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

ALINE BIANCA DE PAIVA ABRANTES

**Efeito da proteína p53 nas respostas celulares à
terapia fotodinâmica com 1,9-dimetil azul de metileno**

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

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
10/02/2017

ALINE BIANCA DE PAIVA ABRANTES

**Efeito da proteína p53 nas respostas celulares à
terapia fotodinâmica com 1,9-dimetil azul de metileno**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
(Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Nadja Cristhina de Souza Pinto

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica

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

Abrantes, Aline Bianca de Paiva

A161e Efeito da proteína p53 nas respostas celulares à terapia fotodinâmica
com 1,9-dimetil azul de metileno / Aline Bianca de Paiva Abrantes.--
São Paulo, 2017.
64p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Baptista, Maurício da Silva

Co-orientador: Souza-Pinto, Nadja Cristhina de

1. Biologia molecular 2. Dano ao DNA 3. Terapia fotodinâmica
4. Mitocôndrias 5. Ciclo celular I. T. II. Baptista, Maurício da Silva,
orientador III. Souza-Pinto, Nadja Cristhina de, co-orientador.

574.88

CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

"Efeito da proteína p53 nas respostas celulares à terapia fotodinâmica com 1,9-dimetil azul de metileno"

ALINE BIANCA DE PAIVA ABRANTES

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Área: Bioquímica.

Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista
(Orientador e Presidente)

Aprovado (a) por:

Profa. Dra. Alícia Juliana Kowaltowski
IQ - USP

Prof. Dr. Antônio Claudio Tedesco
FFCLRP - USP

Prof. Dr. Rodrigo Maghdissian Cordeiro
UFABC

SÃO PAULO
07 de abril de 2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para a conclusão desta etapa, incluindo família e amigos, funcionários, pós-doutores e alunos da USP e agências de fomento à pesquisa.

Agradecimentos especiais a:

- Pelo apoio: meus pais Terezinha Fátima de Paiva Abrantes e José Márcio Caldeira Abrantes, minha irmã Gisele Carine de Paiva Abrantes, Pedro Henrique Cury Camargo, Cleidiane de Sousa Rocha, Juliana Raveli Domingos, Tayana Mazin Tsubone, Mariana Reis Nogueira de Lima, Paulo Newton Tonolli e demais integrantes do Laboratório de Genética Mitocondrial e Laboratório de Processos Fotoinduzidos e Interfaces do IQ-USP;
- Pela orientação: Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista e Prof^ª. Dr^ª. Nadja Cristhina de Souza Pinto;
- Pela ajuda: Mateus Prates Mori, Thiago de Souza Freire, José Renato Rosa Cussiol e Carolina Maria Berra (Laboratório de Genética Mitocondrial do IQ-USP), Felipe Gustavo Ravagnani e Divinomar Severino (Laboratório de Processos Fotoinduzidos e Interfaces do IQ-USP), Ancély Ferreira dos Santos (Laboratório de Mecanismos Moleculares de Citoproteção do IQ-USP), Gustavo Satoru Kajitani e Veridiana Munford (Laboratório de Reparo de DNA do ICB-USP), Evandro Pereira da Silva, Gabriel Guarany de Araujo e Eiji Yamassaki de Almeida (Laboratório de Quimiosfera do IQ-USP);
- Pelo auxílio financeiro: CAPES e FAPESP (Projeto FAPESP 2014/18123-4).

