

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ANGELA PAOLA YAYA CANDELA

**Dano fotoinduzido no sistema endolisossomal:
modulação da autofagia e metabolismo de lipídios
em células de câncer colorretal**

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
18/04/2022

ANGELA PAOLA YAYA CANDELA

**Dano fotoinduzido no sistema endolisossomal:
modulação da autofagia e metabolismo de lipídios
em células de câncer colorretal**

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

Orientador: Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista

São Paulo
2022

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

C 216 Candela, Angela Paola Yaya
d Dano fotoinduzido no sistema endolisossomal:
modulação da autofagia e metabolismo de lipídios em
células de câncer colorretal / Angela Paola Yaya
Candela. - São Paulo, 2022.
122 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de
Bioquímica.

Orientador: Baptista, Maurício da Silva

1. lisofagia. 2. catepsina. 3. colesterol. 4.
estresse. I. T. II. Baptista, Maurício da Silva ,
orientador.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Mauricio Baptista pela orientação e a oportunidade que me proporcionou durante estes anos no Laboratório de Processos Fotoinduzidos e Interfaces (LPFI). Em especial, agradeço a comunicação nestes tempos incomuns.

Ao Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, à coordenadora Dra. Natália Torres e à Dra. Patrícia Aguiar por permitir o acesso às instalações e facilitar o uso de equipamentos nos períodos de pandemia, ao pós-doutorando Felipe Ravagnani pelo desenvolvimento dos experimentos, aos assistentes de pesquisa: Bruna B. Colli, Alessandro M. dos Santos, Thiago A. Aloia, pela ajuda no uso do citômetro de fluxo e do microscópio confocal.

Ao pessoal de treinamento técnico e colaboradores do LPFI: Larissa Albuquerque, Luana de Souza Barbosa, Rafaela Souza e Divinomar Severino. Ao especialista Décio Briotto Filho. Por permitir que nosso trabalho seja factível.

Ao Evandro Araújo de Souza, um dos melhores colegas de laboratório que conheci durante o mestrado no IBqM Leopoldo de Meis (UFRJ). Obrigada porque, apesar da distância e da diferença nos horários, você sempre está disposto a discutir algum dado ou artigo, por muitas vezes ter me ajudado com dicas na análise e planejamento dos experimentos. Sempre agradecerei por ter acreditado no potencial que posso ter na pesquisa, sem sua ajuda minha volta ao Brasil não teria sido possível.

Aos amigos que ganhei no Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia (IQ/USP), em especial, a Natasha e o Sérgio. Agradeço a acolhida no laboratório em

momentos de trabalho caóticos, a disposição e o tempo investido na melhora dos protocolos experimentais, as conversas e milhares de novas questões depois de cada ensaio no microscópio. Agradeço ao Sérgio pela calma para ouvir e contribuir na melhora deste trabalho. Obrigada Natasha e Mariana pelo aprendizado, a ajuda e as risadas. Sem dúvida, o tempo ficou curto para continuar a trabalhar juntos.

A cada um dos membros da minha família, agradeço imensamente ser parte das suas vidas. Obrigada pelo sacrifício do trabalho diário, pelas tantas ausências, idas e voltas.

As agências de financiamento de pesquisa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

EPÍGRAFE

“¿Qué es la vida? Una ilusión, una sombra, una ficción; y el mayor bien es pequeño; que toda la vida es sueño, y los sueños, sueños son.”

Pedro Calderón de la Barca

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Processos Fotoinduzidos e Interfaces (LPFI), Departamento de Bioquímica, do Instituto de Química (IQ), da Universidade de São Paulo (USP) com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), processo número 88882.332973/2019-01 e 1660499.

RESUMO

YAYA-CANDELA, Angela Paola. **Dano fotoinduzido no sistema endolisossomal: modulação da autofagia e metabolismo de lipídios em células de câncer colorretal.** Tese (Doutorado em Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2022.

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro câncer mais diagnosticado em humanos. O CCR causou mais de 900.000 mortes em 2020 e foi estimado, para o período entre 2020 - 2025, um incremento de 13.5 % no número de casos novos de acordo com a plataforma *Web Global Cancer Observatory*. A Terapia Fotodinâmica (PDT) é uma alternativa terapêutica promissora. Conhecer as vias de sinalização de morte celular, assim como, as respostas associadas com a resistência ao dano foto-oxidativo, são relevantes para incrementar a eficiência da PDT. Neste trabalho, investigamos como as células de adenocarcinoma colorretal HT – 29 respondem ao dano fotoinduzido gerado pelo fotossensibilizador (FS) meso-tetrafenilporfirina dissulfônado (TPPS_{2a}), uma molécula que é ativada pela irradiação com luz em 522 nm. Como esperado, após irradiação (2.1 J cm⁻²) foi verificado que com o incremento do TPPS_{2a} houve diminuição da viabilidade celular. A concentração do FS escolhida para darmos seguimento ao estudo foi a necessária para reduzir em 30 % a sobrevivência celular (DL₃₀; 148 nM). Abordagens moleculares nos permitiram identificar que nas células fotossensibilizadas a redução na maturação da catepsina D (CTSD, 55 %) e da catepsina B (CTSB, 52 %) contribuem com a disfunção endolisossomal. Além disso, comprovamos que as células fotossensibilizadas tiveram, pela menor quantidade de CTSD ativa, o processamento da prosaposina (PSAP) significativamente afetado. Células coletadas após 24 horas de irradiação expressaram 7 vezes mais PSAP do que as amostras dos grupos controle, sugerindo que as reações de oxidação causadas pelo TPPS_{2a} podem ocasionar o acúmulo de glicosíngolipídios nos endossomos e nos lisossomos, mimetizando o fenótipo observado em doenças de armazenamento lisossomal. Imagens de células HT – 29 com expressão estável da proteína LGALS3 fusionada ao marcador EFGP mostraram que, após 24 horas de irradiação, as células não ativaram a autofagia para remover os endossomos e os lisossomos danificados. A ausência do recrutamento da LGALS3 também apontou que as membranas dos endossomos e dos lisossomos não apresentam rupturas permanentes que permitam a passagem de uma molécula de 26 kDa. Experimentos complementares de análise da expressão proteica dos marcadores autofágicos LC3-II e p62/SQSTM1 (referida como p62) confirmaram o bloqueio do fluxo autofágico nas células fotossensibilizadas.

Pelo envolvimento do sistema endolisossomal no tráfego de membranas e no fluxo de lipídios, o aumento da transcrição da Hidroximetilglutaril-CoA reductase (*HMGCR*) (\approx 1.6 vezes) – uma enzima envolvida na síntese de *novo* do colesterol - sugeriu que a disfunção dos endossomos e dos lisossomos altera a distribuição de colesterol. Não obstante, para manter a homeostase lipídica nas células fotossensibilizadas este não foi o único mecanismo

compensatório acionado, uma vez que houve um incremento sutil; porém, significativo (1.2 vezes) na transcrição da ceramidase ácida (*ASAHI*).

Em conjunto, nossos dados apontam que a fotossensibilização com TPPS_{2a} constitui uma ferramenta promissora para causar dano no sistema endolisossomal, inibindo a autofagia e permitindo o estudo das respostas metabólicas em células expostas a estresse oxidativo.

Palavras chave: TPPS_{2a}, catepsina, colesterol, estresse, lisofagia, oxidação.

ABSTRACT

YAYA-CANDELA, Angela Paola. **Endo-lysosomal system photodamage: modulation of autophagy and lipid metabolism in colorectal cancer cells.** Ph.D. thesis in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2022.

Colorectal cancer (CRC) is the third most commonly diagnosed cancer in humans. CRC caused more than 900,000 deaths in 2020 and it was estimated for the period 2020 - 2025, an increase of 13.5 % in the number of new cases according to the Global Cancer Observatory Web platform. Photodynamic Therapy (PDT) is a promising therapeutic alternative. Understandings of cell death signaling pathways as well as the adaptive responses associated with resistance to photo-oxidative damage are relevant to optimize the effectiveness of PDT. For this purpose, in this research, we investigated how HT-29 colorectal adenocarcinoma cells respond to photosensitization reactions generated by TPPS_{2a}, a molecule activated by irradiation with light at 522 nm. PS concentrations displayed increased inhibitory effect on cell viability after irradiation (2.1 J cm⁻²). The lethal dose selected to photosensibilize cells was the TPPS_{2a} concentration able to reduce 30 % of cell survival (LD₃₀; 148 nM). By molecular methods, we observed a reduction in cathepsin D (CTSD, 55 %) and cathepsin B (CTSB, 52 %) maturation, depletion that may contribute to endo-lysosomal dysfunction in photosensitized cells. It is widely known that endo-lysosomal cathepsins are crucial in protein turnover and degradation. Thus, we focused on the consequence of CTSD reduction. Literature data indicate that CTSD plays a key role in prosaposin (PSAP) processing to the four saposins (SAPs) that are required in glycosphingolipids breakdown. In fact, our results in photosensitized cells showed that, due to the lower amount of active CTSD, PSAP processing was significantly affected. Cells collected after irradiation expressed 7 times more PSAP than cells from the control groups. This data suggest that oxidative photodamage induced by TPPS_{2a} may result in glycosphingolipid-accumulating endosomes and lysosomes, phenotype which mimics lysosomal storage diseases. Furthermore, we monitored by fluorescence microscopy a form of selective autophagy which detects and removes damaged endosomes and lysosomes known as lysophagy. Images of HT-29 cells expressing Galectin 3/LGALS3 fused to EFGP showed that photosensitized cells did not activate lysophagy. The absence of LGALS3 recruitment also indicated that the membranes of endosomes and lysosomes do not present ruptures which allow the passage of proteins with a molecular weight up to at least 26 kDa. Protein expression analysis of the autophagic markers LC3-II and p62/SQSTM1 (referred as p62) confirmed autophagic flux blockade in cells challenged with photoactivated TPPS_{2a}.

The endo-lysosomal system plays a key role in membrane trafficking and lipid flux. At the transcriptional level, 1.6-fold increase in gene expression of Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (*HMGCR*) - an enzyme involved in the synthesis *de novo* of cholesterol - indicated that endosomes and lysosomes dysfunction alters the distribution of cholesterol in cells

challenged with photoactivated TPPS_{2a}. However, to maintain lipid homeostasis in photosensitized cells, this was not the only compensatory mechanism triggered, since there was a slightly increase (1.2-fold) in the transcription of acid ceramidase (*ASAH1*).

Taken together, our data showed that photosensitization with TPPS_{2a} constitutes a promising tool to damage the endolysosomal system, to inhibit autophagy and to study metabolic responses in cells exposed to oxidative stress.

Keywords: TPPS_{2a}, cathepsin, cholesterol, stress, lysophagy, oxidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica do TPPS _{2a}	19
Figura 2. Representação dos processos envolvidos nas reações de fotossensibilização	22
Figura 3. Esquema dos lipídios foto-oxidados em membranas artificiais.....	25
Figura 4. O sistema endolisossomal	33
Figura 5. Modelos de transporte de macromoléculas aos lisossomos	34
Figura 6. Estabilidade dos endossomos e dos lisossomos mediada por Hsp70.....	41
Figura 7. Determinação DL ₃₀ em células HT-29.....	55
Figura 8. Análise do ciclo celular	56
Figura 9. Maturação das catepsinas.....	60
Figura 10. Cinética da expressão da Catepsina D.....	62
Figura 11. Expressão proteica da Prosaposina (PSAP)	63
Figura 12. Expressão das proteínas LAMP1 e LAMP2	65
Figura 13. Expressão dos genes <i>LAMP1</i> e <i>LAMP2</i>	66
Figura 14. Modelo do recrutamento de Galectinas em lisossomos e endossomos com lesões na membrana	68
Figura 15. Lisossomos e endossomos tardios disfuncionais, após 24 horas de irradiação com TPPS _{2a} , não são degradados pela ativação da lisofagia	71
Figura 16. Expressão proteica das galectinas.....	74

Figura 17. Intensidade de fluorescência de células HT-29 marcadas com LIVE / DEAD™ Fixable Violet	77
Figura 18. Intensidade de fluorescência de células HT-29 marcadas com LysoView™ 633	82
Figura 19. Fotossensibilização com TPPS _{2a} modula a expressão proteica dos marcadores autofágicos LC3 – II e p62.....	85
Figura 20. Fotossensibilização com TPPS _{2a} inibe a autofagia	86
Figura 21. Expressão do mRNA de NRF2 não foi diferente entre os grupos	87
Figura 22. Modelo de endocitose e degradação de membranas	90
Figura 23. BMP e Saposinas (SAPs) nos lisossomos	91
Figura 24. Quantificação relativa de mRNA do gene <i>ASAH1</i>	92
Figura 25. Balanço entre a Esfingosina 1- fosfato (S1P) e a Ceramida (Cer).....	93
Figura 26. Quantificação relativa de mRNA do gene <i>HMGCR</i>	95
Figura 27. Quantificação relativa de mRNA do gene <i>LPCAT2</i>	96
Figura 28. Conteúdo de corpúsculos lipídicos (CLs) em células HT-29.	97
Figura 29. Resumo gráfico dos efeitos de TPPS _{2a} em células HT-29.....	105
Figura 30. Análise do ciclo celular após 48 horas de irradiação	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento quântico de superóxido e de oxigênio singlete das proteínas fluorescentes mCherry e tdKillerRed	28
Tabela 2. Indutores de LMP.....	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Fotossensibilizadores e terapia fotodinâmica	18
1.2. Sistema endolisossomal.....	31
1.2.1. Lisossomos e a via endocítica.....	31
1.2.2. Os lisossomos e a progressão do câncer	34
1.2.3. Estabilidade das membranas endolisossomais	40
2. OBJETIVOS.....	42
2.1. Objetivo 1.....	42
2.2. Objetivo 2.....	42
2.3. Objetivo 3.....	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1. Linhagem celular	43
3.2. Reagentes.....	43
3.3. Fotossensibilização em células	44
3.4. Ensaio de MTT.....	44
3.5. Ciclo celular	46
3.6. Western Blot	46
3.7. Geração da linhagem HT-29 EGFP- LSGAL3	48
3.8. Imunofluorescência	48
3.9. Marcação dos lisossomos (Lysoview)	49
3.10. Marcação dos corpúsculos lipídicos (BODIPY 493 / 503)	50
3.11. Extração de RNA e quantificação dos transcritos por qRT-PCR.....	51
4. RESULTADOS	53
4.1. Base molecular da disfunção lisossomal	53
4.1.1. Desenho experimental	53
4.1.2. Fototoxicidade celular	53
4.1.3. Modulação negativa das catepsinas.....	57
4.2. Degradação dos lisossomos e a autofagia	67
4.3. Fotossensibilização de células altera o metabolismo de lipídios	88

5. DISCUSSÃO	99
6. CONCLUSÃO	105
7. PERSPECTIVAS	106
8. REFERÊNCIAS.....	111
LISTA DE ANEXOS	123

ABREVIATURAS

ASAH1	Ceramidase ácida
ASM	Esfingomielinase ácida
BafA1	Bafilomicina A1
BAX	Proteína X associada a Bcl-2
BAK	Assassino/antagonista homólogo a Bcl-2
BMP	Bis-(monoacilglicero)-fosfato
CCR	Câncer Colorretal
CTSA	Catepsina A
CTSB	Catepsina B
CTSD	Catepsina D
DL	Dose letal
DMEM	Eagle modificado de Dulbecco com alto conteúdo de glicose
FS	Fotossensibilizador
1FS*	Fotossensibilizador no estado singlete
3FS*	Fotossensibilizador no estado triplete
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HMGCR	Hidroximetilglutaril-CoA reductase
HNE	Hidroxinonenal
Hsp70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
LAMP1	Proteína 1 de Membrana Associada ao Lisossomo
LAMP2	Proteína 2 de Membrana Associada ao Lisossomo
LC3	Cadeia leve 3 da proteína associadas a microtúbulos 1A/1B
LGALS3	Galectina-3
LGALS9	Galectina-9
LLOMe	Ester de L-leucil-L-leucina O-metílico
LMP	Permeabilização da membrana do lisossomo
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MDA	Malondialdeído
MNF2	Mitofusina 2
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
mTORC1	Complexo 1 da proteína alvo mecanístico da Rapamicina
NFYB-1	Subunidade Beta 1 do fator de transcrição nuclear Y
NFE2L2 / NRF2	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
¹ O ₂	Oxigênio singlete
PCI	Internalização Fotoquímica
PDT	Terapia Fotodinâmica
PSAP	Prosaposina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAP	Saposina
SQSTM1 / p62	Sequestossomo-1
SREBP	Proteínas de Ligação a Elemento Regulador de Esterol
TPPS _{2a}	Meso-tetrafenil porfirina dissulfonada
V-ATPase	ATPase vacuolar

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fotossensibilizadores e terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica é uma alternativa para o tratamento de doenças e baseia-se na foto-oxidação de biomoléculas com o consequente dano e morte celular. No processo fotodinâmico são necessários três elementos: o fotossensibilizador (FS), o oxigênio e a luz (AGOSTINIS et al., 2011) e envolve a geração de espécie reativas de oxigênio (ROS) por fotoativação. Identificou-se que a localização celular do FS é um fator chave no aumento da sua eficiência (OLIVEIRA et al., 2011). De fato, dano seletivo em organelas como os lisossomos e as mitocôndrias tem sido eficaz na redução da sobrevivência celular (MARTINS et al., 2019).

Neste estudo usamos o fotossensibilizador chamado de TPPS_{2a} (Meso-tetrafenil porfirina dissulfonada) para causar dano no sistema endolisossomal e podermos estudar os mecanismos moleculares das respostas celulares. Como mostrado na **Figura 1**, TPPS_{2a} possui na sua estrutura um anel de porfina (em azul) com quatro grupos fenilas, sendo duas dessas fenilas sulfonadas. Esses substituintes têm carga negativa e se encontram dispostos adjacientemente, tornando a molécula anfifílica, com grande tendência a interagir com as membranas (ENGELMANN et al., 2007). O espectro de absorvância do TPPS_{2a} apresenta o perfil típico das porfirinas, caracterizadas por uma banda de absorção de forte intensidade em torno dos 413 nm denominada Banda Soret, além de um conjunto de quatro bandas de menor intensidade, localizadas entre os 500 nm e os 700 nm, chamadas de Bandas Q (BERG et al., 2010). Pelas suas propriedades fotofísicas, tais como o baixo rendimento quântico de fluorescência ($\Phi_f < 0.15$), o alto coeficiente de extinção molar ($450\,000\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), e a alta eficiência de geração do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$, $\Phi_\Delta = 0.7$), TPPS_{2a} é considerado um

fotossensibilizador eficiente (TSUBONE et al., 2017). Não obstante, vale também ressaltar que detectar a geração do $^1\text{O}_2$ de um FS pelo decaimento da fluorescência em células é um tópico desafiante devido a que o oxigênio é pouco solúvel numa das principais substâncias da composição de uma célula: a água, sendo a sua capacidade de desativar o $^1\text{O}_2$ outra desvantagem, característica que encurta o tempo de decaimento da luminescência em cerca de 3.7 μs . Além disso, macromoléculas como as proteínas podem reduzir ainda mais este tempo de decaimento (HACKBARTH STEFFEN; BORNHÜTTERA; RÖDER, 2016).

TPPS_{2a} pode ser ativado por luz em qualquer uma das suas bandas de absorção. Neste trabalho, utilizamos irradiação com luz verde (522 nm), evitando irradiar ao fotossensibilizador com luz azul, por exemplo, em torno dos 413 nm, onde a absorção é maior, já que FSs endógenos das células podem ser excitados. Reações de oxidação causadas por FSs endógenos, tais com a Vitamina A, a Riboflavina (Vitamina B2), o Mononucleotideo de flavina (FMN), o Dinucleotideo de flavina e adenina (FAD), a Lipofuscina, entre outros (BAPTISTA et al., 2021; CARDOSO; LIBARDI; SKIBSTED, 2012), são sabidamente responsáveis por causar efeitos e consequências semelhantes aos dos FSs sintéticos (WONDRAK; JACOBSON; JACOBSON, 2006).

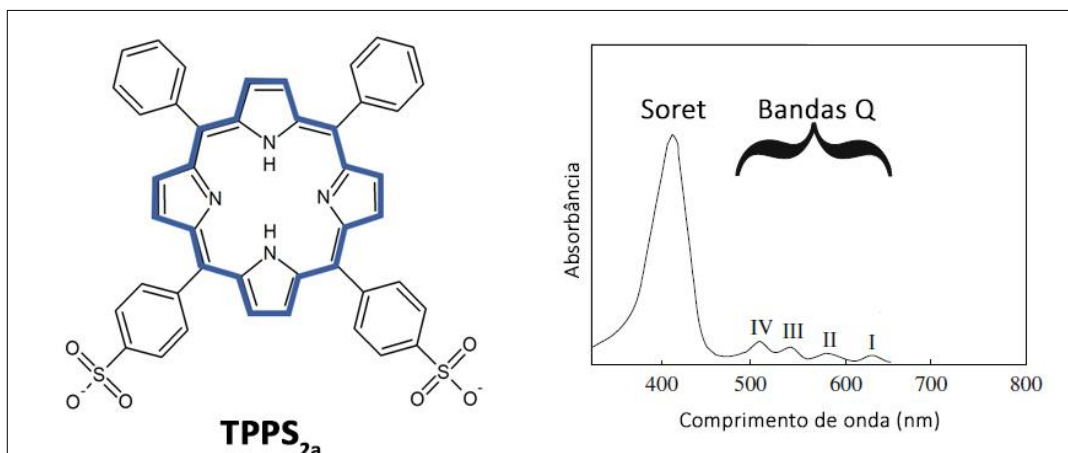


Figura 1. Estrutura básica do TPPS_{2a}. Estrutura básica do TPPS_{2a} (lado esquerdo) com o anel de porfirina em azul e gráfico do espectro de absorção típico dos derivados das porfirinas (lado direito) mostrando a banda Soret (em torno dos 400 nm) e quatro bandas Q. Modificado e adaptado de (BERG et al., 2010)

O processo fotodinâmico inicia-se quando um FS absorve energia luminosa num determinado comprimento de onda, possibilitando a ocorrência de diversas reações de oxidação (**Figura 2**). A absorção da energia luminosa pelo FS que estava no estado fundamental (F_0) incrementa o seu nível energético drasticamente, acrescentando os potenciais de oxidação e de redução do FS (BAPTISTA et al., 2021). O FS eletronicamente excitado, inicialmente no estado singlete ($^1FS^*$), pode retornar ao estado fundamental emitindo um fóton (fenômeno chamado de fluorescência) ou pela dissipação de calor através da Conversão Interna. A partir do FS no estado singlete podem ocorrer rearranjos eletrônicos que formam espécies reativas que persistem por tempos maiores no estado excitado. Através do Cruzamento Intersistemas, a inversão do spin eletrônico leva ao FS para o estado de triplete ($^3FS^*$). Diferentemente dos singletes, as espécies de tripletes possuem tempo de vida na escala dos microssegundos, propriedade que lhes oferece maior probabilidade de interação química com o seu entorno (DI MASCIO et al., 2019; LEWIS; KASHA, 1944).

Segundo a classificação proposta por Foote, os mecanismos de foto-oxidação em biomoléculas podem ser divididos em duas classes: mecanismos Tipo I e mecanismos Tipo II. No mecanismo tipo I, a energia luminosa passa do triplete para a biomolécula pela transferência de elétrons (mecanismo radicalar). Neste processo se formam diversos tipos de radicais (oxidados ou reduzidos) a partir das biomoléculas e do fotossensibilizador. Como primeiro ponto, deve-se lembrar que essa transferência de elétron inicial pode levar a perda de função das biomoléculas que tenham se envolvido na reação redox (BAPTISTA et al., 2021). Além disso, os radicais gerados transferem os elétrons a moléculas de oxigênio formando espécies reativas que incluem o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio

(H₂O₂) e o radical hidroxila (HO•). No mecanismo tipo II a energia dos tripletes é transferida diretamente a moléculas de oxigênio, o que resulta na formação do oxigênio singlete (¹O₂) (BAPTISTA et al., 2017; FOOTE, 1991). As espécies de ¹O₂ são importantes na PDT, já que tem a capacidade de oxidar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, sendo os compostos fenotiazínicos e os polipirróis macrocíclicos (porfirinas e derivados), fotossensibilizadores comumente usados na PDT por causa da eficácia na geração de tripletes após excitação eletrônica (BACELLAR et al., 2015).

Em outras propostas de classificação se enfatiza que os mecanismos de foto-oxidação devem ser categorizados pelo modo no qual os tripletes ativam o oxigênio, sugerindo que a ativação do oxigênio como resultado de reações de transferência de elétrons deve ser classificada como mecanismo Tipo I e que a ativação do oxigênio como resultado da transferência de energia deve ser classificada como mecanismo Tipo II (KRASNOVSKY, 2007).

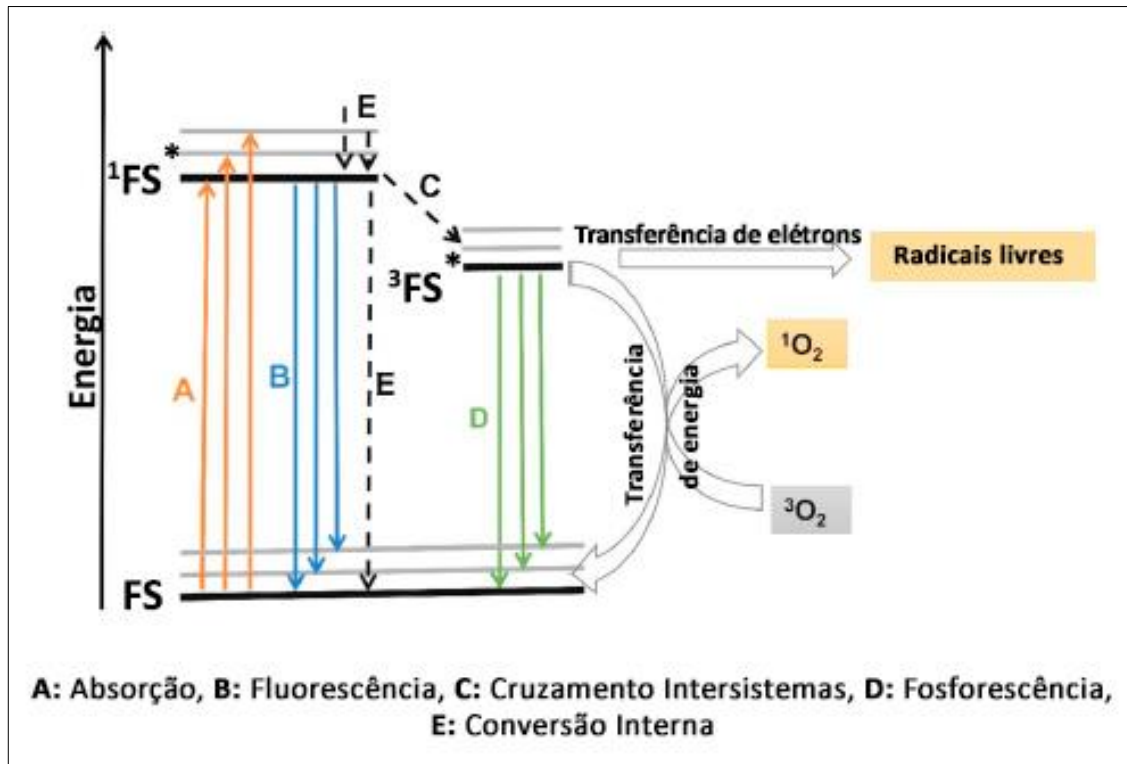


Figura 2. Representação dos processos envolvidos nas reações de fotossensibilização. FS: fotossensibilizador no estado fundamental, $^1\text{FS}^*$: estado singlete excitado do fotossensibilizador e $^3\text{FS}^*$: estado tripleto excitado do FS, $^3\text{O}_2$: oxigênio molecular, $^1\text{O}_2$: oxigênio singlete. Adaptado de TSUBONE; BAPTISTA; ITRI, 2019.

A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos mecanismos Tipo I e Tipo II acontecem de forma simultânea e a taxa de ocorrência de cada mecanismo depende de fatores como o tipo de fotossensibilizador usado, a concentração das biomoléculas alvos, a concentração do oxigênio, além da afinidade do fotossensibilizador pelo substrato (TSUBONE; BAPTISTA; ITRI, 2019).

Por sua propriedade anfífilica; o TPPS_{2a} se liga na membrana plasmática e acredita-se que a sua captação intracelular segue a via endocítica, localizando-se finalmente no perímetro dos endossomos e dos lisossomos (BERG et al., 2010). O acúmulo do TPPS_{2a} na membrana dos compartimentos endolisossomais, e em especial, a sua interação com os lipídios, é de particular importância para os efeitos das reações de foto-oxidação.

Interessantemente, tem sido demonstrado que FSs localizados nas membranas lipídicas causam danos citotóxicos com maior eficiência (PAVANI; IAMAMOTO; BAPTISTA, 2012).

Pelo contato direto do TPPS_{2a} com os lipídios das membrana dos endossomos e dos lisossomos reações de peroxidação lipídica podem ser desencadeadas. Os mecanismos gerais de oxidação lipídica são divididos em três fases: iniciação, propagação e terminação. Na iniciação, a retirada de um átomo de hidrogênio da cadeia de carbonos dos lipídios (LH) gera um radical lipídico (L•). A facilidade com que um hidrogênio é abstraído depende de fatores físico-químicos como a proximidade do fotossensibilizador e o lipídio, além da energia de dissociação do enlace C – H (PRATT; MILLS; PORTER, 2003; YIN; XU; PORTER, 2011). No progresso da reação, o radical lipídico reage rapidamente com o oxigênio, gerando radicais peroxila (LOO•). Os radicais peroxila abstraem átomos de hidrogênio de lipídios não oxidados (LH) formando hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e outros radicais lipídicos (L•) que propagam a lipoperoxidação até se autodestruírem. Como resultado das reações em cadeia, subprodutos oxidados como álcoois, cetonas e aldeídos lipídicos podem ser formados por diversas vias. É importante ressaltar que em modelos miméticos, os hidroperóxidos lipídicos não comprometem a permeabilidade das membranas, sendo o aumento da área superficial das vesículas lipídicas a principal alteração causada, já que a adição do grupo hidroperóxido na dupla ligação insaturada da cadeia acila promove uma mudança na estrutura química que incrementa a área ocupada dos lipídios (**Figura 3**) (BACELLAR; BAPTISTA, 2019; RISKE et al., 2009; TSUBONE; BAPTISTA; ITRI, 2019).

Reações independentes do contato direto entre o TPPS_{2a} e os lipídios das membrana dos endossomos e dos lisossomos também ocorrem durante a fotossensibilização. Nesse

cenário, o $^1\text{O}_2$ é o principal mediador das reações de oxidação. O $^1\text{O}_2$ reage com lipídios insaturados por meio da reação “ene” formando LOOH. Quando o $^1\text{O}_2$ é o único agente oxidante, a oxidação de lipídios monoinsaturados produz exclusivamente hidroperóxidos lipídicos; porém, FSs que formam concomitantemente radicais livres via mecanismos Tipo I e a presença de metais como o ferro eventualmente propagam as reações de oxidação (ITRI et al., 2014)

Hidroperóxidos lipídicos formados tanto pelo contato direto do FS com os lipídios quanto por meio do $^1\text{O}_2$ podem gerar subprodutos que incluem aos aldeídos lipídicos com cadeias de ácidos graxos truncados. Tem sido descrito que diferentemente dos hidroperóxidos lipídicos, os aldeídos lipídicos aumentam a permeabilidade de membranas artificiais, levando ao vazamento de conteúdo (**Figura 3**). Em consequência, para um FS causar a ruptura das membranas requer da ação conjunta entre o $^1\text{O}_2$ e as espécies oxidantes geradas nas reações dependentes de contato (BACELLAR et al., 2018). Vale mencionar que o TPPS_{2a} é um fotossensibilizador usado no processo fotodinâmico chamado de Internalização Fotoquímica, metodologia conhecida como PCI (do inglês *Photochemical Internalization*), que permite através do vazamento específico dos endossomos e dos lisossomos a liberação intracelular de uma grande variedade de moléculas (BERG et al., 2010), portanto, desde o ponto de vista teórico, aldeídos lipídicos poderiam estar sendo gerados após ativação do TPPS_{2a}.

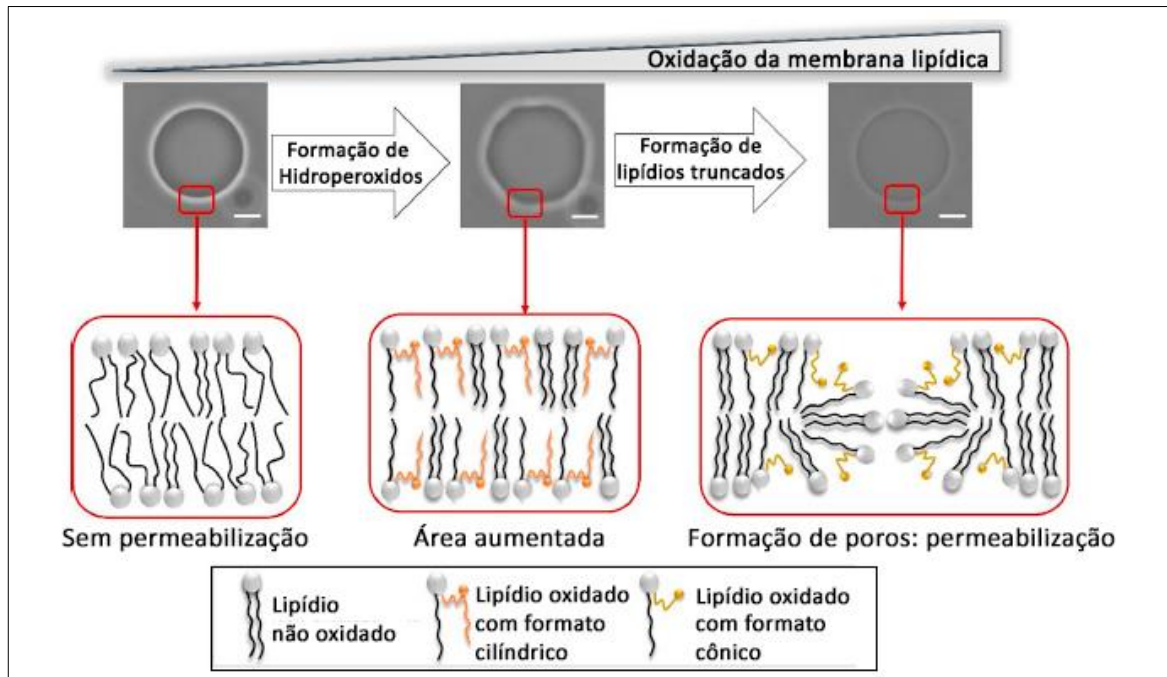


Figura 3. Esquema dos lipídios foto-oxidados em membranas artificiais. Vesículas Unilaminares Gigantes (GUVs, do inglês *Giant Unilamellar Vesicles*) após foto-oxidação apresentam lipídios oxidados com formato cilíndrico ou lipídios oxidados com cadeia curta (forma cônica). Barra de escala em imagens microscópicas: 10 µm. Adaptado de TSUBONE; BAPTISTA; ITRI, 2019.

Diversos grupos de pesquisa, incluindo o nosso, focam esforços na procura de FSs com melhorias nas propriedades fotodinâmicas, que vai além da produção de $^1\text{O}_2$. Não obstante, produzir grandes quantidades dessas espécies reativas não é garantia de sucesso na PDT. De acordo com esta premissa, Oliveira e colaboradores compararam a sobrevivência de duas populações de células. Nos ensaios, as células foram incubadas individualmente com cristal violeta (CV) ou com azul de metileno (AM). O AM é considerado um bom FS, pois gera espécies de $^1\text{O}_2$ com eficácia em torno de 50 %; enquanto, o CV tem eficácia em torno de 0.05 %. Ambos os FSs se localizam nas mitocôndrias; porém, após fotoativação, as duas populações de células apresentaram porcentagens semelhantes de sobrevivência celular. Diminuição da eficácia na geração de $^1\text{O}_2$ pelo AM explica este resultado, uma vez que o AM é reduzido nas mitocôndrias pelas coenzimas NADH e NADPH causando alterações nas

propriedades foto-oxidativas. Este resultado indicou que a localização do FS também tem um papel relevante na PDT (OLIVEIRA et al., 2011). Segundo este delineamento, o uso de FSs com especificidade de localização na mitocôndria, no retículo endoplasmático e nos lisossomos são os mais comuns entre os diversos estudos (TSUBONE et al., 2021). A maioria dos FSs tem natureza orgânica, não obstante, foi demonstrado que a mistura de elementos orgânicos e inorgânicos como o complexo de rutênio é capaz de produzir $^1\text{O}_2$ com muita eficiência, causando danos ao DNA e reduzindo a sobrevivência celular (ALBANI et al., 2014).

