FCS aumenta com a diminuição da concentração do fluoróforo marcador, porque o parâmetro de interesse não é a intensidade de emissão de fluorescência, mas sim as flutuações espontâneas da fluorescência. Durante o tempo em que a partícula ou molécula atravessa o volume de medida pode ocorrer mudanças conformacionais e reações químicas e fotofísicas que alteram as características de emissão do fluoróforo e causam flutuações no sinal detectado. Estas flutuações são então monitoradas e transformadas em uma curva de autocorrelação, por intermédio de um software comercial que emprega um modelo físico apropriado para FCS. Em nosso estudo, utilizamos um marcador comercial (ALEXA 488[®]) para marcar proteínas. Primeiramente utilizamos a técnica de FCS para medir concentrações extremamente baixas de marcadores fluorescentes. Também realizamos um experimento testando a influência da viscosidade do meio na difusão livre do fluoróforo, assim como as melhores condições em que temos um melhor sinal de FCS. Por fim, estudamos a difusão de proteínas marcadas (PUC II e IV) em meio aquoso (PBS) e no interior de células.

Palavras-chave: Espectroscopia de correlação de fluorescência. Marcadores fluorescentes. Microscopia confocal.

ABSTRACT

TSUTAE, F. M. **Fluorescence correlation spectroscopy applied in studies of molecular, biological and cellular systems**. 2016. 96 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) is one of the many different modes of high-resolution spatial and temporal analysis of extremely low concentrated biomolecules. It has become a powerful and sensitive tool in fields like biochemistry and biophysics. As a well established technique, it is used to measure local concentrations of fluorescently labeled biomolecules, diffusion coefficients, kinetic constants and single molecule studies. Through a combination of high quantum yield fluorescent dyes, stable light sources (lasers), ultrasensitive detection and confocal microscopy is possible to perform FCS measurements in femtoliters volumes and nanomolar concentrations in aqueous solution or in live cells. Unlike with other fluorescence technics, its sensibility increases with the decrease of dye concentrarion, because the main factor is not the emission intensity itself. Instead this, spontaneous statistical fluctuation of fluorescence becomes the main factor in FCS analisys. During the time that the conjugated-dye cross the volume detection can occur conformational changes, chemical reaction and photophysical processes that can change the emission properties of the dye and, then, change the detected sinal. This fluctuations are tracked and changed into a autocorrelation curve, by a specific software, appropriate to perform FCS analisys. In our study, we use comercial dye (Alexa 488) to label proteins. Firstly, we applied FCS to measure extremally diluted concentrations of dyes (~ 1 nM). We have performed experiments testing the influence of the viscosity medium in the free difusion of the dyes and the optical apparatus and conditions that result in the best FCS signal. We also have studied protein diffusion (PUC II e IV) in aquous medium (PBS) and toward the inner of the cells.

Keywords: Fluorescence correlation spectroscopy. Fluorescent dyes. Confocal microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema mostrando que independentemente do comprimento de onda de excitação, a curva de emissão resultante é sempre idêntica, apenas variando em sua intensidade.....	33
Figura 2 -	Exemplos de modelos de difusão com autocorrelação.....	39
Figura 3 -	Escala de tempo dos vários processos que podem ser medidos por FCS.....	40
Figura 4 -	Espectro de absorção e emissão do Alexa Fluor 488.....	43
Figura 5 -	Estrutura molecular do marcador Alexa Fluor 488.....	44
Figura 6 -	Espectros de excitação e emissão do ALEXA 488®.....	51
Figura 7 -	Microscópio confocal de varredura (LSM 780, ZEISS) utilizado neste trabalho.....	52
Figura 8 -	Ilustração do princípio da confocalidade.....	53
Figura 9 -	Diagrama esquemático mostrando o instrumental óptico do microscópio confocal utilizado neste trabalho (ZEISS LSM 780).....	54
Figura 10 -	Ilustração da técnica de FCS. Somente quando o marcador fluorescente transita pelo volume de observação ocorre excitação do fluoróforo e emissão de fluorescência. O sinal é então captado pela objetiva e fotodetectoras e sua flutuação durante o tempo de trânsito é analisada.....	57
Figura 11 -	Flutuação do sinal fluorescente ao longo do tempo de aquisição. $F(t)$ é proporcional ao número de fótons.....	58
Figura 12 -	Representação esquemática da medida de FCS.....	58
Figura 13 -	Exemplo de aplicação da função de autocorrelação. A curva em azul corresponde ao marcador livre (referência) e a vermelha corresponde à proteína marcada. No eixo x (t(s)) temos uma distribuição de tempos de difusão sobre o volume de observação.....	59
Figura 14 -	Exemplo de aplicação de FCS na determinação de nanoconcentrações. Neste caso foi utilizado moléculas de rodamina (RG6) como exemplo.....	60
Figura 15 -	Exemplo de aplicação de FCS na diferenciação de espécies moleculares por massa molar.....	61
Figura 16 -	Espectro de absorção do ALEXA 488 em água ultrapura.....	62
Figura 17 -	Medidas de FCS com fluoróforo livre em concentrações de: 1 μ M a 10 nM.....	64
Figura 18 -	Medidas de FCS com fluoróforo livre em concentrações de: 1nM a 10 pM.....	64

Figura 19 - a) Microscópio confocal com câmara para medida com temperatura e atmosfera controlada. b) Vista ampliada da câmara e do poço de medida.....	66
Figura 20 - Representação esquemática da medida de FCS em células com proteínas marcadas.....	66
Figura 21 - Medida de concentração do marcador livre (ALEXA 488®) em solução aquosa.....	71
Figura 22 - Difusão do marcador livre em meios com diferentes concentrações de glicerol.....	72
Figura 23 - Difusão das proteínas PUC II e IV marcadas com ALEXA 488®.....	73
Figura 24 - Imagem de luz transmitida de uma cultura de células. A cruz em azul indica o ponto no interior da célula onde a medida foi realizada.....	74
Figura 25 - Difusão da proteína PUC II para o interior de uma célula.....	75
Figura 26 - Difusão da proteína PUC IV para o interior de uma célula.....	76
Figura 27 - Intensidade de emissão da PUC IV para b) o interior de células e outras regiões celulares para o instante de tempo inicial (t=0 h). A linha azul da figura a) é tomada como referência, pois corresponde ao sinal do meio extracelular. As linhas coloridas do gráfico a) correspondem a intensidade de emissão das regiões de mesma cor, delimitadas na figura b).....	77
Figura 28 - Intensidade de emissão da PUC IV para b) o interior de células e outras regiões celulares para o instante de tempo inicial (t=0,2 h ou 12 minutos).....	77
Figura 29 - a) Intensidade de emissão da PUC IV para b) o interior de células e outras regiões celulares para o instante de tempo inicial (t=1,2 h ou 1h e 12 minutos).....	78
Figura 30 - Imagem de fluorescência medida sobre um pixel (~0,12 μm^2) à 10 μm de distancia da membrana de uma célula. A localização do pixel é indicada pela interseção das retas em branco.....	79
Figura 31 - Imagem de fluorescência medida sobre um pixel (~0,12 μm^2) à 8 μm de distancia da membrana de uma célula. A localização do pixel é indicada pela interseção das retas em branco.....	80
Figura 32 - Imagem de fluorescência medida sobre um pixel (~0,12 μm^2) à 6 μm de distancia da membrana de uma célula. A localização do pixel é indicada pela interseção das retas em branco.....	81
Figura 33 - Imagem de fluorescência medida sobre um pixel (~0,12 μm^2) exatamente sobre a membrana de uma célula. A localização do pixel é indicada pela interseção das retas em branco.....	82
Figura 34 - Imagem de fluorescência medida sobre um pixel (~0,12 μm^2) à 1 μm de distância da membrana, dentro da célula. A localização do pixel é indicada pela interseção das retas.....	83

Figura 35 - Aquisição por FCS nos pixels referentes às imagens anteriores.....	84
Figura 36 - Curvas de autocorrelação do fluoróforo livre em tampão e em 1.0% de arabinosilano (m/v), pH 6.0 e 19 °C. As curvas foram ajustadas com um modelo do tipo T+3D+2D.....	85
Figura 37 - Curvas de autocorrelação da xilanase-N-AF488 e do fluoróforo livre em tampão, pH 6.0 e 19 °C. As curvas foram ajustadas com um modelo do tipo T+3D+2D.....	86
Figura 38 - Curvas de autocorrelação da xilanase-N-AF488 em tampão e em 1.0% de arabinosilano (m/v), pH 6.0 e 19 °C. As curvas foram ajustadas com um modelo do tipo T+3D+2D.....	87
Figura 39 - Combinação das curvas de autocorrelação ajustadas das figuras 36, 37 e 38.....	89
Figura 40 - Curvas de autocorrelação de fluorescência para a XynA-D119C-AttoOxa11 e o <i>Atto655-carboxy</i> em arabinosilano. Todas as curvas foram ajustadas com uma função modelo do tipo T+3D+2D.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Conteúdo do kit de marcação A20181 (ALEXA 488). Após o preparo de cada marcação deve se estocar a solução resultante em ambiente protegido de luz solar, de 2 a 6 C. Se bem acondicionado, as proteínas marcadas podem durar até três meses.....	45
------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

Alexa Fluor 488[®] - Marcador, fluoróforo, sonda fluorenscente com excitação em 488 nm

PUCII – *Abrus pulchellus*- isoforma II

PUCIV – *Abrus pulchellus*- isoforma IV

PBS – Tampão fosfato salino

DMEM – do inglês: *Dulbecco's modified Eagle's médium*

XynA-N-AF488 – enzima xilanase marcada com fluoroforo alexa 488

AF488 - (ALEXA FLUOR 488[®])

pH - Potencial de hidrogênio

rpm – Rotações por minuto

LSCM - *laser scanning confocal microscope*

LSM 780[®] – Microscópio confocal de varredura ZEISS[®]

ZEN 2010[®] - Software da ZEISS[®]

NP – nanopartículas

LISTA DE SIMBOLOS

°C – unidade de temperatura

s - unidade de tempo

MHz – múltiplo da unidade de frequência (Hz)

M – molar

L - litro

nM – nanomolar

μM – micromolar

pM - picomolar

nm – nanômetros

cm - centímetros

mg – miligrama

μg – micrograma

mL – mililitro

μL – microlitro

fL – fentolitro

e – número neperiano (~2,718)

kDa – kilodalton, unidade de massa atômica

D – coeficiente de difusão

t_D – tempo de difusão

Sumário

1 MOTIVAÇÃO	27
2 INTRODUÇÃO	29
2.1 Fluorescência.....	29
2.2 Fluoróforos	32
2.3 Microscopia confocal	35
2.4 Espectroscopia de correlação de fluorescência	37
3 OBJETIVOS	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Diluição das amostras para obtenção de sinal de FCS	43
4.2 Protocolo de marcação das proteínas	45
4.2.1 Marcando as proteínas.....	45
4.2.2 Purificando a proteína marcada.....	46
4.2.3 Determinação do grau de marcação do anticorpo	47
4.2.4 Armazenamento das proteínas marcadas	47
4.2.5 Alguns problemas comuns que podem ocorrer	48
4.3 Diluição das amostras purificadas para regime de trabalho em FCS	50
4.4 Equipamentos utilizados	50
4.5 Metodologia empregada na microscopia confocal de varredura	52
4.6 Metodologia empregada na espectroscopia de correlação de fluorescência (FCS).....	56
4.7 Caracterização do volume focal efetivo	61
4.8 Representação estrutural e materiais utilizados em medidas com células	65
4.9 Espectroscopia de correlação de fluorescência aplicada na análise da difusão e interação da XynA-N-AF488 em arabinosilano.....	67
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	71
5.1 Medidas de concentrações do marcador livre por FCS	71
5.2 Difusão do marcador livre em meios de viscosidades diferentes	72
5.3 Difusão das proteínas PUC II e PUC IV	73
5.4 Estudo da difusão de proteínas em células	73
5.5 Medidas de internalização das proteínas ao longo do tempo por imagem de fluorescência (Time Series).....	76
5.6 Medidas de mapeamento da concentração das proteínas nas proximidades de uma célula por imagem de fluorescência e FCS	78
5.7 Análise da difusão e interação da XynA-N-AF488 em arabinosilano por FCS	85
5.8 Análise da difusão e interação da XynA-D119C-AttoOxa11 em arabinosilano por FCS	89
6 CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS	93

1 MOTIVAÇÃO

A aquisição de imagens microscópicas detalhadas e o estudo das propriedades de eventos isolados em sistemas específicos, tais como o rastreamento e a difusão de biomoléculas em células, oferecem grandes vantagens sobre medidas macroscópicas, que fornecem apenas um valor médio de uma propriedade de uma população ou de um número muito grande de eventos. Estas informações detalhadas sobre sistemas isolados são cruciais em sistemas heterogêneos, como frequentemente ocorre nas aéreas biológicas e de polímeros, por exemplo. O rastreamento de fenômenos e processos em tempo real em células e tecidos, por exemplo, é extremamente relevante para o entendimento dos principais mecanismos relacionados aos processos envolvidos em um diagnóstico óptico.