RESUMO

Abrantes, A. B. P. **Efeito da proteína p53 nas respostas celulares à terapia fotodinâmica com 1,9-dimetil azul de metileno.** 64 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade de tratamento que utiliza um fotossensibilizador, luz e oxigênio para gerar espécies reativas de oxigênio capazes de induzir a morte de células indesejadas, como tumores e micro-organismos infecciosos. Nosso foco está na morte induzida por 1,9-dimetil azul de metileno fotoativado (TFD-DMMB). Este fotossensibilizador foi previamente estudado por nosso grupo. Foi mostrado que o DMMB se acumula em lisossomos e mitocôndrias, e danifica essas organelas após fotoativado. O DMMB em concentração nanomolar promove uma morte celular eficiente, que parece ser resultante do bloqueio da conclusão do processo autofágico, enquanto outros fotossensibilizadores geralmente são empregados na faixa de micromolar. Nosso objetivo neste trabalho foi investigar o mecanismo molecular da TFD-DMMB através do estudo do papel da proteína p53 nas respostas celulares à TFD-DMMB. Sendo uma proteína supressora tumoral, p53 participa de vários processos celulares em resposta a diferentes estresses. Para atingir nosso objetivo, utilizamos linhagens celulares HEK293T que expressam diferentes quantidades de p53, sendo uma linhagem *knockdown* para p53 (HEK293T-p53KD) e outra com expressão normal de p53 (HEK293T-SC, *scramble*). Após o tratamento com DMMB fotoativado, avaliamos a fototoxicidade, apoptose, dano no DNA, ciclo celular e autofagia. Nossos resultados mostram que, apesar de não observarmos a estabilização de p53, a TFD-DMMB parece induzir a localização citoplasmática de p53, sugerindo que p53 citoplasmática participa da resposta celular à TFD-DMMB. A linhagem HEK293T-p53KD mostrou-se menos sensível à TFD-DMMB. Essa diferença foi explicada pelo acúmulo de células em sub-G1, indicativo de morte por apoptose, apenas na linhagem HEK293T-SC, que foi mais sensível ao tratamento. É possível que a atividade citoplasmática de p53 esteja relacionada com a indução de apoptose no nosso modelo. Em contraste aos efeitos de p53 na morte celular, encontramos respostas à TFD-DMMB independentes de p53 na parada do ciclo celular e autofagia. Observamos acúmulo de células na fase S do ciclo celular associado à fosforilação de CHK1 e H2AX, indicativo da ocorrência de estresse replicativo. A relação com a autofagia foi confirmada pelo acúmulo de vesículas ácidas e aumento dos níveis

proteicos de LC3-II. Esses resultados indicam a indução ou o bloqueio da autofagia, entretanto não observamos um aumento simultâneo nos níveis de BECLIN-1, proteína importante para a iniciação da autofagia. Além disso, DMMB fotoativado resultou em dano seletivo no DNA mitocondrial (mtDNA), que não foi reparado em 24 horas. Desse modo, e baseado nos resultados preliminares do nosso grupo, propomos que a morte celular induzida por DMMB fotoativado é decorrente principalmente do bloqueio da resolução da via autofágica, comprometendo a eliminação de mitocôndrias danificadas e levando a alterações na dinâmica do ciclo celular. Nossos resultados sugerem que há respostas celulares à TFD-DMMB dependentes e independentes de p53. Resultados similares foram obtidos para a linhagem HEK293, que é a linhagem parental de HEK293T. Do nosso conhecimento, a realocização de p53 para o citoplasma, a habilidade em induzir dano seletivo no mtDNA e o bloqueio da progressão do ciclo celular na fase S são resultados inéditos decorrentes da TFD-DMMB. O dano seletivo ao mtDNA torna o DMMB um modelo útil para estudos de mecanismos de resposta a dano no DNA específicos para a mitocôndria.

Palavras-chave: Autofagia. Lesão no DNA mitocondrial. Bloqueio da progressão do ciclo celular na fase S.