Mais recentemente, o advento da tecnologia do DNA recombinante permitiu o desenvolvimento de FSs geneticamente codificados. KillerRed foi o primeiro FS de esta classe a ser reportado e deriva de uma cromoproteína denominada anm2CP achada em medusas da classe Hydrozoa. Substituição de aminoácidos na sequência proteica da anm2CP (Thr145Asp e Cys181Gly) favoreceu a formação de um canal que liga o cromóforo ao meio circundante, permitindo a passagem de água e a difusão de oxigênio molecular. Endereçamento do KillerRed a organelas específicas tem sido conseguido mediante a inserção de um fragmento curto de nucleotídeos conhecido como peptídeo sinal na sequência codificante do KillerRed (BULINA et al., 2006). Nos estudos iniciais, foi sugerido que o efeito fototóxico do KillerRed era causado pela geração de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS); porém, não se tinha conhecimento sobre a eficácia na geração do $^1\text{O}_2$. Experiências posteriores, onde foram comparados as eficácias fotodinâmicas do KillerRed e da proteína mCherry, de uso comum na microscopia de fluorescência, evidenciaram que ambas as proteínas geram $^1\text{O}_2$ e $\text{O}_2^{\bullet-}$ (e em subsequência outras ROS) com eficácias semelhantes (**Tabela 1**) (ONUKWUFOR et al., 2020). Embora, outros estudos indiquem que o KillerRed gera seletivamente $\text{O}_2^{\bullet-}$ após irradiação (SHU et al.,

2011). Estes achados devem ser extrapolados com cautela em sistemas biológicos, fatores como os gradientes de O_2 presentes no microambiente tumoral podem afetar a geração de ROS. A alta tensão de O_2 pode favorecer a geração de 1O_2 ; enquanto, condições hipóxicas podem favorecer a formação de $O_2^{\bullet-}$ (GILSON et al., 2017). Contudo, o KillerRed tem demonstrado alta fototoxicidade nas células, fato que confirma que todas as ROS representam um dano potencial nos organismos vivos. Interessantemente, foi observado que a modulação na intensidade de luz aplicada para ativar o FS desencadeia respostas celulares diferentes. Por exemplo, ativação do KillerRed na superfície dos lisossomos com dose de luz de 210 J cm^{-2} resultou na morte de células por necrose; enquanto, ativação do FS com dose de luz de 90 J cm^{-2} causou morte celular por apoptose (SEREBROVSKAYA et al., 2013). Além do KillerRed e seus derivados, outros FSs geneticamente codificados com melhoras no rendimento quântico de 1O_2 foram desenvolvidos (WESTBERG et al., 2017). Hoje em dia, apesar da fácil manipulação genética, a principal desvantagem do KillerRed no seu uso como FS reside no emprego de altas doses de luz (LIU et al., 2021). Outra das potenciais aplicações desta nova classe de FSs é na optogenética, pois já foi demonstrado que é útil na inativação de proteínas; embora, a formação de dímeros durante o envelhecimento proteico do KillerRed pode alterar a localização celular da proteína alvo, limitando seu uso (SEREBROVSKAYA et al., 2011). Como alternativa promissora, foi desenvolvida uma variante monomérica denominada SuperNova. Alvos sensíveis à multimerização como as citoqueratinas e as cofilinas mostraram terem sido inativadas com sucesso quando fusionadas à SuperNova (TAKEMOTO et al., 2013).

Tabela 1. Rendimento quântico de superóxido e de oxigênio singlete das proteínas fluorescentes mCherry e tdKillerRed. Adaptado de ONUKWUFOR et al., 2020.

Proteína fluorescente	Rendimento quântico $O_2^{\bullet-}$ ($\Phi_{O_2^{\bullet-}}$)	Rendimento quântico 1O_2 ($\Phi_{^1O_2}$)
mCherry	$1.20 \pm 0.044 \times 10^{-3}$	$5.7 \pm 0.27 \times 10^{-3}$
tdKillerRed*	$0.97 \pm 0.042 \times 10^{-3}$	$7.6 \pm 0.26 \times 10^{-3}$

*(tdKillerRed): KillerRed versão tandem (cópias expressas em dímero). Os dados representam a média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes.

Não há dúvidas que os FSs são essenciais para a eficácia da PDT e apesar do crescente número de FSs químicos e de FSs derivados da engenharia genética, poucos deles foram aprovados para uso na área da clínica oncológica. Uma mistura de derivados da hematoporfirina denominado Porfímero de sódio e comercialmente conhecido como Photofrin foi o primeiro FS aprovado para PDT em 1995 e desde então continua a ser utilizado no tratamento de tumores, sendo indicado no estágio inicial e avançado do câncer de pulmão, câncer gástrico, câncer cervical, câncer de bexiga e adenocarcinoma esofágico (BROWN; BROWN; WALKER, 2004). Este sensibilizador é ativado com dose de luz de 100 J cm^{-2} a 200 J cm^{-2} no comprimento de onda de 630 nm. Entre as vantagens destacam a sua fácil preparação em solução aquosa para administração intravenosa (2 mg kg^{-1} a 5 mg kg^{-1}), além de ser inócuo na ausência de luz (YANO et al., 2011). Tem sido reportado que o acúmulo de Photofrin nos tecidos tumorais é 1.5 vezes maior do que nos tecidos sadios circundantes (ALLISON, 2014). Os mecanismos responsáveis pela distribuição seletiva das porfirinas no tecido tumoral ainda são pouco esclarecidos. Algumas hipóteses sobre a causa desta seletividade apontam que: i) as porfirinas se acumulam preferencialmente no espaço intersticial, seja como agregados ou complexos de proteínas, por causa da permeabilidade dos vasos sanguíneos formados pelo tumor e a reduzida drenagem linfática, ii) as porfirinas

são transportadas por lipoproteínas na corrente sanguínea e já que muitos tipos de células tumorais sobressintetizam o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL, do inglês *low density lipoprotein*), há um incremento na captação celular destes compostos, iii) a diminuição do pH intracelular nas células tumorais altera a ionização dos fotossensibilizadores, facilitando a passagem de porfirinas através da membrana plasmática, iv) macrófagos associados a tumores (TAMs) favoreceriam o acúmulo do FS no microambiente tumoral, pois tem sido descrito que os TAMs podem acumular grandes quantidades de porfirina (HAMBLIN; LUKE NEWMAN, 1994; POTTIER; KENNEDY, 1990). Após terapia, o principal inconveniente é a baixa taxa de eliminação do FS, ficando retido na pele, fato que causa fotossensibilidade nos pacientes durante seis a oito semanas (ALLISON, 2014). Nos inícios da década do 2000, a União Europeia aprovou o uso da meta-Tetrahidroxifenilclorina (Temoporfina), sendo empregado na terapia paliativa de cânceres de cabeça e de pescoço. Este fotossensibilizador, além de ser um composto puro, apresenta melhoras na eficiência fotodinâmica devido à absorção de fótons mais favorável em 652 nm, o que resulta na redução de doses de luz (5 J cm^{-2} - 20 J cm^{-2}) e na diminuição da quantidade do FS requerido (0.15 mg kg^{-1}). No entanto, este fármaco também está associado com a desvantagem da fotossensibilidade prolongada da pele e outras complicações decorrentes da otimização das propriedades fotoquímicas. Por exemplo, doses inadequadas de luz podem ocasionar feridas que não cicatrizam ou podem causar fibrose nos tecidos (YANO et al., 2011).

A fim de evitar a ocorrência da fotossensibilidade prolongada da pele foi introduzido na terapêutica médica o uso de um precursor do fotossensibilizador endógeno Protoporfirina IX chamado de Ácido Aminolevulínico (ALA) (KENNEDY; POTTIER; PROSS,

1990). O ALA e derivados do ALA (metil-ALA) têm sido indicados no tratamento de lesões pré-malignas e malignas da pele. Formulações tópicas de ALA e metil-ALA são aprovadas para aplicação em lesões superficiais (tumores com espessura menor a 2 mm – 3 mm), no tratamento da queratinose actínica e do carcinoma basocelular (BABILAS et al., 2005). Aplicação tópica de ALA também é usada no tratamento da doença de Bowen, uma neoplasia maligna *in situ*, com taxas de eliminação maiores ao 90 %. Entre as características favoráveis, a PDT mostrou excelentes resultados cosméticos em comparação com a cirurgia. O único efeito colateral reportado no uso do ALA é a dor local durante a irradiação, provavelmente relacionado ao estímulo de terminações nervosas e ou dano nos tecidos (MORTON, 2001; WARREN et al., 2009). Além de lesões na pele, a fotossensibilização com ALA mostrou ser uma abordagem menos invasiva no tratamento do esôfago de Barrett e do câncer esofágico inicial (SIERON et al., 2001). No caso de tumores duodenais, carcinomas pancreáticos irressecáveis e câncer de cólon, a PDT é uma estratégia paliativa apesar de terem resultados promissórios nas fases iniciais dos ensaios clínicos (RAPOZZI; JORI, 2015). Para concluir, fica evidente que mudanças na estrutura química dos fotossensibilizadores e a compreensão dos mecanismos de sensibilização estão contribuindo com avanços na PDT.

1.2. Sistema endolisossomal

1.2.1. Lisossomos e a via endocítica

Estudando enzimas no metabolismo hepático, Christian de Duve, descobriu os lisossomos, estudo pelo qual foi lhe outorgado o prêmio Nobel de Medicina em 1974 (DUVE, 2005). No passado, a degradação e a reciclagem de materiais intracelulares e extracelulares eram as únicas funções atribuídas a estes compartimentos. Atualmente, muitas evidências apontam que os lisossomos são organelas fundamentais para a manutenção da homeostase celular, participando em muitos processos que além da digestão intracelular, incluem o reparo da membrana plasmática, a sinalização celular e o metabolismo lipídico (LAWRENCE; ZONCU, 2019; SETTEMBRE et al., 2013).

Como toda organela integrada com o ambiente intracelular, o lisossomo se conecta com a membrana plasmática através de uma rede de compartimentos conhecida como sistema endolisossomal. Essa comunicação é importante para a manutenção das funções e da estrutura dos lisossomos, já que sem o tráfego dos endossomos, os lisossomos perdem sua integridade e localização celular (BUCCI et al., 2000).

Embora extraordinariamente diversos em formato e em tamanho, a identidade dos endossomos e dos lisossomos é definida pela composição proteica e lipídica das suas membranas, sendo os endossomos caracterizados por sua associação com as Rabs GTPases; enquanto, os lisossomos são caracterizados por apresentarem proteínas glicosiladas como a Proteína 1 de Membrana Associada ao Lisossomo (LAMP1). Além disso, as membranas dos endossomos e dos lisossomos são compostas por fosfoinosítídeos que servem como lipídios sinalizadores (PERRET et al., 2005). É importante mencionar que pela intensa troca de

biomoléculas no sistema endolisossomal, as Rabs, as LAMPs, os fosfoinosítídeos e outras moléculas que compõem os endossomos e os lisossomos, são parcialmente úteis como marcadores moleculares, uma vez que, a maioria delas está associada transitoriamente a um compartimento ou são mantidas por várias etapas até atingirem os lisossomos (HUOTARI; HELENIUS, 2011).

Na endocitose, representada graficamente na **Figura 4**, vesículas endocíticas brotam da membrana plasmática por vias dependentes e independentes de clatrina (MAYOR; PAGANO, 2007). Estas vesículas, carregadas com moléculas da membrana plasmática e do meio extracelular, são transportadas ao interior das células, sendo os endossomos iniciais, de aproximadamente 0.3 μm , os primeiros compartimentos a recebê-las (HELENIUS et al., 1983). A membrana lipídica dos endossomos iniciais é caracterizada pela presença de Rab5 e do fosfatidilinositol 3-fosfato. Estudos com sondas sensíveis ao pH indicam que estes compartimentos têm pH em torno de 5.9 – 6.2 (WANG et al., 2017). Mudanças na morfologia e no perfil lipídico dos endossomos iniciais definem o surgimento dos endossomos tardios com tamanhos entre 0.4 μm e 0.5 μm (FALGUIERES et al., 2008). A troca de Rab5 por Rab7 é uma das características que identificam estes compartimentos, além da presença de fosfatidilinositol 3,5 bifosfato na membrana lipídica e pH em torno de 5.0 – 5.5 (HUOTARI; HELENIUS, 2011). Todas as mudanças que ocorreram desde o início da endocitose tiveram como propósito preparar ao endossomo tardio para que este seja capaz de entregar o seu conteúdo aos lisossomos. Pela falta de consenso na unificação de conceitos, em consequência da assincronia e da heterogeneidade do sistema endolisossomal, diversos modelos têm sido propostos para explicar o mecanismo de transporte das moléculas cargo entre o endossomo tardio e o lisossomo (**Figura 5**) (LUZIO;

PRYOR; BRIGHT, 2007). A melhora das técnicas de microscopia têm sido fundamental no estudo da dinâmica do sistema endolisossomal. Ensaio de captura de imagens realizadas com células vivas sugerem que a troca de conteúdo entre os endossomos e os lisossomos ocorre por eventos de contato transiente e por eventos de fusão e de fissão propostos no modelo de *Kiss and Run* e no modelo híbrido respectivamente (BRIGHT; GRATIAN; LUZIO, 2005). Outras vias podem ter como destino o sistema endolisossomal. De fato, tanto os autofagossomos (compartimentos envolvidos na autofagia) quanto as vesículas derivadas do Golgi se fusionam com os endossomos e os lisossomos (LANGEMEYER; FRÖHLICH; UNGERMANN, 2018). Considerando a ligação inicial do TPPS_{2a} na membrana plasmática e a sua localização no sistema endolisossomal, acredita-se que o FS em estudo seja captado pela célula através da endocitose (BERG et al., 2010).

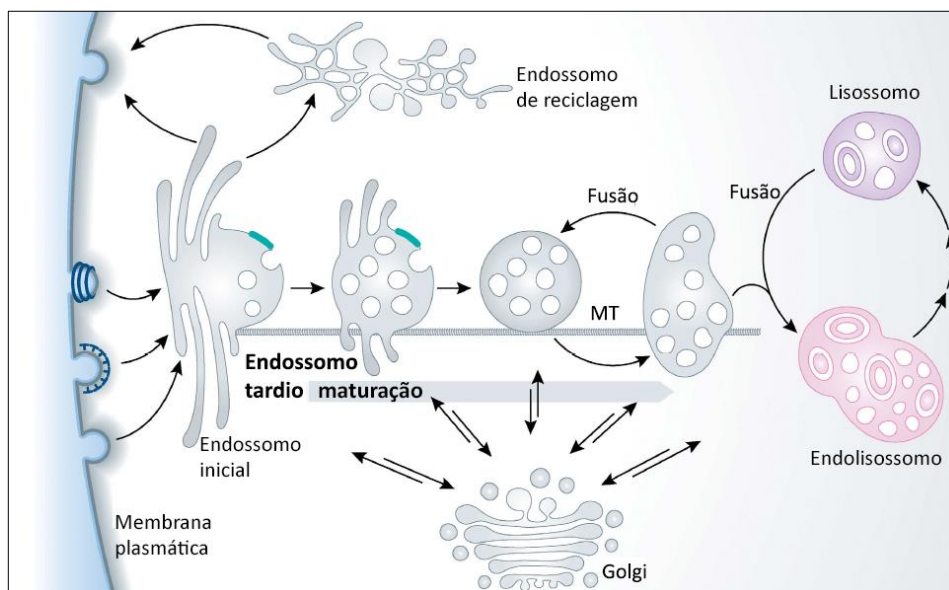


Figura 4. O sistema endolisossomal. Endossomos iniciais recebem as vesículas endocíticas carregadas com moléculas de carga na periferia da membrana plasmática. Após acúmulo no endossomo inicial, as vesículas endocíticas podem ser transportadas aos endossomos de reciclagem que retornam à membrana plasmática. Durante o processo de maturação dos endossomos, mudanças na composição lipídica e proteica dos endossomos iniciais terá como resultado a formação dos endossomos tardios. Além disso, o brotamento interno das membranas dos endossomos gerará vesículas intraluminais que acrescentam moléculas de carga no interior destes compartimentos. Durante o processo de maturação, os endossomos são transportados a regiões próximas ao núcleo por meio de microtúbulos (MT). A fusão de um endossomo tardio com um lisossomo gera uma organela híbrida, o endolisossomo, onde ocorre a degradação das moléculas de carga pela e recuperação seletiva de determinados componentes os lisossomos podem ser reformados. O Complexo de Golgi alimenta a via endocítica, fornecendo vesículas com hidrolases lisossomais sintetizadas no Retículo Endoplasmático. Adaptado de HUOTARI; HELENIUS, 2011.

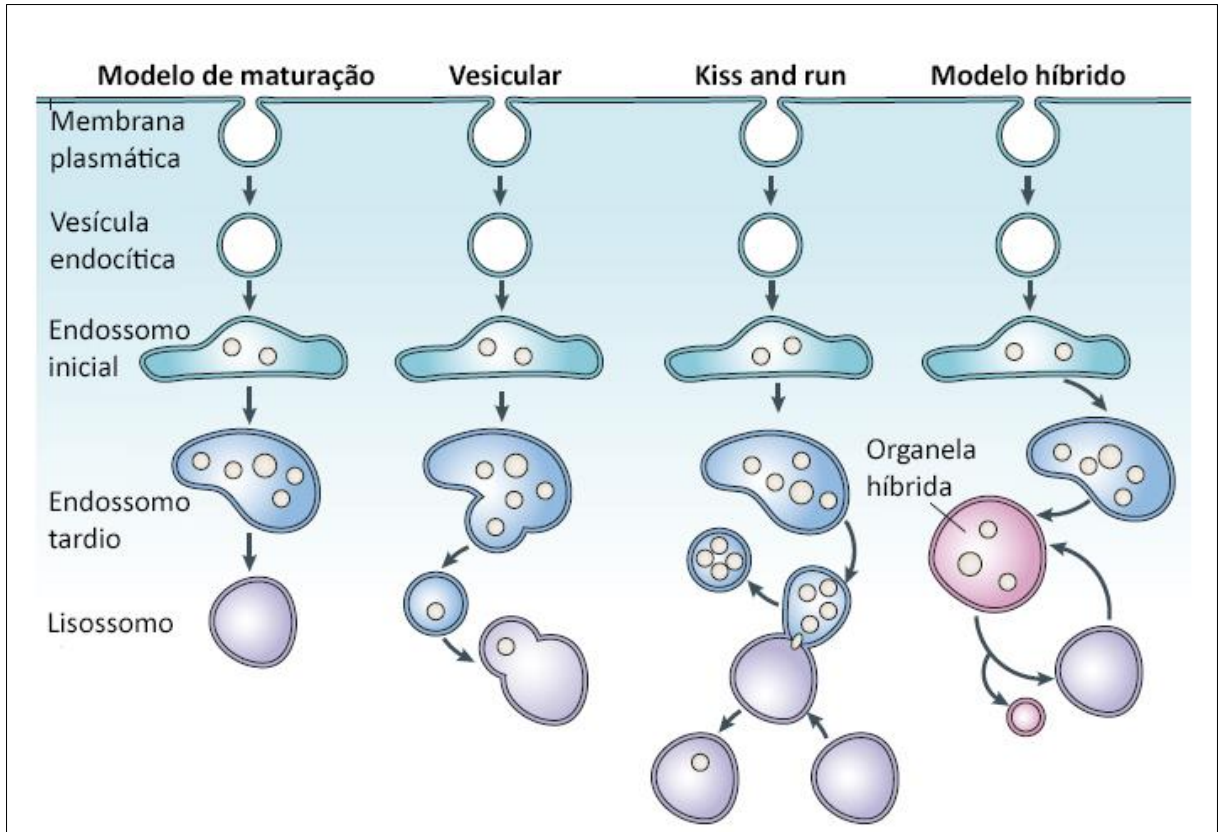


Figura 5. Modelos de transporte de macromoléculas aos lisossomos. A molécula cargo é internalizada na célula por meio de vesículas endocítica que brotam da membrana plasmática. Essas vesículas são transportadas para os endossomos iniciais e depois para os endossomos tardios. Os endossomos tardios entregam as moléculas cargo aos lisossomos a fim de serem degradadas. Diferentes modelos têm sido propostos para explicar como as moléculas cargo são transportadas dos endossomos tardios aos lisossomos. No modelo de maturação, mudanças no perfil lipídico e proteico ocorrem no endossomo tardio, evento que resulta na formação do lisossomo. No modelo vesicular, vesículas que brotam do endossomo tardio são transportadas aos lisossomos. No modelo *Kiss and Run*, o contato transiente (*Kiss*) entre o endossomo tardio e o lisossomo permite a troca de conteúdo e depois da entrega das moléculas cargo ambos os compartimentos se afastam (*Run*). No modelo híbrido, os endossomos e os lisossomos se fusionam formando uma organela híbrida e pela recuperação seletiva de determinados componentes os lisossomos podem ser reformados Adaptado de LUZIO; PRYOR; BRIGHT, 2007.

1.2.2. Os lisossomos e a progressão do câncer

Os lisossomos têm um papel dual na transformação maligna e na progressão para o câncer. Entre as enzimas lisossomais, as catepsinas (CTS) participam numa variedade de processos. Por exemplo, já foi demonstrado que elas participam no processamento de antígenos facilitando a resposta imune adaptativa, além de degradar muitas outras proteínas para manter a homeostase celular (TURK et al., 2012; VASILJEVA et al., 2007). As CTS podem ser divididas em três famílias de proteases: i) de serina (CTSA e CTSG), ii)

aspártato (CTSD e CTSE)) e iii) de cisteína (CTSB, CTSL, CTSC, CTSF, CTSH, CTSK, CTSO, CTSS, CTSV, CTSX e CTSW) (PATEL et al., 2018). As CTSD, CTSB e CTSL são as catepsinas mais abundantes nos lisossomos com concentrações de até 1 mM (TURK; TURK; TURK, 2000). A atividade enzimática destas proteases requer um ambiente ácido. Dai a necessidade dos endossomos e dos lisossomos manterem seu pH interno em torno de 4.5, através da ATPase vacuolar (V-ATPase), que está localizada na membrana destes compartimentos. No entanto, há também catepsinas que permanecem ativas em pH mais próximo a 7 (YADATI et al., 2020).

A liberação de catepsinas no entorno extracelular, por meio da exocitose dos endossomos e dos lisossomos, facilita a migração celular. Diversos relatos descrevem que as catepsinas têm a capacidade de degradar as proteínas da matriz extracelular e as moléculas de adesão. Destaca-se o envolvimento da CSTD na progressão do câncer em múltiplas etapas; porém, essas funções parecem ser independentes da sua atividade proteolítica (LIAUDET-COOPMAN et al., 2006). Estudos sugerem que no meio extracelular o precursor da CSTD teria propriedades análogas às citocinas ou aos fatores de crescimento. Um grupo de pesquisadores da Republica Checa propôs que o precursor da CSTD teria o potencial de se ligar com receptores específicos na superfície celular. Esta interação desencadearia a ativação de vias de sinalização que regulam a expressão de proteínas envolvidas na proliferação, na metástase e na angiogênese tumoral. No modelo sugerido, a via das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) foi considerada como candidata para coordenar este mecanismo pró - tumoral (BENES; VETVICKA; FUSEK, 2008).

Além da CSTD, o aumento da expressão da CSTB tem sido identificado tanto nas células cancerosas quanto nos macrófagos e nos fibroblastos associados aos tumores

(MASON; JOYCE, 2011; MOHAMED; SLOANE, 2006). Interessantemente, já foi evidenciado que a *CTSB* é modulada positivamente por oncogenes. Fibroblastos e células epiteliais transformadas com oncogenes mutantes da família Ras, Src e ErbB2 mostraram incremento na transcrição, na expressão proteica e na atividade enzimática da *CTSB* (FEHRENBACHER et al., 2008; KIM et al., 1998; RAFN et al., 2012; SLOANE et al., 1994). Posteriormente, outras experiências revelaram que mais de uma catepsina pode ser regulada positivamente por oncogenes. Um melhor entendimento sobre as bases moleculares envolvidas na regulação positiva das catepsinas veio de ensaios realizados em células de câncer de mama transformadas com o oncogene mutante ErbB2, onde foi evidenciado que o incremento dos transcritos da *CTSB* e da catepsina L (*CTSL*) não se mostrou dependente da atividade do principal regulador da transcrição de genes lisossomais conhecido como TFEB. De fato, foi identificado que o incremento das catepsinas foi dependente da atividade do fator de transcrição dedo mielóide do zinco 1 (MZF1), o qual é modulado por intermediários da via de ErbB2. Novos questionamentos ficaram em aberto com estes resultados, pois ainda não foi esclarecido se a transcrição de outros genes lisossomais são também dependentes do MZF1 (RAFN et al., 2012).

Considerando os diversos tipos de catepsinas muitas vezes com funções sobrepostas, fica evidente a necessidade de se desenvolver inibidores de amplo espectro para uma terapia eficaz contra o câncer. Os resultados de ensaios em modelo murino de carcinoma pancreático mostraram que o JPM-OEt – um inibidor das cisteína catepsinas permeável às membranas de lipídios – reduziu com eficiência a formação de vasos sanguíneos e o crescimento tumoral. Embora, estes resultados não tenham sido reproduzidos em células metastáticas de câncer de mama (JOYCE et al., 2004). É possível que os achados tenham sido

contraditórios devido às diferenças na biodisponibilidade das drogas nos tecidos (SCHURIGT et al., 2008); porém, não se exclui que as cisteína catepsinas tenham papéis opostos em alguns tipos de câncer (KALLUNKI; OLSEN; JÄÄTTELÄ, 2013).

Contrário ao efeito promotor das catepsinas secretadas no meio extracelular na progressão tumoral, o incremento da expressão e/ou da atividade das catepsinas no lúmen dos endossomos e dos lisossomos pode ter efeitos na supressão de tumores. Principalmente porque a perda da estabilidade das membranas dos lisossomos e dos endossomos resulta no vazamento de catepsinas no citosol, causando a morte celular (FEHRENBACHER et al., 2008).

Vários estudos demonstraram que a permeabilização da membrana do lisossomo (LMP) diminui a sobrevivência das células. Caracterização dos mecanismos de morte celular evidenciou que rupturas parciais das membranas dos endossomos e dos lisossomos ativam a apoptose; enquanto, rupturas completas causam necrose. Interessantemente, relatos indicam que, em resposta a alguns estímulos letais, nem todos os lisossomos são permeabilizados ao mesmo tempo; não obstante, ainda permanece indefinida a causa dessa heterogeneidade (BOYA; KROEMER, 2008). Algumas observações sugerem que o tamanho dos lisossomos influencia na sensibilidade ao dano; sendo os lisossomos de maior tamanho os mais susceptíveis às rupturas (ONO; KIM; HAN, 2003). Resta saber se por causa da LMP o conteúdo total dos lisossomos e dos endossomos vaza ao citosol ou se são liberadas seletivamente certas catepsinas. Diversos estudos da cinética de liberação de proteínas para o meio extra-lisossomal apoiam a hipótese da liberação seletiva. Por exemplo, foi identificado que as catepsinas maduras (ativas), com peso molecular em torno de 40 kDa, são liberadas com antecedência à β -hexosaminidase - uma proteína endolisossomal - com

peso molecular acima dos 200 kDa (BIDÈRE et al., 2003). Ainda não está claro se tal efeito é mediado por transportadores específicos ou se são formados poros proteicos transientes que permitem a liberação de proteínas de um tamanho determinado. Relatos atuais mostraram que as proteínas pró-apoptóticas BAX (Proteína X associada a Bcl-2) e BAK (Assassino/antagonista homólogo a Bcl-2) formam poros na membrana mitocondrial externa, permitindo a liberação de proteínas como o citocromo c (≈ 12 kDa). Além disso, já foi demonstrado que BAX pode se localizar na membrana lisossomal induzindo a permeabilização (FELDSTEIN et al., 2006; KÅGEDAL et al., 2005; UREN; IYER; KLUCK, 2017).

Tem sido sugerido que as membranas dos lisossomos das células cancerosas são especialmente susceptíveis à LMP. Nos lisossomos, a alta taxa de degradação de ferro – proteínas contribuiria com o incremento de ferro livre neste compartimento, facilitando a geração de radicais hidroxilas e a peroxidação lipídica das membranas (EATON; QIAN, 2002). A LMP é induzida por inumeráveis estímulos que incluem o estresse oxidativo e a presença de agentes lisossomotrópicos. Como visto na **Tabela 2**, os fotossensibilizadores que causam dano primário nos lisossomos após ativação podem induzir a ruptura da membrana lisossomal (BOYA; KROEMER, 2008; CARUSO et al., 2004; ICHINOSE et al., 2006).

Tabela 2. Indutores de LMP. Adaptado de BOYA; KROEMER, 2008

Indutor	Exemplos	Mecanismos	Referência
ROS	H ₂ O ₂ , naftazarina, quinonas, fenretinida	Modificação química dos lipídios da membrana lisossomal ?	Terman et al. (2006)
Agentes lisossomotrópicos	Esfingosina, hidroxicloroquina, Detergentes (MSDH, siramesina)	LMP devido a efeitos semelhantes a detergentes.	Kagedal et al. (2001a); Yu et al. (2003); Boya et al. (2003b) Li et al. (2000); Ostenfeld et al. (2005) Boya et al. (2003a)
Lipídios	Ácidos graxos, sais biliares, produtos de oxidação do colesterol, palmitato		Feldstein et al. (2006); Paris et al. (2007) Kagedal
Proteínas da família Bcl-2	Bax	Formação de poros proteicos nas membranas dos lisossomos ?	Kagedal et al. (2005); Feldstein et al. (2006) Werneburg
Caspases	Caspase-9, caspase-8	Degradação de proteínas lisossomais ou efeitos indiretos	Werneburg et al. (2004); Gyrd-Hansen et al. (2006)
Catepsinas	Catepsina B	Degradação de proteínas lisossomais	Werneburg et al. (2002)
Toxinas de microtúbulos	Vincristina, vinorelbina, vinblastina, epotilona B, paclitaxel	Desconhecido	Groth-Pedersen et al. (2007)
Fotodano	NPe6, ATXs10	Membranas dos lisossomos	Xue et al. (2003); Ichinose et al. (2006)
Poifenóis	Resveratrol	Desconhecido	Trincheri et al. (2007)
Receptores	CD3, PHA, TRAIL, TNF- α	Desconhecido	Guicciardi et al. (2000); Heinrich et al. (2004)
Proteínas Lisossomais	LAPF	Poros ?	Chen et al. (2005); Li et al. (2007)
Dano no DNA	p53, camptotecina, etoposídeo	Desconhecido	Emert-Sedlak et al. (2005); Paquet et al. (2005)
Silica	Silica	Desconhecido	Thibodeau et al. (2004); Hamilton et al. (2007)
Toxinas	Veneno de cobra, yesotoxina, crotoxina	Efeito direto nas membranas dos lisossomos ?	Feofanov et al. (2005); Malagoli et al. (2006); Yan

1.2.3. Estabilidade das membranas endolisossomais

Múltiplos compartimentos derivados do brotamento interno das membranas dos endossomos, chamados de vesículas intraluminais, são entregues aos lisossomos. A análise do perfil lipídico mostrou que as vesículas intraluminais estão enriquecidas em fosfolipídios aniônicos denominados bis-(monoacilglicero)-fosfato (BMP), os quais servem como plataforma para facilitar o acesso das lipases e dos cofatores aos substratos (KOLTER; SANDHOFF, 2005). Em 2004, foi demonstrado que a localização da chaperona Hsp70 (Proteína de choque térmico de 70 kDa) nos endossomos e nos lisossomos é necessária para manter a estabilidade das membranas destes compartimentos (NYLANDSTED et al., 2004). Estudos mais recentes reportaram que a proteína Hsp70 tem uma alta afinidade pelo fosfolipídio BMP. Um grupo de pesquisadores liderados por Thomas Kirkegaard questionaram os mecanismos que seriam empregados por esta chaperona para modular a estabilidade das membranas dos endossomos e dos lisossomos (**Figura 6**). Do amplo número de enzimas que existem nestes compartimentos os pesquisadores focaram o estudo na esfingomielinase ácida (ASM, do inglês *Acid sphingomyelinase*) - enzima que degrada a esfingomielina em ceramida - já que relatos anteriores tinham descrito a afinidade entre a ASM e o BMP (LINKE et al., 2001). Os resultados dos ensaios realizados com proteínas recombinantes em lipossomos evidenciaram que concentrações crescentes da proteína Hsp70 (3 nM – 300 nM) incrementam a interação entre a ASM e o BMP, fato que resultou no aumento dos níveis de ceramida; enquanto concentrações da proteína Hsp70 em excesso (750 nM – 1500 nM) competiram com a ASM pela ligação ao fosfolipídio aniônico. Além disso, a inibição farmacológica e genética da ASM em fibroblastos causou uma maior sensibilidade à permeabilização das membranas dos endossomos e dos lisossomos por reações de foto-oxidação, sugerindo-se que o aumento no conteúdo da ceramida, gerado

pelo catabolismo da ASM, poderia ser exportado na membrana circundante e ter um impacto positivo na estabilidade dos compartimentos endolisossomais. Porém, ainda falta saber se a proteína Hsp70 influencia na atividade de outras enzimas, uma vez que cofatores como a proteína ativadora de gangliosídeo GM2 e as saposinas também interagem com o lipídio aniônico e, de maneira similar à ASM, desempenham funções essenciais no catabolismo de esfingolipídios (KIRKEGAARD et al., 2010).

Drogas catiônicas como a Siramesina inibem a atividade da ASM interferindo na atração eletrostática ao BMP, sensibilizando as células à LMP. Testes pré-clínicos mostraram resultados promissores no tratamento de cânceres resistentes à quimioterapia (PETERSEN et al., 2013).

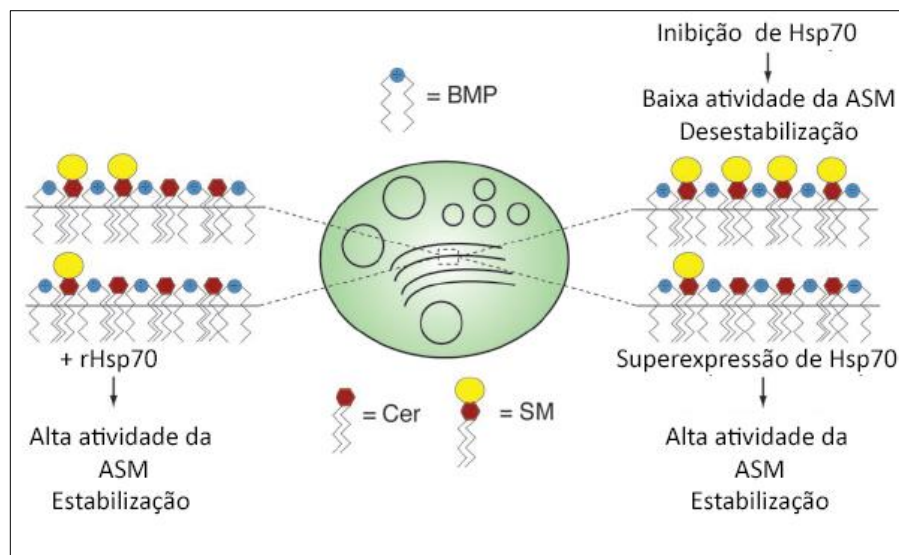


Figura 6. Estabilidade dos endossomos e dos lisossomos mediada por Hsp70. Adição de Hsp70 recombinante (rHsp70) ou superexpressão de Hsp70 em células resulta no aumento da atividade da ASM, o que por sua vez, incrementa o conteúdo de ceramida lisossomal (Cer), fornecendo uma maior estabilidade as membranas dos compartimentos endolisossomais. Caso contrário, a inibição de Hsp70 resulta no aumento do conteúdo de esfingomielina (SM) e na desestabilização das membranas. Adaptado de PETERSEN et al., 2010.

2. OBJETIVOS

Neste estudo investigamos como as células de adenocarcinoma colorretal HT – 29 respondem, após 24 horas da irradiação, ao dano gerado pelo fotossensibilizador meso-tetrafenilporfirina dissulfônado (TPPS_{2a}).

2.1. Objetivo 1

Identificar a base molecular da disfunção dos endossomos e dos lisossomos induzida pelas reações de fotossensibilização mediante a avaliação da expressão de proteínas localizadas no lúmen e nas membranas destes compartimentos.

2.2. Objetivo 2

Avaliar o mecanismo de degradação dos endossomos e dos lisossomos após fotossensibilização e as consequências da disfunção do sistema endolisossomal na autofagia.

2.3. Objetivo 3

Avaliar os efeitos da fotossensibilização no metabolismo de lipídios.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagem celular

A linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano HT – 29 (HTB-38TM) foi doada pelo PhD José Andrés Morgado Díaz (Instituto Nacional de Câncer, RJ, Brasil). As células foram semeadas em garrafas de cultura de 75 cm² e mantidas em estufa a 37 °C e 5 % de CO₂. O meio de cultivo DMEM (Eagle modificado de Dulbecco com alto conteúdo de glicose, Gibco, #12100-038) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB Gibco, #12657-029), 1 % de Piruvato de Sódio (Gibco, #11360-070), 3.7 mg mL⁻¹ de bicarbonato de sódio, 100 U mL⁻¹ de penicilina, 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina e 0.25 µg mL⁻¹ de Anfotericina B (Gibco, #15240-062) foi utilizado na manutenção das culturas celulares.

3.2. Reagentes

Dicloridrato de ácido meso-tetrafenil porfirina dissulfônico (TPPS_{2a}, do inglês *meso-Tetraphenylporphine disulphonic acid dihydrochloride*) em pó foi adquirida da Frontier Scientific (#T40637) e foi solubilizado em tampão 5 mM de Tris-HCl, pH 7.4. Alíquotas de esta solução foram diluídas em metanol e leituras da absorbância no comprimento de onda máximo da banda Soret (λ max = 414 nm) foram utilizadas para determinar a concentração do fotossensibilizador aplicando a Lei de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon lc$$

onde,

A = absorbância

ϵ = coeficiente de extinção molar, 450 x 10³ L mol⁻¹ cm⁻¹

l = comprimento do trajeto ótico

c = concentração do TPPS_{2a} na solução (mol L⁻¹)

Soluções frescas foram feitas em cada experimento.