A técnica de espectroscopia de correlação de fluorescência (FCS) consiste numa ferramenta poderosíssima para análise de fenômenos em dimensões ínfimas, da ordem de fentolitros, e concentrações extremamente baixas, podendo medir concentrações de fluoróforos da ordem de nano a picomolar. Por estar prontamente disponível como ferramenta de trabalho incorporado ao microscópio confocal, além da facilidade de manuseio de software, equipamentos e material de análise, torna-se imprescindível sua implementação como ferramenta básica de análise espectroscópica, principalmente na pesquisa de materiais biológicos e novos materiais orgânicos.

2 INTRODUÇÃO

A Microscopia óptica de fluorescência utiliza uma propriedade que certas moléculas têm chamada de emissão, que consiste na emissão de luz em resposta à uma radiação luminosa incidente. Tais propriedades são baseadas em compostos fluorescentes chamados fluorocromos ou fluoróforos. Quando estes compostos se ligam ou conjugam a certas proteínas ou organelas conseguimos localizá-las até em meios intracelulares. O resultado final que se vê no microscópio de fluorescência é a sua estrutura de interesse, seja esta uma proteína, uma molécula, uma organela ou mesmo a célula inteira, fluorescente contra um fundo preto (sem emissão de luz de fundo). Ou seja, com este contraste em situações de relação sinal alto/ruído baixo, quantidades ínfimas de fluoróforos podem ser detectadas. Em teoria é possível se fazer, em condições muito especiais e com equipamento especializado, a discriminação de um único fóton.

O emprego da microscopia óptica de fluorescência também tem suas limitações. Algumas destas limitações são: 1) Dependendo da procedência do marcador fluorescente, a fluorescência pode oferecer uma marcação fugaz e não permanente. 2) A autofluorescência em vários materiais minerais e biológicos pode apresentar resultados falso-positivos. 3) Temos também a questão do custo. Atualmente o uso de equipamentos que empregam microscopia de fluorescência não são baratos, mas estão se tornando cada vez mais acessíveis do ponto de vista econômico, pois muitas vezes sua praticidade e finalidade justifica os custos. 4) Por último podemos citar o fator de recursos humanos adequados para o manuseio de equipamentos relativamente caros e complexos, o que demanda uma grande tempo para capacitação técnica e investimento no treinamento de pessoal.

2.1 Fluorescência

A fluorescência faz parte da família de processos de emissão de luz não térmica, que ocorre mesmo à baixíssimas temperaturas, próximas do zero absoluto, chamada de

luminescência. É diferente da emissão de luz por corpos em altas temperaturas, chamada incandescência. De forma estilizada, a emissão de luz na luminescência envolve a excitação de elétrons para níveis de energia mais altos e a emissão acontece quando os elétrons decaem para um dos níveis de energia mais baixos emitindo fótons. A luminescência é classificada pela forma como os elétrons são excitados para os níveis de energia mais altos. Exemplos dessa classificação são: fotoluminescência, bioluminescência, quimioluminescência, eletroluminescência, catodoluminescência e termoluminescência. A fotoluminescência é o processo no qual os elétrons são excitados por luz (fótons) e engloba a fluorescência e a fosforescência. A fluorescência é um processo rápido (da ordem de 10^{-9} a 10^{-7} s) permitido por spin, o que significa que elétrons decaem de um estado singlete para um singlete, ou de um tripleto para um tripleto. Já a fosforescência é lenta (da ordem de 10^{-3} a 100 s), proibida por spin, decaindo de estados tripletos para singletos ou vice versa. A fluorescência ocorre enquanto houver excitação da amostra, desaparecendo quando cessa a excitação. Já a fosforescência persiste por um determinado tempo depois que a amostra deixa de ser excitada.

George Stokes (1819-1903), físico e matemático escocês, foi o primeiro a descrever o fenômeno da fluorescência em 1852. Como observou o fenômeno em cristais de fluorita (CaF_2) o efeito foi chamado de fluorescência, embora a emissão, nesse caso, fosse devida ao elemento dopante Európio, uma terra rara da família dos lantanídeos. O físico Kohler (1866-1948) observou o fenômeno de fluorescência na microscopia óptica em 1904 quando iluminou as amostras com luz ultravioleta em busca de resolução mais alta advinda dos comprimentos de ondas mais curtos. Entretanto, o primeiro instrumento de microscopia de fluorescência foi desenvolvido pelo físico Oskar Heimstadt, em 1911, que conseguiu concentrar luz ultravioleta suficiente para excitar a fluorescência e barrar a luz de excitação para coletar apenas a fluorescência. Esses trabalhos pioneiros, entretanto, só observam a autofluorescência das amostras biológicas. Faltavam marcadores fluorescentes com alta eficiência para o desenvolvimento pleno da técnica.

Por isso, apesar da fluorescência ter sido descoberta por volta de 1852, somente por volta de 1930, com a invenção dos corantes orgânicos como marcadores fluorescentes é que ela passou a ser utilizada intensamente na ciência. Por volta de 1950, os cientistas acoplaram o corante fluoresceína com anticorpos e demonstraram a localização de antígenos em tecidos. O uso de corantes permitiu identificar células e

organelas com alto grau de especificidade, o que não seria possível sem a fluorescência. A grande vantagem de técnicas baseadas em fluorescência é a alta intensidade, permitindo monitoração de processos em tempo real e a especificidade química que advém da afinidade existente entre marcadores fluorescentes e as macromoléculas no objeto de estudo. Também existem materiais que são autofluorescentes, ou seja, que fluorescem naturalmente sem precisar da adição de substâncias exógenas. Quase todo tecido biológico, por causa dos aminoácidos tirosina e triptofano, é autofluorescente. A clorofila é outro exemplo de autofluorescência. A autofluorescência, embora indesejada em muitos casos, está se tornando valiosa para estudos de processos celulares *in vivo* nos quais a marcação exógena deve ser evitada.

A Microscopia óptica de fluorescência se baseia no uso de compostos fluorescentes, chamados de fluoróforos, compostos que quando iluminados por um determinado comprimento de onda emitem luz de comprimento de onda maior (desvio de Stokes). (1) Quando estes compostos se ligam a certas proteínas ou organelas iluminam a sua localização intracelular. O resultado final que se vê no microscópio de fluorescência é a sua estrutura de interesse, seja esta uma proteína, uma molécula, uma organela ou mesmo a célula inteira, fluorescente contra um fundo preto (sem emissão de luz de fundo). Ou seja, com este contraste em situações de relação sinal alto e ruído baixo, quantidades ínfimas de fluoróforos podem ser detectadas.

Atualmente, um enorme arsenal de moléculas fluorescentes com diferentes propriedades espectrais e afinidades bioquímicas (2) (sensíveis, por exemplo, a variações de pH, de níveis iônicos e de polaridade de estruturas celulares) permitem a análise de uma gama inesgotável de fenômenos biológicos. Sobrepõe-se a isto a recente possibilidade de expressão de proteínas naturalmente fluorescentes em organismos e células vivas e a inovações tecnológicas importantes como melhorias na óptica de microscópios fluorescentes convencionais, a introdução da microscopia confocal (3) e multifotônica (4-5) dentre outros. Portanto, podemos afirmar que a técnica de microscopia de fluorescência tornou-se uma ferramenta essencial e indispensável em um laboratório moderno e por isso, devemos buscar um melhor entendimento dos mecanismos básicos para a melhor aplicação desta técnica.

2.2 Fluoróforos

Os fluoróforos em geral são compostos cíclicos aromáticos com ligações covalentes duplas contendo ligações π . Outra generalização importante é que quanto maior o número destas ligações duplas menos energia é necessária para levar o fluoróforo a um estado excitado, ou seja, a luz de excitação pode ter um comprimento de onda maior (deslocado para vermelho). Além disto, compostos com maior número de anéis aromáticos e ligações duplas apresentam uma maior eficiência quântica (como, por exemplo, os marcadores comerciais utilizados neste trabalho), ou seja, menos fótons são necessários para produzir uma emissão de luz. De forma simplificada podemos dizer que quanto maior o diâmetro molecular mais fótons atingem a molécula em um determinado tempo. Finalmente, uma das regras de maior importância heurística em relação aos fluoróforos é que independente do comprimento de luz de excitação, a curva de emissão resultante é sempre idêntica, apenas variando em sua intensidade.

Figura 1 - Esquema mostrando que independentemente do comprimento de onda de excitação, a curva de emissão resultante é sempre idêntica, apenas variando em sua intensidade

Fonte: Elaborada pelo autor

A diversidade de fluoróforos é prodigiosa e de crescimento aparentemente incessante. Hoje em dia temos disponível uma variedade de fluoróforos cujo espectro de emissão combinados cobrem a maior parte do espectro no visível (400-700 nm) e alguns até mesmo na faixa do infravermelho.

As duas características mais importantes que distinguem os fluoróforos entre si são as regiões de comprimento de onda de excitação/emissão e suas características físico-químicas. No entanto, uma enorme variedade de aspectos diferentes tem relevância para suas aplicações práticas tais como: solubilidade, tamanho molecular, coeficiente de extinção molar, estrutura tridimensional, toxicidade, afinidade bioquímica e fotoestabilidade (resistência a *photobleaching*). Estes aspectos são importantes de serem conhecidos antes de se considerar sua utilização em determinado protocolo.

Alguns fluoróforos são desenvolvidos para aplicações específicas, como os listados abaixo:

-Fluoróforos reativos: Estes fluoróforos, devido à sua reatividade são em geral utilizados para marcar macromoléculas, as quais são conjugadas quimicamente. São utilizados comumente para marcar anticorpos secundários, mas podem até marcar moléculas pequenas. Trata-se de um grupo heterogêneo quimicamente e com enorme gama de aplicações não limitadas a conjugação de proteínas ou moléculas. Nesta classificação temos os fluoróforos mais tradicionais e antigos como a fluoresceína (FITC), que possui um espectro de emissão no verde. Como exemplos de novos corantes temos os da família ALEXA, utilizada neste trabalho, que apresentam uma fotoestabilidade e rendimento quântico ainda maiores, e os derivados de coumarínicos, as cianinas, que apresentam uma grande diversidade espectral.

-Corantes de ácidos nucleicos: Largamente usados, não apenas para investigação de conteúdo de ácidos nucleicos, mas como marcadores celulares inespecíficos. Suas aplicações são inesgotáveis e largamente empregadas em pesquisas com fluorescência. Alguns destes corantes são fotoestáveis, outros apolares e atravessam membranas, outros são polares e não marcam células vivas. São também muito utilizadas para avaliar a viabilidade celular e contaminações por microorganismos em culturas de células animais. É importante se chamar a atenção para o fato da grande maioria destes corantes ser carcinogênica e, portanto, deve-se evitar tomar o cuidado na sua manipulação. Neste grupo de corantes de ácidos nucleicos podemos encontrar exemplos como laranja de acridina e o brometo de etídio.

-Corantes de organelas e do citoesqueleto: Algumas variações de corantes reativos tem tropismo para certo compartimento celular, muitas vezes mediado por processamento enzimático em um compartimento específico. Estes podem ser específicos para estruturas como: mitocôndrias, complexo de Golgi, retículo endoplasmático, entre outras organelas. Exemplos destes corantes são a rodamina B que marca mitocôndrias e o NBD-ceramida que marca complexo de Golgi. Além disso, existem vários corantes reativos específicos para elementos do citoesqueleto, como a faloidina que marca a actina filamentosa.

-Rastreadores não usuais: Alguns fluoróforos fogem da regra de moléculas pequenas, aromáticas reativas e quimicamente sintetizadas. Nesse caso são utilizados

polímeros sintéticos que formam contas de tamanho grande na ordem de nanômetros à micrometros, como por exemplo as microesferas de látex (látex beads) que possuem uma enorme gama de tamanhos e cores disponíveis e padronizados. Também são utilizados para calibração do pinhole no microscópio confocal através do levantamento da curva de PSF. Outros exemplos são os quantum dots, que são nanocristais (da ordem de nm) formados de três camadas que usam semicondutores de sais de cádmio (podem também ser sintetizados a partir de outros materiais como o Óxido de Európio) e que são o equivalentes a fluoróforos, e revestidos de polímeros inertes. São extremamente fotoestáveis e podem ser conjugados à proteínas, além de apresentarem uma fluorescência muito intensa.

Os mais revolucionários entre estes novos fluoróforos são as proteínas fluorescentes, um grupo que tem como protótipo básico a proteína fluorescente verde ("Green Fluorescent Protein", GFP) retirada da água viva *Aequora victoria*, que é naturalmente fluorescente. As sequências gênicas destas proteínas fluorescentes podem ser inseridas por transfecção em células vivas e a distribuição intracelular da proteína fluorescente expressa pode ser analisada em um microscópio de fluorescência. A GFP foi utilizada como gene repórter com muito sucesso, e atualmente temos à disposição uma grande variedade de outras proteínas fluorescentes, com propriedades espectrais distintas, cobrindo todo o espectro visível. Elas são derivadas através de modificações genéticas da estrutura da GFP ou de outras espécies de corais de recife do gênero *Discosomas*.