ABSTRACT

Abrantes, A. B. P. **Effect of p53 protein on cell responses to photodynamic therapy with 1,9-dimethylmethylen blue**. 64 p. Master's Thesis. Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Photodynamic Therapy (PDT) is a treatment modality that uses a photosensitizer, light and oxygen to generate reactive oxygen species capable of inducing death of unwanted cells, such as cancer cells and infectious microorganisms. In this work, we are interested in studying death induced by 1,9-dimethylmethylen blue as a photosensitizer by PDT (DMMB-PDT). This photosensitizer has been previously studied by our group. It has been shown that DMMB accumulates within lysosomes and mitochondria, and damages these organelles after photoactivation. In this case, cell death is believed to be a result from the impairment of autophagy. DMMB at nanomolar concentration promotes efficient cell death, while other photosensitizers are usually employed in the micromolar range. The aim of this work is to investigate the molecular mechanism of DMMB-PDT action through the study of p53 protein role over the cell response to DMMB-PDT. Being a tumor suppressor protein, p53 participates in several cellular processes in response to different stresses. To achieve our goal, we used HEK293T cell lines that express different amounts of p53: a p53 knockout cell line (HEK293T-p53KD) and a normal cell line (HEK293T-SC, scramble). After treatment with photoactivated DMMB, we evaluated phototoxicity, apoptosis, DNA damage, cell cycle, and autophagy. Our results showed that, although we did not observe p53 stabilization, DMMB-PDT seems to induce the cytoplasmic localization of p53, suggesting that cytoplasmic p53 participates in the cell response to DMMB-PDT. The HEK293T-p53KD cell line was less sensitive to DMMB-PDT. This difference could be explained by the level of sub-G1 accumulation suggestive of apoptosis that was only observed for HEK293T-SC cell line, which was more sensitive to the treatment. It is possible that the cytoplasmic activity of p53 was related to apoptosis induction according our model. In contrast to p53 effects on cell death, we found that there are p53-independent responses to DMMB-PDT on cell cycle arrest and autophagy. We observed a significant increase in the fraction of cells in the S phase of the cell cycle associated with phosphorylation of the CHK1 and H2AX proteins, indicating induction of replicative stress. The relationship of DMMB-PDT and autophagy was confirmed by the accumulation of acidic vesicles and the increased LC3 conversion (LC3-I to LC3-II). These results indicated that DMMB-PDT induces and/or impairs autophagy.

However, we did not observe a simultaneous increase in BECLIN-1 levels, which is an important protein to autophagy initiation. Photoactivated DMMB resulted in selective damage in mitochondrial DNA (mtDNA) that was not repaired in 24 hours. According to these results, we propose that cell death induced by photoactivated DMMB is mainly related to blockade of a late stage of the autophagy pathway. It could compromise the elimination of damaged mitochondria and might lead to cell cycle dynamics alterations. Our results suggested that there are p53-dependent and p53-independent cell responses to DMMB-PDT. Similar results were obtained from HEK293 cell line, which is the parental cell line of HEK293T. To the best of our knowledge, the p53 relocalization to the cytoplasm, the ability to induce selective mtDNA damage, and the S arrest represent new insights in the DMMB-PDT field. The selective mtDNA damage makes DMMB a useful model for studies on mechanisms of DNA damage responses in mitochondria.

Keywords: Autophagy. Mitochondrial DNA damage. S arrest.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	absorbância
AMP	adenosina monofosfato
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albumina sérica bovina
CHK1	<i>checkpoint kinase 1</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMMB	1,9-dimetil azul de metileno
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EROs	espécies reativas de oxigênio
HaCaT	queratinócitos humanos imortalizados
HEK293	<i>human embryonic kidney 293</i>
HEK293T	<i>human embryonic kidney 293-T-antigen</i>
LED	diodo emissor de luz
LTag	<i>large T-antigen</i>
mtDNA	DNA mitocondrial
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NP-40	<i>nonyl phenoxypolyethoxylethanol</i>
p53KD	<i>knockdown</i> para a proteína p53
PBS	tampão fosfato-salino
PCR	reação em cadeia da polimerase
PFT α	pifithrin- α
PpIX	<i>protoporphyrin IX</i>
PVDF	fluoreto de polivinilideno
SC	<i>scramble</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
TBS-T	tampão tris-salino com Tween 20
TFD	Terapia fotodinâmica
UV	luz ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Terapia fotodinâmica.....	11
1.1.1. Princípios da terapia fotodinâmica	11
1.1.2. Morte celular induzida pela terapia fotodinâmica	13
1.1.3. Terapia fotodinâmica com DMMB	16
1.2. A proteína p53	18
1.2.1. p53 e ciclo celular.....	18
1.2.2. p53 e reparo de DNA.....	19
1.2.3. p53 e apoptose	20
1.2.4. p53 e autofagia	21
1.3. p53 e a terapia fotodinâmica	22
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Linhagens e condições de cultivo.....	26
3.2. Tratamento com DMMB e fotossensibilização.....	26
3.3. Irradiação com UV-B	27
3.4. Avaliação da viabilidade celular por ensaio de MTT.....	28
3.5. Medida da sobrevivência celular por ensaio clonogênico.....	28
3.6. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo	28
3.7. Avaliação da integridade do DNA por PCR de longa extensão.....	29
3.8. Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real	30
3.9. Avaliação do acúmulo de vesículas ácidas por microscopia de fluorescência.....	32
3.10. Avaliação da localização subcelular de p53 por microscopia de fluorescência.....	32
3.11. Análises por <i>Western blot</i>	33