3.3. Fotossensibilização em células

Para a captação do fotossensibilizador pelas células, o TPPS_{2a}, nas concentrações indicadas em cada experimento, foi acrescentado no meio DMEM suplementado com 10 % de SFB e incubado por 3 horas, segundo as condições descritas no item 3.1 e de acordo com o reportado por (TSUBONE et al., 2017). Posteriormente, o meio foi removido e após duas lavagens com tampão fosfato-salino (PBS), as células foram irradiadas em PBS. O equipamento utilizado foi o irradiador Ethik que possui um arranjo de LEDs com comprimento de onda de 522 nm, potencia média de 8.7 mW cm⁻² e controle de temperatura a 37 °C. O tempo de irradiação foi de 4 minutos contabilizando 2.1 J cm⁻² de energia.

3.4. Ensaio de MTT

Para os ensaios de viabilidade celular, 0.8 x 10⁴ células HT-29 foram semeadas em placas de 96 poços. As células foram mantidas nas condições estabelecidas no item 3.1 até atingir a densidade na faixa de: 1.6 x 10⁴ – 2.0 x 10⁴ células. Nos experimentos, o efeito citotóxico de cada concentração do fotossensibilizador foi avaliado em oito poços, sendo testadas 11 concentrações de TPPS_{2a} (20 nM, 40 nM, 60 nM, 80 nM, 120 nM, 160 nM, 240 nM, 320 nM, 400 nM, 480 nM e 560 nM).

Para avaliar a sobrevivência celular 24 horas após fotossensibilização (item 3.3), as células foram incubadas com meio de cultura contendo 50 µg mL⁻¹ de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio). Após duas horas de incubação a 37 °C e 5 %

de CO₂, o sobrenadante foi retirado e os cristais de formazan formados pela reação de redução do MTT pelas desidrogenases e reductases celulares foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e quantificados pela leitura da absorbância a 550 nm (Infinite M200, Tecan-RChisto).

Uma curva dose – resposta foi construída pelo ajuste dos dados ao modelo logístico de quatro parâmetros. No eixo X, as diferentes concentrações do fotossensibilizador foram transformadas em escala logarítmica e no eixo Y, os dados das leituras da redução do MTT foram transformados em valores percentuais, onde a viabilidade celular de 100 % foi estabelecida a partir da média das leituras correspondentes às células que foram apenas irradiadas com luz a 522 nm, na ausência de pré-incubação com TPPS_{2a}. Para se determinar a citotoxicidade do FS não irradiado, as células foram incubadas por três horas com as mesmas concentrações do FS (20 nM - 560 nM) usadas no ensaio de fotossensibilização, após lavagem e descarte do excesso, foi adicionado meio DMEM fresco e as placas foram mantidas nas condições de uso frequente. Após 24 horas, a sobrevivência celular foi avaliada por meio do ensaio de redução do MTT segundo os procedimentos descritos acima. Dos resultados foi construído um gráfico de barras, em que diferentes concentrações do fotossensibilizador na escala nanomolar foram plotados em função dos dados da redução do MTT transformados em valores percentuais, sendo o 100 % da viabilidade celular estabelecido a partir da média das leituras correspondentes às células que não foram pré-incubadas com o FS. Para análise estatística, os grupos foram comparados utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma via. Nos gráficos foram plotados a média e o desvio padrão de 3 experimentos independentes. A análise estatística e a construção dos gráficos foram realizados no *software* GraphPad Prism 6.

3.5. Ciclo celular

Nos ensaios de avaliação do ciclo celular, 5×10^5 células foram semeadas em placas de 60 mm. Após atingir a densidade na faixa de $10 \times 10^5 - 12 \times 10^5$, as células foram fotossensibilizadas e passadas as 24 horas do experimento, o meio foi removido e o excesso foi retirado por lavagens com PBS (2 x 5 min). As células foram coletadas por tripsinização e centrifugadas a 6.000 rpm por 5 min. Em seguida, o *pellet* foi ressuscitado em solução de etanol gelado 70 % e armazenado a 4 °C. No dia da análise, o *pellet* foi centrifugado e ressuscitado na solução de marcação em PBS composta por 100 mg L^{-1} de RNase e 50 mg L^{-1} de iodeto de propídeo. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37 °C por 30 min em banho seco. No citômetro foram analisados no mínimo 30.000 eventos. Os dados foram processados utilizando o *software* FlowJo™ 10.4.

3.6. Western Blot

Para os ensaios de identificação de proteínas, cerca de 14×10^5 células foram semeadas em placas de 100 mm. Após atingir uma densidade na faixa de $28 \times 10^5 - 30 \times 10^5$ células por placa, estas foram tratadas segundo o procedimento descrito no item 3.3. Após 24 horas de fotossensibilização, o meio de cultura foi removido e foram realizadas duas lavagens com PBS a 37 °C. As células aderidas foram recolhidas por raspagem em 450 μL de tampão de lise a 4 °C [1 % de Triton X-100, 0.5 % de desoxicolato de sódio, 0.2 % de SDS, 150 mM de NaCl, 10 mM de HEPES (pH 7.3), 2 mM de EDTA (pH 7.4), inibidor de proteases (1:500, Sigma-Aldrich, #P8340) e inibidor de fosfatases (1:500, Sigma-Aldrich, #P5726 e #P0044)]. Em gelo, o conteúdo total de cada amostra foi transferido a tubos de 1.5 mL, homogeneizado e, após centrifugação a 4 °C (10.000 rpm, 10 minutos), o sobrenadante foi coletado e estocado a - 80 °C até seu uso. A dosagem proteica do sobrenadante foi realizada

pelo uso do método colorimétrico RC DC™ (Bio-Rad, #5000122) segundo as instruções do fabricante. Após dosagem, as amostras foram diluídas com água livre de nucleases na concentração de $5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ para logo adicionar o tampão de carregamento Laemmli (4x) [277.8 mM de Tris – HCl (pH 6.8), 44.4 % de glicerol (v/v), 4.4 % de SDS (v/v), 0.02 % de Azul de Bromofenol (v/v)] e Ditioneitol na concentração final de 50 mM (DTT , Bio-Rad, #1610611). Seguidamente, as amostras foram denaturadas a 95 °C por 8 minutos no banho seco.

As amostras foram resolvidas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) e transferidas a membranas de PVDF (tamanho de poro: 0.45 μm , GE Healthcare, #10600023). As membranas foram bloqueadas e incubadas por 12 horas a 4 °C segundo as condições especificadas no **Anexo 1**. Após três lavagem com TBST – 0.05 % [20 mM de Tris–HCl (pH 7.6), 150 mM de NaCl e 0.05 % de Tween 20] a temperatura ambiente, as membranas foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário correspondente: anti-rabbit (Millipore AP188P) 1:5000 ou anti-mouse (Millipore AP160P) 1:5000. Transcorrido o tempo, as membranas foram lavadas com TBST – 0.05 % e as proteínas foram visualizadas por quimiluminescência (SuperSignal West Pico PLUS, Thermo Scientific™, #34580) utilizando o fotodocumentador Uvitec Limited (Cambridge, UK). A intensidade das bandas foi quantificada no *software Image J 1.53* (National Institutes of Health, USA).

Para o reaproveitamento das membranas foi utilizado o tampão *Mild stripping* [15 g de glicina, 1 g de SDS, 10 mL de Tween 20, avolumar para 1L de água destilada (pH 2.2)] segundo o protocolo descrito pela Abcam.

3.7. Geração da linhagem HT-29 EGFP- LSGAL3

Placas no formato de 6 poços foram utilizadas na etapa inicial deste experimento. Cerca de 36×10^4 células por poço foram semeadas para, 24 horas depois, serem transfectadas com o plasmídeo pEGFP-hGal3 (Addgene, #73080) utilizando o reagente Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen #L3000015) segundo as instruções do fabricante. Após 48 horas da transfecção, as células com expressão do plasmídeo pEGFP-hGal3 foram selecionadas pela adição do meio DMEM contendo 800 mg L^{-1} de geneticina (G418; Gibco #11811031) e 10 % de SFB. As células foram mantidas durante três semanas sob pressão seletiva, sendo o meio trocado a cada 72 horas. As transfecções chamadas de HT-29 pEGFP - LSGAL3 foram expandidas (DMEM + 10 % SFB + 400 mg L^{-1} de G418) em garrafas de cultura de 25 cm^2 e subcultivadas por quatro passagens.

3.8. Imunofluorescência

Sob condições padrões de cultura, 8×10^4 células HT-29 pEGFP - LSGAL3 foram crescidas em câmeras Lab-Tek® II com fundo de lâmina em vidro borossilicato (Thermo Scientific™, #155382). Após 24 horas de fotossensibilização, as amostras foram fixadas em paraformaldeído (PFA) gelado 4 % por 15 minutos. O PFA foi removido e, após lavagens com tampão fosfato salino (PBS, 2 x 5 min), as células foram incubadas a temperatura ambiente durante 20 min com o tampão de marcação composto de 0.1 % de Saponina, 3 % de soro fetal bovino em PBS (pH 7.4). No processo de marcação celular, o anticorpo primário LAMP1 (D2D11) XP® Rabbit (Cell Signaling, mAb #9091) diluído no tampão descrito anteriormente (1:500) foi adicionado às amostras e incubado por 12 horas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ com agitação constante. Após, lavagens com PBS (3 x 5 min), as células foram incubadas por uma hora com o anticorpo secundário anti-*rabbit* IgG H&L Alexa Fluor® 647 (abcam, #ab150083) diluído no

tampão de marcação (1:500 , temperatura ambiente e agitação constante). O excesso de anticorpo secundário foi retirado por lavagens com PBS (3 x 5 min). A seguir, as células foram delimitadas pela marcação com faloidina conjugada ao fluoróforo Alexa Fluor® 555 (Invitrogen, #A34055) segundo as instruções do fabricante. No final do procedimento, os núcleos foram marcados com Hoechst 33342 (0.001 g L⁻¹ em PBS, Invitrogen #H1399). As imagens foram capturadas em PBS no microscópio confocal Zeiss LSM 710 equipado com a objetiva de 63x de imersão em óleo (Plan Apochromat NA 1.4).

Em cada grupo experimental, no mínimo 15 imagens (\approx 35 células por imagem) foram processadas no software Image J 1.53 (National Institutes of Health, USA). Para a detecção dos *dots* de LSGAL3 foi gerada uma máscara binária com o auxílio da ferramenta MorphoLibJ (LEGLAND; ARGANDA-CARRERAS; ANDREY, 2016), segundo os parâmetros reportados em KILCHRIST et al., 2019. Em cada imagem, o número total de *dots* foi dividido pelo número de células (núcleo), o qual foi determinado pelo estabelecimento de um limiar de fluorescência (valores: 161 e 232) no canal de Hoechst seguido do preenchimento de espaços (*Fill Holes*), a segmentação por *Watershed* e a quantificação de partículas. Macros foram gerados para automatizar a quantificação dos *dots*. A co-localização entre os *dots* de LSGAL3 e a proteína LAMP1 foi realizada com o uso da ferramenta JACoP (BOLTE; CORDELIERES, 2006).

3.9. Marcação dos lisossomos (Lysoview)

Nos ensaios de marcação com o fluoróforo Lysoview, cerca de 5×10^5 células foram semeadas em placas de 60 mm. Após atingir uma densidade na faixa de $10 \times 10^5 - 12 \times 10^5$, as células foram fotosensibilizadas e, após 24 horas, o meio foi removido e o excesso foi retirado por lavagens com PBS (2 x 5 min). As células foram coletadas por tripsinização e centrifugadas a 6.000 rpm por 5 min até formar um *pellet*. O excesso de tripsina foi

neutralizado com 4 mL de meio DMEM suplementado com 10 % de SFB. Em seguida, foram feitas duas marcações consecutivas, cada uma delas em 500 µL de meio de uso frequente sem vermelho de fenol. Para diferenciar células viáveis e inviáveis, o marcador LIVE/DEAD™ Fixable Violet (Thermo Fisher Scientific, #L34955, Ex. 405 nm) na concentração final de 1 % (v/v) foi adicionado nas amostras e incubado por 30 min a 37 °C e 5 % de CO₂. Culminada esta marcação, após centrifugação, o corante LysoView™ 633 (Biotium, #70058) na concentração final de 0.2 % (v/v) foi adicionado ao meio de cultura. Foram analisados 50.000 eventos no citômetro e o processamento dos dados foi realizado no *software* FlowJo™ 10.4.

3.10. Marcação dos corpúsculos lipídicos (BODIPY 493 / 503)

As células foram semeadas, fotosensibilizadas, tripsinizadas e coletadas segundo descrito no item **Marcação dos lisossomos (Lysoview)**. Para diferenciar células viáveis e inviáveis, o marcador LIVE/DEAD™ Fixable Violet (Thermo Fisher Scientific, #L34955, Ex. 405 nm) em 500 µL de meio de cultura e na concentração final de 1 % (v/v) foi adicionado nas amostras e incubado por 30 min a 37 °C e 5 % de CO₂. Culminada esta marcação, após centrifugação e retirada do excesso por meio de uma lavagem com PBS (5 min), as células foram fixadas com PFA 4% por 10 minutos. Transcorrido o tempo, o PFA foi removido e após lavagens com tampão fosfato salino (PBS, 2 x 5 min), as células foram incubadas com BODIPY 493/503 por 10 minutos em PBS a temperatura ambiente. Após marcação, no mínimo 30.000 eventos foram analisados no citômetro de fluxo. Os dados foram processados no *software* FlowJo™ 10.4.

Células carregadas com oleato (Sigma, #268046, CAS 112801) foram utilizadas no grupo controle. Para o preparo do estoque de carregamento em meio de cultura, 1.77 mM de ácido oleico em etanol foi complexado com BSA livre de ácidos graxos (Sigma, A7030) na

razão 6:1. Imediatamente após o preparo, a solução foi homogeneizada, incubada por 12 horas a 24 °C com agitação constante e armazenada a 4 °C até seu uso. Para sincronizar as células, 16 horas antes do carregamento, as culturas foram privadas de soro. Antes do uso, a solução estoque de ácido oleico/BSA foi homogeneizada e incubada a 24 °C por 1 hora com agitação constante para só então ser acrescentada ao meio de cultura usual na concentração final de 400 µM.

3.11. Extração de RNA e quantificação dos transcritos por qRT-PCR

Em placas de 60 mm foram semeadas 5×10^5 células. Após atingir a densidade na faixa de $10 \times 10^5 - 12 \times 10^5$, as células foram fotossensibilizadas segundo descrito no item **Fotossensibilização em células**. Após 24 horas, o meio de cultura foi removido e depois de duas lavagens com PBS (2 x 5 min) a 37 °C, as células aderidas foram recolhidas por tripsinização, sendo o excesso neutralizado com 4 mL de meio DMEM suplementado com 10 % de SFB e centrifugadas a 6.000 rpm por 5 min. Os *pellets* foram lavados com PBS (2 x 5 min) e estocados a – 80 °C até seu uso.

No dia do isolamento do RNA, os *pellets* foram descongelados em gelo e o RNA foi extraído mediante o uso do kit PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen™, #12183025) e tratado com DNase (PureLink DNase, Invitrogen™, #12185010). Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Amostras de RNA ressuspensas em água ultrapura livre de nucleases foram quantificadas por espectrofotometria no NanoDrop® OneC (Thermo)®. A quantificação da concentração de RNA foi realizada por leituras da absorbância nos comprimentos de onda de 260 nm e de 280 nm. Após leitura, amostras de RNA com razões $A_{260}/A_{280} \approx 2.0$ foram selecionadas e diluídas em água ultrapura livre de

nucleases (100 mg L^{-1}) e submetidas à reação da transcriptase reversa (RT do inglês *Reverse Transcriptase*) para a obtenção do cDNA (DNA complementar) segundo o procedimento fornecido no kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems™, #4368814). O cDNA foi armazenado a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ até seu uso. Os ensaios de qPCR (PCR quantitativo em tempo real) foram conduzidos em placas de 96 poços, em que 100 ng do cDNA foram amplificados com oligonucleotídeos específicos (**Anexo 2**) para os genes *ASAH1*, *GAPDH*, *HMGCR*, *LAMP1*, *LAMP2*, *LPCAT2*, *NFE2L2* (*NRF2*) na presença de sondas TaqMan caracterizadas por apresentar na extremidade 5' um fluoróforo (Amidita de fluoresceína, FAM) e na outra extremidade um *quencher*. Quando a sonda TaqMan está intacta, a proximidade do *quencher* reduz a fluorescência do FAM por transferência de energia de ressonância. O alinhamento do oligonucleotídeo numa sequência específica do DNA complementar e, em seguida, o processo de extensão cliva a sonda TaqMan devido à atividade exonuclease 5'→3' da DNA polimerase, separando o *quencher* da molécula fluorescente, o que resulta no aumento da fluorescência proporcional à quantidade de produtos amplificados. Os reagentes usados nas reações de RT - PCR foram adquiridos da Applied Biosystems (TaqMan™ Gene Expression Master Mix, #4369016) e os experimentos foram conduzidos no termociclador QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os parâmetros de ciclagem térmica utilizados foram: ativação da enzima a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10min, seguido de 40 ciclos de: desnaturação a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15s e anelamento / extensão a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1min. Os dados foram analisados no software QuantStudio™ v 1.7.1. A expressão dos genes foi normalizada pela expressão do gene *GAPDH* e os níveis de mRNA relativos foram calculados usando o método de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4. RESULTADOS

4.1. Base molecular da disfunção lisossomal

4.1.1. Desenho experimental

Nos experimentos executados ao longo deste trabalho foram incluídos três controles baseados na ausência ou na presença das variáveis fotossensibilizador “FS” e “luz”. O primeiro controle foi denominado controle basal e nele as células não foram expostas a nenhuma das variáveis experimentais. A seguir, no controle escuro, as células foram apenas expostas ao “FS” (incubação com TPPS_{2a} por três horas); enquanto, no controle claro, as células - na ausência de pré-incubação com TPPS_{2a} - foram irradiadas com luz no comprimento de onda de 522 nm (\approx 4 minutos). Por último, no grupo FS ativado, as células foram pré-incubadas com TPPS_{2a} e posteriormente irradiadas, permitindo na presença do FS e da luz a ocorrência de reações de oxidação.

4.1.2. Fototoxicidade celular

Em 2017, numa pesquisa precedente do grupo, foi demonstrado que a fotossensibilização com TPPS_{2a} causa dano nos lisossomos e induz morte com bloqueio autofágico em células HeLa, uma linhagem de adenocarcinoma cervical (TSUBONE et al., 2017).

Favorecido por sua propriedade anfifílica, este fotossensibilizador (FS) se liga na membrana plasmática e acredita-se que a sua captação e localização intracelular nos endossomos e nos lisossomos segue a via endocítica. De fato, fotossensibilização com TPPS_{2a} é utilizada na Internalização Fotoquímica, metodologia também conhecida como PCI (do inglês *Photochemical Internalization*), que permite a liberação intracelular de uma grande

variedade de moléculas através do vazamento específico dos lisossomos (BERG et al., 2010). Não obstante, apesar de se conhecer as propriedades fotofísicas e fotoquímicas do TPPS_{2a}, bem como, a sua localização intracelular, ainda não tinha sido identificada a base molecular do dano nos endossomos e nos lisossomos.

Nas etapas iniciais desta pesquisa foi necessário determinar a concentração de trabalho do fotossensibilizador em células de adenocarcinoma colorretal HT-29. Portanto, após 24 horas de fotossensibilização avaliamos a sobrevivência celular usando o ensaio de MTT. Como apresentado na **Figura 7A** nota-se que o TPPS_{2a} no escuro não foi citotóxico nas concentrações utilizadas; porém, após irradiação, com o aumento da concentração do FS (20 nM - 560 nM) houve diminuição da viabilidade celular (**Figura 7B**). A dose letal escolhida para darmos seguimento ao estudo foi a concentração do TPPS_{2a} necessária para reduzir em 30 % a sobrevivência celular (DL₃₀; 148 nM).

Já foi reportado que espécies oxidantes geradas pelas reações de fotossensibilização podem causar alterações na dinâmica do ciclo celular (ABRANTES et al., 2019). Para avaliar os efeitos da fotoativação do TPPS_{2a} na progressão do ciclo celular, analisamos pelo citômetro de fluxo a distribuição de células HT - 29 nas fases: G1 (preparação para a divisão), S (síntese de DNA) , G2 (preparação para a mitose) e M (mitose) do ciclo celular. Este acompanhamento foi realizado mediante a marcação de células com Iodeto de propídeo (PI), uma molécula que emite fluorescência de maneira proporcional ao conteúdo de DNA (AWTAR, 1975). Como mostrado na **Figura 8**, a fotossensibilização com TPPS_{2a} não altera a porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular e, por conseguinte, parece não afetar a progressão deste nas condições investigadas.

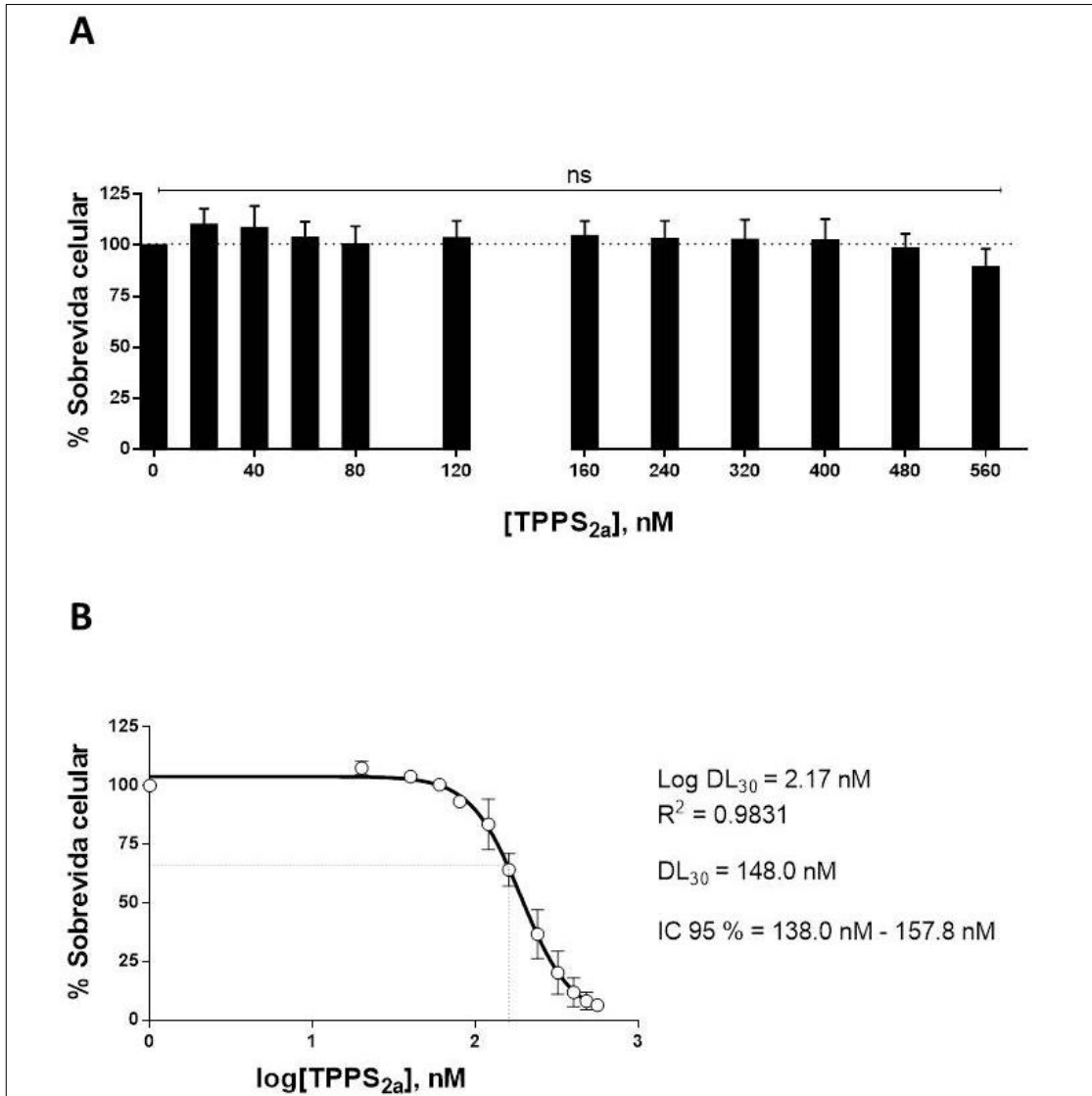


Figura 7. Determinação DL₃₀ em células HT-29. Diferentes concentrações de TPPS_{2a} (20 nM - 560 nM) foram testadas. Após 24 horas de irradiação, a sobrevida celular (%) foi determinada pelo ensaio de redução do MTT. **(A) TPPS_{2a} no escuro.** As médias da porcentagem de sobrevida celular entre os grupos não mostraram diferenças, ns: não significativo (ANOVA de uma via; $p = 0.3772$). Os gráficos representam a média e o desvio padrão de 3 experimentos independentes. **(B) Fototoxicidade do TPPS_{2a} após fotosensibilização.** Na curva dose – resposta (logaritmo das concentrações de TPPS_{2a} vs. % da sobrevida celular), o modelo logístico de quatro parâmetros foi utilizado no ajuste da curva ($R^2 = 0.9831$). O intervalo de confiança de 95 % (IC 95%) foi de 138 nM e 157.8 nM para o limite inferior e o limite superior respectivamente.

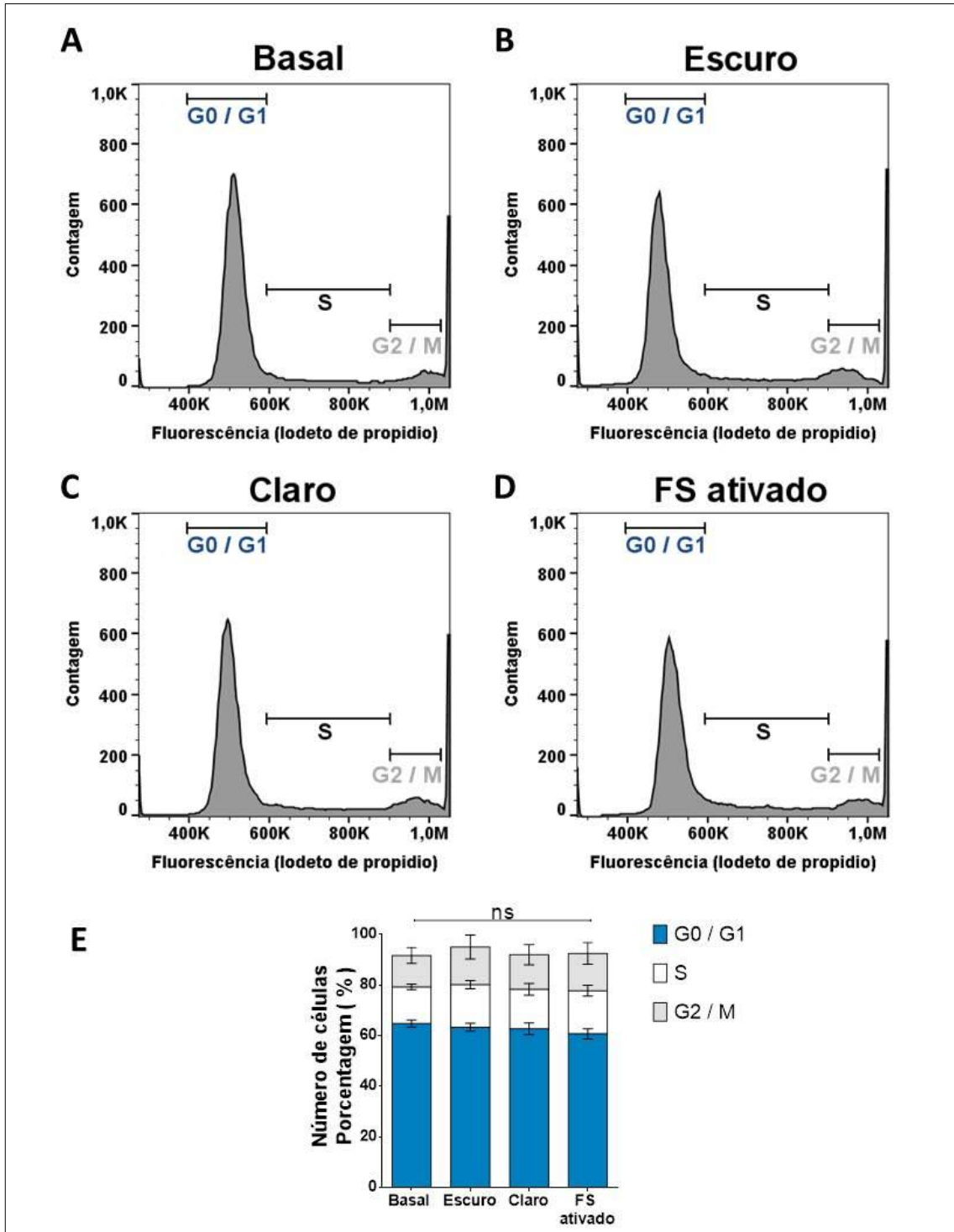


Figura 8. Análise do ciclo celular. Histogramas representativos da análise do ciclo celular pelo citômetro de fluxo após 24 horas de fotossensibilização: **(A)** Basal **(B)** Controle escuro **(C)** Controle claro **(D)** FS ativado. **(E)** Porcentagem de células em G0/G1, S e G2/M. O gráfico mostra a média e o desvio padrão de 3 experimentos independentes. ANOVA de uma via e teste Dunnett *post hoc* foram aplicados para a análise de cada fase do ciclo celular. ns: não significativa.

4.1.3. Modulação negativa das catepsinas

Para investigar a base molecular do dano nos endossomos e nos lisossomos, quantificamos a expressão das catepsinas - enzimas residentes nestes compartimentos - que têm como função degradar diversos substratos (TURK et al., 2012). Para esta análise, foram escolhidas as catepsinas A, D e B, categorizadas respectivamente nas famílias das serina proteases, aspartil proteases e cisteína proteases (YADATI et al., 2020).

Como reportado em diferentes estudos; as catepsinas são sintetizadas na forma de precursores inativos no Retículo Endoplasmático (RE), local onde terá início, co-traducionalmente, o processo de glicosilação. Posteriormente, durante a sua passagem pelo Complexo de Golgi, as pró-catepsinas glicosiladas serão marcadas com a manose 6 – fosfato (M6P) a fim de facilitar o seu reconhecimento por receptores específicos na rede *trans* de Golgi. Em seguida, vesículas revestidas de clatrina - que brotam da rede *trans* de Golgi - transportam os precursores das catepsinas para os endossomos e os lisossomos. Uma vez, no lúmen dos endossomos e dos lisossomos, o processamento dos pró-peptídeos resultará na geração das catepsinas maduras (enzimaticamente ativas). Embora, esta via de tráfego vesicular é um caminho frequente no endereçamento de proteínas dirigidas para os compartimentos endolisossomais, alguns receptores de M6P escapam desta rota e seguem para a membrana plasmática, onde recapturam os pró-peptídeos que foram secretados no meio extracelular e os devolvem aos lisossomos mediante a endocitose (BRAULKE; BONIFACINO, 2009).

Para os ensaios de expressão de catepsinas, proteínas separadas por eletroferese em gel de poliacrilamida-SDS foram transferidas para membranas de PVDF (fluoreto de polivinilideno). Como podemos observar na **Figura 9A**, a incubação das membranas com um anticorpo específico para a forma precursora da catepsina A (CTSA), depois do revelado,

identificou o pró-peptídeo desnaturado que foi visualizado como uma banda única com peso molecular aproximado de 54 kDa. A análise densitométrica da intensidade da banda da pró-CTSA nas distintas amostras, indicou que a expressão da forma precursora desta catepsina nas células fotossensibilizadas teve seus níveis diminuídos quando comparados aos controles experimentais ($\approx 70\%$) (**Figura 9B**). A falta de especificidade do anticorpo pela forma madura impossibilitou esclarecer se essa redução foi devido a uma diminuição na sua síntese ou pelo aumento no processamento para gerar a forma ativa da CTSA nos endossomos e nos lisossomos.

No caso da catepsina D (CTSD) o anticorpo teve especificidade para identificar as proteínas tanto na sua forma precursora quanto na sua forma madura. A marcação das membranas com o anticorpo para a CTSD permitiu confirmar a expressão da forma ativa de esta catepsina nas amostras (28 kDa); porém, a análise comparativa da intensidade das bandas mostrou que, nas células fotossensibilizadas, essa expressão teve uma redução de 55% em relação aos grupos controle (**Figura 9A – 3D**). Consistente com essa diminuição significativa, a forma precursora da CTSD representada com uma banda de 48 kDa mostrou um aumento na sua expressão de até 4 vezes, sugerindo que esse incremento foi consequência da falta de maturação da pró - CTSD nas células fotossensibilizadas. Em experimentos semelhantes, a incubação das membranas com o anticorpo para detectar a CTSD tanto na sua forma madura quanto na sua forma precursora, apontou que a expressão da CTSD segue o padrão de expressão proteica notado nas membranas marcadas com CTSD, observando-se nas células fotossensibilizadas um aumento de 2.4 vezes na expressão da pró - CTSD (44 kDa); enquanto que, paralelamente foi calculada uma redução de 52% na expressão da CTSD madura. Como apresentado na **Figura 9E** esta catepsina na forma ativa tem duas subunidades visualizadas como bandas de 24 kDa e 27 kDa. Interessantemente, a

suscetibilidade das cisteínas da CTSB ao estresse oxidativo já foi reportado em modelos celulares expostos a espécies reativas de oxigênio geradas por UVA e por endoperóxidos (LAMORE; WONDRAK, 2012; NAGAOKA et al., 2005).

Com o propósito de determinar se a redução no processamento das catepsinas também teria ocorrido nas primeiras horas após irradiação foram avaliados os níveis proteicos da CTSD em distintos tempos (0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h). Os resultados, apresentados na **Figura 10**, mostraram que a menor quantidade de CTSD madura (28 kDa) foi atingida 24 h após fotossensibilização. A análise densitométrica da intensidade das bandas indicou que entre as 4 h e as 8h após irradiação houve uma redução de 30 % na quantidade de CTSD ativas, não se encontrando diferenças na análise realizada em células coletadas 2 horas após irradiação. Como demonstrado em experimentos anteriores, além da forma madura da CTSD, foi também identificada a expressão da forma precursora (banda de 48 kDa). A análise densitométrica confirmou o incremento de 8 vezes na expressão da pró-CTSD após 24 horas de irradiação. Além disso, não foram identificadas diferenças significativas na expressão do pró-peptídeo nas oito primeiras horas após foto-oxidação; porém, apesar de não ter sido estatisticamente diferente, a partir das 6 h foi notado um incremento de 1.5 vezes na expressão da pró-CTSD. Estes dados indicam que as reações foto-oxidativas afetam o processamento da CTSD gradualmente, resultando na menor expressão de CTSD madura após 24 horas de irradiação.