2.3 Microscopia confocal

A utilização da microscopia teve sempre como objetivo a observação de detalhes do mundo ao nosso redor que não poderiam ser observados naturalmente a olho nu. Em geral, os equipamentos utilizados nessa busca permitiram a observação de pequenos volumes com grandes magnificações, permitindo a observação de detalhes cada vez menores da estrutura da matéria. Porém, o volume observado em um microscópio óptico depende sempre da combinação entre as lentes e o tipo de luz utilizado. Desta forma, os volumes de observação obtidos em um microscópio óptico comum

apresentam, em geral, dimensões muito maiores do que as estruturas que se quer observar.

Um fato observado por Marvin Minsky na década de 1950 começou a mudar essa ideia. Minsky queria estudar os detalhes das conexões entre as células no cérebro e percebeu que a iluminação de um volume relativamente grande, em comparação com as estruturas a serem observadas, era o que levava ao aumento da quantidade de luz espalhada. Além disso, a observação deste grande volume também causava a inclusão de imagens de partes da amostra que não faziam parte exatamente do mesmo plano focal, dentro da estrutura tridimensional do tecido. Isso limitava em muito a qualidade da imagem e o tipo de informação que se podia obter.

Com o intuito de contornar estas dificuldades, Minsky propôs os princípios da confocalidade em sua célebre patente de 1957. (6) O nome da técnica vem da utilização de planos focais conjugados para a formação de imagem, onde são posicionados obstáculos físicos chamados pinholes que servem como filtros espaciais, rejeitando os sinais oriundos de outras regiões fora do plano focal da objetiva. Desta forma, além de permitir a seleção de uma profundidade de campo específica a ser observada, o orifício também reduz a quantidade relativa de sinais espúrios, resultando assim em uma relativa melhoria da resolução lateral da imagem obtida e um ganho significativo na resolução axial.

A busca pela observação de volumes cada vez menores tem levado à grandes avanços da microscopia óptica, culminando recentemente no rompimento do limite imposto pela difração da luz para a resolução do microscópio. (7) No caminho para estes avanços, diferentes abordagens como a microscopia confocal e a multifotônica surgiram na tentativa de gerar as condições necessárias para a observação de detalhes da estrutura tridimensional em amostras espessas. A capacidade de produzir imagens tridimensionais (8) de objetos espessos e a possibilidade de observar um plano específico da amostra sem que seja necessário processar fisicamente o material cortando fatias mais finas, o que poderia destruir a estrutura original das amostras. A eliminação da luz espalhada e fora de foco são também algumas das principais vantagens que levaram ao imenso interesse no uso desta técnica de microscopia.

2.4 Espectroscopia de correlação de fluorescência

No mundo macroscópico dificilmente observamos flutuações. Apesar de não percebermos, o mundo ao nosso redor está constantemente flutuando, variando ao redor de uma média, que é a condição que nós observamos como se fosse constante. Isso acontece porque essas flutuações ocorrem em uma dimensão muito menor do que a observável por nós. No universo macroscópico, as flutuações ficam escondidas nas grandes dimensões, sendo totalmente ofuscadas por uma média observável, aquilo que notamos e acabamos por considerar constante. Por outro lado, quando observamos o mundo microscópico, transformamos as dimensões das grandezas observáveis através do uso de equipamentos como os microscópios. Desta forma, as dimensões não são mais tão grandes assim e as flutuações constantes passam a ter dimensões muito próximas das dimensões observáveis, podendo então ser percebidas e até mesmo medidas.

Em experimentos de espectroscopia ou microscopia de fluorescência, onde reduzimos as dimensões a pequenos volumes de observação e um pequeno número de moléculas, essa redução tem como consequência a redução média do sinal observado. Isso leva à observação de ruído: variações do sinal de fluorescência ao redor da média que, para o observador desatento são consideradas ruído indesejável. Na verdade, esse “ruído” é causado em grande parte por flutuações espontâneas da amostra. Essas flutuações podem ter causas variadas como a difusão das moléculas, sua associação em complexos mais ou menos brilhantes, reações do estado excitado, modificações conformacionais, entre outras. É muito importante notar que essas flutuações guardam informações sobre a cinética, a natureza temporal, de todos esses possíveis fenômenos que estejam ocorrendo ao mesmo tempo.

Na espectroscopia de correlação, utilizamos as flutuações espontâneas em torno do equilíbrio termodinâmico do próprio sistema para buscar a informação temporal que desejamos. Para tal finalidade utilizamos microscopia de fluorescência e, portanto, a única perturbação necessária é a inclusão de moléculas fluorescentes que participem dos eventos a serem estudados e permitam assim sua detecção.

Toda a informação sobre a dinâmica das flutuações está contida no termo da equação que descreve a variação da fluorescência no tempo. Ao descrever matematicamente a variação de fluorescência em função do fenômeno observado durante o experimento, pode-se substituir este termo e chegar à equação que melhor descreverá a função de autocorrelação para esse determinado fenômeno. Utilizando essa abordagem é possível extrair uma gama enorme de dados de flutuações de fluorescência oriundas de eventos de associação/dissociação, reações químicas, mudanças conformacionais, processos fotodinâmicos, etc. Mesmo que mais de um fenômeno ocorra ao mesmo tempo em um experimento, é possível separá-los ao descrever as funções de autocorrelação para cada um. A autocorrelação total será a convolução dos processos, descrita como o produto das funções de autocorrelação correspondentes a cada um deles. A descrição de modelos matemáticos e a obtenção de equações descrevendo os mais variados fenômenos podem ser encontrados com facilidade na literatura.

É importante lembrar que esses experimentos são realizados em microscópios, e portanto permitem a investigação de tipos diferentes de amostras, desde soluções até células vivas. O volume de excitação pode ser localizado em qualquer ponto usando o sistema de varredura do feixe, permitindo a coleta de dados de flutuações em qualquer parte de uma célula, por exemplo. É possível também fazer a correlação cruzada (crosscorrelation) entre dois canais de detecção. Nesse tipo de abordagem, apenas as flutuações observadas nos dois canais ao mesmo tempo são consideradas. Desta forma, é possível comprovar a interação entre moléculas, pois a única possibilidade de flutuações ocorrerem ao mesmo tempo em ambos os canais é a formação de complexos entre as moléculas diferentemente marcadas, levando à sua difusão conjunta.

A espectroscopia de correlação de fluorescência (9-11) (FCS) consiste na análise estatística de flutuações temporais de fluorescência que ocorrem em um pequeno volume aberto da ordem de fentolitro, definido por um feixe de laser focalizado em um ponto da amostra. A técnica de FCS foi proposta pela primeira vez em 1972, quando foi aplicada para estudar a difusão e ligação de brometo de etídio em fitas duplas de DNA. (12-13) Pela primeira vez a fluorescência era utilizada como ferramenta para acompanhar flutuações em soluções, até então observadas através do espalhamento de luz causado pela passagem de partículas pelo volume de observação.

Podemos ter vários modelos de autocorrelação para diferentes tipos de movimentos das partículas. Alguns modelos levam em conta que a partícula se movimenta tridimensionalmente, sendo este o modelo mais comum. Em alguns casos considera-se modelos 2D, em que as partículas estão sofrendo forte interação com a superfície da lamínula. Há também vias de transporte ativo e vias em que a difusão ocorre de forma anômala.

Figura 2 - Exemplos de modelos de difusão com autocorrelação
Fonte: SCHWILLE; HAUSTEIN. (10)

Em experimentos de FCS é preciso manter um número pequeno de moléculas ou partículas fluorescentes no volume de observação, de maneira que o sinal ainda seja alto o suficiente para evitar o ruído de fundo, mas baixo o suficiente para que as flutuações possam ser observadas. Para isso, são necessários volumes de observação bem pequenos. A utilização das técnicas de microscopia confocal (14-16) fornece as condições necessárias para o aumento da sensibilidade da espectroscopia de flutuações e permite elevar o limite de detecção ao nível de moléculas individuais (17-18), dependendo das condições experimentais.

Dependendo da curva obtida podemos ter vários regimes temporais no domínio certos estados como difusão pura (10 μ s – 100 μ s), estados proibidos de transição do

tipo tripleto ($0,1 \mu\text{s} - 10 \mu\text{s}$) e flutuações rotacionais ($0,01 \mu\text{s} - 0,1 \mu\text{s}$). Abaixo desta escala de tempo nosso equipamento disponível já não é capaz de realizar tal medida.

Figura 3 - Escala de tempo dos vários processos que podem ser medidos por FCS
Fonte: SCHWILLE; HAUSTEIN. (10)

3 OBJETIVOS

-Implementar a técnica de FCS como ferramenta de análise ultrasensível no Instituto de Física de São Carlos – USP.

-Analisar concentrações extremamente diluídas de fluoróforos (da ordem de nanomolar) através da técnica de espectroscopia de correlação.

-Estudar a influência da viscosidade do meio sobre o sinal de FCS.

-Estabelecer uma marcação eficiente da proteína *Pulchellina* (PUC II e PUC IV) e realizar caracterização óptica por FCS.

-Investigar a difusão das proteínas *Pulchellina* de um meio externo aquoso (meio de cultura) para o interior de células.

-Análise da difusão e interação de enzimas (xilanases) com arabinoxilano por FCS, utilizando dois diferentes fluoróforos.

-

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Diluição das amostras para obtenção de sinal de FCS

Para trabalharmos no regime de FCS devemos ter amostras extremamente diluídas, da ordem de nanomolar (10^{-9} M). Usualmente, as sondas ou fluoróforos são marcadores fluorescentes adquiridos comercialmente na forma de pó, em kits específicos para marcação. No nosso caso, utilizamos o kit A20181 (Alexa Fluor[®] 488 Monoclonal Antibody Labeling Kit, da Molecular Probes[®]). Tal kit contém todo o material necessário para realizar ao todo cinco preparações de marcação em anticorpos ou proteínas. Cada preparação é otimizada para reagir e marcar uma quantidade de até 100 µg de anticorpos ou proteínas. O marcador fluorescente que utilizamos é muito similar, do ponto de vista espectral, com a fluoresceína, embora seja mais fotoestável e possua um rendimento quântico maior, em torno de 0,92. Ao contrário da fluoresceína, o Alexa Fluor 488[®] possui grande estabilidade em pH entre 4 a 10. Seus máximos de absorção e emissão são, aproximadamente, em 494 nm e 519 nm, respectivamente.

Figura 4 - Espectro de absorção e emissão do Alexa Fluor 488
Fonte: ALEXA... (22)

O Alexa Fluor 488[®] possui um grupo ester TFP (tetrafluorfenil) que reage eficientemente com aminas primárias das proteínas, de modo a formar conjugados estáveis de marcador-proteína.

Figura 5 - Estrutura molecular do marcador Alexa Fluor 488
Fonte: ALEXA ... (22)

A proteína *pulchellina* é conhecida pela sua capacidade de inativação de ribossomo (RIP, tipo 2), extraída da planta *Abrus pulchellus*, apresentado quatro isoformas (I, II, III and IV) sendo composta por duas cadeias principais: a cadeia A e a cadeia B. A cadeia A é responsável pela toxicidade inerente à *pulchellina* enquanto a cadeia B é responsável pela ligação da proteína à membrana celular. Na literatura específica há vários estudos sobre a *pulchellina* publicados pelo Grupo de Biofísica Molecular (19-21), um de nossos parceiros no Instituto de Física de São Carlos. Tais proteínas encontram potencial aplicação nas áreas de fármacos para tratamento de tumores e outras aplicações na área de biotecnologia. Atualmente nosso grupo conta com alunos trabalhando na investigação dos mecanismos associados à internalização destas proteínas e suas cadeias individuais em células HeLa.

As proteínas a serem marcadas, em nosso caso as PUC II e IV, devem ser estocadas em meio tampão livre de íons amônia e aminas primárias, pois tais substâncias competem com as aminas primárias das proteínas diminuindo assim a intensidade da marcação. A presença de impurezas e de anticorpos estabilizados em BSA (Albumina de Soro Bovino) estão entre os outros fatores que podem prejudicar a marcação.

4.2 Protocolo de marcação das proteínas

Tabela 1 - Conteúdo do kit de marcação A20181 (ALEXA 488®). Após o preparo de cada marcação deve se estocar a solução resultante em ambiente protegido de luz solar, de 2 a 6 C. Se bem acondicionado, as proteínas marcadas podem durar até três meses.