3.12. Análises estatísticas	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Caracterização das linhagens.....	35
4.2. Relação entre p53 e DMMB fotoativado	38
4.3. Fototoxicidade	40
4.4. Lesão no DNA nuclear e mitocondrial.....	45
4.5. Ciclo celular	47
4.6. Autofagia e morte celular	50
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICE A - PCR de longa extensão	63
APÊNDICE B - PCR em tempo real	64

1. INTRODUÇÃO

1.1. Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade de tratamento para diferentes patologias, incluindo vários tipos de câncer e infecções microbianas. Fundamenta-se em reações fotoquímicas, as quais são iniciadas pela ativação de um fotossensibilizador por luz visível, culminando na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). A eficácia da TFD está associada à indução direta de morte das células indesejadas, além da promoção de importantes efeitos vasculares e no sistema imune (Agostinis et al., 2011).

Comparada às terapias convencionais, a TFD representa uma técnica de baixo custo, minimamente invasiva, cujos efeitos colaterais se limitam geralmente a reações locais de fotossensibilizabilidade. Além disso, não há mecanismos descritos de resistência à TFD, devido ao seu princípio de ação que não é restrito a um alvo celular em particular. Uma utilização importante da TFD consiste na eliminação de células tumorais remanescentes após cirurgia de ressecção do tumor. Também pode ser usada como terapia adjuvante à quimioterapia e radioterapia (Kübler, 2005; Bacellar et al., 2015). Um exemplo fascinante de aplicação da TFD está descrito no trabalho de Tardivo et al. (2014) para o tratamento de infecções em pés de pacientes diabéticos, inclusive os que não respondem ao tratamento com antibióticos, evitando a amputação na maioria dos casos.

1.1.1. Princípios da terapia fotodinâmica

A TFD possui 3 componentes essenciais – fotossensibilizador, luz visível e oxigênio molecular –, consistindo de um processo de 2 etapas: administração do fotossensibilizador e ativação do mesmo por irradiação com luz visível a um comprimento de onda correspondente à banda de absorção do fotossensibilizador. Um fotossensibilizador ideal não deve ser citotóxico na ausência de irradiação e deve ter alta absorção de luz entre 600 e 800 nm. Esta faixa de comprimento de onda constitui a chamada janela terapêutica da TFD, uma vez que a luz penetra mais profundamente nos tecidos, ou seja, é pouco absorvida pelos principais cromóforos endógenos como melanina e hemoglobina. O limite superior de cerca de 800 nm é dado pela energia mínima requerida para iniciar as reações fotoquímicas (Castano et al., 2004; Agostinis et al., 2011).

A Figura 1 apresenta um esquema simplificado do processo de fotossensibilização. A absorção de luz pelo fotossensibilizador no estado fundamental singlete (S_0) leva à sua passagem para um estado excitado singlete (S_1), de alta energia. Este é bastante instável e pode retornar ao estado fundamental por perda de energia na forma de fluorescência ou calor. Por outro lado, um fotossensibilizador excitado no estado singlete (S_1) pode sofrer um cruzamento intersistema, passando a um estado excitado triplete (T_1), de maior tempo de vida. Este pode voltar ao estado fundamental emitindo fosforescência ou energia na forma de calor, ou transferindo energia ao oxigênio molecular. Alternativamente, o fotossensibilizador no estado excitado triplete pode também transferir elétrons (ou hidrogênio) a um substrato. A reação com biomoléculas, por meio da transferência de elétrons para formar radicais, e subsequente reação com o oxigênio, resulta na produção de EROs como o ânion radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila (reações do tipo I). Por sua vez, a transferência de energia ao oxigênio leva à formação de oxigênio singlete, uma espécie bastante reativa (reação do tipo II). Em geral, o rendimento observado para a reação do tipo II é maior que a do tipo I (Castano et al., 2004; Agostinis et al., 2011).