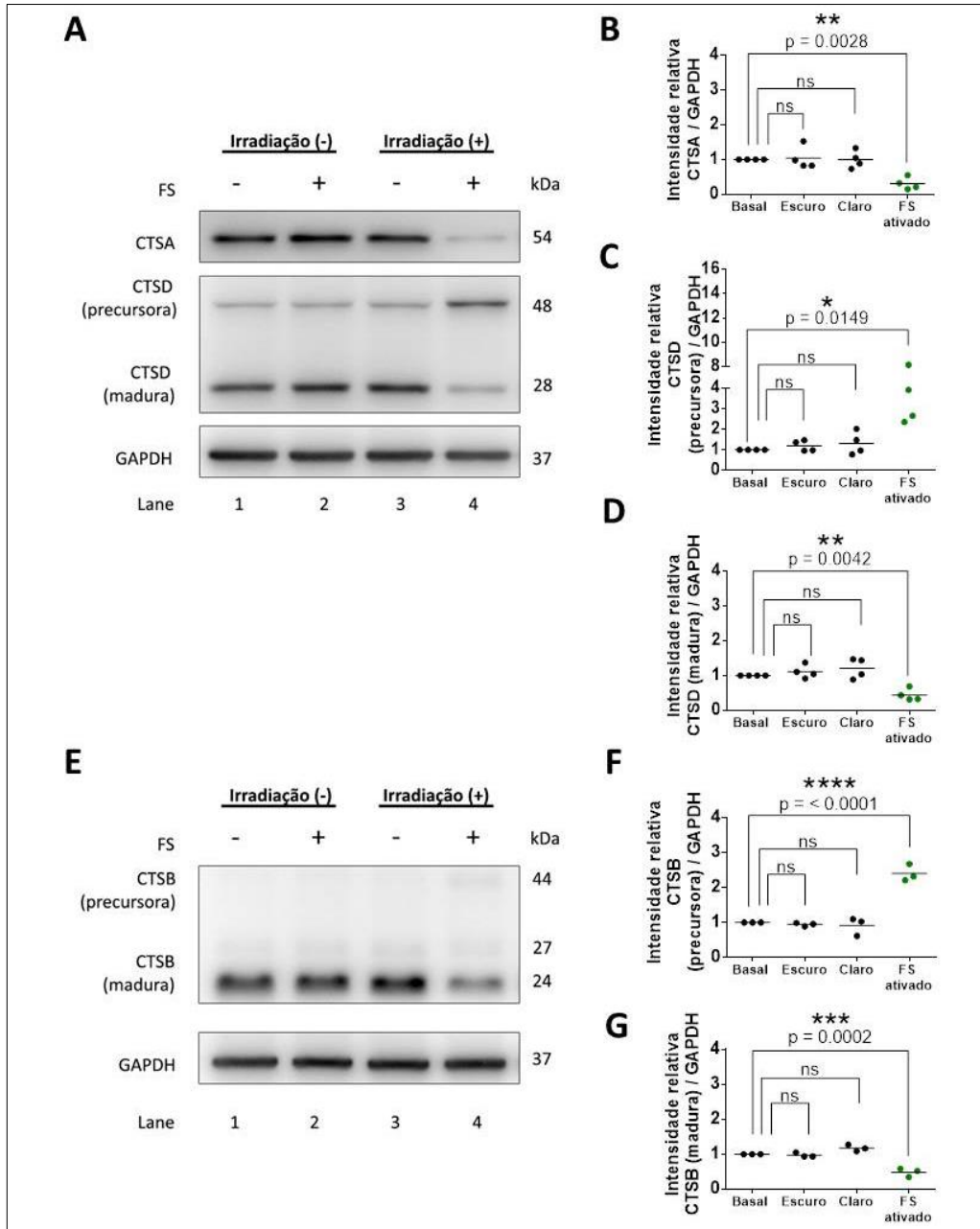


Figura 9. Maturação das catepsinas. Lisado celular de amostras coletadas após 24 horas de fotossensibilização foram analisados por *Western blot* usando anticorpos para a catepsina A (CTSA), catepsina D (CTSD) e catepsina B (CTSB). Os números na parte inferior das membranas indicam a ordem das amostras: 1 – Basal, 2 – Controle escuro, 3 – Controle claro, 4 – FS ativado. **(A)** Na esquerda superior pode se observar que após irradiação a forma madura da CTSD (28 kDa) teve seus níveis proteicos diminuídos, achado concomitante com o acúmulo da forma precursora (48 kDa). O reaproveitamento das membranas para a detecção do precursor da CTSA (54 kDa) mostrou que houve uma redução significativa na sua expressão após fotossensibilização. **(E)** Na esquerda inferior, marcação das membranas com um anticorpo específico para a CTSB evidenciou que os níveis proteicos de esta catepsina seguem a mesma tendência de expressão observada na CTSD. Em todos os ensaios, a expressão de GAPDH (37 kDa) foi utilizada como controle de carregamento. **(B – D; F – G)** Na direita, gráficos plotados com os dados da quantificação da intensidade das bandas correspondentes as catepsinas (forma precursora e madura) relativa à intensidade da banda da proteína GAPDH. Os resultados de cada grupo foram normalizados pelo controle basal. Os gráficos de dispersão mostram a média aritmética de pelo menos três experimentos independentes. Para as comparações foi utilizada a análise ANOVA de uma via e teste Dunnett *post hoc* (**** $p \leq 0.0001$; *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$, não significativo (ns) $p > 0.05$).

Motivados pela redução na maturação da CTSB e da CTSD, posterior ao estresse oxidativo desencadeado pelas reações de fotossensibilização, decidimos avaliar as consequências de um menor número de catepsinas ativas nas células, caracterizando a expressão de proteínas relacionadas a elas. Revisão da literatura permitiu identificar a prosaposina (PSAP), uma glicoproteína que com o auxílio da CTSD gera saposinas, as quais são requeridas na hidrólise dos esfingolipídios (HAIDAR et al., 2006).

Em primeiro lugar, a análise do *immunoblot* revelou que a PSAP apresenta pesos moleculares entre 60 kDa a 70 kDa (**Figura 11**). A faixa de peso molecular indicou que, em células HT-29, a PSAP é uma proteína que possui diferentes graus de glicosilação como já demonstrado por YONESHIGE et al., 2009. Além disso, como esperado, avaliação densitométrica das bandas mostrou que nas células fotoativadas a redução da expressão da CTSD não facilitou a maturação das prosaposinas, o que, em consequência, levou ao seu acúmulo, calculando-se valores 7 vezes maiores do que os registrados para as células dos grupos controle. Ensaio posteriores com a finalidade de verificar a depleção das saposinas nas células fotossensibilizadas serão necessários; no entanto, nossos resultados sugerem que as reações de oxidação causadas pelo TPPS_{2a} podem causar o acúmulo de glicoesfingolipídios nos endossomos e nos lisossomos, mimetizando o fenótipo observado na doença de armazenamento lisossomal Niemann-Pick tipo C (**Figura 11**).

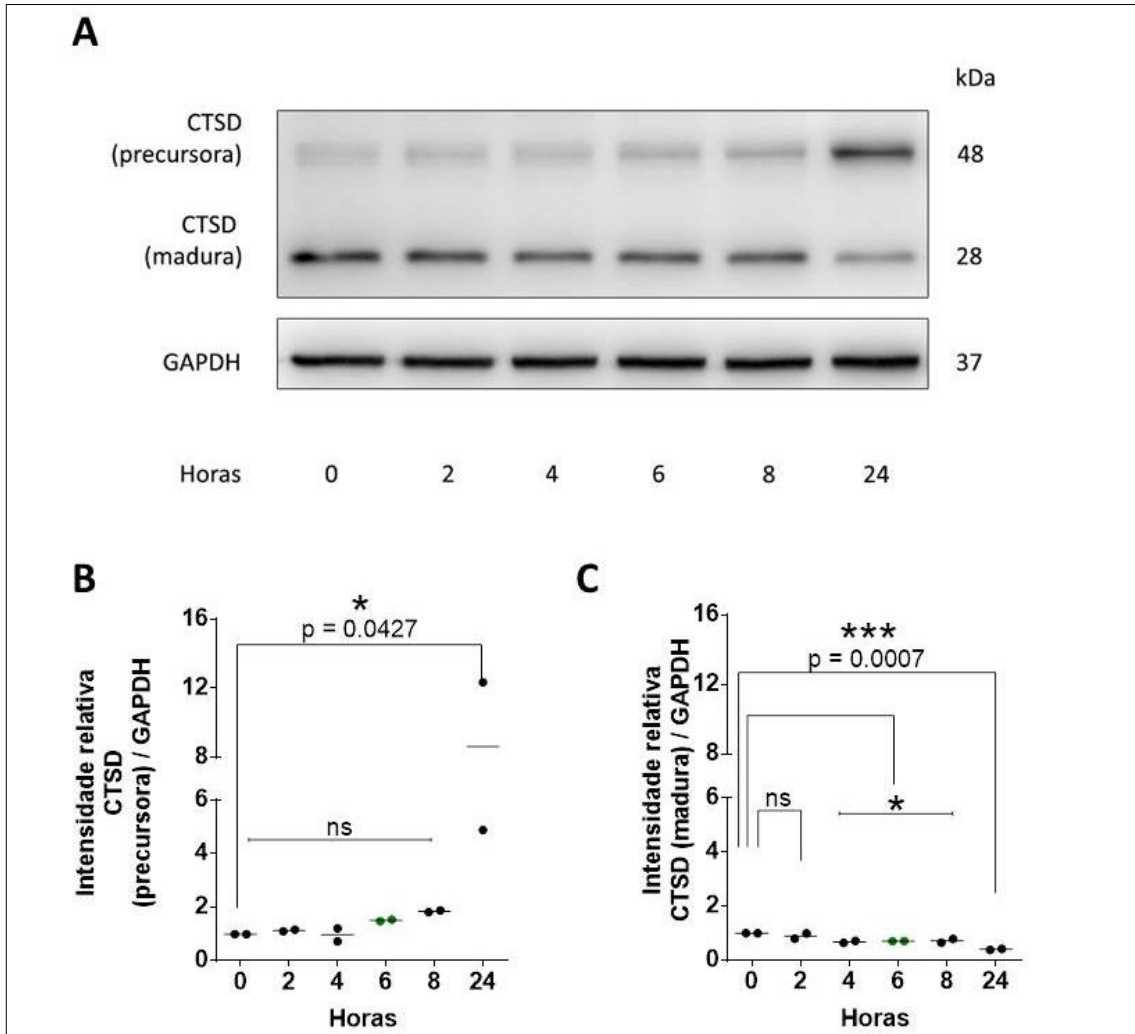


Figura 10. Cinética da expressão da Catepsina D. Lisado celular de amostras coletadas após 2 h, 4 h, 6 h, 8 h e 24 h de irradiação foram analisados por *Western blot* usando anticorpo específico para a catepsina D (CTSD). O tempo zero refere-se às células coletadas no início de cada ensaio e que não foram nem irradiadas nem incubadas com TPPS_{2a}. **(A)** Membrana representativa onde pode se observar que após fotossensibilização a forma madura da CTSD (28 kDa) teve seus níveis proteicos diminuídos. A análise densitométrica mostrou que a menor quantidade de CTSD ativas foi atingida após 24 h de irradiação. Na faixa de tempo entre as 4 h e as 8 h foi calculada uma redução de 30 % na quantidade de CTSD ativas, não se encontrando diferenças na análise realizada em células coletadas após 2 horas de irradiação. Além da forma madura da CTSD, na membrana foi identificada a expressão da forma precursora (48 kDa). Densitometria da intensidade das bandas indicou que a pró-CTSD apresenta um acúmulo significativo só após 24 horas de irradiação. **(B-C)** Quantificação da intensidade das bandas correspondentes à CTSD (forma precursora e madura) relativa à intensidade da banda da proteína GAPDH (37 KDa). Os dados de cada grupo foram normalizados pelos dados das células coletadas no tempo zero. Os gráficos de dispersão mostram a média aritmética de dois experimentos independentes. Para as comparações foi utilizada a análise ANOVA de uma via e teste Dunnett *post hoc* (***) $p \leq 0.001$; * $p \leq 0.05$, não significativo (ns) $p > 0.05$).

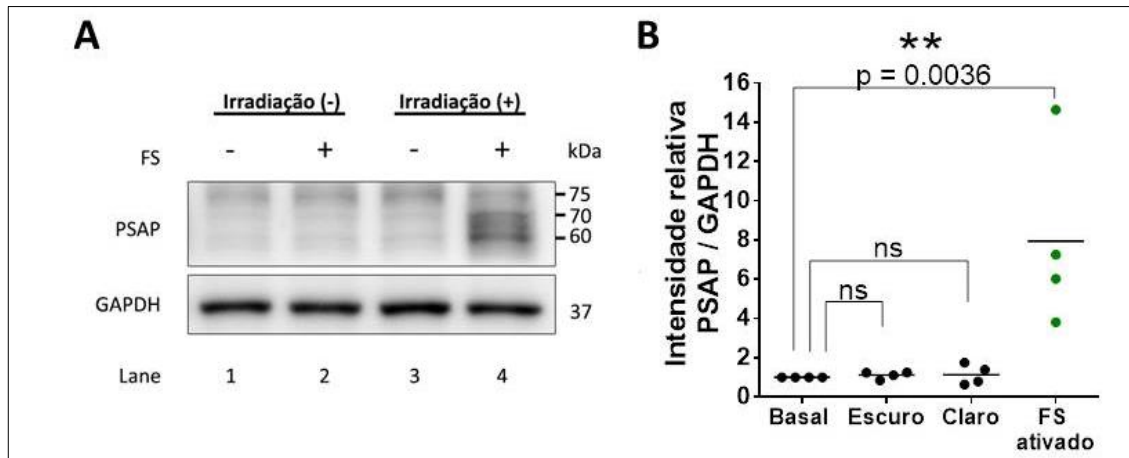


Figura 11. Expressão proteica da Prosaposina (PSAP). (A) Membrana representativa da análise por *Western blot* de amostras coletadas após 24 horas de fotossensibilização. Os números na parte inferior das membranas indicam a ordem das amostras: 1 – Basal, 2 – Controle escuro, 3 – Controle claro, 4 – FS ativado. A imagem mostra que a ativação do TPPS_{2a} em células HT – 29 resultou no aumento dos níveis proteicos da PSAP visualizadas com bandas de 60 kDa e 70 kDa. A expressão de GAPDH (37 kDa) foi utilizada como controle de carregamento. (B) Os gráficos de dispersão mostram a média aritmética de pelo menos três experimentos independentes. Os dados de cada grupo foram normalizados pelo controle basal. Para as comparações foi utilizada a análise ANOVA de uma via e teste Dunnett *post hoc* (** $p \leq 0.01$; não significativo (ns) $p > 0.05$).

Posteriormente, nos perguntamos se as proteínas transmembrana altamente glicosiladas LAMP1 e LAMP2 localizadas preferencialmente nas membranas dos endossomos tardios e nos lisossomos (FUKUDA, 1991; TAN et al., 2016) poderiam ter seus níveis proteicos alterados de maneira semelhante às catepsinas. Os resultados, mostrados na **Figura 12**, indicam que ambas as proteínas possuem pesos moleculares entre 90 – 120 kDa, sendo a banda correspondente a 120 kDa predominante nos grupos controle; enquanto, nas células fotossensibilizadas, as amostras apresentaram um padrão de migração diferente, visualizando-se bandas em toda a faixa de peso molecular reportada. Não obstante, apesar de observar essa alteração, não foram identificadas diferenças na intensidade integrada das bandas proteicas entre os grupos avaliados, indicando que não há discrepâncias na abundância de LAMP1 e LAMP2. Nota-se também que a expressão dos transcritos dos genes *LAMP1* e *LAMP2* foram semelhantes entre os grupos analisados (**Figura 13**), apontando que

as reações de foto-oxidação resultantes da ativação do TPPS_{2a} modulam a expressão das proteínas LAMP1 e LAMP2, a nível pós-traducional mas não a nível transcricional.

Estruturalmente, os endossomos e os lisossomos se encontram protegidos da ação das hidrolases por uma camada de glicoproteínas que formam o glicocálix. Mudanças na glicosilação podem alterar o peso molecular das LAMPs. Interessantemente, um estudo sugere que células portadoras de lisossomos com deficiência na proteína Niemann Pick tipo C1 (NPC1) apresentam glicocálix menos densos a fim de promover a saída do colesterol acumulado no espaço intraluminal (LI et al., 2015). Apesar de não termos resultados suficientes para comprovar esta hipótese, esse mecanismo adaptativo poderia contribuir para o fornecimento de colesterol requerido pelas células. Em concordância com esta necessidade, uma pesquisa recente indicou que células com lisossomos disfuncionais ativam a via da síntese *de novo* do colesterol (WEBER et al., 2020). Por outro lado, tem sido reportado que proteínas LAMP1 e LAMP2 com perdas de glicosilação são encaminhadas para degradação (KUNDRA; KORNFELD, 1999).

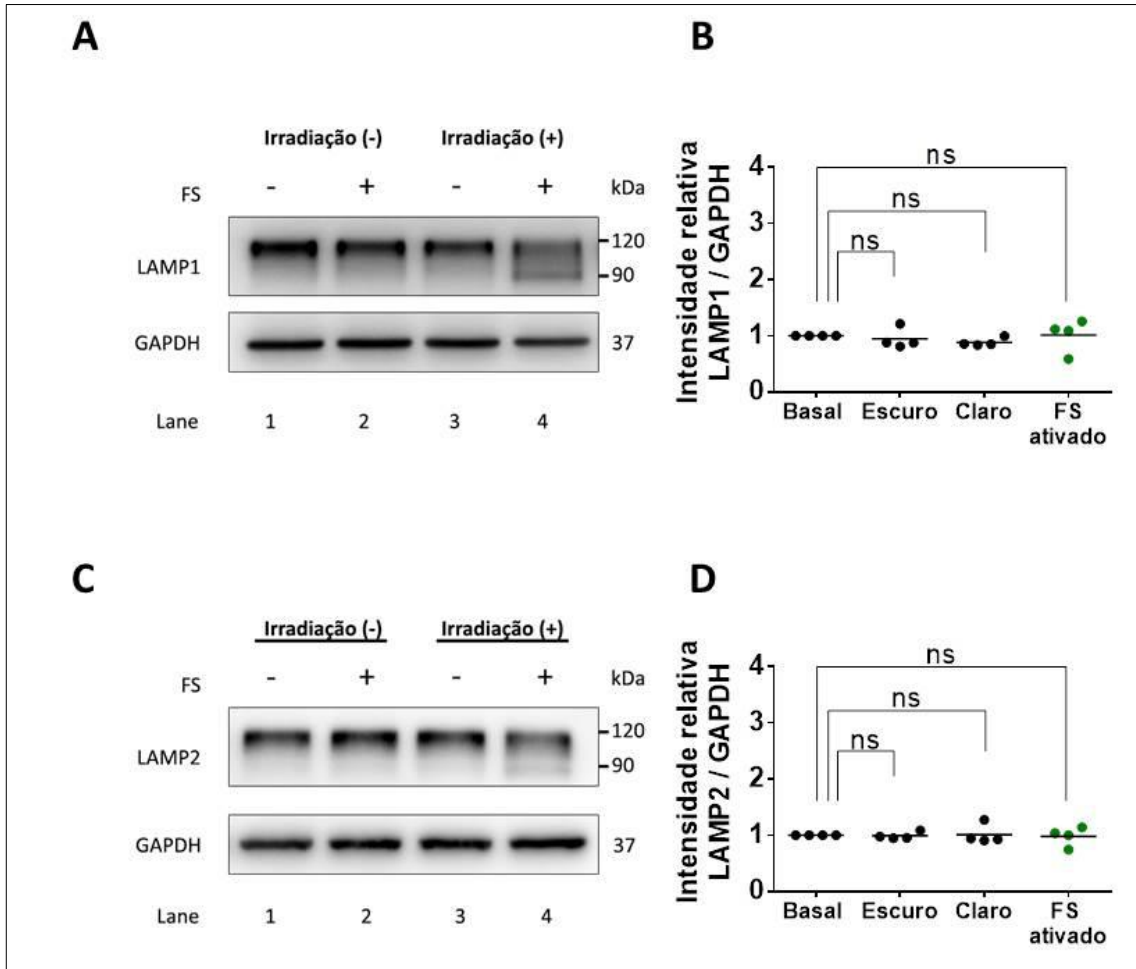


Figura 12. Expressão das proteínas LAMP1 e LAMP2. Membrana representativa da análise por *Western blot* de amostras coletadas após 24 horas de irradiação. Os números na parte inferior das membranas indicam a ordem das amostras: 1 – Basal, 2 – Controle escuro, 3 – Controle claro, 4 – FS ativado. **(A e C)** As proteínas integrais de membrana LAMP1 e LAMP2 apresentaram pesos moleculares entre 90 kDa e 120 kDa. Note - se que nos grupos controle foi predominante a expressão de proteínas com pesos correspondentes a 120 kDa; porém, nas células fotossensibilizadas foram observadas alterações no padrão de migração, identificando-se proteínas com menor peso molecular (90 kDa). A expressão de GAPDH (37 kDa) foi utilizada como controle de carregamento. **(B e D)** Os gráficos de dispersão mostram a média aritmética de pelo menos três experimentos independentes. Os dados de cada grupo foram normalizados pelo controle basal. Para as comparações foi utilizada a análise ANOVA de uma via e teste Dunnett *post hoc* (não significativo (ns) $p > 0.05$).

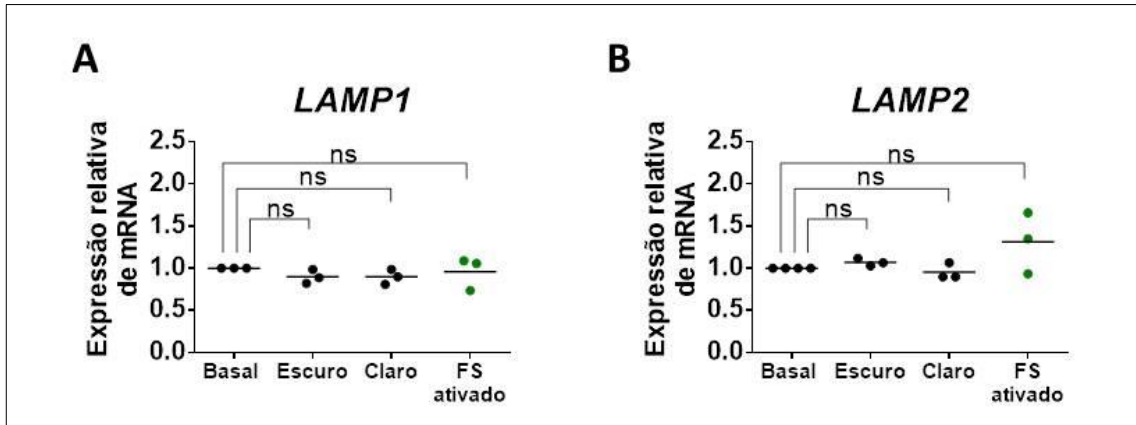


Figura 13. Expressão dos genes *LAMP1* e *LAMP2*. (A) Expressão do mRNA de *LAMP1* não foi diferente entre os grupos. (B) Expressão do mRNA de *LAMP2* não foi diferente entre os grupos. Para as comparações foi utilizada a análise ANOVA de uma via e teste Dunnett *post hoc* (não significativo (ns) $p > 0.05$).

Recentemente, Eapen e colaboradores sugeriram que lisossomos com rupturas nas membranas podem ser removidos das células mediante duas vias. Em uma destas vias, as galectinas, sinalizam o início de uma série de eventos que conduzem a formação do fagóforo e a ativação da autofagia (lisofagia), enquanto em um cenário paralelo, os lisossomos são marcados diretamente com ubiquitinas para serem reconhecidas e degradadas mediante o proteassomo. Embora, cada uma destas vias seja independente, há certo nível de comunicação entre elas (EAPEN et al., 2021).

De qualquer forma, estes resultados sugerem que o FS ativado afeta significativamente a expressão das catepsinas e proteínas associadas a elas nos endossomos e nos lisossomos, de forma semelhante a outros modelos experimentais de fotossensibilização e de doenças de armazenamento lisossomal.

4.2. Degradação dos lisossomos e a autofagia

A macroautofagia (referida como autofagia) exerce inúmeras funções na manutenção da homeostase celular, incluindo o fornecimento de nutrientes através da degradação de macromoléculas e o monitoramento da qualidade intracelular pelo reconhecimento de organelas danificadas, agregados proteicos e patógenos (DERETIC; KROEMER, 2021). Na autofagia, estruturas lipídicas denominadas fagóforos identificam mediante receptores específicos os componentes a serem degradados e, por meio da expansão das suas membranas, sequestram o material em compartimentos que uma vez fechados são conhecidos como autofagossomos. Através da fusão, os autofagossomos entregam seu conteúdo aos lisossomos (YIM; MIZUSHIMA, 2020). Por consequência, os lisossomos exercem um papel fundamental na autofagia. Interessantemente, já tem sido reportado que a redução das catepsinas resulta na inibição da autofagia (TATTI et al., 2012).

Estudos prévios propuseram que a fotossensibilização com TPSS_{2a} causa dano nos lisossomos e a desestabilização das suas membranas com a subsequente liberação do seu conteúdo para o citoplasma (BERG et al., 2010). Há também dados que demonstram que um tipo de autofagia de caráter seletivo denominado lisofagia é induzido para degradar endossomos e lisossomos com rupturas nas suas membranas limitantes (SKOWYRA et al., 2018). Um dos métodos mais robustos para caracterizar a disrupção das membranas endolisossomais baseia-se na identificação de aglomerados (*dots*) de galectinas nestas organelas. A utilidade da galectina como sensor do dano se fundamenta na afinidade de esta proteína por os β -galactosídeos presentes nas glicoproteínas e, provavelmente, nos glicolipídios (JIA et al., 2020a). Sob condições normais, as galectinas encontram-se distribuídas no citosol, no núcleo e até no espaço extracelular; porém, por conta do dano

nas membranas dos endossomos e dos lisossomos, as galectinas ganham acesso ao lúmen destes compartimentos, onde reconhecem e se ligam aos β -galactosídeos presentes em proteínas como LAMP1 e LAMP2, formando *dots* que podem ser visualizados com o auxílio de técnicas de microscopia de fluorescência (AITS et al., 2015). Devido à sua ampla expressão; a Galectina-3, também chamada de LGALS3, é usada como repórter geral de dano nas membranas endolisossomais (PAPADOPOULOS; MEYER, 2017). Além disso, destaca-se a participação da LGALS3 na lisofagia através do recrutamento de proteínas envolvidas na formação do fagóforo, estrutura lipídica que após expansão dará origem ao autofagossomo (CHAUHAN et al., 2016) (**Figura 14**). Mais recentemente foi reportado que a LGALS3 coordena, além da lisofagia, as respostas do reparo e a biogênese lisossomal (JIA et al., 2020b).

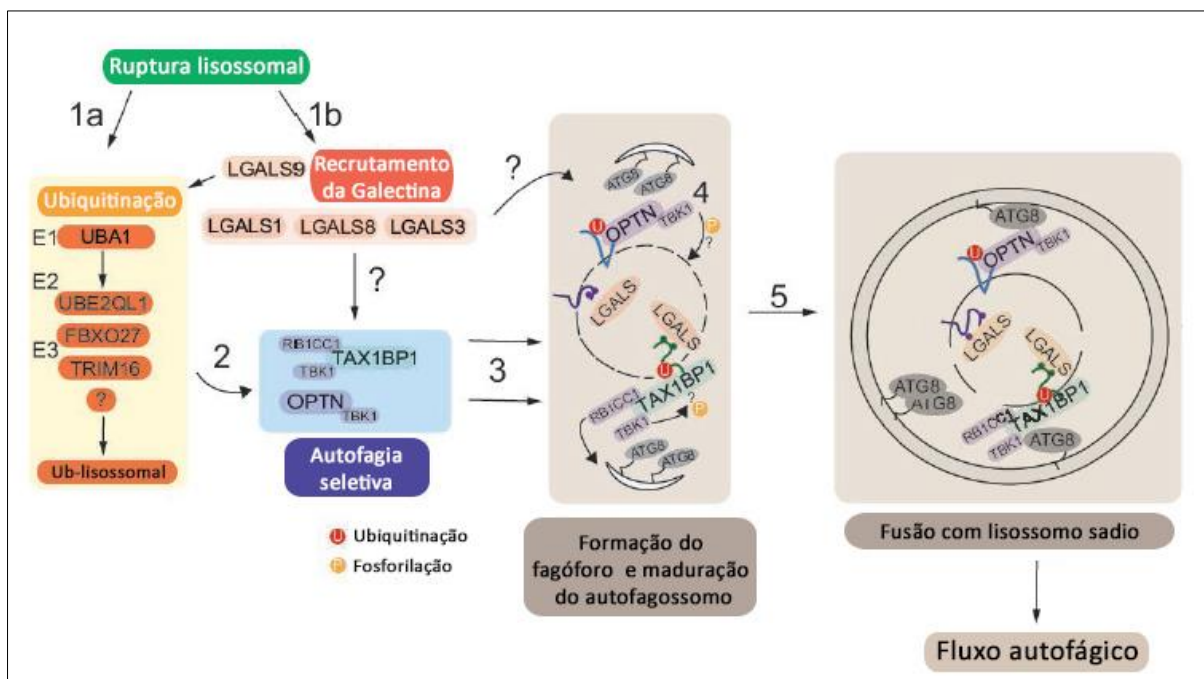


Figura 14. Modelo do recrutamento de Galectinas em lisossomos e endossomos com lesões na membrana. (Etapas 1a e 1b) A ruptura dos endossomos e dos lisossomos causa o recrutamento das galectinas e paralelamente desencadeia a marcação com ubiquitina de uma série de proteínas. Na etapa 2, a ubiquitinação promove o recrutamento dos complexos: OPTN-TBK1 e TAX1BP1-TBK1- RB1CC1 (etapa 3), proteínas que por sua vez, recrutam proteínas envolvidas na formação do fagóforo (ATGs) (etapa 4), ativando o fluxo autofágico (etapa 5). Adaptado de EAPEN et al., 2021.

Com o intuito de avaliar o impacto da fotossensibilização e da redução das catepsinas na integridade das membranas dos endossomos e dos lisossomos, além de conferir se estes compartimentos disfuncionais podem ser removidos por intermédio da lisofagia, células HT – 29 com expressão estável da proteína LGALS3 fusionada ao marcador fluorescente EFGP, foram fotossensibilizadas e após 24 horas de irradiação foram fixadas em paraformaldeído e marcadas com o anticorpo LAMP1 (Proteína-1 associada à membrana do lisossomo). Células incubadas por 90 minutos com 1 mM do composto lisossomotrópico LLOMe (Éster metílico de L-leucil-L-leucina) foram utilizadas como controle positivo experimental. Este análogo sintético de dipeptídeo de leucina modificado com um grupo metil éster permeia as membranas dos endossomos e dos lisossomos, onde pela atividade peptidil transferase da Catepsina C (CTSC), formam polímeros de leucina capazes de quebrar as membranas de estes compartimentos (KAVČIČ et al., 2020; THIELE; LIPSKY, 1990).

Para a captura das imagens microscópicas, o anticorpo LAMP1 foi conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor® 647 que emite, após excitação, fluorescência detectada no canal vermelho, enquanto a LGALS3 fusionada ao EFGP (Ex. 488 nm, Em. 507 nm) foi detectada no canal verde. Com a finalidade de facilitar a contagem de células, os núcleos foram marcados com Hoechst (Ex. 350 nm, Em. 461 nm) e detectados no canal azul. Como ferramenta de auxílio na quantificação do número de células, foi realizada a marcação do citoesqueleto de actina, os quais foram detectados no canal amarelo (Faloidina conjugada ao Alexa Fluor® 555).

Como apresentado na imagem da **Figura 15**, no grupo basal, a LGALS3 encontra-se distribuída homogeneamente no citoplasma; enquanto, os endossomos tardios e os lisossomos marcados com LAMP1 mostraram que estas organelas estão localizadas aleatoriamente no citoplasma. O padrão de distribuição da LGALS3 e de LAMP1 foi

semelhante nas células pertencentes aos grupos: basal, claro, escuro e nas células fotossensibilizadas, sugerindo que após 24 horas de irradiação não há ativação da lisofagia e os endossomos tardios e os lisossomos não apresentam rupturas permanentes nas suas membranas. Ao contrário do que foi observado nesses grupos experimentais, visualização das células incubadas com o LLOMe no microscópio de fluorescência mostraram aglomerados de LGALS3. O coeficiente de Pearson calculado ($r = 0.53 \pm 0.08$) na análise de correlação entre a proteína LGALS3 e a proteína LAMP1 indicou que a co-localização entre a galectina e o marcador do lisossomo é parcial, fato que sugere que o LLOMe pode causar danos nas membranas de outros componentes do sistema endolisossomal como os endossomos iniciais. Cabe ressaltar, que LGALS3 não é a única isoforma que modula a lisofagia, uma vez que a Galectina-8/LGALS8 e a Galectina-9/LGALS9 participam na resposta autofágica após dano lisossomal (JIA et al., 2018). Além disso, um estudo realizado em modelo murino sugere que a LGALS9 pode ser transportada aos lisossomos por meio da endocitose e mediante a sua interação com LAMP2, contribui com a estabilização das membranas dos compartimentos endolisossomais (SUDHAKAR et al., 2020).

Uma explicação alternativa para a ausência da lisofagia após fotossensibilização seria que as células apresentassem redução proteica das galectinas. Devido à relevância da LGALS3 (26 kDa) na coordenação da resposta autofágica e a participação da LGALS9 (40 kDa) na estabilidade dos compartimentos endolisossomais foi avaliada a expressão dessas proteínas em lisados de células HT – 29, não se identificando diferenças entre os grupos experimentais na análise densitométrica da intensidade das bandas (**Figura 16**). Resultado que descarta a depleção endógena das galectinas LGALS3 e LGALS9 como causa subjacente da inibição da lisofagia mediada por LGALS3.

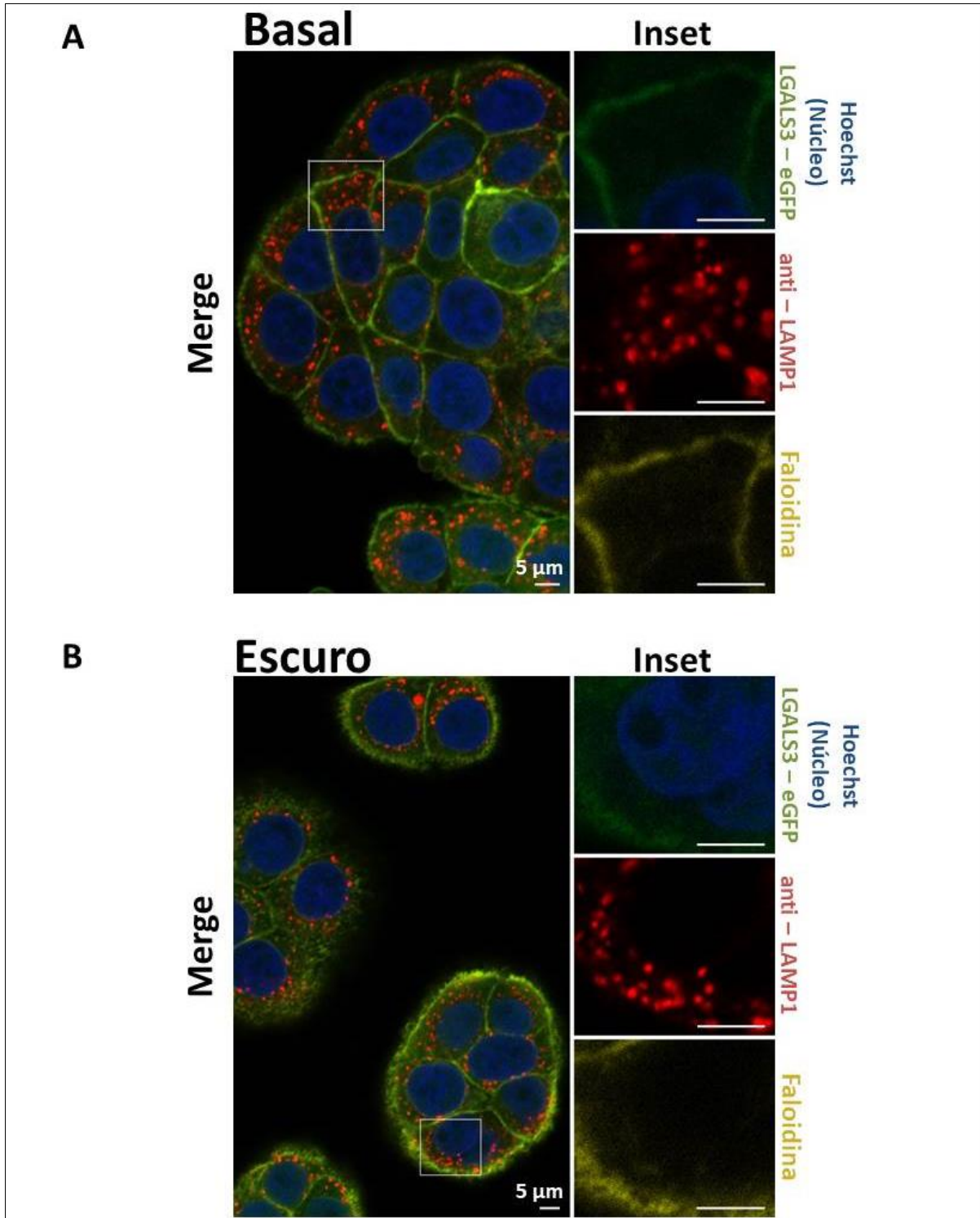


Figura 15. Lisossomos e endossomos tardios disfuncionais, após 24 horas de irradiação com TPPS_{2a}, não são degradados pela ativação da lisofagia. Células expressando a proteína LGALS3 fusionada ao eGFP (verde) foram marcadas com LAMP1 (lisossomo e endossomos tardios, vermelho), Hoechst (núcleo, azul) e Faloidina (citoesqueleto de actina, amarelo). A captura das imagens foi realizada no microscópio confocal Zeiss LSM 710 com a objetiva de 63X. Na esquerda é mostrada a sobreposição (*merge*) dos canais dos fluoróforos empregados no ensaio. Na direita superior, a região com maior ampliação (*inset*) mostra a localização da LGALS3 e do núcleo. Na direita inferior, a região com maior ampliação (*inset*) mostra a marcação individual dos lisossomos, endossomos tardios e da Faloidina. Nas células dos grupos: **(A)** Basal, **(B)** Escuro, **(C)** Claro e **(D)** Fs ativado, a LGALS3 encontra-se distribuída homogeneamente no citoplasma, sugerindo que não há ativação da lisofagia e não há perda da integridade das membranas dos endossomos tardios e dos lisossomos. Barra de escala: 5 μm. *Continua na página seguinte.*

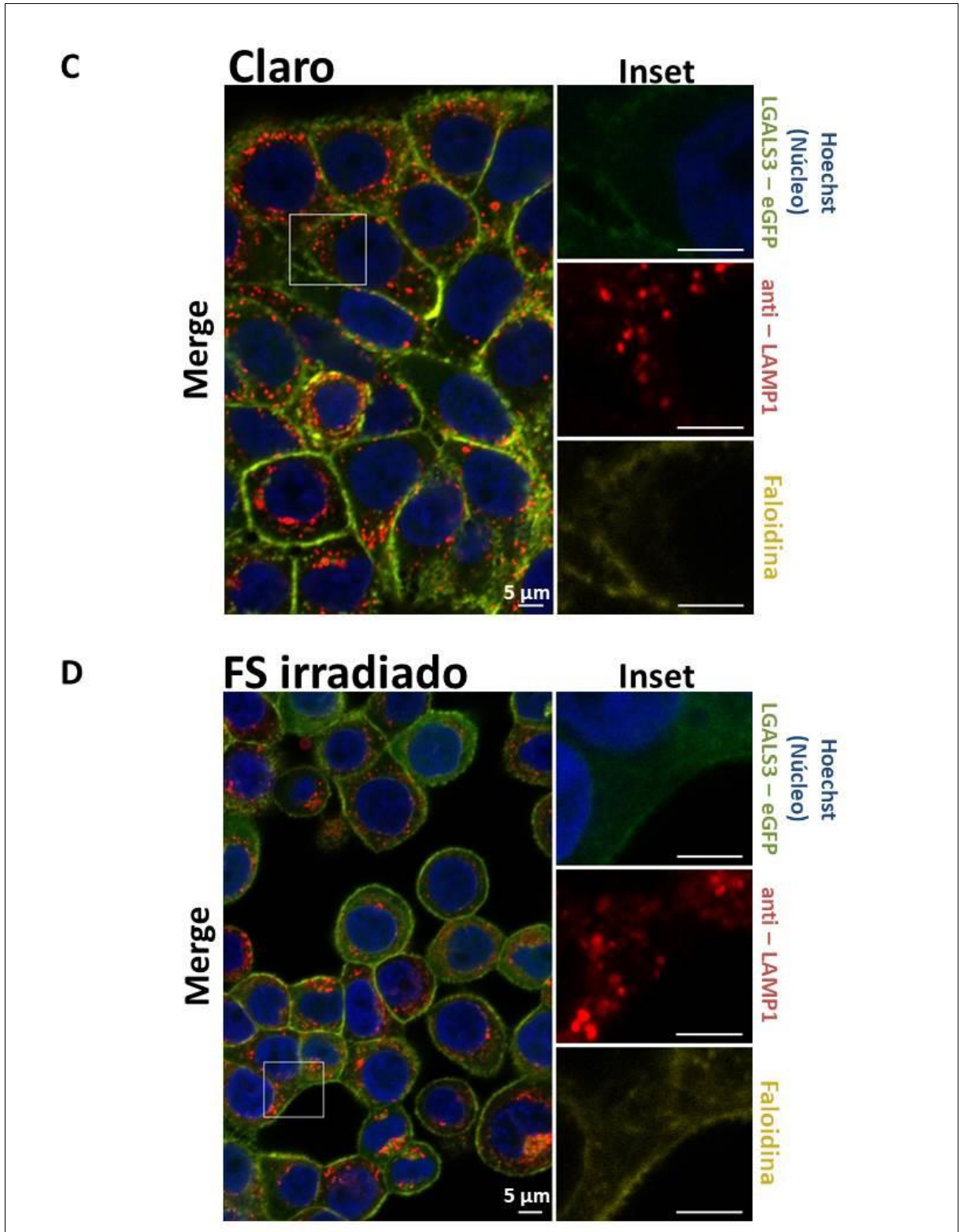


Figura 15. Lisossomos e endossomos tardios disfuncionais, após 24 horas de irradiação com TPPS_{2a}, não são degradados pela ativação da lisofagia (Continuação). Na esquerda é mostrada a sobreposição (*merge*) dos canais dos fluoróforos empregados no ensaio. Na direita superior, a região com maior ampliação (*inset*) mostra a localização da LGALS3 e do núcleo. Na direita inferior, a região com maior ampliação (*inset*) mostra a marcação individual dos endossomos tardios, dos lisossomos e da Faloidina. Nas células dos grupos: (A) Basal, (B) Escuro, (C) Claro e (D) Fs ativado, a LGALS3 encontra-se distribuída homogeneamente no citoplasma, sugerindo que não há ativação da lisofagia e não há perda da integridade das membranas dos endossomos tardios e dos lisossomos. Barra de escala: 5 μm. Continua na página seguinte.