Material	Quantidade
Alexa Fluor® 488: marcador reativo (Componente A)	5 frascos
Bicarbonato de Sódio (Componente B)	~84 mg
Tamanho de exclusão: 30 kDa em PBS, pH 7.2, mais 2 mM azeto de sódio (Componente C)	~10 mL
Colunas de centrifugação (Componente D)	5 colunas
Tubos coletores (Componente E)	5 tubos

Fonte: ALEXA ... (22)

4.2.1 Marcando as proteínas

-Prepare uma solução de bicarbonato de sódio 1 M adicionando 1 mL de água deionizada no frasco de bicarbonato de sódio fornecido pelo fabricante (Componente B). Agite a solução até que ela esteja completamente dissolvida. A solução assim obtida deverá ter pH ~ 8,3 e deve ser armazenado entre 2-6°C.

-Se o anticorpo a ser marcado tiver uma concentração ≥ 1 mg/mL você deve diluí-lo até alcançar a concentração de 1 mg/mL e então adicionar um décimo em volume da solução de bicarbonato de sódio preparada (passo 1.1). O intuito de adicionar a solução de bicarbonato, pH 8,3, é aumentar o pH do meio reagente, pois os ésteres TFP reagem mais eficientemente em pH básico.

-Transfira 100 µL da solução de proteína do passo 1.2 para o frasco com a sonda reagente. Tampe o frasco e agite-o delicadamente poucas vezes até notar que o marcador está completamente dissolvido. Se muito forte o frasco pode ocorrer desnaturação da proteína.

-Deixe a solução em incubação por uma hora à temperatura ambiente e protegido da luz. A cada 15 minutos agite o frasco, delicadamente, pois isto irá causar maior mistura dos reagentes e uma consequente melhora da marcação.

4.2.2 Purificando a proteína marcada

- Coloque uma coluna de centrifugação (Componente D) em um tubo de vidro de dimensões 13x100 mm.

- Agite a resina de purificação (Componente C). Coloque então 1 mL da resina na coluna de centrifugação e espere até ela estabilizar.

- Continue adicionando a resina até completar um volume de aproximadamente 1,5 mL.

- Deixe pingar algumas gotas da coluna por gravidade. Inicialmente pode ser necessário aplicar um pouco de pressão para que as primeiras gotas comecem a pingar.

- Coloque a coluna em um dos tubos coletores (Componente E) e centrifugue o conjunto por três minutos à 1100 x g utilizando uma ultracentrifuga com um rotor adequado que caiba o conjunto a ser centrifugado. Para converter rpm para força g utilize a seguinte equação:

$$força\ g = (1,12 \times 10^{-5})(rpm)^2(raio\ do\ rotor) \quad (1)$$

onde o raio do rotor deve ser medido do seu centro até sua base. Feito isto podemos descartar o buffer eluído excedente. Agora podemos usar o tubo e a coluna para purificar o anticorpo conjugado.

- Coloque com uma micropipeta 100 uL da solução preparada no passo 1.4 no centro da coluna. Espere um pouco até que a solução seja absorvida pelo gel.

- Coloque a coluna de centrifugação dentro do tubo coletor e centrifugue por 5 minutos à 1100 x g.

- Após a centrifugação, o tubo coletor conterá 100 uL de proteína marcada, pH 7,2 aproximadamente, livre de sondas livres, que permanecerão na coluna de centrifugação.

4.2.3 Determinação do grau de marcação do anticorpo

- Diluir uma pequena quantidade do anticorpo marcado em PBS ou outra substância tampão adequada. Meça a curva de absorção no comprimento de onda de 280 nm (A_{280}) e 494 nm (A_{494}).

- Calcule a concentração da proteína através da seguinte equação:

$$\text{Concentração da proteína (M)}: \frac{[A_{280} - (A_{494} \times 0,11)] \times \text{fator de diluição}}{203.000} \quad (2)$$

onde 203.000 corresponde ao coeficiente de extinção molar (ϵ , em $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) do IgG (anticorpo) em 280 nm e 0,11 é um fator de correção.

- Para o cálculo do grau de marcação utilize a seguinte equação:

$$\text{Mols de marcador por mols de proteína} = \frac{A_{494} \times \text{fator de diluição}}{71.000 \times \text{concentração da proteína (M)}} \quad (3)$$

onde $71.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ é, aproximadamente, o coeficiente de extinção do ALEXA FLUOR 488[®] em 494 nm. Para IgGs, o intervalo de 7-9 mols de ALEXA FLUOR[®] por anticorpo é considerado o ideal.

4.2.4 Armazenamento das proteínas marcadas

O intervalo de temperatura ideal para armazenamento das proteínas fica entre 2 a 6°C, protegido da luz solar. Se a concentração final da proteína conjugada e purificada

for menor que 1 mg/mL adicione BSA ou outro estabilizante de proteína, de 1-10 mg/mL. Na presença de azeto de sódio com concentração de 2 mM, o conjugado permanece estável no intervalo de 2 a 6°C por vários meses. Para tempos maiores de armazenamento, divida o conjugado em alíquotas e congele a uma temperatura menos que a 20°C. É aconselhável evitar vários ciclos repetidos de congelamento e descongelamento, pois isto pode resultar em desnaturação da amostra.

4.2.5 Alguns problemas comuns que podem ocorrer

- Sub-marcação

Se os cálculos indicarem que a proteína marcada possui menos que três moles de fluoróforo por mol de proteína (145 kDa), sua proteína provavelmente pode estar sub-marcada, ou seja, com uma quantidade menor de fluoróforos que deveriam estar conjugados à ela. Varia condições podem ocasionar estes problemas. Entre eles podemos citar:

- Traços residuais de aminas primárias componentes do buffer de reação, que podem reagir com o corante e diminuir sua eficiência de marcação. Se sua proteína esteve em buffers com amina (ex: Tris ou glicina), dialize-a extensivamente com PBS antes da marcação.

- Soluções muito diluídas de proteínas (≤ 1 mg/mL) não são marcadas eficientemente.

- A adição de bicarbonato de sódio tem como finalidade aumentar o pH da mistura em reação para aproximadamente 8, pois ésteres succinimidyl (NHS) reagem mais eficientemente com aminas primárias em pH básico. Se a proteína em solução é fortemente tamponada em pH ácido, a adição do bicarbonato não surtirá efeito no aumento do pH para melhorar a marcação.

- Pelo fato de proteínas, incluindo diferentes anticorpos, reagem com fluoróforos em taxas diferentes e possuem diferentes atividades biológicas em variados graus de marcação, o protocolo padrão nem sempre pode resultar em uma ótima marcação. Para

aumentar a taxa de marcação você pode repetir o mesmo processo de marcação ou pode realizar a marcação com uma quantidade menor de proteína ou uma quantidade maior de marcador por reação. Para aumentar a eficiência de marcação na reação você pode juntar a quantidade de fluoróforos de dois frascos de reação juntos. Alguns pesquisadores obtêm melhores marcações com incubação por uma noite à 4°C antes de uma incubação prévia de uma hora à temperatura ambiente.

- Super-marcação

Se os cálculos indicarem que a proteína conjugada está com uma marcação de mais de oito moles de fluoróforo por mol de anticorpo IgG, sua proteína provavelmente está super-marcada. Embora alguns conjugados com alto grau de marcação podem ser aceitáveis para uso, super-marcação pode causar o efeito de agregação das proteínas conjugadas e então reduzir a especificidade do anticorpo com seu antígeno, levando, em ambos os casos à uma marcação não específica. Super marcação também pode induzir supressão da fluorescência do conjugado (quenching). Para reduzir a quantidade de marcação, adicione mais proteínas na sua reação para diminuir a razão molar de marcadores por proteína, ou então faça com que a reação dure menos tempo que o convencional.

- Marcação ineficiente e remoção de marcadores livres

Embora tenha-se uma boa qualidade de marcação com respeito à remoção de marcadores livres dos conjugados utilizando apenas para isto as colunas de centrifugação, é possível que trações residuais de marcadores livres permaneçam na solução do conjugado após a purificação. A presença destes marcadores livres, que pode ser determinada por colunas de cromatografia ou até mesmo por FCS, como veremos logo adiante, irá resultar em valores calculados errados. Tais traços de marcadores livres podem ser removidos colocando a solução do conjugado em outra coluna ou pode ser separado através de uma diálise extensiva.

Caso não haja eluído durante após a centrifugação, não coloque mais nenhum buffer adicional à coluna. Ao invés disto, faça uma nova centrifugação quantas vezes forem necessárias para que ocorra a eluição da proteínas.

4.3 Diluição das amostras purificadas para regime de trabalho em FCS

Após a purificação e preparação das proteínas alíquotamos a solução colocando 5 μL de PUC II ou PUC IV em cada EPPENDORF[®]. A concentração calculada para cada tipo de proteína são 7,1 mM (1,5 mg/mL) e 7,8 mM (1,7 mg/mL) para PUCII e PUCIV, respectivamente. Portanto, para medirmos sinal de FCS é necessário diluir estas soluções. Isto foi feito através de diluições sucessivas com o uso de EPPENDORFS[®] de 2 mL com água ultrapura. Na primeira diluição utilizamos a alíquota de 5 μL e completamos com 1995 μL de água ultrapura, ou seja, diluímos 400 vezes ($\sim 18 \mu\text{M}$). Após esta diluição, diluímos novamente de modo a obtermos uma solução estoque de 1 μM . A partir desta solução estoque podemos novamente fazer diluições seriadas, de modo a obter valores de 1 nM até 10 pM, que sejam adequados para trabalhar com FCS.

4.4 Equipamentos utilizados

Em nossos experimentos, utilizamos o marcador comercial ALEXA 488[®] (INVITROGEN²²) como fluoróforo padrão. Este marcador possui absorção em 495nm, emissão em 519 nm e coeficiente de extinção de $73000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Figura 6 - Espectros de excitação e emissão do ALEXA 488®

Fonte: Elaborada pelo autor

Para excitar este marcador, utilizamos um laser de argônio de 488 nm. Foram feitas diluições do ALEXA 488® em PBS de modo a obter concentrações adequadas para cada experimento. Nas medidas de FCS de proteínas utilizamos duas isoformas da proteína *Pulchellina*, ao qual chamamos PUCII e PUCIV, marcadas através de protocolo específico (kit de marcação do ALEXA 488®). Nos experimentos com células, utilizamos células de câncer de mama. Tanto a marcação das proteínas como o cultivo das células foram realizadas pela aluna de doutorado Helene Hellen Teixeira Moreira, sob orientação da professora Ana Paula Ulian de Araujo, do grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas”, do Instituto de Física de São Carlos, USP.

O microscópio confocal utilizado neste trabalho foi o LSM 780 da ZEISS®, que utiliza a técnica de aquisição de imagens por varredura a laser. Para a aquisição dos dados, assim como para a análise destes, foi utilizado o software ZEN 2010® da ZEISS®.

Figura 7 - Microscópio confocal de varredura (LSM 780, ZEISS® utilizado neste trabalho
Fonte: Elaborada pelo autor

4.5 Metodologia empregada na microscopia confocal de varredura

A construção do microscópio confocal de varredura utiliza como base os mesmo conceitos de construção dos microscópios ópticos convencionais, adicionando-se as modificações necessárias para a aplicação dos princípios de confocalidade.

Figura 8 - Ilustração do princípio da confocalidade
 Fonte: LASER ... (47)

Devido a esses princípios, o método de aquisição de imagens em um microscópio confocal é completamente diferente dos microscópios convencionais. No lugar das lâmpadas os microscópios confocais de varredura usam lasers como fontes de luz de luz. Um feixe de laser expandido e corretamente alinhado ao eixo óptico da objetiva deve preencher toda sua abertura traseira com luz. Desta forma, a objetiva focaliza um volume limitado pela difração da luz dentro da amostra gerando a iluminação pontual desejada. O tamanho ou diâmetro do ponto iluminado pelo laser varia de 0,25 a 0,8 micrometros. O tamanho do ponto confocal é determinado pelo tipo de microscópio, comprimento de onda da luz incidente e características da objetiva. A mesma objetiva vai coletar a luz refletida ou a fluorescência emitida a partir deste ponto que passará por um espelho dicróico e formará uma imagem que estará em um plano focal conjugado (confocal) ao do ponto iluminado e será projetada sobre um detector. Para o instrumento operar como um microscópio confocal, essa projeção ocorre através de uma abertura confocal (pinhole) colocada em frente ao fotodetector, que pode ser uma fotomultiplicadora (PMT) ou um arranjo de detectores com 32 canais. O sinal do detector é digitalizado e guardado em um computador para processamento posterior.

O microscópio confocal de varredura está baseado no escaneamento óptico da imagem, também chamado de princípio de varredura, permitindo que a imagem seja capturada na forma de um sinal eletrônico e em seguida analisada com técnicas de

processamento de imagem. Cada ponto capturado corresponde a um pixel na imagem final e, consequentemente, o número de pontos por linha e o número de linhas definem a resolução física da imagem digitalizada.