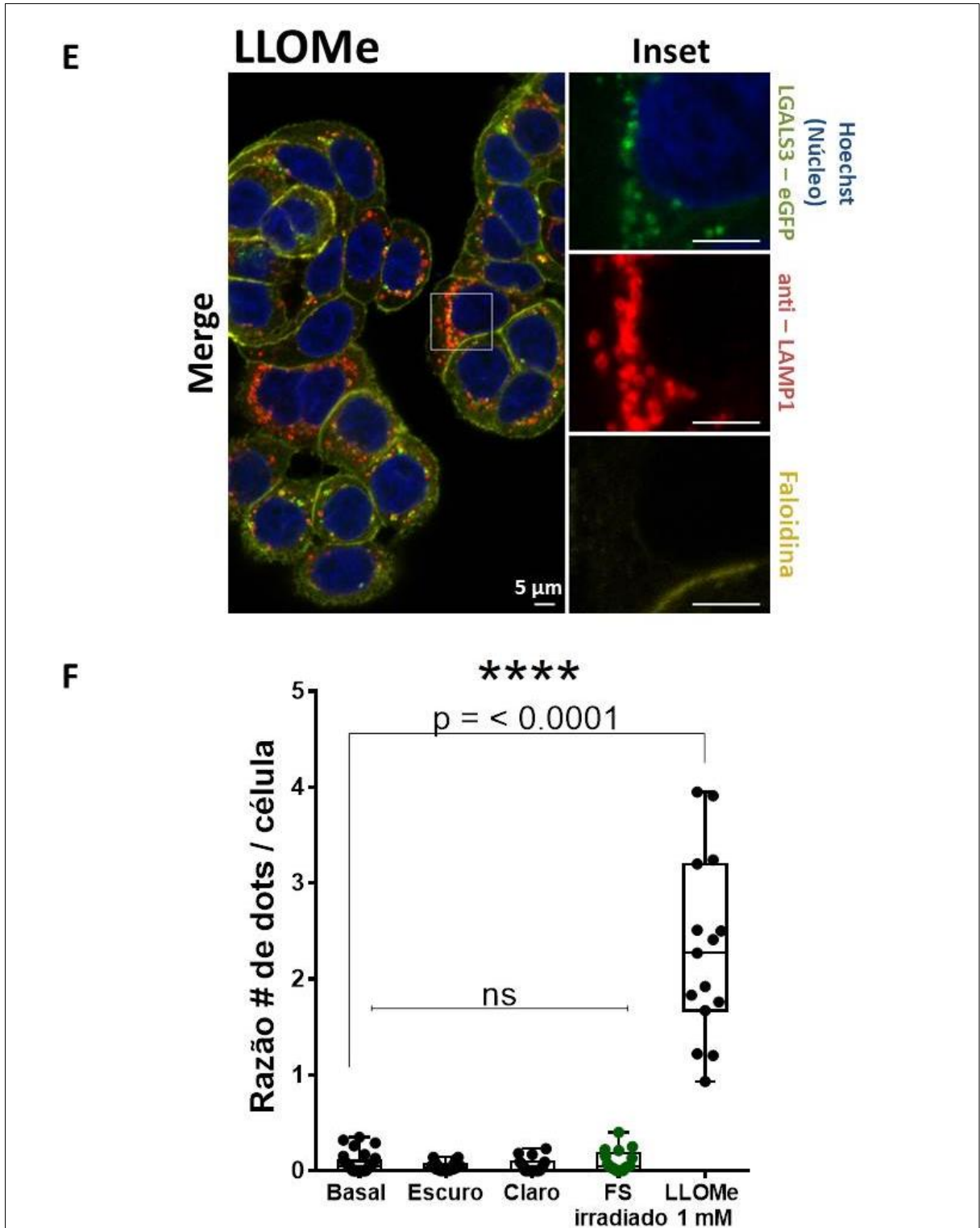


Figura 15. Lisossomos e endossomos tardios disfuncionais após 24 horas de irradiação com TPPS2a, não são degradados pela ativação da lisofagia (Continuação). **(E)** Células incubadas com 1 mM de LLOMe mostraram aglomerados de LGALS3 que co-localizaram parcialmente com a proteína LAMP1 (Coeficiente de Pearson, $r = 0.53 \pm 0.08$), fato que sugere que o LLOMe pode causar danos nas membranas dos endossomos tardios, dos lisossomos e de outros componentes dos sistema endolisossomal como os endossomos iniciais. **(F)** Os gráficos de caixa mostram o primeiro quartil, a linha da mediana, o terceiro quartil e o segmento de reta vertical (bigodes) estendendo-se para os valores mínimos e máximos. Os dados de cada grupo mostram a razão entre os *dots* (aglomerados) de LGALS3 e o número de células. Para as comparações foi utilizada a análise ANOVA de uma via e teste Dunnett *post hoc* (** $p \leq 0.001$; não significativo (ns) $p > 0.05$). O processamento das imagens foi realizado no software Image J. Barra de escala: 5 μ m.

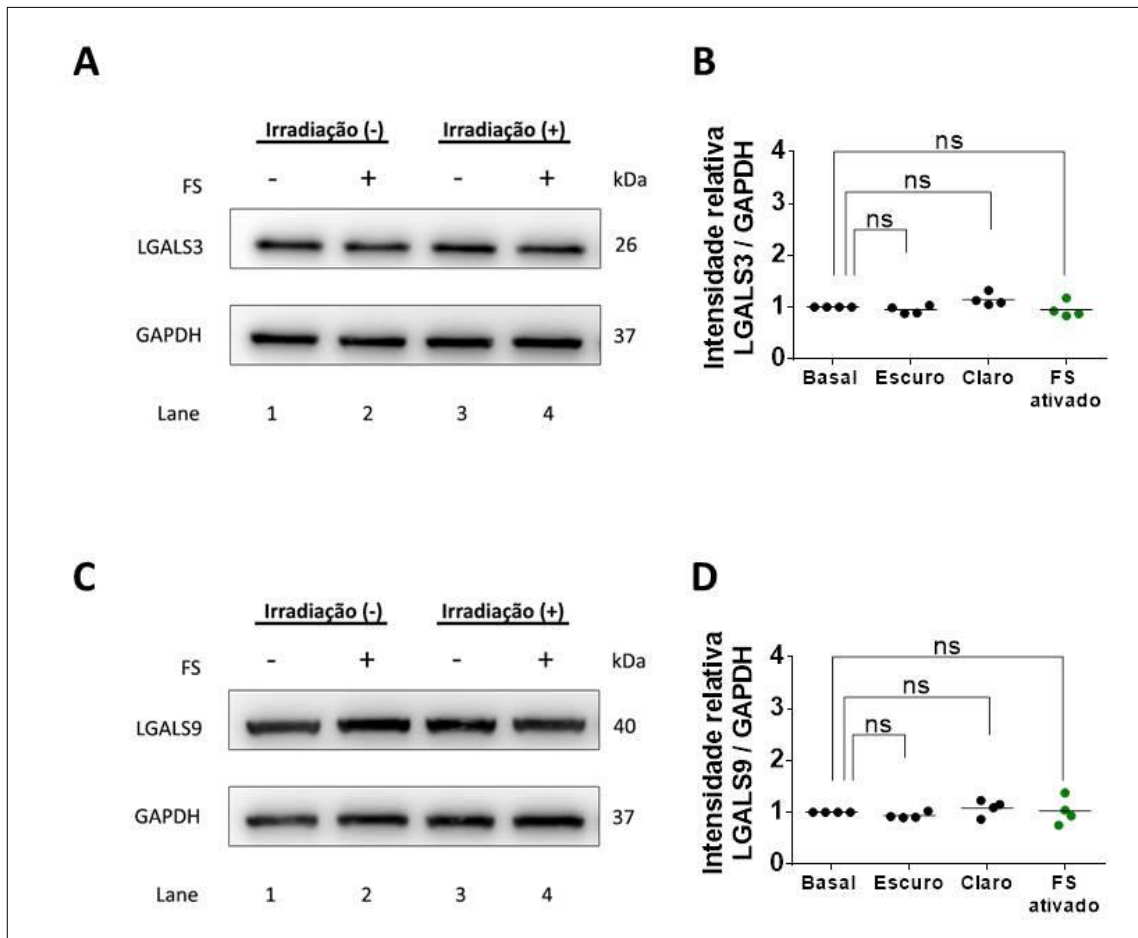


Figura 16. Expressão proteica das galectinas. (A e C) Na esquerda, membranas da análise por *Western blot* de amostras coletadas após 24 horas de irradiação. Os números na parte inferior das membranas indicam a ordem das amostras: 1 – Basal, 2 – Controle escuro, 3 – Controle claro, 4 – FS ativado. Os resultados mostram que a ativação do TPPS_{2a} em células HT – 29 não alteram os níveis proteicos da LGALS3 (26 kDa) e da LGALS9 (40 kDa). A expressão de GAPDH (37 kDa) foi utilizada como controle de carregamento. (B e D) Na direita, os gráficos de dispersão mostram a média aritmética de pelo menos três experimentos independentes. Os dados de cada grupo foram normalizados pelo controle basal. Para as comparações foi utilizada a análise ANOVA de uma via e teste Dunnett *post hoc*, ns: não significativo ($p > 0.05$).

Caso as membranas dos endossomos e dos lisossomos, nas células fotossensibilizadas, apresentassem poros manométricos que não permitissem o fluxo de moléculas iguais ou maiores a 26 kDa, peso molecular reportado e conferido pelos *immunoblots* para LGALS3, justificaria-se a ausência do recrutamento de esta galectina nos ensaios de microscopia. Portanto, para descartar rupturas nas membranas dos endossomos e dos lisossomos de tamanho menor do que as requeridas para a passagem de uma molécula de 26 kDa, avaliamos o vazamento de prótons através da marcação de células com

LysoView™ 633, um corante permeável às membranas em pH neutro e que uma vez localizado no entorno ácido dos endossomos e dos lisossomos é protonado, fato que favorece o seu sequestro e acúmulo nestes compartimentos. Além disso, o LysoView™ 633 pode servir como indicativo de alterações no pH endolisossomal, já que o fluoróforo emite menor fluorescência em ambientes alcalinos e ,pelo contrário, incrementa a sua intensidade em ambientes mais ácidos (**Figura 18A**). Vale destacar, que no ensaio só foram consideradas células viáveis, as quais foram diferenciadas com base no estado da membrana plasmática. Logo, as células foram incubadas com o corante fluorescente LIVE / DEAD™ Fixable Violet (Thermo Fisher Scientific, #L34955, Ex. 405 nm). Tomando vantagem da capacidade de ligação de este fluoróforo com os grupos amina da superfície celular, amostras com membranas plasmáticas íntegras após excitação emitiram um sinal de fluorescência relativamente menor do que o sinal registrado em células não viáveis - com danos na membrana plasmática – onde o incremento do sinal de fluorescência é por causa da ligação do fluoróforo nos grupos amina da superfície celular e nos grupos amina do interior das células (**Figura 17A**).

Os histogramas das amostras analisadas no citômetro de fluxo, após exclusão do debris e de aglomerados celulares, mostraram que aproximadamente o 97 % das células pertencentes ao grupo basal e o grupo controle escuro, assim como as células incubadas com LLOMe não apresentam perda da integridade da membrana plasmática, registrando-se intensidades de fluorescência semelhantes ($\approx 0.9 - 1.0$) (**Figura 17B - H**). Sem influenciar na quantidade de células viáveis, as quais foram entre o 97 % a 99 % da população analisada, pois não houve incremento da permeabilidade plasmática ao LIVE/DEAD™, foi evidenciada a redução na emissão de fluorescência desse corante nas células dos grupos: controle claro (\approx

0.8), células fotossensibilizadas (≈ 0.7) e num grupo controle adicional conformado por células incubadas com um inibidor da H^+ - ATPase (V-ATPase) lisossomal ($0.1 \mu M$ de BafA1; ≈ 0.4). Não obstante, essa diminuição só foi significativa nos dois últimos grupos descritos (**Figura 17B – H**). Importante mencionar, que pelo mecanismo de ação do corante LIVE / DEAD, uma eventual diminuição na intensidade de fluorescência do corante poderia indicar, indiretamente, mudanças na composição da membrana plasmática, já que os glicerofosfolipídios e os esfingolipídios na membrana plasmática possuem grupos aminas hidrofílicos que podem servir como substratos para a ligação do corante. Portanto, os dados sugerem, indiretamente, que nas células fotossensibilizadas e nas células incubadas com BafA1 poderia ter ocorrido mudanças na composição lipídica da membrana plasmática. Interessantemente, foi reportado que os fibroblastos têm a capacidade de eliminar lisossomos disfuncionais através da exocitose e como resultado do incremento da fusão dos lisossomos com a membrana plasmática, hidrolases endolisossomais liberadas ao meio extracelular têm acesso, entre os diversos componentes da bicamada lipídica, aos esfingolipídios. Na superfície celular, as ceramidas formadas por causa da degradação dos esfingolipídios estariam envolvidas na ativação de uma cascata de sinalização que leva à diminuição da proliferação celular com a consequente parada de crescimento (SAMARANI et al., 2018).

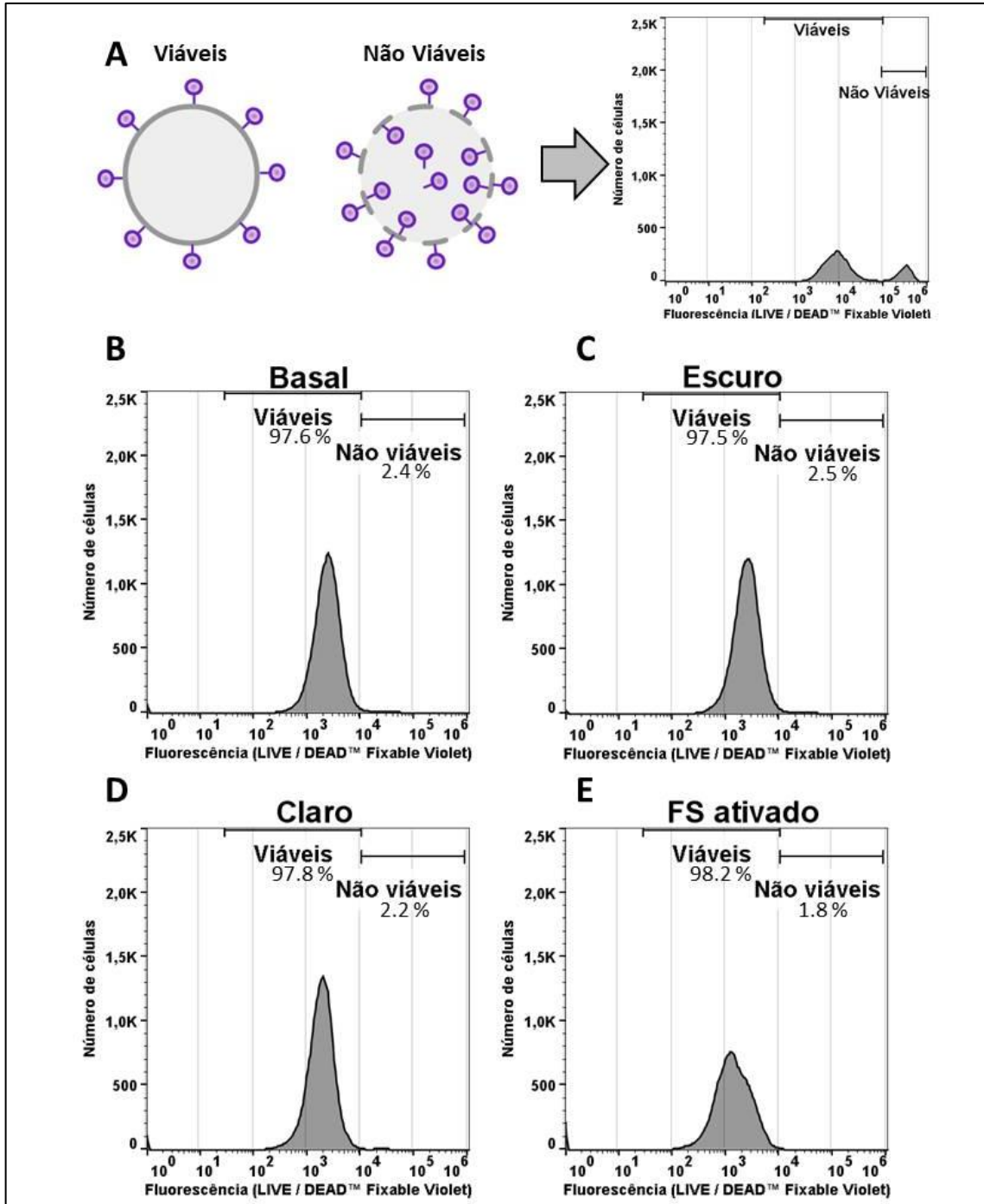


Figura 17. Intensidade de fluorescência de células HT-29 marcadas com LIVE / DEAD™ Fixable Violet. Após 24 horas da irradiação, foram coletadas as células aderidas na placa de cultura e as localizadas no sobrenadante (meio DMEM suplementado com 10 % de SFB). As células foram marcadas com o corante LIVE / DEAD™ Fixable Violet. **(A)** Diagrama do mecanismo de ação do corante e histograma representativo da análise no citômetro de fluxo. **(B-E)** Histogramas das células pertencentes aos grupos: basal, escuro, claro e FS ativado. *Continua na página seguinte.*

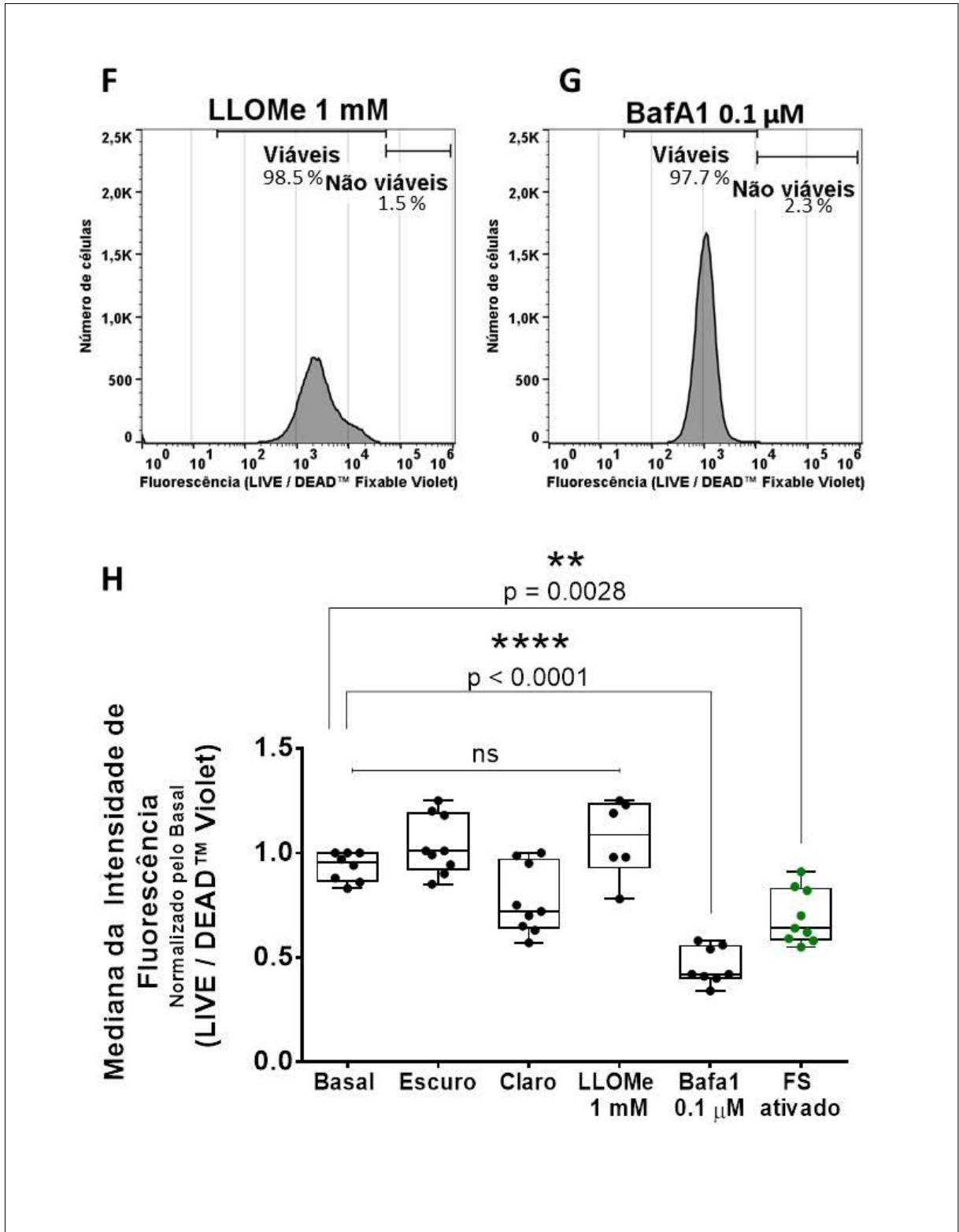


Figura 16. Intensidade de fluorescência de células HT-29 marcadas com LIVE / DEAD™ Fixable Violet (Continuação). (F-G) Histogramas representativos das células incubadas com 1 mM de LLOMe (90 minutos) e 0.1 μM de BafA1 (24 horas). (H) Os gráficos de caixa mostram o primeiro quartil, a linha da mediana, o terceiro quartil e o segmento de reta vertical (bigodes) estendendo-se para os valores mínimos e máximos. Os dados de pelo menos três experimentos independentes foram normalizados pela intensidade de fluorescência do controle basal. Para as comparações foi utilizada a análise ANOVA de uma via e teste Dunnett *post hoc* (****p ≤ 0.0001; **p ≤ 0.01; p > 0.05 não significativo (ns)).

Os dados da análise das marcações celulares com LysoView™ 633 indicaram que as células possuem duas populações de endossomos (E) e de lisossomos (L). Essas populações foram chamadas de População 1 e de População 2, como mostrado na **Figura 18B**. Em condições basais, a diferença na intensidade de fluorescência entre elas foi de aproximadamente 17 vezes. A População 1, com menor intensidade de emissão de fluorescência (E / L com lúmen menos ácido), representou 2 % das células viáveis ; enquanto, a População 2, com maior intensidade de emissão de fluorescência (E / L com lúmen mais ácido), representou 98 % das células viáveis. Esse padrão de distribuição celular e as intensidades de fluorescência emitidas pelo LysoView foram semelhantes entre o grupo controle claro e o grupo controle escuro quando comparados ao grupo basal (**Figura 18C - D**). Como esperado, células incubadas com LLoMe apresentaram um incremento de ≈ 9 vezes no número de células com subpopulações de endossomos e de lisossomos menos ácidos. Não obstante, os histogramas não permitiram diferenciar os endossomos e os lisossomos que perderam prótons por causa da permeabilização das membranas; e, em consequência, incrementaram seu pH, dos endossomos e dos lisossomos que em condições basais tinham lúmen menos ácido (População 1) (**Figura 18E**). Perante esta limitante, a análise comparativa dos compartimentos com menor intensidade de fluorescência de LysoView™ não foi realizada, considerando-se simplesmente a razão entre a porcentagem de células com E / L menos ácidos e a porcentagem de células com E / L mais ácidos como parâmetro na análise do vazamento de prótons . (**Figura 18I**). Baixo essa condição, as razões calculadas para o grupo basal e o grupo de células incubadas com LLOMe foram de 0.02 e de 0.23 respectivamente. Portanto, esses dados em conjunto com as microscopias onde foram observados aglomerados de LGALS3 indicam que o LLoMe causa um incremento no número de endossomos e de lisossomos caracterizados por terem lúmen menos ácido,

provavelmente, por conta da quebra das membranas dos compartimentos endolisossomais. Inesperadamente, células incubadas com BafA1 mantiveram os valores da razão empregada para a análise do vazamento de prótons de maneira semelhante ao grupo basal (**Figura 18F**), resultado que poderia indicar que a BafA1, na concentração testada, não ocasiona mudanças no pH dos compartimentos endolisossomais e/ou sustenta a possibilidade da exocitose de estes compartimentos nas células HT – 29. Na procura de respostas para esta observação, avaliamos o efeito da incubação de células com Cloroquina (CQ, 100 μ M). A diferença da BafA1 que inibe a H^+ - ATPase (V-ATPase) dos endossomos e dos lisossomos, a CQ atravessa a membrana destes compartimentos e sofre protonação, causando a alcalinização do lúmen e prejudicando a função endolisossomal. Os dados mostraram que de maneira parecida às células incubadas com LLOMe, a CQ causa um incremento de ≈ 20 vezes no número de células com endossomos e com lisossomos menos ácidos (**Figura 18G**), sendo a média da razão do vazamento de prótons de 0.68. Esta análise, nas células fotossensibilizadas, não mostrou diferenças quando comparada ao grupo basal, sendo a média do valor calculado de 0.01, sugerindo que após 24 horas de fotossensibilização, esses compartimentos não têm rupturas que permitam o vazamento de prótons (**Figura 18H - I**). Por outro lado, os dados da intensidade de fluorescência emitida pela População 2 caracterizados por terem E / L com lúmen mais ácido evidenciou que nas células incubadas com CQ e nas células fotossensibilizadas houve um incremento na intensidade de LysoView™ 633. Este achado já tem sido relatado em outro estudo realizado com CQ e células da retina, onde o incremento na intensidade de fluorescência do LysoTracker (um corante que se acumula nos compartimentos endolisossomais de maneira semelhante ao LysoView) foi registrado após 4 horas da perda da gradiente de prótons, atingindo o incremento máximo de fluorescência em 24 horas (**Figura 18J**). O que sugere que o efeito da CQ em algumas populações é

transiente e que as células ativam mecanismos de adaptação que permitem que o pH dos lisossomos e dos endossomos seja restaurado depois de ter sido alvo de estresse (LU et al., 2017). O incremento da fluorescência também pode ser um indicativo do aumento no volume dos lisossomos, hipótese apoiada por observações realizadas em células incubadas com LLoMe e acompanhadas por 40 horas (REPNIK et al., 2017). A falta de uma curva padrão que estabeleça uma relação quantitativa entre a intensidade de fluorescência do LysoView™ 633 e o pH, impossibilitou a determinação da magnitude da alteração do pH nos endossomos e nos lisossomos. Contudo, os dados indicam que os endossomos e os lisossomos das células fotossensibilizadas com o TPPS_{2a} são capazes de acumular o corante LysoView, porém de maneira parecida a uma subpopulação de células incubadas com CQ, os endossomos e os lisossomos poderiam ter sido alvo de um estresse transiente ou ter incremento no seu volume.

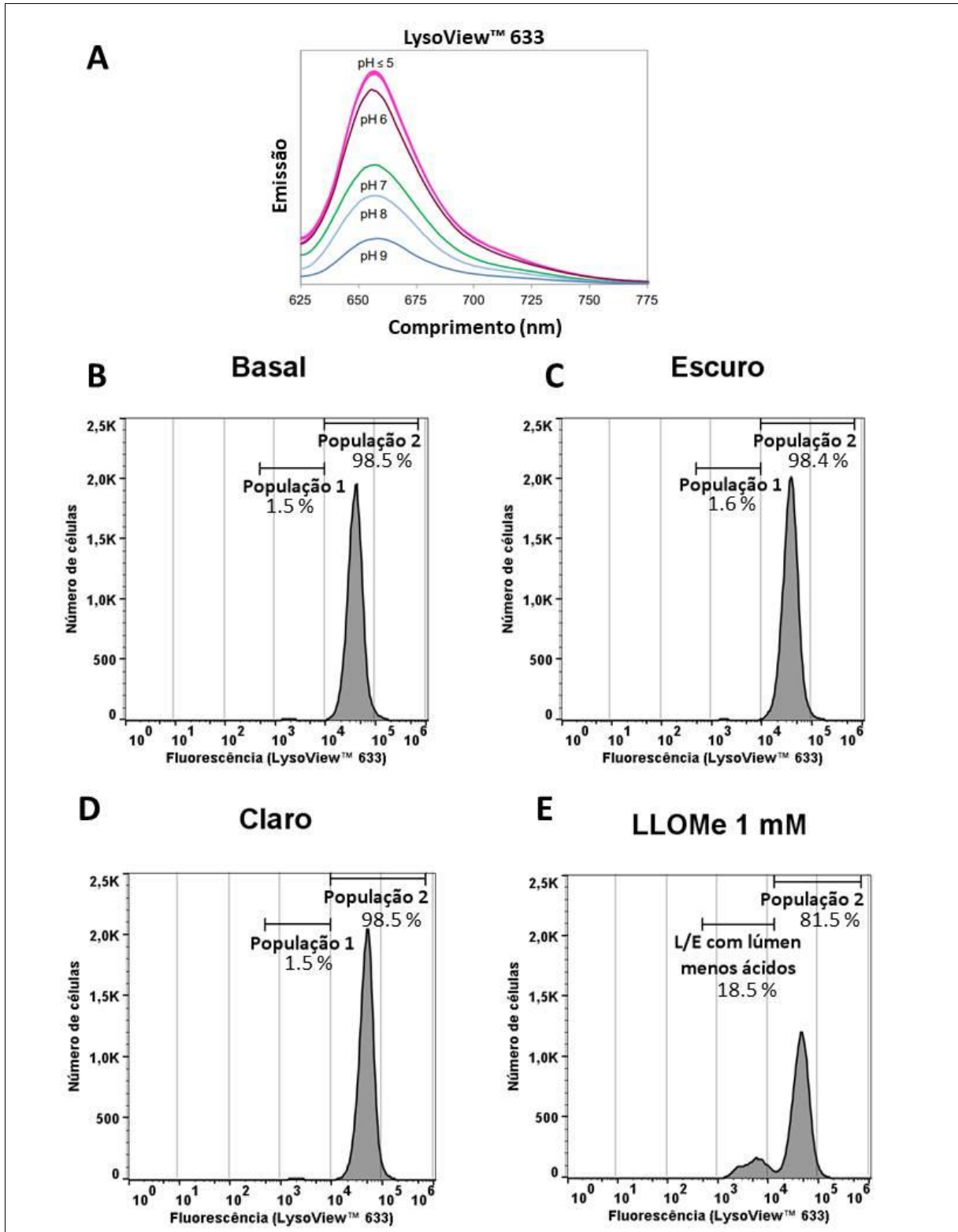


Figura 18. Intensidade de fluorescência de células HT-29 marcadas com LysoView™ 633. Após 24 horas de irradiação, foram coletadas as células aderidas na placa de cultura e as localizadas no sobrenadante (meio DMEM suplementado com 10 % de SFB). As células foram marcadas com o corante LysoView™ 633 **(A)** Diagrama da intensidade de fluorescência do LysoView™ 633 em pH diferentes (manual do usuário da Biotium) **(B-E)** Histogramas representativos das células pertencentes aos grupos: basal, escuro, claro e das células incubadas com LLOMe (90 minutos). *Continua na página seguinte.*

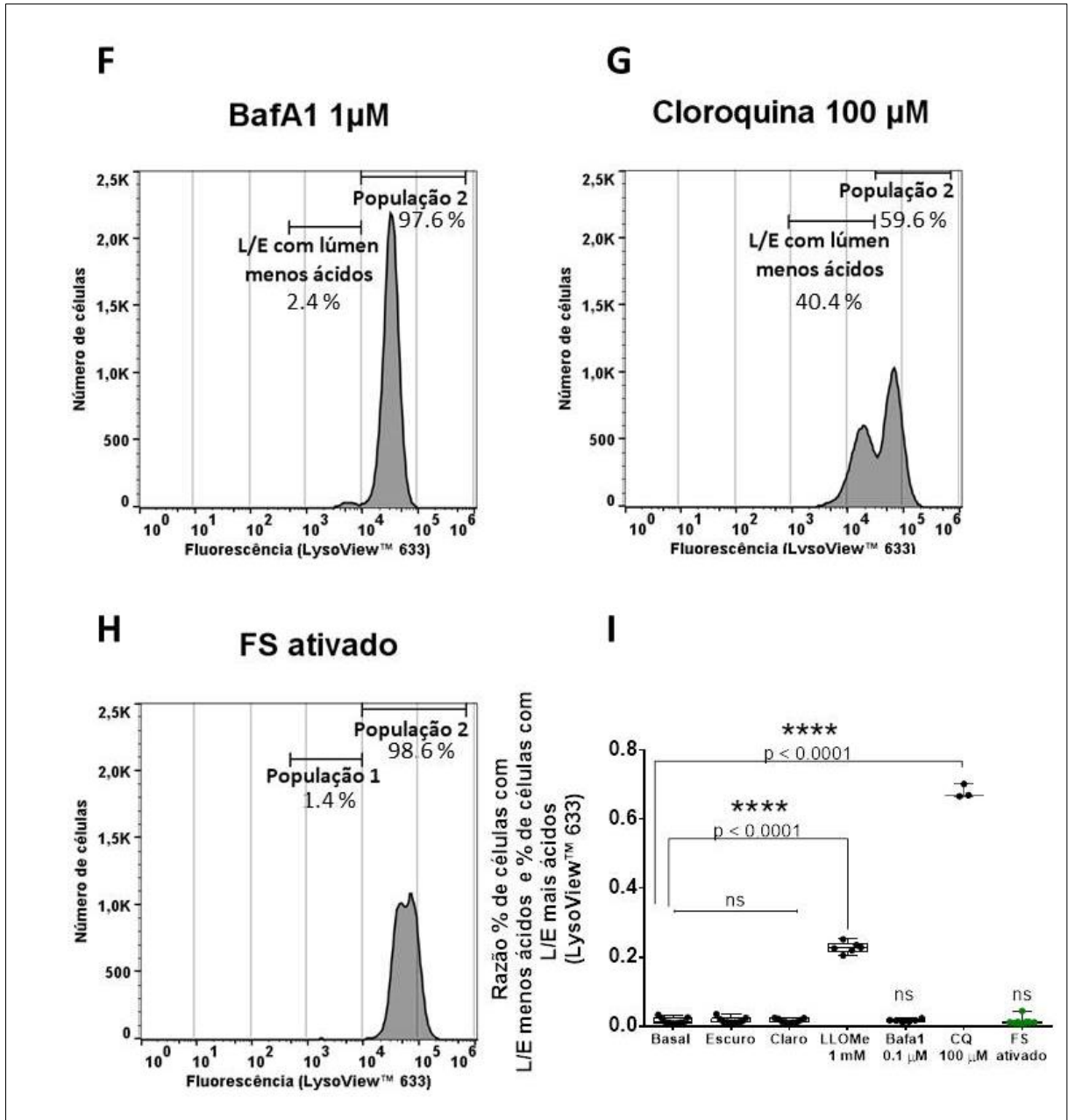


Figura 18. Intensidade de fluorescência de células HT-29 marcadas com LysoView™ 633. (Continuação). (F-H) Histogramas representativos das células incubadas com 0.1 μ M de BafA1 (24 horas), 100 μ M de Cloroquina (24 horas) e células fotossensibilizadas com TPPS_{2a}, coletadas após 24 horas de irradiação. **(I)** Os gráficos de caixa mostram o primeiro quartil, a linha da mediana, o terceiro quartil e o segmento de reta vertical (bigodes) estendendo-se para os valores mínimos e máximos. Os dados de pelo menos três experimentos independentes foram normalizados pela intensidade de fluorescência do controle basal. Para as comparações foi utilizada a análise ANOVA de uma via e teste Dunnett *post hoc* (**** $p \leq 0.0001$; $p > 0.05$ não significativo (ns)). *Continua na página seguinte.*

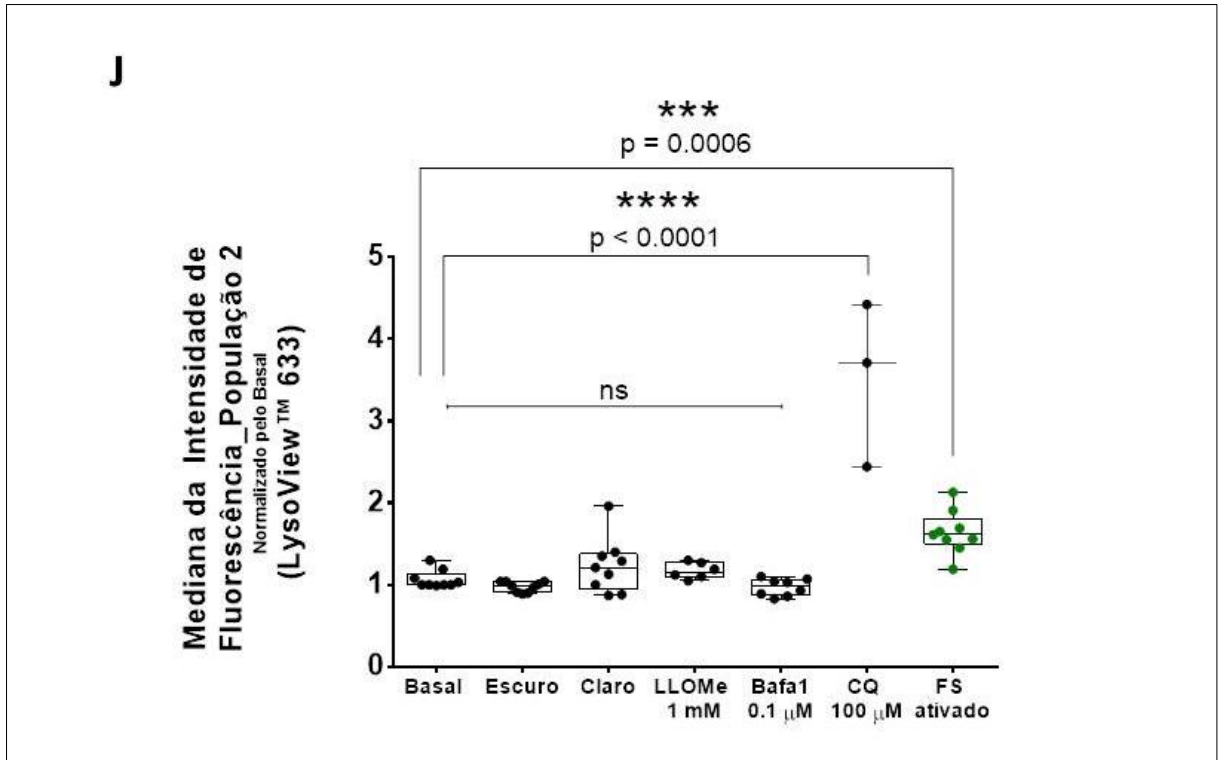


Figura 18. Intensidade de fluorescência de células HT-29 marcadas com LysoView™ 633. (Continuação). (I) Os gráficos de caixa mostram o primeiro quartil, a linha da mediana, o terceiro quartil e o segmento de reta vertical (bigodes) estendendo-se para os valores mínimos e máximos. Os dados de cada grupo foram normalizados pela intensidade de fluorescência do controle basal. Para as comparações foi utilizada a análise ANOVA de uma via e teste Dunnett *post hoc* (**** $p \leq 0.0001$; *** $p \leq 0.001$; * $p \leq 0.05$, não significativo (ns) $p > 0.05$).