Diferentemente do que acontece na microscopia convencional onde a objetiva atua de maneira decisiva apenas no momento da formação da imagem, determinando a resolução do sistema, na microscopia confocal a objetiva faz o papel de ambas as lentes (objetiva e condensador) atuando no processo de formação da imagem e de iluminação, resultando em um aumento na resolução em um fator de 1,4. Este aumento na resolução é uma importante vantagem na microscopia confocal e acontece devido à dependência do quadrado da abertura numérica (NA) da objetiva decorrente do desenho do caminho óptico.

Na microscopia confocal de varredura, a fonte de luz e os detectores estão separados da amostra pela objetiva. O microscópio de fluorescência confocal consiste de múltiplas fontes de excitação (linhas de lasers), uma “cabeça” de varredura com componentes ópticos e eletrônicos e um computador para aquisição, processamento, análise e visualização da imagem.

HAL Halogen Lamp
HBO Mercury Vapor Short-Arc Lamp
MBS Main Beam Splitter
NDD Non-Descanned Detector
PMT Photomultiplier
T-PMT Transmission-Photomultiplier

Figura 9 - Diagrama esquemático mostrando o instrumental óptico do microscópio confocal utilizado neste trabalho (ZEISS LSM 780)

Fonte: ALEXA ... (22)

As principais linhas de laser utilizadas em microscopia confocal de fluorescência são:

- Íon Argônio 488 nm: utilizado para excitar moléculas de fluoresceína, alexa 488, GFP, etc...
- Íon Argônio 514 nm: utilizado para excitar moléculas de rodamina.
- Diodo 405 nm: utilizado para excitar moléculas com absorção no visível e ultravioleta.

Filtros de barreira, de excitação, e espelhos dicróicos estão contidos dentro da unidade de varredura. O componente mais importante desta unidade é o pinhole de abertura. O diâmetro do pinhole e, conseqüentemente, a espessura da fatia óptica, pode ser ajustado pelo operador. No entanto, o diâmetro do pinhole também afeta a resolução espacial do microscópio, tanto no plano xy (lateral) quanto em z (axial). Se o diâmetro for muito pequeno, a resolução lateral do microscópio poderá ser aumentada aproximadamente 40% além do estabelecido pela equação de Abbe. Como o pinhole é ajustado de modo que capte uma quantidade de luz razoável, a resolução cai. Quando ele iguala o diâmetro do disco de Airy, quase toda luz oriunda do plano focal é captada, produzindo um ganho de 10% na resolução lateral. Quando for ainda mais aberto, uma quantidade de luz proveniente de regiões abaixo e acima do plano focal passa a ser captada pelo fotodetector, reduzindo o efeito seccional óptico, mas melhorando a captação de fótons. Portanto, dependendo da particularidade de cada experimento, pode ser preferível fechar o pinhole para melhorar a resolução espacial ou abri-lo para captar mais sinal, reduzindo a resolução. A situação onde o diâmetro do pinhole coincide com o diâmetro do disco de Airy determinado para uma dada objetiva, é a situação que resulta na melhor relação entre a resolução e o sinal obtido. A redução do diâmetro do pinhole abaixo deste valor leva a uma progressiva perda de sinal, enquanto o ganho em termos de resolução, principalmente axial, não aumenta mais na mesma proporção. Esta relação torna a redução excessiva do diâmetro do pinhole desvantajosa na grande maioria das aplicações.

A sensibilidade e a especificidade da microscopia confocal de fluorescência são características desejáveis para a observação de flutuações, pois assim só se coleta dados das espécies que emitem fluorescência, sem qualquer influência das

moléculas não fluorescentes nas flutuações observadas, desde que elas não interfiram com sinal de fluorescência ou sua variação no tempo. Isso é especialmente importante na realização de experimentos de FCS em células e amostras biológicas complexas, como será discutido logo a seguir.

4.6 Metodologia empregada na espectroscopia de correlação de fluorescência (FCS)

Flutuações de fluorescência podem ser causadas pela difusão de espécies fluorescentes para dentro e para fora do ponto focal, ou qualquer outro processo (reações químicas, eventos de associação e dissociação, processos fotodinâmicos, mudanças conformacionais) que modifique as espécies fluorescentes entre estados que apresentem diferentes características de emissão de fluorescência. Desta forma, a função de autocorrelação fornece um método estatístico para quantificar com alguma precisão, concentrações locais e diferentes parâmetros relacionados à dinâmica do sistema (coeficientes de difusão, constantes cinéticas, constantes de associação e dissociação). Desde que ocorram em diferentes escalas de tempo, é possível observar e diferenciar processos que ocorram concomitantemente durante o mesmo experimento, como difusão e mudança conformacional, por exemplo.

Para a análise destas flutuações, utilizamos a função de autocorrelação. A função de autocorrelação de fluorescência $G(\tau)$ corresponde à probabilidade de que uma molécula que emite fluorescência dentro do volume de observação no tempo zero, ainda emita fluorescência dentro deste volume após um intervalo de tempo τ . Se a molécula difunde através do volume, essa probabilidade cairá ao longo do tempo, de acordo com a mobilidade da molécula. Moléculas mais rápidas causarão flutuações mais rápidas, resultando em um decaimento mais rápido da probabilidade $G(\tau)$.

Figura 10 - Ilustração da técnica de FCS. Somente quando o marcador fluorescente transita pelo volume de observação ocorre excitação do fluoróforo e emissão de fluorescência. O sinal é então captado pela objetiva e fotodetectoras e sua flutuação durante o tempo de trânsito é analisada
Fonte: LASER ... (47)

A função de autocorrelação de um sinal de fluorescência que varia no tempo pode ser calculada por:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (4)$$

onde $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$, ou seja, $\delta F(t)$ é a variação do sinal de fluorescência em relação a média no tempo t e $G(\tau)$ é o valor de autocorrelação após um intervalo de tempo τ .

Ao contrário de outras técnicas de fluorescência, a sensibilidade em FCS cresce inversamente com a concentração do fluoróforo de interesse ($\sim 10^{-9}$ M) porque o parâmetro de interesse não é a intensidade da emissão, mas sim sua flutuação temporal. Durante o tempo que a partícula ou molécula cruza o volume focal podem ocorrer mudanças conformacionais e reações químicas ou fotofísicas. Estas alterações podem ser analisadas através das variações na flutuação do sinal medido. Este sinal é então transformado em uma função de autocorrelação e plotado na forma de um gráfico.

Ao se realizar um experimento de FCS, obtém-se uma série de valores de flutuação do sinal fluorescente ao longo do tempo.

Figura 11 - Flutuação do sinal fluorescente ao longo do tempo de aquisição. $F(t)$ é proporcional ao número de fótons

Fonte: Elaborada pelo autor

Podemos representar o processo na seguinte forma:

Figura 12 - Representação esquemática da medida de FCS

Fonte: Elaborada pelo autor

A partir das flutuações é possível calcular a função de autocorrelação ou utilizar a distribuição das suas amplitudes para obtenção de histogramas de contagem de fótons,

a partir dos quais é possível caracterizar as moléculas por seu brilho molecular individual (23).

Figura 13 - Exemplo de aplicação da função de autocorrelação. A curva em azul corresponde ao marcador livre (referência) e a vermelha corresponde à proteína marcada. No eixo x ($t(s)$) temos uma distribuição de tempos de difusão sobre o volume de observação

Fonte: Elaborada pelo autor

Como dito anteriormente, a função de autocorrelação descreve o comportamento temporal das flutuações. O valor da função para um intervalo de tempo que se aproxima de zero, ou $G(0)$ é proporcional à amplitude das flutuações observadas, enquanto que o tempo em que a função decai para o valor de $1/e$ é proporcional à frequência das flutuações. Flutuações mais rápidas apresentam decaimento em tempos menores, ou seja, um desvio da curva para a esquerda, enquanto flutuações mais lentas deslocam a curva para a direita, apresentando um decaimento mais lento. Se o único fenômeno observado no experimento for a difusão das moléculas fluorescentes, então as flutuações ocorrem por causa de flutuações da concentração de moléculas fluorescentes no volume observado, em decorrência de sua difusão. Neste caso temos que

$$G(0) = \frac{1}{\langle N \rangle} \quad (5)$$

onde $\langle N \rangle$ é o número médio de moléculas que ocupam o volume observado. Se esse volume for conhecido, é possível então calcular a concentração das moléculas fluorescentes.

Figura 14 - Exemplo de aplicação de FCS na determinação de nanoconcentrações. Neste caso foi utilizado moléculas de rodamina (RG6) como exemplo
Fonte: LAKOWICZ. (1)

Além disso, o tempo médio de decaimento das flutuações será equivalente ao tempo médio de permanência das moléculas no volume de observação, ou o tempo médio de difusão τ_D . De maneira análoga, se as dimensões deste volume são conhecidas, podemos então calcular o coeficiente de difusão das moléculas fluorescentes. Portanto, temos que:

$$\tau_D = \frac{s^2}{4D} \quad (6)$$

onde s é o raio do foco lateral (xy) e D o coeficiente de difusão. Como o coeficiente de difusão é inversamente proporcional ao raio da molécula, podemos inferir o tamanho da molécula e ter informação sobre processos de associação e dissociação que façam o tamanho da molécula variar o suficiente para mudar o perfil da curva de autocorrelação. Portanto, esses processos podem ser acompanhados qualitativamente, apenas pelo desvio da curva de autocorrelação. Se o tamanho da molécula aumenta, a difusão diminui e a curva sofre um desvio para a direita. Se o tamanho diminui, a difusão aumenta e a curva sofre um desvio para a esquerda.

Figura 15 - Exemplo de aplicação de FCS na diferenciação de espécies moleculares por massa molar
Fonte: LAKOWICZ. (1)

É importante lembrar que esses experimentos são realizados em microscópios e portanto permitem a investigação de tipos diferentes de amostras, desde soluções até células vivas. O volume de excitação pode ser localizado em qualquer ponto usando o sistema de varredura de feixe, permitindo a coleta de dados de flutuações em qualquer parte de uma célula, por exemplo. É possível também fazer a correlação cruzada entre dois canais de detecção. Nesse tipo de abordagem, apenas as flutuações observadas nos dois canais ao mesmo tempo são consideradas. Desta forma, é possível comprovar a interação entre moléculas, pois a única possibilidade de flutuações ocorrerem ao mesmo tempo em ambos os canais é a formação de complexos entre moléculas diferentemente marcadas, levando à sua difusão conjunta.

4.7 Caracterização do volume focal efetivo

Como dito anteriormente, a técnica de FCS é utilizada para medir constantes de difusão e concentrações que variam de nano a picomolar. Para trabalhar neste regime, a técnica precisa utilizar parâmetros extremamente precisos como o volume focal efetivo. Para medir este parâmetro devemos ficar atentos com alguns fatores tais como saturação do laser de excitação, efeito de fotodegradação, índice de refração do meio e abertura numérica da objetiva utilizada.

Através de uma série de diluições de uma amostra de fluoróforos com uma concentração inicial conhecida podemos determinar o volume focal efetivo da objetiva utilizada. A objetiva utilizada e que apresentou melhores resultados foi a ZEISS C-APOCHROMAT, 63X[®], NA: 1,2. Tal objetiva foi desenvolvida para maximizar o sinal de FCS em meios aquosos.

O fluoróforo utilizado foi o ALEXA 488[®] diluído em água ultrapura à 25° C. A partir de uma solução estoque inicial de 1 μM realizamos uma série de diluições e medimos as concentrações com um espectrofotômetro UV-VIS SHIMADZU[®], sabendo que o coeficiente de extinção do ALEXA 488[®] é $73000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [2]. A excitação do fluoróforo foi feita com o laser de argônio em 488 nm.

Figura 16 - Espectro de absorção do ALEXA 488 em água ultrapura.
Fonte: Elaborada pelo autor

Vemos no canto superior direito da Figura 16 que a absorbância segue a Lei de Beer-Lambert, com um coeficiente angular de 70300, ou seja, bem próximo do valor do coeficiente de extinção esperado. Isso nos assegura que as diluições posteriores tenham as concentrações desejadas.

Sabemos também que o coeficiente de difusão do ALEXA 488[®] é da ordem de $435 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (24) A resolução lateral (w_0) e a resolução axial (z_0) podem ser calculadas através das seguintes equações retiradas do manual do microscópio:

$$w_0 = \frac{0,51 \cdot \lambda}{NA} \approx 207 \text{ nm} \quad (7)$$

$$z_0 = \frac{0,88 \cdot \lambda}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \approx 568 \text{ nm} \quad (8)$$

onde:

$$\lambda \equiv \text{laser de excitação} = 488 \text{ nm}$$

$$NA \equiv \text{abertura numérica da objetiva} = 1,2$$

$$n \equiv \text{índice de refração do meio} = 1,33$$

Portanto, o tempo de difusão e o volume focal podem ser calculados através das seguintes equações (25):

$$t_d = \frac{w_0^2}{4D} = 25 \mu\text{s} \quad (9)$$

$$V_{\text{efetivo}} = \pi^{3/2} \cdot w_0^2 \cdot z_0 \approx 0,14 \text{ fL} \quad (10)$$

onde:

$$D \equiv \text{coeficiente de difusão} = 435 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$$

Através do software ZEN[®] (ZEISS[®]) foi possível fazer medidas de FCS para diferentes concentrações variando de 1 μM a 10 pM, ou seja, conseguimos fazer FCS em concentrações variando até cinco ordens de grandeza.

Figura 17 - Medidas de FCS com fluoróforo livre em concentrações de: 1 μM a 10 nM
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 18 - Medidas de FCS com fluoróforo livre em concentrações de: 1 nM a 10 pM
Fonte: Elaborada pelo autor

Vemos que há muito ruído para maiores concentrações de fluoróforos (figura 17), pois há grande quantidade de fluoróforos emitindo ocasionando uma grande flutuação na correlação. Para soluções mais diluídas (figura 18) vemos um efeito diferente. Para a concentração de 1 nM há forte correlação, pois geralmente esta concentração corresponde a região de trabalho em FCS. Acima disso há um aumento no sinal devido ao fato da correlação ser inversamente proporcional à concentração. Assim, temos um aumento de sinal e uma maior flutuação no sinal para concentrações menores que 1 nanomolar.

O valor médio para o tempo de difusão t_d encontrado pelo software é de 40 μ s, o qual concorda parcialmente com o valor calculado anteriormente, de 28 μ s. A discrepância pode ser explicada pela presença de estados tripletos em alguns fluoróforos. Tais estados consistem numa transição intersistema não permitida do estado excitado para o estado tripleto. Isso acarreta em um atraso no tempo de difusão, explicando em parte a discrepância encontrada. Para o valor calculado de 28 μ s utilizamos uma equação para um modelo de difusão pura, que é o processo dominante. Concomitantemente à este pode haver processos mais complexos de interação entre as moléculas do fluoróforo e efeitos de ligação com o substrato. Portanto, todos estes efeitos podem aumentar o tempo médio de difusão.

4.8 Representação estrutural e materiais utilizados em medidas com células

Materiais utilizados:

- Marcador fluorescente: Alexa Fluor 488[®] - Invitrogen[®]
- Proteína: *Pulchellina* (Isoformas II and IV)
- Células HeLa (tumerais)
- Meio de cultura: DMEN
- Meio de medida: PBS
- Microscópio Confocal ZEISS LSM 780[®]
- Lamínulas de vidro com espessura de 170 μ m
- Objetiva de imersão em água, 40x, NA 1,2
- Laser de Argônio (488 nm)

Para fazer este tipo de medida utilizamos placas especialmente desenvolvidas para incubar células. Tais placas são adequadas para acondicionamento em um módulo especial do microscópio que mantém as células à uma temperatura de 37°C e em um ambiente de 5% de CO₂.

Figura 19 - a) Microscópio confocal com câmara para medida com temperatura e atmosfera controlada. b) Vista ampliada da câmara e do poço de medida

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 20 - Representação esquemática da medida de FCS em células com proteínas marcadas.

Fonte: Elaborada pelo autor

Através de um recipiente que denominado "poço" (figura acima) são cultivadas células em meio de cultura adequado (DMEM). Antes de se realizar a medida, retiramos o meio de cultura rapidamente e colocamos PBS em seu lugar. Logo após, pingamos uma gota (cerca de 20 µL) da proteína marcada (~10 nM) no poço utilizando para isto uma micropipeta EPPENDORF® de 100 µL (micropipeta amarela). Feito isto fechamos a câmara e iniciamos o processo de medida, fazendo aquisições em tempos determinados e em locais determinados, como regiões próximas ao centro célula, como mostra a figura acima.

4.9 Espectroscopia de correlação de fluorescência aplicada na análise da difusão e interação da XynA-N-AF488 em arabinoxilano

As endo-1,4-beta-xilanases são endoglicosidades que catalisam a hidrólise do xilano, a hemicelulose mais abundante na natureza (26) e que corresponde a um terço de todo o carbono orgânico renovável disponível na Terra.

Embora a hidrólise de xilano por microrganismos tenha sido descrita desde o final do século XIX, o primeiro artigo publicado acerca da hidrólise enzimática do xilano por uma xilanase é de 1955 (27), o qual descreve a hidrólise do xilano de um sabugo de milho à xilobiose por uma preparação enzimática de *Aspergillus foetidus* (28). Em 1961, as xilanases foram reconhecidas pela União de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), lhes atribuindo o código de enzima EC 3.2.1.8. (29) Mas, foi só em 1983 que ocorreu a primeira publicação sobre a clonagem molecular de uma xilanase de *Bacillus subtilis*, bem como o isolamento e caracterização desta enzima (30).

As xilanases GH11 possuem importantes papéis em muitos processos biotecnológicos de alimentos baseados em cereais e alimentação animal. O interesse por xilanases microbianas tem aumentado nas últimas décadas para muitas aplicações: biotecnologia de fibras e alimentos, na produção de pães e cerveja, a separação do glúten do amido e estoques de ração animal; aplicações em não alimentos, principalmente na indústria de fibra e papel, e um crescente interesse na produção de biocombustíveis que requerem tais catalisadores. (31-35)

As aplicações potenciais das xilanases incluem: bioconversão de material lignocelulósico e agroresíduos em produtos fermentáveis, a clarificação de sucos, o melhoramento da consistência da cerveja e a digestibilidade de insumos animais. Uma das mais importantes aplicações biotecnológicas da xilanase é o seu uso no branqueamento de polpa de papel. Xilanases também podem ser aplicadas na produção de raiom, celofane e muitos outros compostos, como ésteres de celulose (acetatos, nitratos, propionatos e butiratos) e éteres de celulose (carboximetil celulose e metil e etil

celulose), que são todos produtos da dissolução da polpa e purificação de fibras para outros carboidratos. (36)

Outros exemplos de aplicações recentes das xilanases são: degradação de subprodutos do café (37), biobranqueamento da polpa de cachos de frutos sem óleo de palma (38), processos têxteis (39) e alimentação de frangos. (40)

A XynA marcada no amino terminal com a sonda fluorescente Alexa Fluor 488[®] 5-SDP Ester (XynA-N-AF488) teve sua difusão determinada em diversas concentrações de arabinosilano em tampão fosfato de sódio 100 mmol L⁻¹ pH 6.0, através do uso de um microscópio confocal de fluorescência com resolução temporal ZEISS LSM 780[®]. A aquisição inicial dos dados de FCS foi feita no programa ZEN[®], os dados resultantes foram processados e analisados no programa PyCorrFit 0.8.6[®] e as imagens finais foram geradas no programa OriginPro 8.0[®].

O fluoróforo em uma gota de solução de ~30 µL sobre uma lamínula de vidro foi excitado com um feixe de laser de 488 nm, 10 µm acima da superfície da lamínula. Foram utilizados uma objetiva do tipo ar-água com aumento de 40X e um pinhole de 32 nm. Espelho dicróico e filtro de emissão adequados foram empregados para barrar os fótons do comprimento de onda de excitação e coletar somente aqueles provenientes da emissão. As medidas de FCS foram feitas a uma concentração de proteína marcada de ~1 nmol L⁻¹. As concentrações de arabinosilano empregadas variaram de 4.0 10⁻⁴ % até 1.0% (m/v). As medidas foram feitas em triplicatas de 60 ou 120 segundos, a temperatura ambiente (~19 °C). Além da difusão da proteína, também foi medida a difusão do fluoróforo livre (ácido carboxílico do fluoróforo) por FCS em todas as concentrações de substrato empregadas, para posterior correção do efeito da viscosidade do meio sobre a difusão da proteína. Para tal, foi empregada uma concentração de fluoróforo livre de ~0.1 nmol L⁻¹. As médias das curvas de FCS e suas respectivas normalizações foram medidas através do programa PyCorrFit[®].

Previamente à realização das medidas, determinou-se a potência ideal do laser medindo-se a variação do número de contagens de fótons em função da potência do laser, para uma solução de proteína marcada na concentração máxima de substrato. A potência ideal foi determinada como sendo aquela máxima ainda dentro do regime linear, aproximadamente 8% da potência total do laser. Essa solução foi escolhida como ideal por ser, supostamente, aquela em que o fluoróforo fica mais tempo dentro do

volume focal e, portanto, está mais sujeito a sofrer fotobranqueamento. Garantindo que esse artefato seja evitado nessa condição, garantiu-se automaticamente que isso não ocorreria para concentrações menores de substrato (menores viscosidades) e com o fluoróforo livre (maior coeficiente de difusão).

Para o cálculo de raio hidrodinâmico da proteína, utilizou-se a equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_H} \quad (11)$$

onde D é coeficiente/constante de difusão de uma partícula apresentando movimento browniano, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, η é a viscosidade dinâmica do meio, e r_H é o raio da partícula esférica ou raio hidrodinâmico (que é diferente do raio de giro).

Fazendo-se a razão do coeficiente de difusão para duas partículas de raio hidrodinâmico distinto, mas em meio idêntico, podemos obter o raio hidrodinâmico por FCS de, por exemplo, uma proteína, sabendo-se o coeficiente de difusão e o raio hidrodinâmico de uma sonda no mesmo meio:

$$r_{H1} = \frac{D_2}{D_1} r_{H2} \quad (12)$$

onde r_{H1} é o raio hidrodinâmico da partícula 1, r_{H2} é o raio hidrodinâmico da partícula 2, D_1 é o coeficiente de difusão da partícula 1, e D_2 é o coeficiente de difusão da partícula 2. Utilizando-se, por exemplo, o Atto655-carboxy em solução aquosa a 25 °C como referência, temos que:

$$r_{H1} = \frac{425 \mu m^2 s^{-1}}{D_1} 0.714 nm \quad (13)$$

O volume confocal, parâmetro estrutural, e raio do volume confocal foram determinados através da calibração deste volume com uma medida de FCS de uma solução 0.1 nmol L⁻¹ do fluoróforo livre em água deionizada nas mesmas condições das medidas anteriores. Para isso, foi utilizado o coeficiente de difusão deste fluoróforo em água na temperatura de trabalho ($2.92 \cdot 10^{-10} m^2 s^{-1}$ a 19°C).

Para determinar a constante de dissociação do complexo enzima-substrato, tentou-se ajustar os tempos de difusão experimentais das proteínas marcadas em diferentes concentrações de substrato através do uso da equação deduzida:

$$\overline{\tau_{D_{S_0}}^E} = \tau_E + \frac{19,2\tau_{D_0}^{AF488}[S]_0}{K_D + [S]_0} \quad (14)$$

em que $\overline{\tau_{D_{S_0}}^E}$ é o tempo de difusão médio da proteína marcada em uma certa concentração de substrato, τ_E é o tempo de difusão da proteína livre (na ausência de substrato), $\tau_{D_0}^{AF488}$ é o tempo de difusão do fluoróforo livre na mesma concentração de substrato, K_D é a constante de dissociação do complexo enzima-substrato e $[S]_0$ é a concentração de substrato.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Medidas de concentrações do marcador livre por FCS

Neste experimento foram realizadas medidas de FCS sobre o marcador livre ALEXA 488[®] diluído em PBS.

Figura 21 - Medida de concentração do marcador livre (ALEXA 488[®]) em solução aquosa
Fonte: Elaborada pelo autor

A figura 10 mostra claramente que a técnica de FCS é capaz de medir concentrações extremamente baixas de fluoróforos, podendo chegar até da ordem de 10^{-10} M. Podemos ver na figura que a intensidade do sinal $G(0)$ cresce conforme esperado teoricamente ($G(0) \propto 1/N$, onde N é o número de fluoróforos dentro do volume de observação no instante inicial) de 5 nM até 0,33 nM. A partir desta concentração, diluições maiores proporcionam uma saturação do sinal.

A medida de concentrações tão baixas só é possível graças ao sistema óptico do microscópio confocal. Sem tal aparato o volume de observação se torna muito grande,

de modo a englobar muitas moléculas. Como consequência, obteríamos medidas com baixíssima amplitude da função de correlação, até para tempos longos de aquisição.

5.2 Difusão do marcador livre em meios de viscosidades diferentes

A influência da viscosidade nas medidas de FCS já é conhecida na literatura (41-43). Neste experimento, com o intuito de analisar a difusão do fluoróforo em meios de viscosidades diferentes, realizamos medidas de FCS sob diferentes concentrações de glicerol em meio aquoso.

Figura 22 - Difusão do marcador livre em meios com diferentes concentrações de glicerol

Fonte: Elaborada pelo autor.

Podemos ver na figura 11 que conforme aumentamos a concentração de glicerol, a curva de FCS se desloca para a direita, na direção de tempos maiores. Portanto, podemos concluir que o tempo de difusão aumenta com o aumento da viscosidade do meio.

5.3 Difusão das proteínas PUC II e PUC IV

A difusão de proteínas em um meio aquoso (PBS) pode ser monitorada por FCS através de marcação com moléculas fluorescentes. Em nosso trabalho, utilizamos o ALEXA 488[®] para marcar as proteínas.