Como observado previamente através da microscopia, a autofagia (neste caso lisofagia, por se tratar de dano fotoquímico nos endossomos e nos lisossomos) encontra-se inibida e a fim de monitorar o fluxo autofágico com uma análise complementar, quantificamos pelo *western blot* a expressão dos marcadores autofágicos LC3-II e p62/SQSTM1 (referida como p62). Como é sabido, esses marcadores são usados classicamente devido a sua associação com a membrana dos autofagossomos. Quantificação proteica dos *immunoblots*, apresentados na **Figura 19**, mostrou que nas células fotossensibilizadas houve um aumento na expressão das proteínas LC3-II e p62; porém, uma vez que tanto a indução quanto o bloqueio da autofagia resultam no incremento dos marcadores autofágicos, foi necessário avaliar a expressão de ambas as proteínas na

presença de Bafilomicina A1 (Baf A1, 400 nM) (**Figura 20**). A análise comparativa entre o grupo de células que foram apenas fotosensibilizadas e o grupo de células que após irradiação foram incubadas com BafA1 não mostrou aumento na expressão da proteína p62 e LC3-II, comprovando desta forma a inibição do fluxo autofágico.

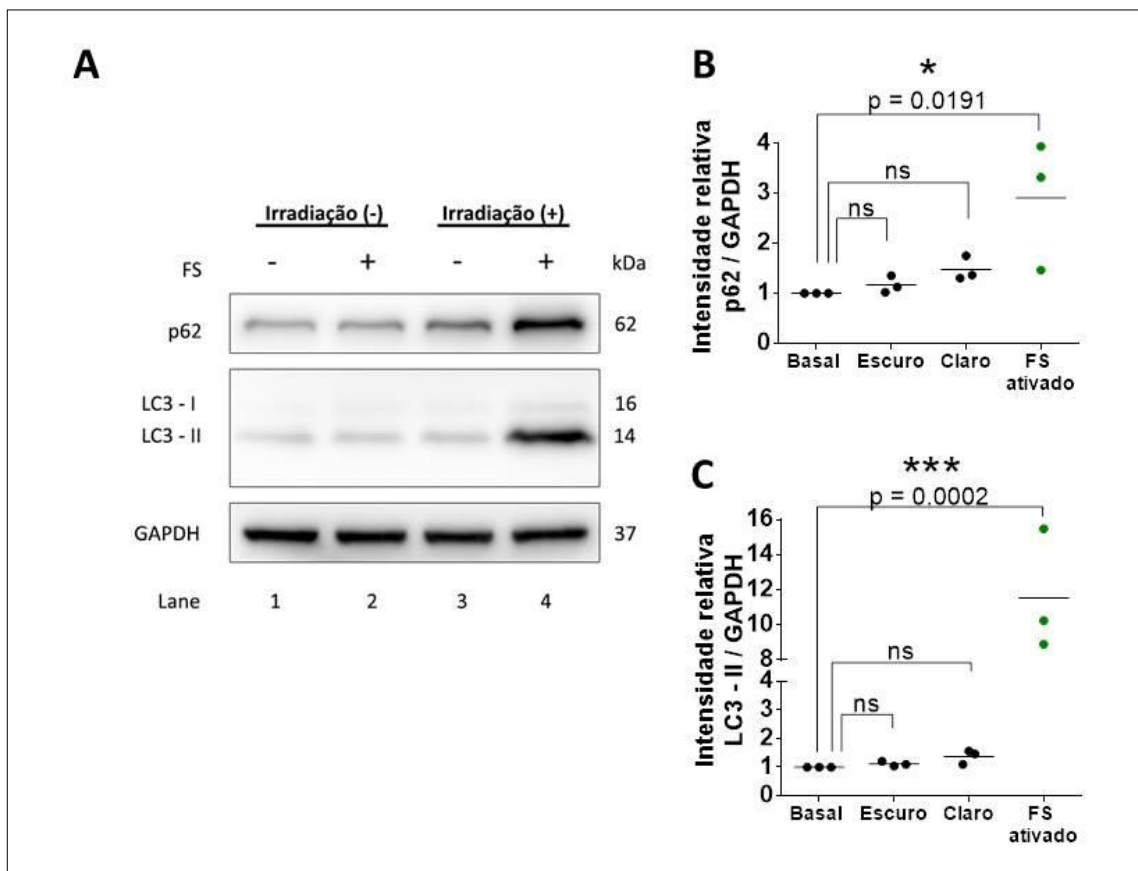


Figura 19. Fotosensibilização com TPPS_{2a} modula a expressão proteica dos marcadores autofágicos LC3 – II e p62. As amostras foram analisadas após 24 horas de irradiação. **(A)** Membrana representativa mostrando a detecção das proteínas LC3 – II e p62. A proteína GAPDH foi utilizada como controle de carregamento. As membranas foram reaproveitadas na detecção de cada proteína. Os números na parte inferior da membrana indicam a ordem das amostras: 1 – Basal, 2 – Controle escuro, 3 – Controle claro, 4 – FS ativado. **(B - C)** Quantificação da intensidade das bandas correspondentes às proteínas LC3 – II e p62 relativa à intensidade da banda da proteína GAPDH. Os dados de cada grupo foram normalizados pelo controle basal. Os gráficos de dispersão mostram a média aritmética de três experimentos independentes. Para as comparações foi utilizada a análise ANOVA de uma via e teste Dunnett *post hoc* (** $p \leq 0.001$; * $p \leq 0.05$, não significativo (ns) $p > 0.05$).

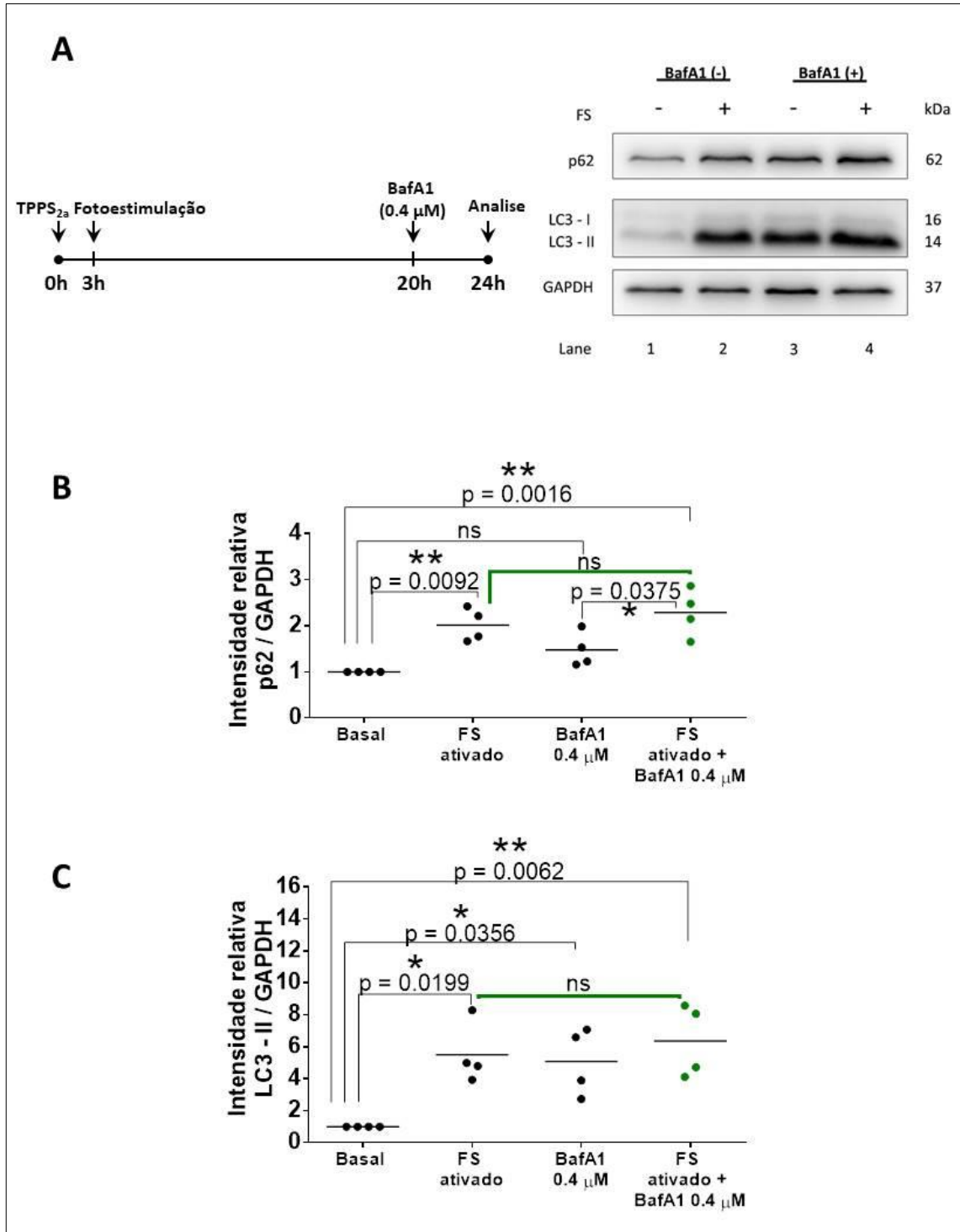


Figura 20. Fotossensibilização com TPPS_{2a} inibe a autofagia. (A) Na esquerda, esquema do desenho experimental, note que 0.4 μM de BafA1 foram adicionados nas últimas 4 horas antes da coleta das amostras. Na direita, membrana representativa das proteínas LC3 – II e p62 detectadas por quimioluminescência. A proteína GAPDH foi utilizada como controle de carregamento. Os números na parte inferior da membrana indicam a ordem das amostras: 1 – Basal, 2 – FS ativado, 3 – células incubadas com 0.4 μM de BafA1 por 4 horas, 4 – células fotossensibilizadas e incubadas com 0.4 μM de BafA1. As membranas foram reaproveitadas na detecção de cada proteína. **(B - C)** Densitometria das proteínas LC3 – II e p62. Os resultados da média aritmética de pelo menos três experimentos independentes não mostraram diferenças entre as células fotossensibilizadas e as células tratadas de maneira conjunta com BafA1 (linha verde). Para as comparações foi utilizada a análise ANOVA de uma via e teste Dunnett *post hoc* (** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$, não significativo (ns) $p > 0.05$).

Autofagia insuficiente pode ativar o Fator 2 relacionado a NF-E2 (NRF2), um dos principais sensores de estresse oxidativo na célula (ITO et al., 1999). Em condições basais, a proteína NRF2 é sequestrada no citosol pela Proteína 1 Associada a ECH semelhante a Kelch (KEAP1) e direcionada ao proteossomo para sua degradação (KOBAYASHI et al., 2004; TAGUCHI; YAMAMOTO, 2017). Não obstante, o acúmulo de p62 pode dissociar esta interação, permitindo a localização nuclear da proteína NRF2, onde ativa além da sua própria expressão, a transcrição de genes antioxidantes, detoxificantes, entre outros (KOMATSU et al., 2010).

Baseados nestes antecedentes e no acúmulo de p62 observado nas células fotosensibilizadas, avaliamos a expressão do mRNA do gene *NRF2*. Os resultados não mostraram diferenças entre os grupos estudados. No entanto, abordagens que incluíam a análise de genes alvos do fator de transcrição NRF2 e o nível de ubiquitinação da proteína NRF2 no citosol são necessárias para conferir a atividade desta via de proteção celular. De qualquer modo, nossos resultados sugerem que após 24 horas da fotossensibilização não há alteração na regulação transcricional do gene *NRF2* que pudesse indicar o seu envolvimento no alívio ou exacerbação do estresse oxidativo gerado pela ativação do fotossensibilizador (Figura 21).

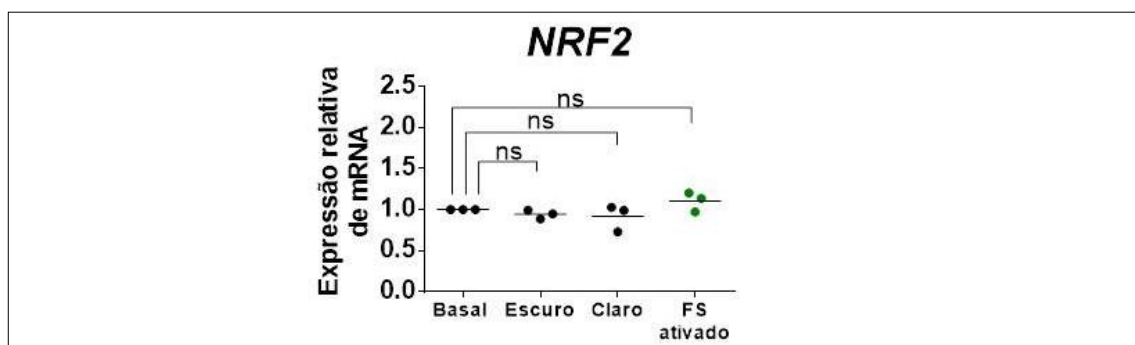


Figura 21. Expressão do mRNA de NRF2 não foi diferente entre os grupos. As amostras celulares foram coletadas após 24 horas de irradiação. Os valores de expressão para o gene *GAPDH* foram utilizados como controle endógeno. O grupo basal foi utilizado como referência nos cálculos da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). O gráfico representa a média de 3 experimentos. Para as comparações foi utilizada a análise ANOVA de uma via e teste Dunnett *post hoc*. Na análise entre grupos não se obtiveram diferenças (não significativo (ns) $p > 0.05$).

Considerando o conjunto de experimentos, os dados indicam que as células fotossensibilizadas com TPPS_{2a} não ativam a lisofagia para degradarem os endossomos e os lisossomos defeituosos, ao contrário, nossos dados evidenciam um bloqueio geral da autofagia caracterizado pelo acúmulo de autofagossomos.

4.3. Fotossensibilização de células altera o metabolismo de lipídios

O tráfego de membranas é crucial na homeostase celular, especialmente nos organismos eucariotos que possuem células compartimentadas. Cada um desses compartimentos ou organelas é um espaço funcionalmente especializado delimitado por membranas. A identidade de cada organela é mantida pela intensa troca de lipídios que ocorre através de eventos de fusão e de fissão, a proximidade física entre organelas ou por vesículas de transporte (KLUMPERMAN; PUCADYIL, 2021; LUJAN et al., 2021).

O fluxo de lipídios aos lisossomos é facilitado pela endocitose, via que participa na internalização dos componentes lipídicos e proteicos das membranas plasmáticas seja como constituintes da membrana limitante dos endossomos ou como parte de vesículas intraluminais formadas nos endossomos iniciais mediante o brotamento interno das suas membranas. Enquanto os componentes lipídicos e proteicos incorporados na membrana dos endossomos não são degradados por estarem protegidos pelo glicocalix; de maneira oposta, é sugerido que as vesículas intraluminais favorecem a digestão dos glicosfingolipídios da membrana plasmática (**Figura 22**) (FÜRST; SANDHOFF, 1992; SANDHOFF; KOLTER, 1996).

O perfil lipídico das vesículas no lúmen dos endossomos e dos lisossomos mostra enriquecimento do lipídio BMP (Bis (monoacilglicerol) fosfato), uma molécula de carga negativa que facilita a ligação de proteínas catiônicas. Dentre essas proteínas, a associação

do BMP com as Saposinas (SAPs) é de extrema relevância para o metabolismo de lipídios (**Figura 23**) (KOLTER; SANDHOFF, 2005). Há 4 Saposinas nomeadas como SAP-A, SAP-B, SAP-C, SAP-D, que são geradas nos compartimentos endolisossomais pelo processamento da prosaposina (PSAP) com o auxílio da CTSD. As SAPs têm como função favorecer o catabolismo de glicosfingolipídios, em especial, de aqueles formados por uma cadeia curta de carboidratos (4 ou 5 unidades de açúcares); porém, estas proteínas com pesos moleculares entre 8 a 11 kDa apesar de possuírem propriedades semelhantes, apresentam especificidade pelos substratos diferentes. Por exemplo, a SAP-A é requerida na degradação da galactosilceramida, enquanto a SAP-D estimula a lipólise das ceramidas (KLEIN et al., 1994; KOLTER; SANDHOFF, 2005; SPIEGEL et al., 2005).

A proteína PSAP, de importância neste trabalho, é transportada até os endossomos e os lisossomos através dos receptores de M6P ou alternativamente mediante os receptores de sortilina (LEFRANCOIS et al., 2003). Interessantemente, a PSAP pode também ser secretada no meio extracelular (MEYER et al., 2014). Na clínica, os históricos de pacientes portadores de mutações gênicas que levaram a perda da expressão da PSAP, e em consequência das SAPs, mostraram, nos fibroblastos, acúmulo de muitos esfingolipídios tais como a glicosilceramida, a lactosilceramida, a galactosilceramida, os gangliosídeos, entre outros (PATON et al., 1992). Outro aspecto interessante da saposina, em específico da SAP-D, é que ela ativa a ceramidase ácida, uma proteína lisossomal codificada pelo gene *ASAH1*, que tem como função degradar a ceramida em esfingosina e ácidos graxos (AZUMA et al., 1994; KLEIN et al., 1994).

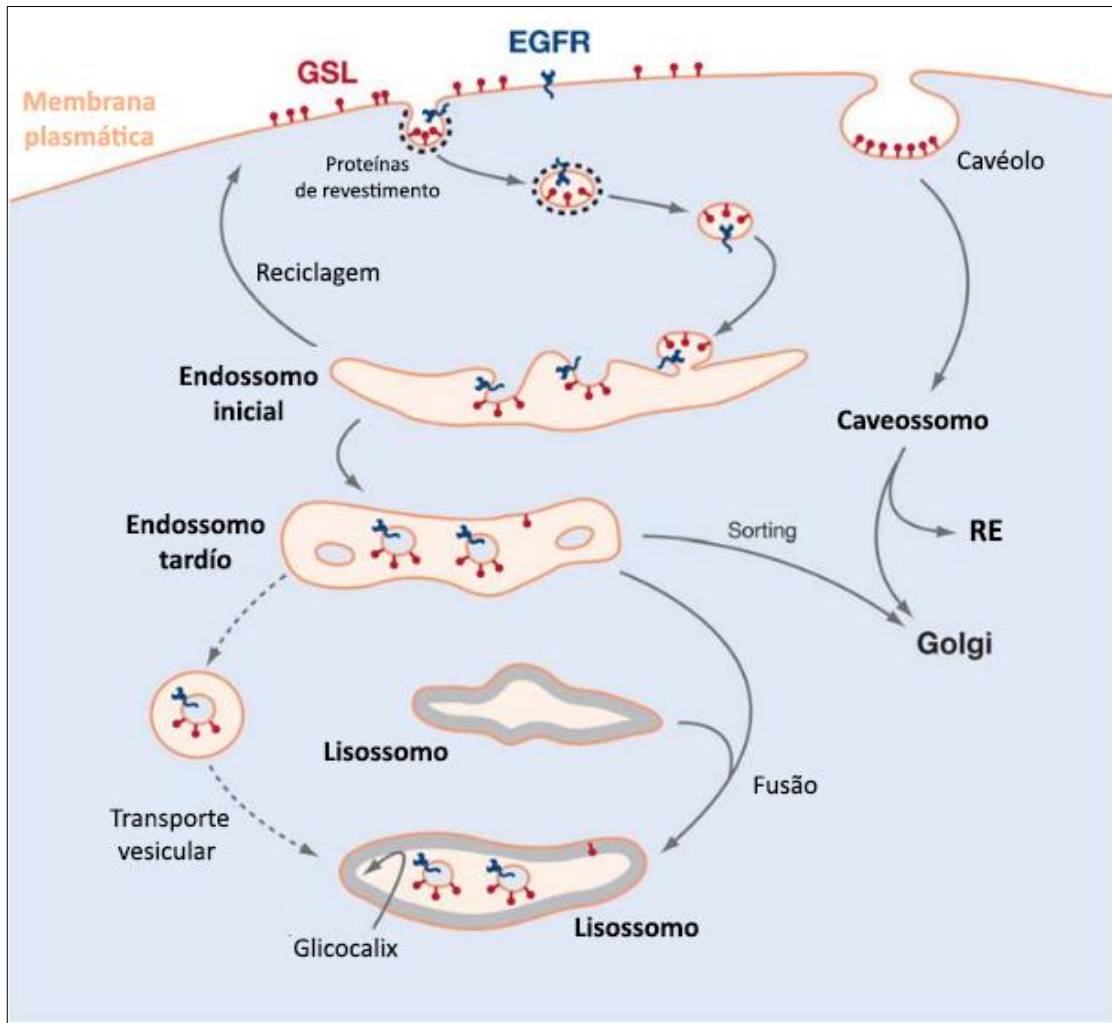


Figura 22. Modelo de endocitose e degradação de membranas. Em geral, a endocitose tem início com a formação de vesículas revestidas de clatrina. Essas vesículas carregam partes da membrana plasmática incluindo os glicosídeos (GSL); lipídios complexos que podem ser incorporados tanto nas membranas limitantes quanto nas vesículas internas dos endossomos. Seguindo a via endocítica, os endossomos entregam as vesículas internas aos lisossomos com o fim de serem degradadas. Acredita-se que este evento envolve a fusão transiente entre ambos os compartimentos. O perímetro da membrana lisossomal é protegido da degradação pelo glicocalix.. Em contraste com as vesículas revestidas de clatrina, os caveólos formados a partir de microdomínios ricos em colesterol, GSL e proteínas de membrana ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI) evitam os endossomos e os lisossomos. EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico. Adaptado de KOLTER; SANDHOFF, 2005.

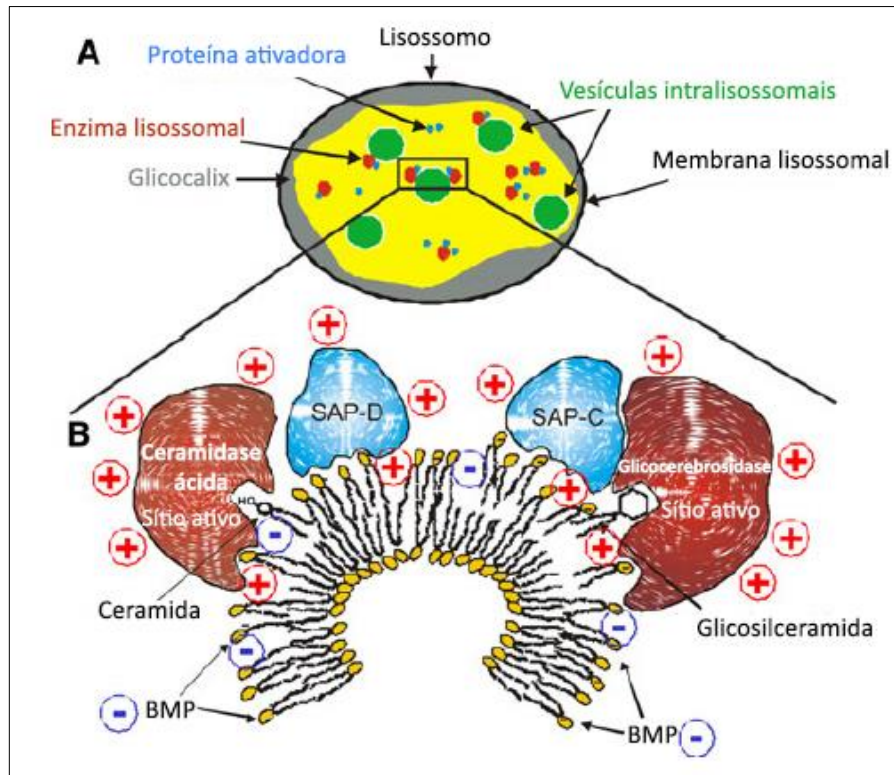


Figura 23. BMP e Saposinas (SAPs) nos lisossomos. (A) Representação do lisossomo mostrando o glicocalix (cinza), as enzimas (vermelho), as proteínas ativadoras (azul) e as vesículas intralisossomais (verde). (B) Modelo de vesícula lipídica intralisossomal. Em pH 4.0 – 5.0, proteínas catiônicas como as SAPs (em azul) e as lipases (ceramidase ácida, glicosilceramidase, em vermelho) se ligam na superfície das vesículas intralisossomais atraídas pelo lipídio de carga negativa BMP (Bis (monoacilglicerol) fosfato). Para resolver o problema do acesso das lipases ácidas por seus substratos, as saposinas se ligam aos lipídios e os transferem para as enzimas facilitando sua degradação. Adaptado de GALLALA; SANDHOFF, 2011.

Demonstramos acima que nas células incubadas com TPPS_{2a} e irradiadas houve acúmulo da PSAP (≈70 kDa) como resultado provável da diminuição na expressão proteica da CTSD, enzima indispensável no seu processamento proteolítico. Conseqüentemente, a diminuição dos níveis proteicos da CTSD impacta negativamente na formação das SAPs. Portanto, seria de esperar que nas células fotossensibilizadas ocorram alterações no metabolismo dos esfingolipídios.

Com o intuito de estudar a consequência da falta de saponinas, avaliamos a expressão dos transcritos de *ASA1* de amostras coletadas após 24 horas do início do ensaio e observamos que as células fotossensibilizadas, quando comparadas aos grupos controle, tiveram seus transcritos aumentados em 1.2 vezes (**Figura 24**). Uma interpretação plausível

é que as células após fotossensibilização ativem a transcrição de *ASAH1* como parte de um mecanismo compensatório a fim de manter a homeostase das esfingosinas e contribuir com a sobrevivência celular. Interessantemente, na via de degradação dos esfingolipídios complexos, após da reação catalisada pela ceramidase ácida, a subsequente formação da esfingosina 1 – fostato (S1P) pela esfingosina quinase é de importância na sinalização celular (**Figura 25**) (ZEIDAN et al., 2008). A ceramidase ácida é uma molécula de interesse nos estudos que envolvem o tratamento do câncer (DOAN et al., 2017). Em alguns tipos de células, o incremento da razão entre a S1P / ceramida tem sido associado com a resistência a quimioterápicos, enquanto a inversão no balanço resulta em níveis maiores de ceramida com o potencial de induzir a apoptose (CAMPANELLA; MARFIA, 2020).

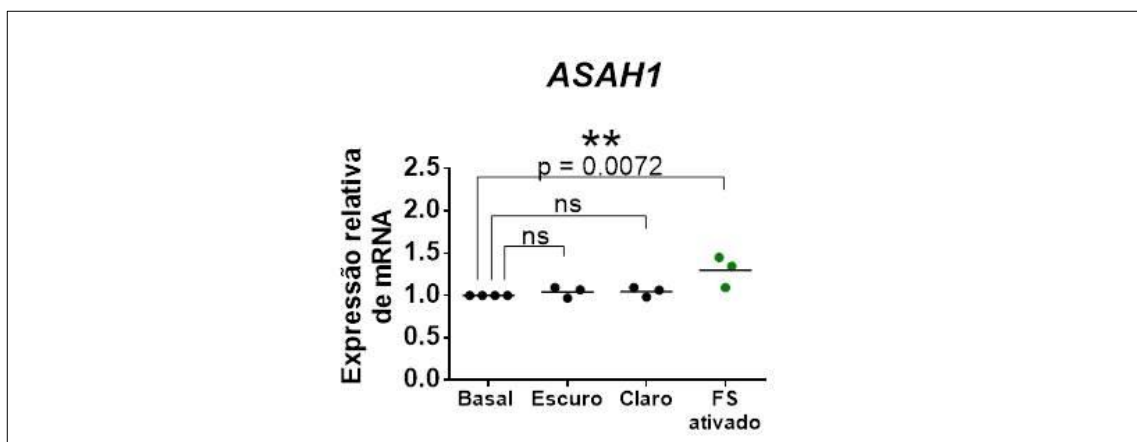


Figura 24. Quantificação relativa de mRNA do gene *ASAH1*. As amostras celulares foram coletadas após 24 horas de irradiação. Os valores de expressão para o gene *GAPDH* foram utilizados como controle endógeno. O grupo basal foi utilizado como referência nos cálculos da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). O gráfico representa a média de 3 experimentos independentes. Para as comparações foi utilizada a análise ANOVA de uma via e teste Dunnett *post hoc*. Diferenças significativas na expressão de *ASAH1* foram encontradas entre o grupo basal e o grupo de células fotossensibilizadas (** $p \leq 0.01$). Na análise comparativa entre os grupos controle não se obtiveram diferenças (não significativo (ns) $p > 0.05$).

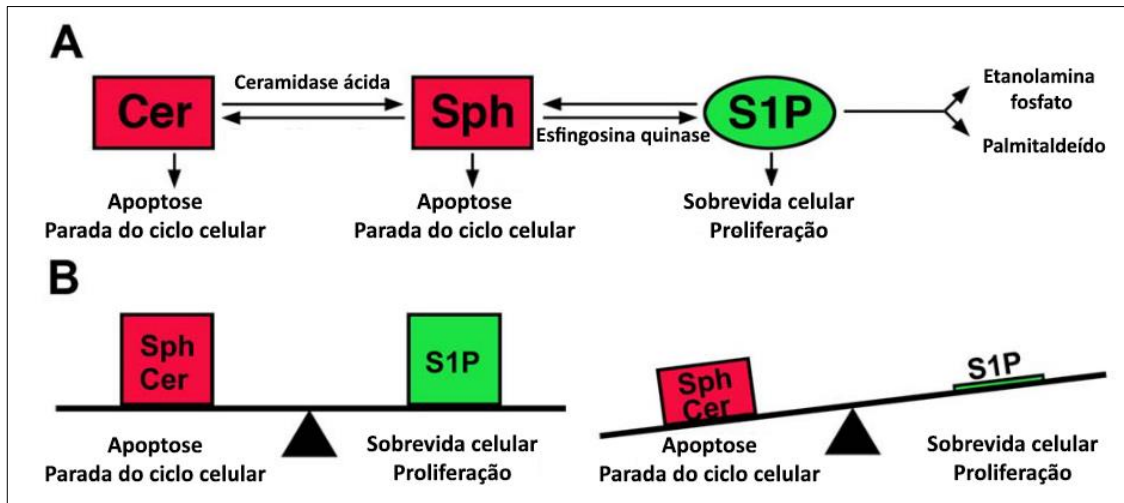


Figura 25. Balanço entre a Esfingosina 1- fosfato (S1P) e a Cerâmica (Cer). (A) Esquema simplificado da via da S1P. A esfingosina (Sph) é fosforilada pela Esfingosina quinase 1 / 2 para gerar S1P. A S1P pode servir de substrato tanto para a re-síntese de Cerâmica quanto para formação de etanolamina fosfato e palmitaldeído. Relatos da literatura sugerem que o aumento da razão S1P / Cer favorece a proliferação e a sobrevivência celular; enquanto a queda dessa razão tende a promover a apoptose e a parada do ciclo celular. (B) O equilíbrio entre a S1P e a Cerâmica garante o balanço entre a sobrevivência e a morte celular. Adaptado de MENG; YUAN; LEE, 2011.

No entanto, a disfunção lisossomal não parece alterar só o metabolismo das ceramidas e de seus derivados. Experiências com amônia e BafA1, duas drogas com efeitos semelhantes no incremento do pH lisossomal, porém através de mecanismos distintos, evidenciaram que em concentrações baixas ambas inibem a proliferação celular, enquanto em concentrações maiores causam a morte. Interessantemente, a adição de ferro no meio de cultura foi o único tratamento capaz de restaurar a proliferação celular. Os dados relacionados ao metabolismo de lipídios indicaram que as células com disfunção lisossomal mimetizaram às células com privação de colesterol e ativaram a via mediada pelo SREBP, a qual tem como função estimular a síntese de *novo* do colesterol. Entre os genes alvos do SREBP avaliados, a *HMGCS1* (Hidroximetilglutaril-CoA sintase), a *HMGCR* (hidroximetilglutaril-CoA reductase) e o *SQLE* (Esqualeno monooxigenase) apresentaram incremento transcricional após de alterar o pH lisossomal. Além disso, foi reportado o aumento da abundância do lanosterol, um precursor na síntese do colesterol (WEBER et al., 2020).