Figura 23 - Difusão das proteínas PUC II e IV marcadas com ALEXA 488[®]
Fonte: Elaborada pelo autor.

Podemos ver na figura 12 que as proteínas PUC II e PUC IV apresentam uma difusão mais lenta se comparadas com o marcador livre (ALEXA 488[®]). Isso ocorre devido ao fato das proteínas apresentarem uma massa molar muito maior que a do marcador. Esta condição é extremamente importante para se ter um bom sinal de FCS, assim como uma boa marcação da proteína, sem marcadores residuais na solução. Também podemos notar que a técnica de FCS é capaz de diferenciar a difusão das duas proteínas de características conformacionais diferentes.

5.4 Estudo da difusão de proteínas em células

A técnica de FCS tem se tornado uma importante ferramenta para a investigação de processos celulares. (44-45) Um aspecto essencial neste tipo de experimento é a

escolha de uma objetiva adequada para medidas de FCS. Para este propósito utilizamos uma objetiva de imersão em água com uma magnificação de 63X, com o intuito de minimizar eventuais perdas de luz espalhada pela amostra. Tal objetiva também possui um ajuste manual de correção, específico para cada espessura da lamínula ($\sim 170\ \mu\text{m}$). Para estudar a difusão das proteínas PUC II e PUC IV em células devemos acertar as condições de foco na região de interesse. Isto é conseguido através da aquisição de uma imagem de luz transmitida em tempo real.

Figura 24 - Imagem de luz transmitida de uma cultura de células. A cruz em azul indica o ponto no interior da célula onde a medida foi realizada

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após acertar o foco, procedemos com o experimento escolhendo um ponto de interesse no interior da célula (cruz azul na figura 13) e executando medidas de FCS em intervalos de tempos definidos.

Figura 25 - Difusão da proteína PUC II para o interior de uma célula

Fonte: Elaborada pelo autor.

Podemos ver na figura 14 que o sinal da curva de FCS aumenta até o tempo de 17 minutos. Isto ocorre devido à migração das proteínas para o interior das células. Inicialmente tem-se poucas proteínas marcadas no interior da célula e consequentemente temos um baixo sinal. Aos poucos, com o aumento da concentração das proteínas, ocorre um aumento de sinal até um valor limite. Este ponto corresponde à concentração ótima para medida de FCS (da ordem de nM). Após este valor, um aumento da concentração das proteínas para o interior das células implica em uma queda do sinal de FCS, pois estamos saindo da condição ótima de medida. A queda prossegue até o ponto em que a medida é interrompida (50 min) devido ao fato de que para grandes tempos a célula começa a morrer e mudar sua forma e sua estrutura, comprometendo assim os resultados.

No experimento com a PUC IV podemos ver que a difusão ocorre mais rapidamente. Podemos notar que o sinal de FCS atinge seu ápice já nos primeiros segundos do experimento. Após 5 minutos de experimento podemos notar que ocorre uma saturação do sinal e após 10 minutos ocorre uma brusca queda do sinal devido à elevada concentração de PUC IV no interior da célula, diminuindo então o sinal de

FCS, lembrando novamente que a curva de correlação é inversamente proporcional à concentração das proteínas marcadas.

Figura 26 - Difusão da proteína PUC IV para o interior de uma célula

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.5 Medidas de internalização das proteínas ao longo do tempo por imagem de fluorescência (Time Series)

Seguindo o mesmo objetivo da técnica de FCS, que seria o rastreamento da internalização das proteínas, utilizamos uma outra técnica baseada em imagem de fluorescência seriada ao longo do tempo (time series).

Figura 27 - Intensidade de emissão da PUC IV para b) o interior de células e outras regiões celulares para o instante de tempo inicial ($t=0$ h). A linha azul da figura a) é tomada como referência, pois corresponde ao sinal do meio extracelular. As linhas coloridas do gráfico a) correspondem a intensidade de emissão das regiões de mesma cor, delimitadas na figura b)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Vemos que para o instante inicial ($t=0$) que as proteínas marcadas ainda não se encontram fortemente localizadas em alguma estrutura celular, ou seja, que resulte em uma boa imagem de fluorescência, como podemos ver pelo gráfico na figura a e pela imagem na figura b.

Figura 28 - Intensidade de emissão da PUC IV para b) o interior de células e outras regiões celulares para o instante de tempo inicial ($t=0,2$ h ou 12 minutos)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Já na figura acima para $t=12$ minutos podemos ver claramente uma forte emissão nas regiões de interface celular (membrana celular) com o meio externo. O gráfico a) mostra um máximo de emissão para este tempo, o que é corroborado pela figura b).

Figura 29 - a) Intensidade de emissão da PUC IV para b) o interior de células e outras regiões celulares para o instante de tempo inicial ($t=1,2$ h ou 1h e 12 minutos)

Fonte: Elaborada pelo autor

Agora na figura x vemos o final do processo de internalização das proteínas, com parte delas retidas na membrana e outras contidas em estruturas celulares internas. No gráfico a) podemos ver uma saturação do sinal para $t=1,2$ h ou uma hora e 12 minutos e a figura b) mostra como as proteínas ficam distribuídas nas células nesta condição final. Podemos ver também que resta muito pouco sinal residual do meio extracelular (linha azul) durante todo o processo de medida

5.6 Medidas de mapeamento da concentração das proteínas nas proximidades de uma célula por imagem de fluorescência e FCS.

Nesta parte do trabalho fizemos medidas de difusão de proteínas PUCII marcadas com ALEXA 488[®]. Para isto, utilizamos métodos de imagem de fluorescência

e FCS. A concentração utilizada foi da ordem de 1 nM e o aparato experimental utilizado foi o mesmo do tópico anterior.

Figura 30 - Imagem de fluorescência medida sobre um pixel ($\sim 0,12 \mu\text{m}^2$) à $10 \mu\text{m}$ de distancia da membrana de uma célula. A localização do pixel é indicada pela interseção das retas em branco

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 31 - Imagem de fluorescência medida sobre um pixel ($\sim 0,12 \mu\text{m}^2$) à $8 \mu\text{m}$ de distancia da membrana de uma célula. A localização do pixel é indicada pela interseção das retas em branco

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 32 - Imagem de fluorescência medida sobre um pixel ($\sim 0,12 \mu\text{m}^2$) à $6 \mu\text{m}$ de distancia da membrana de uma célula. A localização do pixel é indicada pela interseção das retas em branco

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 33 - Imagem de fluorescência medida sobre um pixel ($\sim 0,12 \mu\text{m}^2$) exatamente sobre a membrana de uma célula. A localização do pixel é indicada pela interseção das retas em branco
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 34 - Imagem de fluorescência medida sobre um pixel ($\sim 0,12 \mu\text{m}^2$) à $1 \mu\text{m}$ de distância da membrana, dentro da célula. A localização do pixel é indicada pela interseção das retas

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 35 - Aquisição por FCS nos pixels referentes às imagens anteriores
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Podemos ver que inicialmente a 10 mm fora, ou seja em uma região extracelular, praticamente não há sinal de FCS, como era de se esperar. Quando nos aproximamos um pouco da célula (8 mm) vemos um grande aumento do sinal e o mesmo acontece quando estamos à 6 mm longe da célula. Quando entramos na região da membrana há uma grande concentração de proteínas marcadas, o que leva a queda do sinal de FCS, uma vez que este diminui se a concentração é grande. O interessante é que o sinal volta a subir quando entramos 1 mm dentro da membrana, o que indica que há proteínas no meio intracelular e em concentrações adequadas para se medir sinais de FCS, corroborando mais uma vez a nossa explicação para a internalização das proteínas em meio celular.

5.7 Análise da difusão e interação da XynA-N-AF488 em arabinosilano por FCS

Foram realizadas medidas de FCS da xilanase-N-AF488 e do AF488 (ALEXA FLUOR 488[®]) livre em diversas concentrações de arabinosilano em pH 6,0 e 19 °C em um sistema de microscopia confocal de fluorescência com resolução temporal ZEISS LSM 780[®] com ajuda do software ZEN. Os detalhes do procedimento estão descritos na parte de materiais e métodos.

Para correção do coeficiente de difusão das proteínas interagindo com o substrato foram feitas medidas de difusão do fluoróforo livre nas mesmas soluções empregadas para as proteínas. A Figura 36 mostra as curvas de autocorrelação para o fluoróforo livre em tampão e em 1,0% do substrato (m/v), ajustadas com um modelo que leva em conta o estado tripleto, uma difusão tridimensional e uma difusão bidimensional (T+3D+2D). Esse modelo foi escolhido porque foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais das medidas de FCS na presença de substrato.

Figura 36 - Curvas de autocorrelação do fluoróforo livre em tampão e em 1,0% de arabinosilano (m/v), pH 6,0 e 19 °C. As curvas foram ajustadas com um modelo do tipo T+3D+2D

Fonte: MOLINA. (46)

Verificou-se que praticamente não houve variação do tempo de difusão do fluoróforo na maior concentração de substrato em relação à concentração zero. Desse modo, considerou-se que o efeito da variação da viscosidade na difusão da proteína devido ao incremento na concentração de substrato poderia ser ignorado. Apesar disso, pode-se observar uma pequena mudança na forma da curva de autocorrelação do fluoróforo em 1% de substrato. É possível que tal mudança seja atribuída ao aparecimento de uma difusão bidimensional introduzida pelo substrato.

A partir desses dados pode-se verificar facilmente que o tempo de difusão do fluoróforo livre em ambos meios vale em torno 60 μ s.

A Figura 37 compara as curvas de autocorrelação do fluoróforo livre e da proteína em tampão sem substrato, ajustadas com os mesmos modelos supracitados.

Figura 37 - Curvas de autocorrelação da xilanase-N-AF488 e do fluoróforo livre em tampão, pH 6,0 e 19 °C. As curvas foram ajustadas com um modelo do tipo T+3D+2D
Fonte: MOLINA. (46)

As formas das curvas de autocorrelação foram bastante semelhantes, evidenciando a presença de apenas estado tripleto e difusão tridimensional em ambos os casos. A proteína livre apresentou difusão em torno de 200 μ s, de modo que seu raio hidrodinâmico R_H pôde ser calculado com base no raio hidrodinâmico do fluoróforo

livre (0,714 nm) e em seu tempo de difusão ($\sim 60 \mu\text{s}$) utilizando a razão da equação de Stokes-Einstein para as duas espécies. O raio hidrodinâmico obtido para a proteína foi, portanto, de 2,38 nm. O raio hidrodinâmico teórico com base na massa molecular e na estrutura tridimensional da proteína, desconsiderando-se a presença do fluoróforo, foi de 2,63 nm. Isso é, o raio hidrodinâmico da proteína determinado por FCS foi 9,5% menor do que o teórico.

A Figura 38 compara as curvas de autocorrelação da proteína livre em tampão e em 1,0% de arabinosilano (m/v). Os dados experimentais foram ajustados com um modelo do tipo T+3D+2D, como nos casos anteriores.

Figura 38 - Curvas de autocorrelação da xilanase-N-AF488 em tampão e em 1,0% de arabinosilano (m/v), pH 6,0 e 19 °C. As curvas foram ajustadas com um modelo do tipo T+3D+2D
Fonte: MOLINA. (46)

A partir dessa curva pôde-se observar duas características importantes do sistema sob estudo. Primeiramente, as medidas para a xilanase-N-AF488 em altas concentrações de substrato apresentaram um nível de ruído muito alto, principalmente em tempos de correlação menores. A mesma tendência foi observada para o fluoróforo livre em substrato. Esse comportamento pode ser explicado por duas observações

experimentais importantes: (1) o forte espalhamento de luz e/ou a autofluorescência do arabinoxilano interferiram com as medidas de FCS, aumentando drasticamente a contagem de fótons e, com isso, o número de moléculas “falsas” no volume focal, reduzindo a amplitude de FCS, o número de contagens por molécula e introduzindo ruídos; (2) por algum motivo que ainda não se conseguiu explicar bem, o fluoróforo ligado à proteína apresentou contagens de fótons cerca de dez vezes menores que o fluoróforo livre, reduzindo a qualidade do sinal de FCS pelo baixo número de contagens por molécula. A combinação desses dois fatores levou a menores amplitudes de FCS e alto nível de ruído, principalmente para maiores concentrações de substrato. Por esse motivo, muitas medidas de FCS tiveram de ser descartadas, já que o ruído dificultou a normalização correta das curvas.

O segundo detalhe notável é a mudança na forma da curva de FCS em concentrações mais altas de substrato. Esse comportamento é devido provavelmente não somente ao aumento do tempo de difusão pela formação de complexo enzima-substrato, mas também a essa difusão ocorrer majoritariamente em duas dimensões quanto maior a concentração de substrato. O programa PyCorrFit[®] empregado nos ajustes das curvas aos dados experimentais foi incapaz de separar e/ou calcular eficientemente esses efeitos, de modo que não foi possível obter medidas confiáveis dos tempos de difusão 3D e 2D. Talvez esse problema tenha sido devido ao alto nível de ruído das medidas realizadas.

Se considerássemos a presença apenas do estado tripleto e da difusão tridimensional da proteína em 1,0% de substrato (m/v), o tempo de difusão calculado seria em torno de 300 μ s apenas, enquanto em teoria o tempo de difusão deveria ser de pelo menos 1 ms (>3X maior) considerando que a proteína estivesse 100% do tempo ligada ao substrato e que esse possui um raio hidrodinâmico teórico de 13,7 nm. Por esse motivo, é necessária a aplicação de uma metodologia que considere a difusão bidimensional e que consiga calculá-la efetivamente.

Figura 39 - Combinação das curvas de autocorrelação ajustadas das figuras 36, 37 e 38
Fonte: MOLINA. (46)

5.8 Análise da difusão e interação da XynA-D119C-AttoOxa11 em arabinoxilano por FCS

Na presença de arabinoxilano, as medidas de FCS da XynA-D119C-AttoOxa11 mostraram um claro aumento do tempo de difusão da proteína e perfis de curva alterados (ver Figura 40). Esse efeito foi muito mais evidente do que no caso anterior, com o conjugado XynA-N-AF488. De acordo com os controles empregados usando uma sonda livre (Atto655-carboxy), mudanças de viscosidade não explicariam tamanha diferença. Isso indica que o efeito observado é devido à formação de complexo de xilanase-arabinoxilano. Além disso, pôde-se observar o aparecimento de um movimento bidimensional para a proteína, o que pode ser atribuído à presença de agregados de substrato ou à formação de filme/deposição de substrato.

Figura 40 - Curvas de autocorrelação de fluorescência para a XynA-D119C-AttoOxa11 e o *Atto655-carboxy* em arabinoxilano. Todas as curvas foram ajustadas com uma função modelo do tipo T+3D+2D

Fonte: MOLINA. (46)

A complexidade do meio reacional com substrato, que apresenta muitos agregados dinâmicos e espalhamento de luz, além da própria supressão do fluoróforo por PET e sua consequente redução de rendimento quântico, impediram uma medida quantitativa confiável de tempos e coeficientes de difusão para a enzima.

6 CONCLUSÕES

Através dos recursos disponíveis no microscópio confocal e suas inúmeras possibilidades de aquisição de dados, foi possível realizar medidas de fluorescência sob condições extremas e diferenciadas, como em concentrações extremamente baixas e no interior de células. A técnica utilizada para realizar tais medidas é a espectroscopia de correlação de fluorescência (FCS), muito conhecida principalmente na área biológica por sua capacidade de detecção de molécula única (single molecule). Primeiramente verificamos que a técnica é eficiente para realizar determinações de concentrações de marcadores fluorescentes (ALEXA 488[®]) até da ordem de 0,1 nanomolar. Verificamos também que a técnica é suficientemente sensível para diferenciar a difusão de fluoróforos em meios com diferentes viscosidades.

Também conseguimos realizar uma eficiente marcação das proteínas *Pulchellina*, de modo a obter um sinal proveniente apenas dos marcadores ligados às proteínas, sem nenhuma interferência de marcadores residuais em solução. Conseguimos medir a difusão de duas isoformas da proteína *Pulchellina* (PUC II e PUC IV) assim como distingui-las opticamente através de FCS. Uma consequência importante de nosso trabalho é o emprego da técnica de FCS no estudo da difusão de proteínas para o interior de células vivas. Observamos que a difusão da PUC II para o interior de células ocorre mais lentamente que a difusão da PUC IV. Portanto, podemos concluir que nossa metodologia e instrumentação é adequada para monitorar a difusão de proteínas em nível celular, sendo possível monitorar regiões até do tamanho de um pixel (~200 nm).

Demonstramos também que a técnica de FCS é adequada para medir a difusão, concentração e parâmetros fotofísicos de enzimas em substratos de celulose. Fomos capazes de fazer medidas qualitativas e verificar efeito de viscosidade sobre o conjugado, assim como utilizar modelos matemáticos disponíveis em softwares para poder inferir o tipo de difusão ocorrida (3D, 2D) assim como verificar a presença de estados escuros do tipo tripleto.

REFERÊNCIAS

- 1 LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Terceira Edição. Nova York: Springer, 2006.
- 2 ALEXA fluor[®] dyes. Disponível em: <<http://www.lifetechnologies.com/br/en/home/brands/molecular-probes/key-molecular-probes-products/alexa-fluor.html>>. Acesso em 23 jan. 2016.
- 3 WHITE, J. G.; AMOS, W. B.; FORDHAM, M. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 105, n. 1, p. 41-48, 1987.
- 4 DENK, W.; STRICKLER, J. H.; WEBB, W. W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. **Science**, v. 248, n. 4951, p. 73-76, 1990.
- 5 ZIPFEL, W. R.; WILLIAMS, R. M.; CHRISTIE, R.; NIKITIN, A. Y.; HYMAN, B. T.; WEBB, W. W. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 12, p. 7075-7080, 2003
- 6 Marvin Minsky. **Microscopy apparaturs**. US 3013467. 7 Nov. 1957, 19 Dec. 1961.
- 7 HELL, S. W. Toward fluorescence nanoscopy. **Nature Biotechnology**, v. 21, 1347-1355, 2003. doi:10.1038/nbt895.
- 8 MASTERS, B. R.; BOHNKE, M. Three-dimensional confocal microscopy of the living human eye. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 4, p. 69-91, 2002. doi: 10.1146/annurev.bioeng.4.092701.132001.
- 9 KRICHEVSKY, O.; BONNET, G. Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. **Reports on Progress in Physics**, v. 65, n. 2, p. 251-297, 2002.
- 10 SCHWILLE, P.; HAUSTEIN, E. Fluorescence correlation spectroscopy: novel variations of an established technique. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 36, p. 151-169, 2007. doi: 10.1146/annurev.biophys.36.040306.132612.
- 11 RIGLER, R.; ELSON, E. S. **Fluorescence correlation spectroscopy: theory and application**. New York: Springer Verlag, 2001.
- 12 MADGE, D.; ELSON, E.; WEBB, W. W. Thermodynamic fluctuations in a reacting system: measurement by fluorescence correlation spectroscopy. **Physical Review Letters**, v. 29, n. 11, p. 705-708, 1972.
- 13 MADGE, D.; ELSON, E.; WEBB, W. W. Fluorescence correlation spectroscopy. II. an experimental realization. **Biopolymers**, v. 13, n. 1, p. 29-61, 1974.

- 14 QUIAN, H.; ELSON, E. L. Analysis of confocal laser-microscope optics for 3-D fluorescence correlation spectroscopy. **Applied Optics**, v. 30, n. 10, p. 1185-1195, 1991.
- 15 RIGLER, R.; METS, U.; WIDENGREN, J.; KASK, P. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. **European Biophysics Journal**, v. 22, n. 3, p. 169-175, 1993.
- 16 KOPPEL, D. E.; MORGAN, E. F.; COWAN, A. E.; CARSON, J. H. Scanning concentration correlation spectroscopy using the confocal laser microscope. **Biophysical Journal**, v. 66, n. 2, p.502-507, 1994.
- 17 RIGLER, R. Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening. **Journal of Biotechnology**, v. 41, n. 2-3, p. 177-186, 1995.
- 18 NIE, S.; CHIU, D. T.; ZARE, R. N. Probing individual molecules with confocal fluorescence microscopy. **Science**, v. 266, n. 5187, p. 1018-1021, 1994.
- 19 CASTILHO, P. V.; GOTO, L. S.; ROBERTS, L. M.; ARAUJO, A. P. U. Isolation and characterization of four type 2 ribosome inactivating pulchellin isoforms from *Abrus pulchellus* seeds. **FEBS Journal**, v. 275, n. 5, p. 948-959, 2008.
- 20 SILVA, A. L. C.; GOTO, L. S.; DINARTE, A. R.; HANSEN, D.; MOREIRA, R. A.; BELTRAMINI, L. M.; ARAUJO, A. P. U. Pulchellin, a highly toxic type 2 ribosome-inactivating protein from *Abrus pulchellus* - Cloning, heterologous expression of A-chain and structural studies. **FEBS Journal**, v. 272, n. 5, p. 1201-1210, 2005.
- 21 REYES, L. F.; NOBRE, T. M.; PAVINATTO, F. J.; ZANIQUELLI, M. E. D.; CASELI, L.; OLIVEIRA, O. N.; ARAUJO, A. P. U. The role of the C-terminal region of pulchellin A-chain in the interaction with membrane model systems. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v. 1818, n. 1, p. 82-89, 2012.
- 22 ALEXA fluor® 488 monoclonal antibody labeling kit. Disponível em: <<http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp20181.pdf>>. Acesso em : 23 jan. 2016.
- 23 CHEN, A. H. A.; HANLEY, Q. S.; VERVEER, P. J. The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy. **Biophysical Journal**. v. 77, n. 1, p.553-567, 1999.
- 24 PETRASEK, Z.; SCHWILLE. P. Precise measurement of diffusion coefficients using scanning fluorescence correlation spectroscopy. **Biophysical Journal**. v. 94, n. 4, p. 1437-1448, 2008.
- 25 QUANTITATIVE FCS: determination of the confocal volume by FCS and bead scanning with the microtime 200. Germany. 2009. Disponível em: <https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7351/appnote_quantfcs.pdf> Acesso em: 15 abr. 2016.

- 26 TÖRRÖNEN, A.; ROUVINEN, J. Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4-beta-xylanases. **Journal of Biotechnology**, v. 57, n. 1-3, p. 137-149, 1997.
- 27 WHISTLER, R. L.; MASAK JR., E. Enzymatic hydrolysis of xylan. **Journal of the American Chemical Society**, v. 77, n. 5, p. 1241-1243, 1955.
- 28 PAËS, G. et al. Thumb-loops up for catalysis: a structure/function investigation of a functional loop movement in a GH11 xylanase. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 1, n. 2, p. 1-10, 2012.
- 29 COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3-23, 2005.
- 30 BERNIER JR., R. et al. Isolation and characterization of a xylanase from *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 511-514, 1983.
- 31 BEG, Q. K. et al. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3-4, p. 326-338, 2001.
- 32 KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 411-456, 1999.
- 33 PAËS, G.; BERRIN, J.-G.; BEAUGRAND, J. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 564-592, 2012.
- 34 POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.
- 35 SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 33-64, 2002.
- 36 MOTTA, F. L.; ANDRADE, C. C. P.; SANTANA, M. H. A. A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. In: CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S. (Ed.). **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass: techniques, applications and commercialization**. Rijeka, Cr : INTECH, 2013. p. 251-275.
- 37 MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Production and Application of Xylanase from *Penicillium* sp. Utilizing Coffee By-products. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 2, p. 657-664, 2010.
- 38 MARTÍN-SAMPEDRO, R. et al. Biobleaching of pulp from oil palm empty fruit bunches with laccase and xylanase. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 371-378, 2012. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.111.
- 39 BATTAN, B. et al. Application of Thermostable Xylanase of *Bacillus pumilus* in Textile Processing. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 222-229, 2012.

- 40 AHMAD, Z. et al. Effect of oral application of xylanase on some hematological and serum biochemical parameters in broilers. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 33, n. 3, p. 388-390, 2013.
- 41 KURNIAWAN, N. A.; LIM, C. T.; RAJAGOPALAN, R. Image correlation spectroscopy as a tool for microrheology of soft materials. **Soft Matter**, v. 6, n. 15, p. 3499-3505, 2010.
- 42 CHATTORAJ, S.; CHOWDHURY, R.; GHOSH, S.; BHATTACHARYYA, K. Heterogeneity in binary mixtures of dimethyl sulfoxide and glycerol: Fluorescence correlation spectroscopy. **Journal of Chemical Physics**, v. 138, n. 21, p. 214507, 2013.
- 43 SEONCHEOL, C.; KIM, S. H.; DOSEOK, K. Viscosity of sucrose aqueous solutions measured by using fluorescence correlation spectroscopy. **Journal of the Korean Physical Society**, v. 56, n. 4, p. 1315-1318, 2010.
- 44 SCHWILLE, P.; HAUPTS, U.; MAITI, S.; WEBB, W. W. Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one and two-photon excitation. **Biophysical Journal**, v. 77, n. 4, p. 2251-2265, 1999.
- 45 DUPONT, A.; STIRNNAGEL, K.; LINDEMANN, D.; LAMB, D. C. Tracking image correlation: combining single-particle tracking and image correlation. **Biophysical Journal**, v. 104, n. 11, p. 2373-2382, 2013.
- 46 MOLINA, G. A. **Caracterização biofísica da dinâmica catalítica de uma xilanase GH11**. 2016. 219 p. Dissertação(Mestrado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.
- 47 LASER Scanning Confocal Microscopy. Disponível em: <<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/livecellimaging/techniques.html>>. Acesso em 18 abr. 2016.