Seguindo os achados de Weber e colaboradores, avaliamos a expressão da *HMGCR* através do RT – qPCR. Note que houve, nas células fotossensibilizadas, um aumento significativo de ≈ 1.6 vezes em relação aos valores calculados para as células dos grupos controle (**Figura 26**). Esse resultado levantou a pergunta: qual seria o motivo por trás da ativação de um sinal de carência de colesterol?. As saponinas, especificamente a SAP-A participa do efluxo do colesterol endolisossomal por meio da sua associação com a cavidade luminal da proteína integral de membrana lisossomal tipo 2 (LIMP-2) (HEYBROCK et al., 2019). Alteração no processamento de saponinas e a provável redução da SAP-A, sugerido pelo acúmulo de prosaponinas nas células fotossensibilizadas, poderia diminuir a eficiência do transporte de colesterol entre os endossomos / lisossomos e o retículo endoplasmático (RE), o qual acaba por reconhecer a redução no nível de colesterol, ativando a transcrição da *HMGCR*. Não obstante, esta proposta tem ressalvas, uma vez que os transportadores NPC1 e NPC2 trabalham de maneira mais eficiente do que a SAP-A no transporte do colesterol (MENG et al., 2020). Em concordância com esta hipótese, foi reportado que a diminuição de apenas 1 % no transporte de colesterol entre a membrana plasmática e o RE bastou para ativar a via do SREBP em uma linhagem celular de ovário de hamster chinês, sugerindo que as células são muito sensíveis a mudanças no *pool* de esta macromolécula e, portanto, acionam mecanismos para equilibra-lo rapidamente (INFANTE; RADHAKRISHNAN, 2017).

Restava saber como os corpúsculos lipídicos (CLs), organelas que armazenam lipídios esterificados e que possuem um papel central na homeostase lipídica serão afetados pela foto-oxidação nos endossomos e nos lisossomos. Estruturalmente, no interior dos CLs, os lipídios esterificados ou também chamados de lipídios neutros - triacilglicerídeos e ésteres de colesterol - estão dispostos num núcleo hidrofóbico; enquanto, exteriormente, esses

lipídios estão delimitados por uma monocamada de fosfolipídios constituída principalmente por fosfatidilcolina (PC) (PENNO; HACKENBROICH; THIELE, 2013; WELTE, 2015).

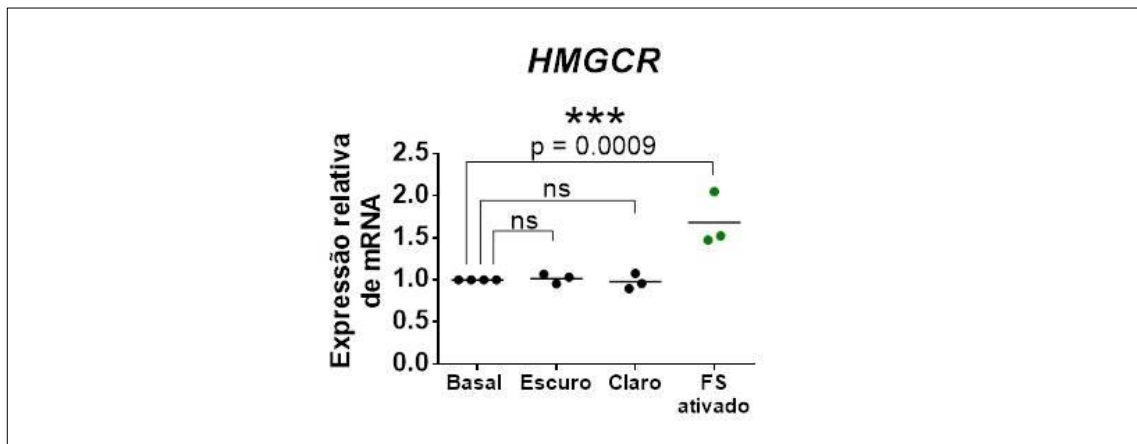


Figura 26. Quantificação relativa de mRNA do gene *HMGCR*. As amostras celulares foram coletadas após 24 horas de irradiação. Os valores de expressão para o gene *GAPDH* foram utilizados como controle endógeno. O grupo basal foi utilizado como referência nos cálculos da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). O gráfico representa a média de 3 experimentos independentes. Para as comparações foi utilizada a análise ANOVA de uma via e teste Dunnett *post hoc* (***) $p \leq 0.001$; não significativo (ns) $p > 0.05$). Unicamente foram encontradas diferenças significativas entre o grupo basal e o grupo de células fotossensibilizadas.

Na literatura já há relatos que sugerem que estas organelas protegem as células perante o estresse oxidativo e o estresse de nutrientes, além de contribuir ao crescimento e sobrevivência de células cancerosas. Essa relação, foi demonstrada num estudo realizado em células de CRC, onde foi caracterizado que os CLs servem como ancoras para sequestrar a proteína calreticulina na sua superfície e assim evitar a sua expressão na membrana plasmática, fato que torna a célula irreconhecível na destruição conduzida pelos linfócitos T citotóxicos (CD8) e confere resistência aos quimioterápicos: 5 – fluoruracila (5- Fu) e oxaliplatina (Oxa). Além disso, foi evidenciado que a expressão gênica e proteica da lisofosfatidilcolina aciltransferase 2 (LPCAT2), uma enzima que catalisa a síntese da PC nos CLs, correlaciona-se positivamente com a abundância destas organelas. Portanto, segundo o parâmetro da expressão proteica da LPCAT2 e com o auxílio do citômetro de fluxo e da

microscopia de fluorescência, células HT-29 foram classificadas como células com alto conteúdo de CLs; enquanto células SW620 apresentaram o fenótipo contrário (COTTE et al., 2018; PETAN; JARC; JUSOVIC, 2018).

Em primeiro lugar, baseados nesses antecedentes, avaliamos através da expressão gênica de *LPCAT2* se as células poderiam modular os estoques de CLs após de serem desafiadas pela fotossensibilização; porém, não identificamos diferenças na expressão do mRNA de *LPCAT2* nos grupos avaliados (**Figura 27**). A seguir, a análise do conteúdo dos CLs através do cálculo da mediana da intensidade da fluorescência de células marcadas com BODIPY 493 / 503, um corante que se liga aos lipídios neutros dos CLs, conferiu os resultados da expressão genica, não se achando diferenças significativas nos estoques de lipídios neutros; não obstante, nas células fotoativadas foi observado um incremento da fluorescência, sendo este valor em torno de 20 % em relação aos grupos: basal, controle claro e controle escuro (**Figura 28**).

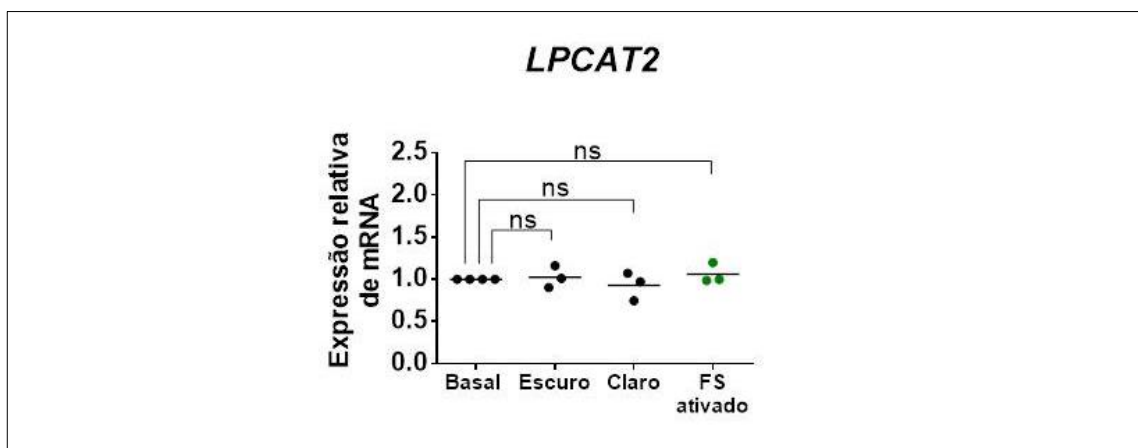


Figura 27. Quantificação relativa de mRNA do gene *LPCAT2*. As amostras celulares foram coletadas após 24 horas de irradiação. Os valores de expressão para o gene *GAPDH* foram utilizados como controle endógeno. O grupo basal foi utilizado como referência nos cálculos da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). O gráfico representa a média de 3 experimentos independentes. Para as comparações foi utilizada a análise ANOVA de uma via e teste Dunnett *post hoc*. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos analisados (não significativo (ns) $p > 0.05$).

Adicionalmente no ensaio foi adicionado um grupo de células tratadas com 0.1 μM de BafA1 por 24 horas, pois como reportado por diversos estudos, mediante a lipofagia, um dos tipos de autofagia seletiva, os CLs podem ser sequestrados nos autofagossomos para depois serem degradadas pelas lipases ácidas nos lisossomos (OGASAWARA; TSUJI; FUJIMOTO, 2020). Parecido aos dados das células fotossensibilizadas com TPPS_{2a}, as células de este grupo apresentam um incremento aproximado da fluorescência de 15 %, resultado que poderia indicar que a inibição da autofagia é um dos motivos pelos quais é observado este acúmulo tanto nas células fotossensibilizadas quanto nas tratadas com BafA1. No entanto, não podemos descartar que esse acúmulo seja resultado do aumento na síntese dos ácidos graxos ou da redução da lipólise dos CLs no citosol. Células carregadas com 400 μM de oleato foram utilizadas como controle positivo no acúmulo de CLs, e tal como esperado essas células mostraram um consistente incremento na emissão de fluorescência, atingindo valores 3 vezes maiores que os demais grupos.

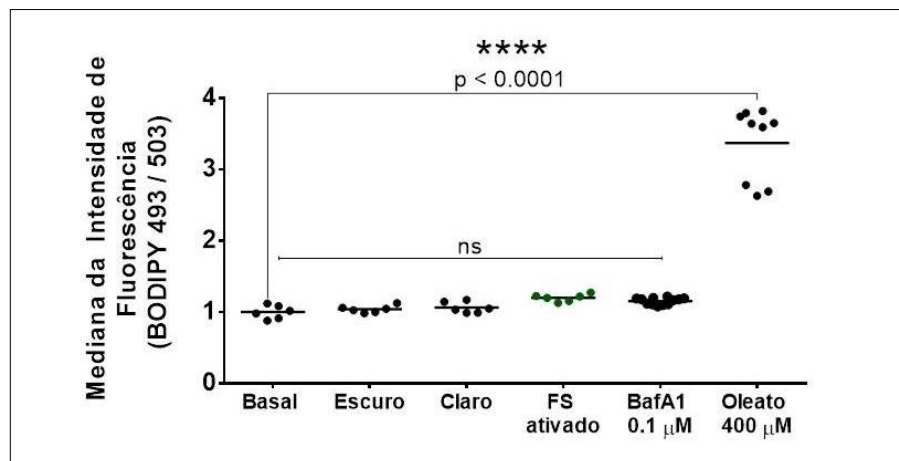


Figura 28. Conteúdo de corpúsculos lipídicos (CLs) em células HT-29. Células foram fixadas após 24 horas de irradiação e marcadas com Bodipy 493 / 503 para análise no citômetro de fluxo. O gráfico representa a média de 3 experimentos independentes. Para as comparações foi utilizada a análise ANOVA de uma via e teste Dunnett *post hoc* (**** $p \leq 0.0001$; não significativo (ns) $p > 0.05$). Unicamente foram encontradas diferenças significativas entre o grupo basal e o grupo de células incubadas com 400 μM de oleato.

Em geral, nossos resultados indicam que a disfunção do sistema endolisossomal causada pela fotossensibilização de células com TPPS_{2a} ativa a síntese de *novo* do colesterol de

maneira semelhante a BafA1 e a amônia. Entretanto, este não seria o único mecanismo compensatório acionado, uma vez que houve incremento ao nível transcricional da ceramidase ácida. Nesse sentido, manter a homeostase do colesterol, das ceramidas e dos seus derivados seria preponderante nas células fotossensibilizadas.

5. DISCUSSÃO

Relatos sobre o uso da luz para o tratamento de doenças se remonta ao ano 3 000 a.C ; não obstante, o seu uso como terapia na oncologia clínica ainda é subutilizada. As reações de fotossensibilização foram descritas com mais detalhe mecanístico a partir do trabalho de Foote e vem recebendo contribuições crescentes (BAPTISTA et al., 2021; FOOTE, 1991). Há inumeráveis estudos envolvendo o emprego de FSs. Entre os protocolos desenvolvidos ao longo dos anos, alguns procuraram o seu uso em tratamentos almejando a morte celular; enquanto, diversos outros buscam melhoras na captação celular de fármacos; porém, devido à diversidade dos protocolos testados em células, a identificação do mecanismo de ação de um FS torna-se difícil. Em relação ao TPPS_{2a}, dados na literatura mostram que a incubação prolongada (18 horas) e a irradiação com luz azul (435 nm) é um dos protocolos usados para causar danos nos lisossomos e nos endossomos, e em consequência, induzir a liberação de cargos. Embora, há relatos exitosos na internalização e liberação de macromoléculas pelo sistema endolisossomal, o modelo com o qual se fundamenta essa liberação é demasiado simplista e pouco se sabe sobre os efeitos do TPPS_{2a} na homeostase celular, existindo limitadamente duas pesquisas independentes que abordam o efeito do TPPS_{2a} nas MAP quinases (MAPKs), nos microtúbulos e nos filamentos de actina (GERDA DE BRUIN, 2008; WEYERGANG; KAALHUS; BERG, 2008).

Procurando contribuir para o entendimento do impacto do TPPS_{2a} na autofagia e no metabolismo de lipídios, neste trabalho utilizamos células de adenocarcinoma colorretal HT – 29 caracterizadas por apresentar mutações em *BRAF*, *PIK3CA*, *TP53*, *SMAD4* e *APC*; além de, fenotipicamente possuir um alto conteúdo de corpúsculos lipídicos (COTTE et al., 2018;

HAO et al., 2016; ROMA et al., 2016; ROWAN et al., 2000; WOODFORD-RICHENS et al., 2001).

Em concordância com ensaios anteriores realizados em células HeLa (*TP53* WT) demonstramos que, nas células fotossensibilizadas com TPPS_{2a}, o aumento da expressão proteica dos marcadores autofágicos LC3 – II e p62 foi resultado do fluxo autofágico inibido (TSUBONE et al., 2017). Além disso, a diferença entre os genótipos das células sugere que esse bloqueio é pelo menos independente do estado da proteína p53 (ABRANTES et al., 2019). Se a inibição da autofagia exerce um papel supressor ou promotor na tumorigênese e na progressão do CRC é um assunto controverso que não foi abordado nesta pesquisa. Não obstante, uma hipótese da literatura sugere que a escolha entre ambos os caminhos em células de CRC poderia ser determinada pela capacidade da célula em ativar a autofagia (LAUZIER et al., 2019).

Como observado nas imagens microscópicas, fotossensibilizações realizadas em células que expressaram a proteína LGALS3 fusionada ao marcador EFGP não mostraram aglomerados de galectinas que indiquem a ativação da lisofagia por danos irreparáveis nas membranas endolisossomais. Devido ao papel do TPPS_{2a} na Internalização Fotoquímica e a liberação de macromoléculas e diversos cargos, seria de esperar um certo nível de permeabilização das membranas dos endossomos e dos lisossomos. Qual seria a razão da ausência da permeabilização das membranas destes compartimentos?. Os resultados da cinética de expressão da CTSD realizadas nas primeiras 24 horas após irradiação mostraram uma redução gradual na quantidade de CTSD ativas. Além disso, o incremento da fluorescência em células marcadas com LysoView™ 633 indicou que de maneira parecida aos

efeitos da Cloroquina em células da retina, os endossomos e os lisossomos poderiam ter sido alvo de permeabilização transiente ou ter incremento no seu volume (LU et al., 2017). Estudos sugerem que FSs com grupos iônicos adjacentes como o TPPS_{2a} podem se inserir nas membranas lipídicas (BERG et al., 1990). Portanto, baseados nos relatos reportados e nos nossos resultados, hipotetizamos que a interação do TPPS_{2a} com lipídios da membrana endolisossomal na presença de oxigênio foi capaz de gerar lipídios oxidados. Desta forma, nos primeiros minutos após fotoativação, esses lipídios oxidados causariam a permeabilização transiente da membrana dos endossomos e dos lisossomos, fato que levaria à perda do gradiente de prótons e desestabilizaria a estrutura nativa das enzimas lisossomais. Uma vez que essa permeabilização parece ser transiente e tênue por não gerar agregados de LGALS3, hipotetizamos também que o sistema de reparo de membranas deve ter sido capaz de reconstituir a membrana dos endossomos e dos lisossomos, restaurando o gradiente de prótons. Não obstante, a atividade enzimática de muitas proteínas não conseguiu ser restabelecida causando o acúmulo gradual de substratos que 24 horas após da fotossensibilização resultou na depleção das catepsinas sem o comprometimento aparente da membrana endolisossomal. O modelo citado não é novo na literatura, Repnik e colaboradores propuseram um modelo semelhante em 2017, a partir de experimentos realizados com o agente lisomotrópico LLOMe. Em concordância com a hipótese da permeabilização transiente da membrana dos endossomos e dos lisossomos, há estudos que indicam que estes compartimentos podem lidar com certo grau de vazamento lisossomal e que tal vazamento possui papéis fisiológicos na segregação de cromossomos, na inflamação e na motilidade celular (STAHL-MEYER; STAHL-MEYER; JÄÄTTELÄ, 2021).

Reações de oxidação não só parecem alterar a fluidez das membranas, também podem levar a perda da atividade enzimática das catepsinas, tal e como o demonstrado em culturas do epitélio pigmentar da retina, onde produtos derivados da oxidação lipídica como o 4-hidroxinonenal (HNE) e o malondialdeído (MDA) foram propensos a formarem adutos no centro ativo das cisteína proteases como a catepsina B (CTSB) e a catepsina L (CTSL). Se bem que nesse mecanismo há uma interação direta entre os lipídios oxidados e as catepsinas, não se exclui que o HNE e o MDA causem tal inatividade indiretamente, por intermédio, da modificação dos substratos proteicos das catepsinas. Interessantemente, através de este mecanismo, não só foram inativadas as cisteínas proteases, a CTSD - uma aspartil protease - considerada um alvo pouco provável da ação direta dos lipídios oxidados também teve uma redução drástica na sua atividade enzimática ($\approx 94\%$). No entanto, a modificação indireta das catepsinas pelos substratos ainda carece de suporte no modelo celular, uma vez que os ensaios foram realizados em lisossomos isolados (KROHNE et al., 2010). Visto que as reações fotoquímicas não são limitadas ao tecido ocular; em fibroblastos dérmicos, a CTSB e a CTSL foram igualmente sensíveis ao estresse oxidativo causado por doses não citotóxicas e constantes de UVA (320 – 400 nm) (LAMORE; WONDRAK, 2013). Nesse modelo, a atividade enzimática da CTSD foi moderadamente reduzida ($\approx 20\%$), fato que pode refletir a dependência de algumas catepsinas por outras proteases durante a clivagem das suas formas precursoras. No caso das CTSB e CTSL, o pH nos lisossomos e nos endossomos garantem a geração das suas formas ativas por meio da auto-ativação; enquanto, a forma precursora da CTSD não é clivada com eficiência pela autocatálise e requer da CTSB e da CTSL para um processamento completo (LAURENT-MATHA et al., 2006; VERMA; DIXIT; PANDEY, 2016). De forma parecida aos artigos citados, nossos resultados indicam que, nas células fotossensibilizadas, há redução da expressão proteica da CTSB e da CTSD, sugerindo

que eles podem constituir a base da disfunção do sistema endolisossomal e a inibição do fluxo autofágico.

Os lisossomos além de degradar substratos funcionam como sensores de nutrientes. Entre os nutrientes que são transportados aos lisossomos o colesterol tem um papel importante na regulação do mTORC1 (Complexo 1 da proteína alvo mecanístico da Rapamicina), um complexo que quando ativo pode ser localizado na superfície lisossomal e que além de modular a homeostase lipídica, tem sido envolvido na regulação da autofagia (LAPLANTE; SABATINI, 2012; LIM et al., 2019). Nas células, os lisossomos, mediante transportadores e sítios de contato com outras organelas, distribuem os nutrientes. Por exemplo, Eid e colaboradores demonstraram que os lisossomos contribuem com o colesterol disponível no RE, sendo as membranas celulares que chegam aos lisossomos através da endocitose e da autofagia as principais fontes de este lipídio; porém, muito pelo contrário, nos lisossomos, o colesterol liberado dos corpúsculos lipídicos pelas lipases ácidas teve pouca influência no *pool* de colesterol no RE. Além disso, foi observado que a inibição simultânea da autofagia e da endocitose tanto farmacológica quanto genética resultou na redução de colesterol no RE e na ativação do SREBP. Interessantemente, as células submetidas à inibição independente da autofagia e da endocitose não apresentaram falta de colesterol no RE, achado que sustenta um estudo prévio onde foi evidenciado que quando a autofagia encontra-se inibida, componentes da via endocítica, como os endossomos de reciclagem, transportam o colesterol aos lisossomos (EID et al., 2017). Nossos dados indicaram aumento na transcrição do *HMGCR*, um gene alvo do SREBP, o que sugere que nas células fotossensibilizadas, há alteração na distribuição de colesterol provavelmente pelo bloqueio simultâneo da autofagia e da endocitose. Vale citar, que Kessel e colaboradores

demonstraram que nos lisossomos as reações de oxidação de lipídios induzidas por fotossensibilização com NPe6 têm a capacidade de afetar o tráfego celular de membranas, o que está plenamente de acordo com nossos resultados (KESSEL et al., 2011).

6. CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem que, após 24 horas da captação e irradiação com TPPS_{2a}, o estresse gerado pelas reações de fotossensibilização em células HT – 29 não causam rupturas permanentes nas membranas dos compartimentos endolisossomais. Além disso, este estudo permite concluir que os endossomos e os lisossomos disfuncionais não são removidos pela lisofagia mediada por LSGAL3, evidenciando-se o bloqueio do fluxo autofágico caracterizado pelo acúmulo de autofagossomos, fato associado com a diminuição da quantidade de catepsinas ativas e a redução da capacidade de degradação dos endossomos e dos lisossomos (**Figura 29**). Ademais, pelo papel do sistema endolisossomal no tráfego de membranas, o aumento da transcrição da *HMGCR* indica que a fotossensibilização com TPPS_{2a} altera a distribuição de colesterol nas células.

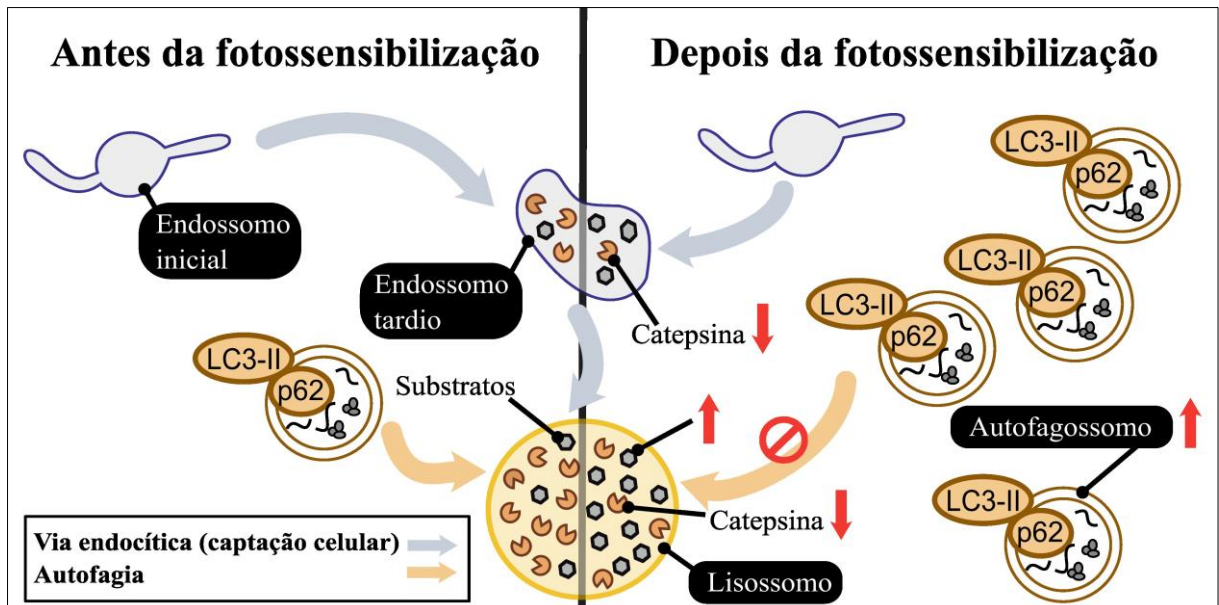


Figura 29. Resumo gráfico dos efeitos de TPPS_{2a} em células HT-29. Endossomos e lisossomos disfuncionais apresentam redução na quantidade de catepsinas e bloqueio do fluxo autofágico caracterizado pelo acúmulo de autofagossomos.

7. PERSPECTIVAS

Neste trabalho demonstramos que a captação do TPPS_{2a} pelas células e a sua ativação pela irradiação com luz num comprimento de onda específico constituem uma ferramenta promissora para inibir a autofagia. Interrogantes sobre como uma célula adapta o seu metabolismo e a identificação das vias que permitem a sua sobrevivência ou levam à morte perante a fotossensibilização podem ser estudadas. Entretanto, experiências em células de câncer colorretal com diferentes genótipos contribuirão na identificação da base molecular envolvida na complexa regulação da autofagia.

Cabe ressaltar que nosso objetivo principal foi avaliar as respostas celulares efetivadas após 24 horas da irradiação. Se bem a falta do recrutamento da LSGAL3 neste tempo sugere ausência da permeabilização das membranas dos endossomos e dos lisossomos é primordial esclarecer se, imediatamente após fotossensibilização, as reações de oxidação geradas são capazes de causar permeabilização transiente da membrana destes compartimentos; pois já foi descrito em modelos miméticos de vesículas internas dos endossomos e dos lisossomos que a foto-oxidação de lipídios geradas pela ativação do TPPS_{2a} causa vazamento, para o meio aquoso externo, da glicose e da sacarose (TSUBONE; ITRI, 2018). Portanto, conferir este efeito a nível celular é um desafio de trabalhos futuros. Com este fim, na abordagem podem ser realizados estudos focados no reparo das membranas do sistema endolisossomal (SKOWYRA et al., 2018).

Por outro lado, ainda não foi explorado se a disfunção do sistema endolisossomal produto da ativação do TPPS_{2a} é capaz de causar dano subsequente em outras organelas. Como é sabido, o lisossomo é uma organela dinâmica que se interconecta com o entorno intracelular. De fato, a comunicação entre o lisossomo e a mitocôndria foi reportada em

Caenorhabditis elegans. Interessantemente, neste modelo foi descoberto que uma proteína responsável pela manutenção da morfologia e da função mitocondrial denominada Subunidade Beta 1 do fator de transcrição nuclear Y (NFYB-1) regula a expressão de uma família de proteínas semelhante à saponina chamada de SPP-8 (do inglês *Saposin-like Protein family*) / ortóloga a PSAP em humanos. Entre os diversos ensaios realizados, foi ressaltante a localização de um *pool* de NFYB-1 nos lisossomos dos enterocitos, sugerindo a sua participação na sinalização lisossomal, hipótese que foi reforçada pela visualização de lisossomos menos ácidos nos vermes que sofreram *knockdown* do *nfyb-1*. Consistente com o comprometimento da função mitocondrial neste mutante, avaliação do perfil lipídico mostrou níveis baixos de um lipídio essencial na membrana interna mitocondrial: a cardiolipina. Aliás, os níveis de cardiolipina foram restaurados pelo silenciamento do *spp-8*, estabelecendo um vínculo ainda não conhecido entre a SPP-8/PSAP e a cardiolipina (THARYAN et al., 2020). Em concordância com estes achados, após de inibir a V-ATPase lisossomal em culturas de carcinoma hepatocelular foram observadas mudanças na morfologia das mitocôndrias, alteração que posteriormente foi associada ao incremento da fissão mitocondrial. Essas mitocôndrias fragmentadas não mantiveram o seu potencial de membrana, registrando-se queda do nível de ATP, estresses que culminaram na liberação do citocromo c no citosol e na indução da apoptose (BARTEL et al., 2019).

Em relação a apoptose, um dos ensaios mais utilizados na sua determinação consiste em estimar pelo citômetro de fluxo o conteúdo de DNA fragmentado, o qual é representado nos histogramas com um pico chamado de Sub G1. Curiosamente, num experimento exploratório realizado com amostras coletadas após 48 horas de irradiação, o grupo das células fotossensibilizadas com TPPS_{2a} a diferença dos grupos controle mostrou uma

porcentagem maior de células em Sub G1, sendo esta proporção de $\approx 23\%$ e $\approx 4\%$ respectivamente. Concomitante com este aumento notou-se que em torno do 56% da população fotossensibilizada ficou na fase G0 / G1 do ciclo celular, apresentado uma redução de $\approx 24\%$ em relação aos grupos controle. Além, com a progressão do ciclo celular foi evidenciado que aproximadamente o 11% das células fotossensibilizadas ficaram na fase S do ciclo celular, porcentagem que superou de maneira sutil, porém significativa aos valores estimados para as células do grupo controle ($\approx 6\%$). Não se encontrando diferenças na distribuição de células na fase G2 / M entre os grupos avaliados ($\approx 6\%$) (**Figura 30**). Em conjunto, estas mudanças podem refletir apoptose celular e indução do estresse replicativo. No entanto, testes adicionais deverão ser feitos a fim de conferir a indução da apoptose e o dano mitocondrial subsequente ao dano lisossomal.

Em geral, estes antecedentes levantam muitos questionamentos, entre eles, será que o acúmulo de prosaposinas é capaz de alterar o nível de cardiolipina nas células fotossensibilizadas com o TPPS_{2a}? Há redução da expressão, tanto gênica quanto proteica, de NFYB-1 nas células desafiadas com o TPPS_{2a} fotoativado?.

Pesquisas que envolvem o estudo de NFYB têm sido focadas na regulação do ciclo celular e ainda não foi demonstrado se as observações feitas em *C. elegans* constituem um mecanismo conservado nos humanos. Interessantemente, experimentações realizadas em células de osteosarcoma, onde a ativação do fator de transcrição E2F1 foi induzida seguida do silenciamento de *NFYB* mostraram redução da expressão do gene que codifica a proteína Mitofusina 2 (MNF2), a qual é essencial para a fusão mitocondrial. Embora, esta relação não foi abordada em profundidade, os investigadores demonstraram que a ligação de NFYB no promotor do fator de transcrição E2F1 tem como função diminuir a indução da apoptose (JIANG et al., 2015).

Este resultado trouxe novos aspectos para o estudo do eixo de comunicação lisossomo – mitocôndria via NFYB, pois além de estar envolvido na regulação de lipídios possui um papel potencial na apoptose celular.

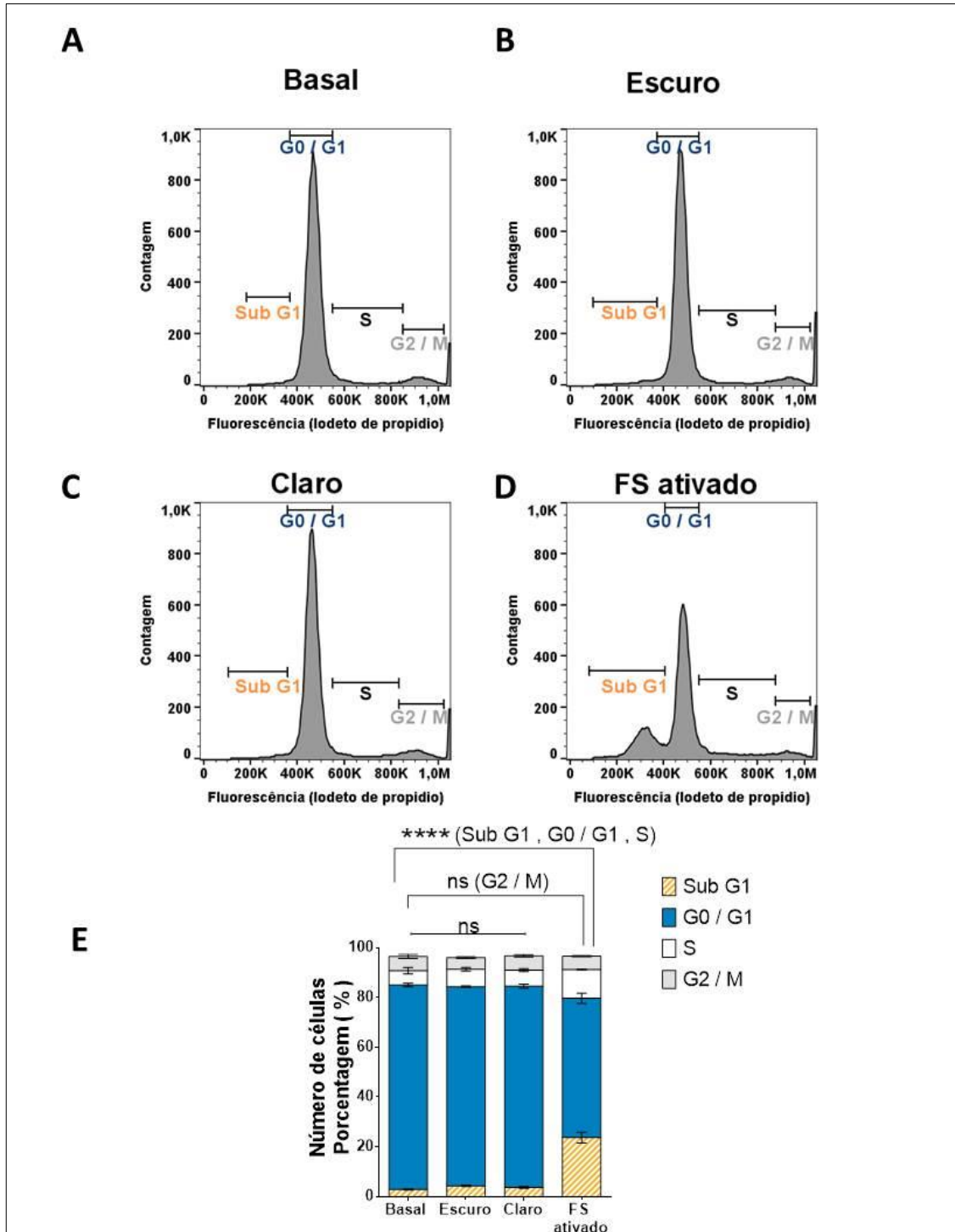


Figura 30. Análise do ciclo celular após 48 horas de irradiação. Células HT – 29 foram coletadas após 48 horas de irradiação, marcadas com Iodeto de Propídeo e analisadas pelo citômetro de fluxo. Os histogramas foram construídos a partir da plotagem da intensidade da fluorescência (eixo horizontal) e o número de eventos analisados (# de células – eixo vertical). **(A – D)** Histogramas representativos dos grupos controle (Basal, Escuro, Claro) e o grupo das células fotossensibilizadas (FS ativado). **(E)** Quantificação das células em Sub G1 e nas fases do ciclo celular: G0 / G1, S e G2 / M. O gráfico mostra a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes. No teste estatístico, ANOVA de uma via e teste Dunnett post hoc foram aplicados para a análise de cada fase do ciclo celular. ns: não significativa. Sub G1, G0 / G1, S (**** $p < 0.0001$).

8. REFERÊNCIAS

- ABRANTES, A. B. D. P. et al. p53-Dependent and p53-Independent Responses of Cells Challenged by Photosensitization. **Photochemistry and Photobiology**, v. 95, n. 1, p. 355–363, 2019.
- AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of cancer: An update. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250–281, 2011.
- AITTS, S. et al. Sensitive detection of lysosomal membrane permeabilization by lysosomal galectin puncta assay. **Autophagy**, v. 11, n. 8, p. 1408–1424, 2015.
- ALBANI, B. et al. Marked Improvement in Photoinduced Cell Death by a New Tris-Heteroleptic Complex with Dual Action: Singlet Oxygen Sensitization and Ligand Dissociation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 49, p. 17095–17101, 2014.
- ALLISON, R. R. Photodynamic therapy: Oncologic horizons. **Future Oncology**, v. 10, n. 1, p. 123–142, 2014.
- AWTAR, K. Rapid Flow Cytofluorometric Analysis of Mammalian Cell Cycle by Propidium Iodide Staining. **The Journal of Cell Biology**, v. 66, n. 1, p. 188–193, 1975.
- AZUMA, N. et al. Stimulation of Acid Ceramidase Activity by Saposin D. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 311, n. 2, p. 354–357, 1994.
- BABILAS, P. et al. Photodynamic therapy in dermatology - an update. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 21, n. 3, p. 142–149, 2005.
- BACELLAR, I. O. L. et al. Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20523–20559, 2015.
- BACELLAR, I. O. L. et al. Photosensitized membrane permeabilization requires contact-dependent reactions between photosensitizer and lipids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 140, n. 30, p. 9606–9615, 2018.
- BACELLAR, I. O. L.; BAPTISTA, M. S. Mechanisms of Photosensitized Lipid Oxidation and Membrane Permeabilization. **ACS Omega**, v. 4, n. 26, p. 21636–21646, 2019.
- BAPTISTA, M. S. et al. Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways. **Photochemistry and Photobiology**, v. 93, n. 4, p. 912–919, 2017.
- BAPTISTA, M. S. et al. Photosensitization Reactions of Biomolecules: Definition, Targets and Mechanisms. **Photochemistry and Photobiology**, v. 97, n. 6, p. 1456–1483, 2021.
- BARTEL, K. et al. Connecting lysosomes and mitochondria - A novel role for lipid metabolism in cancer cell death. **Cell Communication and Signaling**, v. 17, n. 1, p. 1–16, 2019.
- BENES, P.; VETVICKA, V.; FUSEK, M. Cathepsin D-Many functions of one aspartic protease. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 68, n. 1, p. 12–28, 2008.
- BERG, K. et al. Cellular uptake and relative efficiency in cell inactivation by photoactivated

sulfonated meso-tetraphenylporphines. **Photochemistry and Photobiology**, v. 52, n. 4, p. 775–781, 1990.

BERG, K. et al. Photochemical Internalization: A New Tool for Gene and Oligonucleotide Delivery. **Topics in Current Chemistry**, v. 296, p. 251–281, 2010.

BIDÈRE, N. et al. Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 33, p. 31401–31411, 2003.

BOLTE, S.; CORDELIÈRES, F. P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. **Journal of Microscopy**, v. 224, n. 3, p. 213–232, 2006.

BOYA, P.; KROEMER, G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. **Oncogene**, v. 27, n. 50, p. 6434–6451, 2008.

BRAULKE, T.; BONIFACINO, J. S. Sorting of lysosomal proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1793, n. 4, p. 605–614, 2009.

BRIGHT, N. A.; GRATIAN, M. J.; LUZIO, J. P. Endocytic Delivery to Lysosomes Mediated by Concurrent Fusion and Kissing Events in Living Cells. **Current Biology**, v. 15, n. 4, p. 360–265, 2005.

BROWN, S. B.; BROWN, E. A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **Lancet Oncology**, v. 5, n. 8, p. 497–508, 2004.

BUCCI, C. et al. Rab7: A key to lysosome biogenesis. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, n. 2, p. 467–480, 2000.

BULINA, M. E. et al. A genetically encoded photosensitizer. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 95–99, 2006.

CAMPANELLA, R.; MARFIA, G. Sphingosine-1-Phosphate in the Tumor Microenvironment : A Signaling Hub Regulating Cancer Hallmarks. **Cells**, v. 9, n. 2, p. 1–37, 2020.

CARDOSO, D.; LIBARDI, S.; SKIBSTED, L. Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality. **Food & Function**, v. 3, n. 5, p. 487–502, 2012.

CARUSO, J. A. et al. Differential Susceptibilities of Murine Hepatoma 1c1c7 and Tao Cells to the Lysosomal Photosensitizer NPe6: Influence of Aryl Hydrocarbon Receptor on Lysosomal Fragility and Protease Contents. **Molecular Pharmacology**, v. 65, n. 4, p. 1016–1028, 2004.

CHAUHAN, S. et al. TRIMs and Galectins Globally Cooperate and TRIM16 and Galectin-3 Co-direct Autophagy in Endomembrane Damage Homeostasis. **Developmental Cell**, v. 39, n. 1, p. 13–27, 2016.

COTTE, A. K. et al. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2-mediated lipid droplet production supports colorectal cancer chemoresistance. **Nature Communications**, v. 9, n. 322, p. 1–16, 2018.

DERETIC, V.; KROEMER, G. Autophagy in metabolism and quality control: opposing, complementary or interlinked functions? **Autophagy**, p. 1–10, 2021.

DI MASCIIO, P. et al. Singlet Molecular Oxygen Reactions with Nucleic Acids, Lipids, and Proteins. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 3, p. 2043–2086, 2019.

DOAN, N. B. et al. Acid ceramidase and its inhibitors: A de novo drug target and a new class of drugs for killing glioblastoma cancer stem cells with high efficiency. **Oncotarget**, v. 8, n. 68, p. 112662–112674, 2017.

DUVE, C. DE. The lysosome turns fifty. **Nature cell biology**, v. 7, n. 9, p. 847–849, 2005.

EAPEN, V. V. et al. Quantitative proteomics reveals the selectivity of ubiquitin-binding autophagy receptors in the turnover of damaged lysosomes by lysophagy. **eLife**, v. 10, p. 1–36, 2021.

EATON, J. W.; QIAN, M. Molecular bases of cellular iron toxicity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 9, p. 833–840, 2002.

EID, W. et al. mTORC1 activates SREBP-2 by suppressing cholesterol trafficking to lysosomes in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 30, p. 7999–8004, 2017.

ENGELMANN, F. M. et al. Determination of n-octanol/water partition and membrane binding of cationic porphyrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 1–2, p. 12–18, 2007.

FALGUIERES, T. et al. In Vitro Budding of Intraluminal Vesicles into Late Endosomes Is Regulated by Alix and Tsg101. **Molecular biology of the cell**, v. 19, n. 11, p. 4942–4955, 2008.

FEHRENBACHER, N. et al. Sensitization to the lysosomal cell death pathway by oncogene-induced down-regulation of lysosome-associated membrane proteins 1 and 2. **Cancer Research**, v. 68, n. 16, p. 6623–6633, 2008.

FELDSTEIN, A. E. et al. Bax inhibition protects against free fatty acid-induced lysosomal permeabilization. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, n. 6, p. 1339–1346, 2006.

FOOTE, C. S. Definition of Type I and Type II photosensitized oxidation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 54, n. 5, p. 659, 1991.

FUKUDA, M. Lysosomal membrane glycoproteins: Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 32, p. 21327–21330, 1991.

FÜRST, W.; SANDHOFF, K. Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1126, n. 1, p. 1–16, 1992.

GALLALA, H. D.; SANDHOFF, K. Biological function of the cellular lipid BMP - BMP as a key activator for cholesterol sorting and membrane digestion. **Neurochemical Research**, v. 36, n. 9, p. 1594–1600, 2011.

GERDA DE BRUIN, K. **Internalization and Photoinduced Endosomal Release of Polyplexes Studied on a Single Cell Level**. [s.l.: s.n.].

GILSON, R. C. et al. Hybrid TiO₂–Ruthenium Nano-photosensitizer Synergistically Produces Reactive Oxygen Species in both Hypoxic and Normoxic Conditions. **The Journal of the German Chemical Society**, v. 56, n. 36, p. 10717–10720, 2017.

HACKBARTH STEFFEN; BORNHÜTTERA, T.; RÖDER, B. Singlet Oxygen in Heterogeneous Systems. In: NONELL, S.; FLORS, C. (Eds.). . **Singlet Oxygen : Applications in Biosciences and Nanosciences, Volume 2**. [s.l.] The Royal Society of Chemistry, 2016. p. 332.

Haidar, B. et al. Cathepsin D, a lysosomal protease, regulates ABCA1-mediated lipid efflux. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 52, p. 39971–39981, 2006.

HAMBLIN, M. R.; LUKE NEWMAN, E. On the mechanism of the tumour-localising effect in photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v. 23, n. 1, p. 3–8, 1994.

HAO, Y. et al. Oncogenic PIK3CA mutations reprogram glutamine metabolism in colorectal cancer. **Nature Communications**, v. 7, p. 1–13, 2016.

HELENIUS, A. et al. Endosomes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 8, n. 7, p. 245–250, 1983.

HEYBROCK, S. et al. Lysosomal integral membrane protein-2 (LIMP-2/SCARB2) is involved in lysosomal cholesterol export. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.

HUOTARI, J.; HELENIUS, A. Endosome maturation. **EMBO Journal**, v. 30, n. 17, p. 3481–3500, 2011.

ICHINOSE, S. et al. Lysosomal cathepsin initiates apoptosis, which is regulated by photodamage to Bcl-2 at mitochondria in photodynamic therapy using a novel photosensitizer, ATX-s10 (Na). **International Journal of Oncology**, v. 29, n. 2, p. 349–355, 2006.

INFANTE, R. E.; RADHAKRISHNAN, A. Continuous transport of a small fraction of plasma membrane cholesterol to endoplasmic reticulum regulates total cellular cholesterol. **eLife**, v. 6, p. 1–23, 2017.

ITOH, K. et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. **Genes and Development**, v. 13, n. 1, p. 76–86, 1999.

ITRI, R. et al. Membrane changes under oxidative stress: The impact of oxidized lipids. **Biophysical Reviews**, v. 6, n. 1, p. 47–61, 2014.

JIA, J. et al. Galectins Control mTOR in Response to Endomembrane Damage. **Molecular Cell**, v. 70, n. 1, p. 120–135, 2018.

JIA, J. et al. MERIT, a cellular system coordinating lysosomal repair, removal and replacement. **Autophagy**, v. 16, n. 8, p. 1539–1541, 2020a.

JIA, J. et al. Galectin-3 Coordinates a Cellular System for Lysosomal Repair and Removal. **Developmental Cell**, v. 52, n. 1, p. 69–87, 2020b.

JIANG, X. et al. E2F1-mediated induction of NFYB attenuates apoptosis via joint regulation of

- a pro-survival transcriptional program. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–16, 2015.
- JOYCE, J. A. et al. Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 5, p. 443–453, 2004.
- KÅGEDAL, K. et al. Lysosomal membrane permeabilization during apoptosis - Involvement of Bax? **International Journal of Experimental Pathology**, v. 86, n. 5, p. 309–321, 2005.
- KALLUNKI, T.; OLSEN, O. D.; JÄÄTTELÄ, M. Cancer-associated lysosomal changes: friends or foes? **Oncogene**, v. 32, p. 1995–2004, 2013.
- KAVČIČ, N. et al. Intracellular cathepsin C levels determine sensitivity of cells to leucyl-leucine methyl ester-triggered apoptosis. **FEBS Journal**, v. 287, n. 23, p. 5148–5166, 2020.
- KENNEDY, J. C.; POTTIER, R. H.; PROSS, D. C. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin. IX: Basic principles and present clinical experience. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v. 6, n. 1–2, p. 143–148, 1990.
- KESSEL, D. et al. Effects of photodynamic therapy on the endocytic pathway. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 10, n. 4, p. 491–498, 2011.
- KILCHRIST, K. V. et al. Gal8 Visualization of Endosome Disruption Predicts Carrier-Mediated Biologic Drug Intracellular Bioavailability. **ACS Nano**, v. 13, n. 2, p. 1136–1152, 2019.
- KIM, K. et al. Presence of activated ras correlates with increased cysteine proteinase activities in human colorectal carcinomas. **International Journal of Cancer**, v. 79, n. 4, p. 324–333, 1998.
- KIRKEGAARD, T. et al. Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann-Pick disease-associated lysosomal pathology. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 549–553, 2010.
- KLEIN, A. et al. **Sphingolipid activator protein D (sap-D) stimulates the lysosomal degradation of ceramide in vivo** **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1994.
- KLUMPERMAN, J.; PUCADYIL, T. Understanding membrane traffic from molecular ensemble, energetics, and the cell biology of participant components. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 71, p. iii–vi, 2021.
- KOBAYASHI, A. et al. Oxidative Stress Sensor Keap1 Functions as an Adaptor for Cul3-Based E3 Ligase To Regulate Proteasomal Degradation of Nrf2. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 16, p. 7130–7139, 2004.
- KOLTER, T.; SANDHOFF, K. Principles of lysosomal membrane digestion: Stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, p. 81–103, 2005.
- KOMATSU, M. et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. **Nature Cell Biology**, v. 12, n. 3, p. 213–223, 2010.
- KRASNOVSKY, J. Primary Mechanisms of photoactivation of molecular oxygen. History of

Development and the Modern Status of Research. **Biochemistry (Moscow)**, v. 72, n. 10, p. 1311- 1329., 2007.

KROHNE, T. U. et al. Lipid peroxidation products reduce lysosomal protease activities in human retinal pigment epithelial cells via two different mechanisms of action. **Experimental Eye Research**, v. 90, n. 2, p. 261–266, 2010.

KUNDRA, R.; KORNFELD, S. Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 43, p. 31039–31046, 1999.

LAMORE, S. D.; WONDRAK, G. T. Autophagic-lysosomal dysregulation downstream of cathepsin B inactivation in human skin fibroblasts exposed to UVA. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 11, n. 1, p. 163–172, 2012.

LAMORE, S. D.; WONDRAK, G. T. UVA causes dual inactivation of cathepsin B and L underlying lysosomal dysfunction in human dermal fibroblasts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 123, p. 1–12, 2013.

LANGEMEYER, L.; FRÖHLICH, F.; UNGERMANN, C. Rab GTPase Function in Endosome and Lysosome Biogenesis. **Trends in Cell Biology**, v. 28, n. 11, p. 957–970, 2018.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. MTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 274–293, 2012.

LAURENT-MATHA, V. et al. Processing of human cathepsin D is independent of its catalytic function and auto-activation: Involvement of cathepsins L and B. **Journal of Biochemistry**, v. 139, n. 3, p. 363–371, 2006.

LAUZIER, A. et al. Colorectal cancer cells respond differentially to autophagy inhibition in vivo. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2019.

LAWRENCE, R. E.; ZONCU, R. The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control. **Nature Cell Biology**, v. 21, n. 2, p. 133–142, 2019.

LEFRANCOIS, S. et al. The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. **EMBO Journal**, v. 22, n. 24, p. 6430–6437, 2003.

LEGLAND, D.; ARGANDA-CARRERAS, I.; ANDREY, P. MorphoLibJ: Integrated library and plugins for mathematical morphology with ImageJ. **Bioinformatics**, v. 32, n. 22, p. 3532–3534, 2016.

LEWIS, G. N.; KASHA, M. Phosphorescence and the Triplet State. **Journal of the American Chemical Society**, v. 66, n. 12, p. 2100–2116, 1944.

LI, J. et al. Glycosylation inhibition reduces cholesterol accumulation in NPC1 protein-deficient cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 48, p. 14876–14881, 2015.

LIAUDET-COOPMAN, E. et al. Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. **Cancer Letters**, v. 237, n. 2, p. 167–179, 2006.

- LIM, C. Y. et al. ER–lysosome contacts enable cholesterol sensing by mTORC1 and drive aberrant growth signalling in Niemann–Pick type C. **Nature Cell Biology**, v. 21, n. 10, p. 1206–1218, 2019.
- LINKE, T. et al. Stimulation of Acid Sphingomyelinase Activity by Lysosomal Lipids and Sphingolipid Activator Proteins. **Biological Chemistry**, v. 382, n. 2, p. 283–290, 2001.
- LIU, J. et al. Advances in the genetically engineered Killerred for photodynamic therapy applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, p. 1–20, 2021.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LU, S. et al. Lysosomal adaptation: How cells respond to lysosomotropic compounds. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–22, 2017.
- LUJAN, P. et al. Interorganelle communication and membrane shaping in the early secretory pathway. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 71, p. 95–102, 2021.
- LUZIO, J. P.; PRYOR, P. R.; BRIGHT, N. A. Lysosomes : fusion and function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, p. 622–632, 2007.
- MARTINS, W. K. et al. Parallel damage in mitochondria and lysosomes is an efficient way to photoinduce cell death. **Autophagy**, v. 15, n. 2, p. 259–279, 2019.
- MASON, S. D.; JOYCE, J. A. Proteolytic networks in cancer. **Trends in Cell Biology**, v. 21, n. 4, p. 228–237, 2011.
- MAYOR, S.; PAGANO, R. E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 8, p. 603–612, 2007.
- MENG, H.; YUAN, Y.; LEE, V. M. Loss of Sphingosine kinase 1/S1P signaling impairs cell growth and survival of neurons and progenitor cells in the developing sensory ganglia. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, 2011.
- MENG, Y. et al. Cholesterol Handling in Lysosomes and Beyond. **Trends in Cell Biology**, v. 30, n. 6, p. 1–15, 2020.
- MEYER, R. C. et al. The protective role of prosaposin and its receptors in the nervous system. **Brain Research**, v. 1585, p. 1–12, 2014.
- MOHAMED, M. M.; SLOANE, B. F. Cysteine cathepsins: Multifunctional enzymes in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 10, p. 764–775, 2006.
- MORTON, C. A. Topical sensitization - oncologic indications - Bowen ' s disease. In: **Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatolog.** [s.l: s.n.]. p. 217 – 234.
- NAGAOKA, Y. et al. Specific inactivation of cysteine protease-type cathepsin by singlet oxygen generated from naphthalene endoperoxides. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 331, n. 1, p. 215–223, 2005.
- NYLANDSTED, J. et al. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal

membrane permeabilization. **Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 4, p. 425–435, 2004.

OGASAWARA, Y.; TSUJI, T.; FUJIMOTO, T. Multifarious roles of lipid droplets in autophagy – Target, product, and what else? **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 108, n. February, p. 47–54, 2020.

OLIVEIRA, C. et al. Major determinants of photoinduced cell death : Subcellular localization versus photosensitization efficiency. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 4, p. 824–833, 2011.

ONO, K.; KIM, S. O.; HAN, J. Susceptibility of Lysosomes to Rupture Is a Determinant for Plasma Membrane Disruption in Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Cell Death. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 2, p. 665–676, 2003.

ONUWUFOR, J. O. et al. Quantification of reactive oxygen species production by the red fluorescent proteins KillerRed, SuperNova and mCherry. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 147, p. 1–7, 2020.

PAPADOPOULOS, C.; MEYER, H. Detection and Clearance of Damaged Lysosomes by the Endo-Lysosomal Damage Response and Lysophagy. **Current Biology**, v. 27, n. 24, p. R1330–R1341, 2017.

PATEL, S. et al. Cathepsins: Proteases that are vital for survival but can also be fatal. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 105, p. 526–532, 2018.

PATON, B. C. et al. Additional biochemical findings in a patient and fetal sibling with genetic defect in the sphingolipid activator protein (SAP) GM1-. **The Biochemical Journal**, v. 285, p. 481–488, 1992.

PAVANI, C.; IAMAMOTO, Y.; BAPTISTA, M. S. Mechanism and efficiency of cell death of type II photosensitizers: Effect of zinc chelation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 4, p. 774–781, 2012.

PENNO, A.; HACKENBROICH, G.; THIELE, C. Phospholipids and lipid droplets. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 3, p. 589–594, 2013.

PERRET, E. et al. Evolving endosomes: How many varieties and why? **Current Opinion in Cell Biology**, v. 17, n. 4, p. 423–434, 2005.

PETAN, T.; JARC, E.; JUSOVIC, M. Lipid Droplets in Cancer : Guardians of Fat in a Stressful World. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1–41, 2018.

PETERSEN, N. H. T. et al. Connecting Hsp70, sphingolipid metabolism and lysosomal stability. **Cell Cycle**, v. 9, n. 12, p. 2305–2309, 2010.

PETERSEN, N. H. T. et al. Transformation-Associated Changes in Sphingolipid Metabolism Sensitize Cells to Lysosomal Cell Death Induced by Inhibitors of Acid Sphingomyelinase. **Cancer Cell**, v. 24, n. 3, p. 379–393, 2013.

POTTIER, R.; KENNEDY, J. C. The possible role of ionic species in selective biodistribution of photochemotherapeutic agents toward neoplastic tissue. **Journal of Photochemistry and**

Photobiology, B: Biology, v. 8, n. 1, p. 1–16, 1990.

PRATT, D. A.; MILLS, J. H.; PORTER, N. A. Theoretical calculations of carbon-oxygen bond dissociation enthalpies of peroxy radicals formed in the autoxidation of lipids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 19, p. 5801–5810, 2003.

RAFN, B. et al. ErbB2-Driven Breast Cancer Cell Invasion Depends on a Complex Signaling Network Activating Myeloid Zinc Finger-1-Dependent Cathepsin B Expression. **Molecular Cell**, v. 45, n. 6, p. 764–776, 2012.

RAPOZZI, V.; JORI, G. Basic and Clinical Aspects of Photodynamic Therapy. In: **Autophagy Induced by Photodynamic Therapy (PDT): Shaping Resistance Against Cell Death and Anti-Tumor Immunity**. [s.l: s.n.]. p. 3–26.

REPNIK, U. et al. L-leucyl-L-leucine methyl ester does not release cysteine cathepsins to the cytosol but inactivates them in transiently permeabilized lysosomes. **Journal of Cell Science**, v. 130, n. 18, p. 3124–3140, 2017.

RISKE, K. A. et al. Giant vesicles under oxidative stress induced by a membrane-anchored photosensitizer. **Biophysical Journal**, v. 97, n. 5, p. 1362–1370, 2009.

ROMA, C. et al. BRAF V600E mutation in metastatic colorectal cancer: Methods of detection and correlation with clinical and pathologic features. **Cancer Biology and Therapy**, v. 17, n. 8, p. 840–848, 2016.

ROWAN, A. J. et al. APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational “hotspot” and interdependence of the “two hits”. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 7, p. 3352–3357, 2000.

SAMARANI, M. et al. A lysosome–plasma membrane–sphingolipid axis linking lysosomal storage to cell growth arrest. **FASEB Journal**, v. 32, n. 10, p. 5685–5702, 2018.

SANDHOFF, K.; KOLTER, T. Topology of glycosphingolipid degradation. **Trends in Cell Biology**, v. 6, n. 3, p. 98–103, 1996.

SCHURIGT, U. et al. Trial of the cysteine cathepsin inhibitor JPM-OEt on early and advanced mammary cancer stages in the MMTV-PyMT-transgenic mouse model. **Biological Chemistry**, v. 389, n. 8, p. 1067–1074, 2008.

SEREBROVSKAYA, E. O. et al. Light-induced blockage of cell division with a chromatin-targeted phototoxic fluorescent protein. **Biochemical Journal**, v. 435, n. 1, p. 65–71, 2011.

SEREBROVSKAYA, E. O. et al. Phototoxic effects of lysosome-associated genetically encoded photosensitizer KillerRed. **Journal of Biomedical Optics**, v. 19, n. 7, p. 1–4, 2013.

SETTEMBRE, C. et al. Signals from the lysosome : a control centre for cellular clearance and energy metabolism. **Nature Publishing Group**, v. 14, n. 5, p. 283–296, 2013.

SHU, X. et al. A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms. **PLoS Biology**, v. 9, n. 4, p. 1–10, 2011.

SIERON, A. et al. Photodynamic therapy of premalignant lesions and local recurrence of

laryngeal and hypopharyngeal cancers. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 258, n. 7, p. 349–352, 2001.

SKOWYRA, M. L. et al. Triggered recruitment of ESCRT machinery promotes endolysosomal repair. **Science**, v. 360, n. 6384, p. 1–13, 2018.

SLOANE, B. F. et al. Membrane association of cathepsin B can be induced by transfection of human breast epithelial cells with c-Ha-ras oncogene. **Journal of Cell Science**, v. 107, n. 2, p. 373–384, 1994.

SPIEGEL, R. et al. A mutation in the saposin A coding region of the prosaposin gene in an infant presenting as Krabbe disease: First report of saposin A deficiency in humans. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 84, n. 2, p. 160–166, 2005.

STAHL-MEYER, J.; STAHL-MEYER, K.; JÄÄTTELÄ, M. Control of mitosis, inflammation, and cell motility by limited leakage of lysosomes. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 71, p. 29–37, 2021.

SUDHAKAR, J. N. et al. Luminal Galectin-9-Lamp2 interaction regulates lysosome and autophagy to prevent pathogenesis in the intestine and pancreas. **Nature Communications**, v. 11, n. 4286, 2020.

TAGUCHI, K.; YAMAMOTO, M. The KEAP1-NRF2 system in cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 7, n. 85, p. 1–11, 2017.

TAKEMOTO, K. et al. SuperNova, a monomeric photosensitizing fluorescent protein for chromophore-assisted light inactivation. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1–7, 2013.

TAN, K. P. et al. Fucosylation of LAMP-1 and LAMP-2 by FUT1 correlates with lysosomal positioning and autophagic flux of breast cancer cells. **Cell Death and Disease**, v. 7, n. 8, p. 1–11, 2016.

TATTI, M. et al. Reduced cathepsins B and D cause impaired autophagic degradation that can be almost completely restored by overexpression of these two proteases in Sap C-deficient fibroblasts. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 23, p. 5159–5173, 2012.

THARYAN, R. G. et al. NFYB-1 regulates mitochondrial function and longevity via lysosomal prosaposin. **Nature Metabolism**, v. 2, n. 5, p. 387–396, 2020.

THIELE, D. L.; LIPSKY, P. E. Mechanism of L-leucyl-L-leucine methyl ester-mediated killing of cytotoxic lymphocytes: Dependence on a lysosomal thiol protease, dipeptidyl peptidase I, that is enriched in these cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 1, p. 83–87, 1990.

TSUBONE, T. M. et al. Enhanced efficiency of cell death by lysosome-specific photodamage. **Scientific Reports**, v. 7, n. 6734, p. 1–19, 2017.

TSUBONE, T. M. et al. Cellular compartments challenged by membrane photo-oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 697, p. 1–52, 2021.

TSUBONE, T. M.; BAPTISTA, M. S.; ITRI, R. Understanding membrane remodelling initiated by photosensitized lipid oxidation. **Biophysical Chemistry**, v. 254, p. 1–17, 2019.

TSUBONE, T. M.; ITRI, R. Effects of TPPS2a-Photosensitization Lysosomal Membranes. **Biophysical Journal**, v. 114, n. 3, p. 260a, 2018.

TURK, B.; TURK, D.; TURK, V. Lysosomal cysteine proteases: More than scavengers. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1477, n. 1–2, p. 98–111, 2000.

TURK, V. et al. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1824, n. 1, p. 68–88, 2012.

UREN, R. T.; IYER, S.; KLUCK, R. M. Pore formation by dimeric Bak and Bax: An unusual pore? **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 372, n. 1726, p. 1–9, 2017.

VASILJEVA, O. et al. Emerging Roles of Cysteine Cathepsins in Disease and their Potential as Drug Targets. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 4, p. 387–403, 2007.

VERMA, S.; DIXIT, R.; PANDEY, K. C. Cysteine proteases: Modes of activation and future prospects as pharmacological targets. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. APR, p. 1–12, 2016.

WANG, C. et al. Investigation of endosome and lysosome biology by ultra pH-sensitive nanoprobe. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 113, p. 87–96, 2017.

WARREN, C. B. et al. Pain associated with aminolevulinic acid-photodynamic therapy of skin disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 61, n. 6, p. 1033–1043, 2009.

WEBER, R. A. et al. Maintaining Iron Homeostasis Is the Key Role of Lysosomal Acidity for Cell Proliferation Article Maintaining Iron Homeostasis Is the Key Role of Lysosomal Acidity for Cell Proliferation. **Molecular Cell**, n. 77, p. 645–655, 2020.

WELTE, M. A. Expanding Roles for Lipid Droplets. **Current Biology**, v. 25, n. 11, p. R470–R481, 2015.

WESTBERG, M. et al. No Photon Wasted: An Efficient and Selective Singlet Oxygen Photosensitizing Protein. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 121, n. 40, p. 9366–9371, 2017.

WEYERGANG, A.; KAALHUS, O.; BERG, K. Photodynamic therapy with an endocytically located photosensitizer cause a rapid activation of the mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase, p38, and c-Jun NH2 terminal kinase with opposing effects on cell survival. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, n. 6, p. 1740–1750, 2008.

WONDRAK, G. T.; JACOBSON, M. K.; JACOBSON, E. L. Endogenous UVA-photosensitizers: Mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 5, n. 2, p. 215–237, 2006.

WOODFORD-RICHENS, K. L. et al. SMAD4 mutations in colorectal cancer probably occur before chromosomal instability, but after divergence of the microsatellite instability pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 17, p. 9719–9723, 2001.

YADATI, T. et al. The Ins and Outs of Cathepsins : Physiological Function and Role in Disease

Management. 2020.

YANO, S. et al. Current states and future views in photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 12, n. 1, p. 46–67, 2011.

YIM, W. W. Y.; MIZUSHIMA, N. Lysosome biology in autophagy. **Cell Discovery**, v. 6, n. 6, 2020.

YIN, H.; XU, L.; PORTER, N. A. Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 5944–5972, 2011.

YONESHIGE, A. et al. Regional expression of prosaposin in the wild-type and saposin D-deficient mouse brain detected by an anti-mouse prosaposin-specific antibody. **Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences**, v. 85, n. 9, p. 422–434, 2009.

ZEIDAN, Y. et al. Molecular Targeting of Acid Ceramidase: Implications to Cancer Therapy. **Current Drug Targets**, v. 9, n. 8, p. 653–661, 2008.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Anticorpos e condições usadas no *Western blot*.

Anticorpo	Fornecedor	Espécie hospedeira	Bloqueio	Incubação - Anticorpo primário	Incubação - Anticorpo secundário
Catepsina B (D1C7Y) XP® #31718	Cell Signaling	Rabbit	1 % BSA em 0.05 % TBS - T	1 % BSA em 0.05 % TBS - T Diluição 1 : 1000	5 % leite em 0.05 % TBS - T Anti-rabbit conjugado ao HRP. Millipore: AP188P Diluição 1 : 5000
Catepsina D [EPR3057Y] (ab75852)	Abcam	Rabbit	5 % SFB em 0.05 % TBS - T	5 % SFB em 0.05 % TBS - T Diluição 1 : 2000	5 % leite em 0.05 % TBS - T Anti-rabbit conjugado ao HRP. Millipore: AP188P Diluição 1 : 5000
Galectina 3 [EP2775Y] (ab76245)	Abcam	Rabbit	5 % leite em 0.05 % TBS - T	5 % leite em 0.05 % TBS - T Diluição 1 : 1000	5 % leite em 0.05 % TBS - T Anti-rabbit conjugado ao HRP. Millipore: AP188P Diluição 1 : 5000

Galectina (ab69630)	9	Abcam	Rabbit	5 % leite em 0.05 % TBS - T	5 % leite em 0.05 % TBS - T Diluição 1 : 1000	5 % leite em 0.05 % TBS - T Anti-rabbit conjugado ao HRP. Millipore: AP188P Diluição 1 : 5000
GAPDH (14C10) #2118	mAb	Cell Signaling	Rabbit	5 % leite em 0.05 % TBS - T	5 % leite em 0.05 % TBS - T Diluição 1 : 2000	5 % leite em 0.05 % TBS - T Anti-rabbit conjugado ao HRP. Millipore: AP188P Diluição 1 : 5000
LAMP1 (D2D11) mAb #9091	XP®	Cell Signaling	Rabbit	5 % SFB em 0.05 % TBS - T	5 % SFB em 0.05 % TBS - T Diluição 1 : 1000	3 % SFB em 0.05 % TBS - T Anti-rabbit conjugado ao HRP. Millipore: AP188P Diluição 1 : 5000
LAMP2 [H4B4] (ab25631)		Abcam	Mouse	5 % leite em 0.05 % TBS - T	5 % leite em 0.05 % TBS - T Diluição 1 : 500	5 % leite em 0.05 % TBS - T Anti-mouse conjugado ao HRP. Millipore: AP160P Diluição 1 : 500

LC3 (L8918)	Sigma-Aldrich	Rabbit	5 % leite em 0.05 % TBS - T	5 % leite em 0.05 % TBS - T Diluição 1 : 2000	5 % leite em 0.05 % TBS - T Anti-rabbit conjugado ao HRP. Millipore: AP188P Diluição 1 : 5000
Proteína Protetiva (PPCA) / Catapsina A [EPR10435] (ab184553)	Abcam	Rabbit	5 % leite em 0.05 % TBS - T	5 % SFB em 0.05 % TBS - T Diluição 1 : 5000	5 % leite em 0.05 % TBS - T Anti-rabbit conjugado ao HRP. Millipore: AP188P Diluição 1 : 5000
PSAP ab180751	Abcam	Rabbit	5 % leite em 0.05 % TBS - T	5 % leite em 0.05 % TBS - T Diluição 1 : 800	5 % leite em 0.05 % TBS - T Anti-rabbit conjugado ao HRP. Millipore: AP188P Diluição 1 : 5000
SQSTM1 / p62 (ab56416)	Abcam	Mouse	5 % leite em 0.05 % TBS - T	5 % leite em 0.05 % TBS - T Diluição 1 : 2000	5 % leite em 0.05 % TBS - T Anti-mouse conjugado ao HRP. Millipore: AP160P Diluição 1 : 5000

Anexo 2. Oligonucleotídeos para qPCR em Tempo Real

Identificação	Gene Alvo (Abreviatura)	Gene Alvo (Nome)	Tamanho Amplicon (pb)	Fornecedor
Hs00602774_m1	<i>ASAH1</i>	N-acilesfingosina amidohidrolase / Ceramidase ácida	77	Thermo Fisher Scientific
Hs02786624_g1	<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	157	Thermo Fisher Scientific
Hs00168352_m1	<i>HMGCR</i>	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase	67	Thermo Fisher Scientific
Hs00174766_m1	<i>LAMP1</i>	Proteína 1 de Membrana Associada ao Lisossomo	93	Thermo Fisher Scientific
Hs00174474_m1	<i>LAMP2</i>	Proteína 2 de Membrana Associada ao Lisossomo	93	Thermo Fisher Scientific
Hs01044164_m1	<i>LPCAT2</i>	Lisofosfatidilcolina aciltransferase 2	67	Thermo Fisher Scientific
Hs00975961_g1	<i>NFE2L2 / NRF2</i>	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2	74	Thermo Fisher Scientific

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome : Angela Paola Yaya Candela
Nacionalidade : Peruana

EDUCAÇÃO

- 2016 - 2022** Doutorado em andamento em Bioquímica.
 Laboratório de Processos Fotoinduzidos e Interfaces. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Orientador: Mauricio da Silva Baptista. Bolsa: Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
 Instituto de Química – Universidade de São Paulo
 Bloco 12 – Sala 1262. Avenida Prof. Lineu Prestes, 748 – Cidade Universitaria São Paulo, Brasil. Código postal: 05508-900
- 2013 - 2015** Mestrado em Química Biológica.
 Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.
 Dissertação: Bni4, uma proteína envolvida na morfogênese de brotos afeta a homeostase de corpúsculos lipídicos em *Saccharomyces cerevisiae*. Ano de Obtenção: 2015.
 Orientador: Monica Montero Lomeli.
 Bolsa: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
- 2005 – 2009** Graduação em Biologia.
 Universidad Ricardo Palma. Lima, Perú

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- 2010 - 2010 Curso: Tópicos selectos en Bioinformática y Biotecnología
 Universidad Peruana Cayetano Heredia - UPCH, Lima, Perú.
- 2010 - 2010 Curso: VII Curso y Taller de Técnicas de Biología Molecular
 Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt (IMT). Universidad Peruana Cayetano Heredia - UPCH, Lima, Perú
- 2009 - 2009 Curso corto: Técnicas moleculares para la identificación de bacterias
 Universidad Ricardo Palma – URP, Lima, Perú.

OCUPAÇÃO

- 2017** 1º semestre de 2017. Programa de Aperfeiçoamento de Ensino
Estágio Supervisionado em Docência
Disciplina QBQ0230 - Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo.
Departamento de Bioquímica - Instituto de Química-USP
Supervisor: Prof(a). Walter Ribeiro Terra
Carga horária total: 120 horas
- 2019** 2º semestre de 2019. Programa de Aperfeiçoamento de Ensino
Estágio Supervisionado em Docência
Disciplina QBQ0314 - Bioquímica da Nutrição
Departamento de Bioquímica - Instituto de Química-USP
Supervisor: Prof(a). Deborah Schechtman
Carga horária total: 120 horas

Centro Internacional de La Papa, CIP, Perú.

- 2012 – 2013** Vínculo: Estagiária, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 35, Regime: Dedicção exclusiva
Projeto de pesquisa: Valorizing Andean microbial diversity through sustainable intensification of potato-based farming systems.
Departamento: Seed and Integrated Crop Management (ICM) Technology.
Atividades: Propagação de bactérias e fungos micorrizicos no laboratório e casa-de-vegetação. Avaliação de experimentos em laboratório, casa-de-vegetação e campo. Otimização de protocolos para a Propagação de bactérias e micorrizas. Colheita de dados e elaboração de relatórios

Universidad Ricardo Palma, Lima, Peru.

- 2011 – 2012** Vínculo: Estagiária, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 35, Regime: Dedicção exclusiva
Projeto de pesquisa: Inducción de Embriogénesis Somática en *Coffea arabica*. var. Caturra
Laboratorio de Fisiologia y Biotecnologia Vegetal.
Atividades: Otimização de protocolos de multiplicação *in vitro* de plantas medicinais, comestíveis e ornamentais para a conservação do banco de germoplasma. Isolamento de meristemas para a obtenção de plântulas livres de viroses. Elaboração do projeto: Mejoramiento genético mediante Selección masal y Propagación vegetativa *in vitro* de *Gossypium barbadense* Var. Algodón País "Algodón Nativo de Color" para la producción clonal y abastecimiento de fibra de

tonalidades verde, rosado y pardo a la industria textil artesanal del distrito de Nazca, Región Ica. (Autor e Pesquisador Principal: Dr. Mauro Quiñones Aguilar)

2008 Vínculo: Estagiária, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 20
 Atividades: Esterilização de materiais, preparação de meios de cultivo, controle de qualidade.
 Laboratorio de Microbiologia y Parasitologia.

Instituto Nacional de Investigación Agraria, INIA, Peru.

2010 – 2011 Vínculo: Estagiária, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 40
 Atividades: Cultivo de anteras de *Hordeum vulgare* "Cevada" para a obtenção de plantas duplo-haplóides. Atividades de campo, colheita manual de espigas.

Universidad Peruana Cayetano Heredia - UPCH, Peru.

2010 – 2011 Vínculo: Estagiária, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva
 Projeto: Quantitative trait loci for multiple disease resistance in Latin America's Barley. Ph. D. Gisella Orjeda
 Atividades: Avaliação de marcadores SSR para a detecção de polimorfismo numa população de retrocruzamento de *Hordeum vulgare* "Cevada". - Extração e quantificação de DNA. Eletroforeses em gel de agarose e poliacrilamida.

PUBLICAÇÕES

HELLEN PAULA VALERIO, FELIPE GUSTAVO RAVAGNANI, ANGELA PAOLA YAYA CANDELA, BRUNA DIAS CARVALHO DA COSTA, GRAZIELLA ELIZA RONSEIN, PAOLO DI MASCIO. Spatial proteomics reveals subcellular reorganization in human keratinocytes exposed to UVA light. iScience. Volume 25, Issue 4, 2022.