Figura 1. Esquema do processo de fotossensibilização. Adaptado de Agostinis et al. (2011).

As EROs geradas pela TFD são agentes altamente oxidantes que podem reagir diretamente com biomoléculas, incluindo constituintes de membranas celulares, proteínas e DNA. Embora as células possuam mecanismos para neutralizar o efeito deletério de algumas EROs e para o reparo de lesões oxidativas, o dano irreversível a estruturas celulares vitais pode levar à morte celular. Devido à alta reatividade e consequente curto tempo de vida das EROs, em geral somente biomoléculas e estruturas celulares que estão próximas a sua área de produção (área de localização do fotossensibilizador) são diretamente afetadas pela TFD.

Diferentes fotossensibilizadores acumulam em organelas celulares específicas, tornando possível direcionar o dano fotoinduzido (Castano et al., 2004). Desta forma, propõe-se que, a fim de induzir mecanismos particulares de morte celular e de maximizar a eficiência da TFD, fotossensibilizadores deveriam ser otimizados para causar danos em alvos celulares convenientes, no lugar de tentar maximizar a produção de EROs (Bacellar et al., 2015).

1.1.2. Morte celular induzida pela terapia fotodinâmica

Os mecanismos de fototoxicidade mediados pela TFD incluem a indução de necrose, apoptose e morte celular relacionada à autofagia. O tipo de morte celular desencadeado pela TFD irá depender de vários fatores, entre eles: as características químicas do fotossensibilizador, sua concentração e o tempo de incubação com o mesmo, a dose de luz e o tipo celular (Mroz et al., 2011).

Inicialmente, a morte celular induzida pela TFD era atribuída somente à necrose (Kessel et al., 2006). Elevadas doses de luz ou altas concentrações de fotossensibilizador tendem a causar a morte celular por necrose (Mroz et al., 2011). As características morfológicas da morte por necrose compreendem o aumento do volume celular, a vacuolização do citoplasma e o rompimento da membrana plasmática (Edinger e Thompson, 2004). A necrose é classificada como uma morte acidental, resultado da exposição a condições físico-químicas extremas ou insultos mecânicos. Por outro lado, estudos recentes têm demonstrado que as características morfológicas da necrose também são observadas em situações nas quais a morte celular ocorre de forma regulada, a qual envolve uma maquinaria molecular específica, sendo possível sua modulação (Galluzzi et al., 2015).

Estudos posteriores mostraram a indução de apoptose após TFD em vários tipos celulares e utilizando diferentes fotossensibilizadores (Kessel et al., 2006). As características morfológicas da morte por apoptose incluem a redução do volume celular, a condensação e fragmentação da cromatina e a formação de corpos apoptóticos que, a princípio, retêm a integridade da membrana plasmática (Edinger e Thompson, 2004). A morte por apoptose é uma morte regulada, pois ocorre de forma coordenada por meio de cascatas de sinalização com uma variedade de mecanismos que convergem na ativação de proteases específicas denominadas caspases, sendo classificada em duas vias: apoptose extrínseca e intrínseca. A apoptose extrínseca é iniciada pela ativação de receptores de morte na superfície celular. A apoptose intrínseca envolve a permeabilização da membrana mitocondrial externa por meio

da oligomerização de proteínas pró-apoptóticas BAX e BAK para formar poros na membrana, liberando outros fatores pró-apoptóticos como citocromo c. Proteínas anti-apoptóticas, como BCL-XL e BCL-2, inibem a morte celular por apoptose através da interação com proteínas pró-apoptóticas (Galluzzi et al., 2015). Como resultado da TFD, foram observadas tanto a indução de apoptose pela via extrínseca quanto pela via intrínseca. Fotossensibilizadores com localização intracelular no retículo endoplasmático, mitocôndria e lisossomos têm sido relacionados com a indução de morte por apoptose (Buytaert et al., 2007). Um dos alvos moleculares parece ser a proteína BCL-2, que pode ser foto-oxidada no processo da TFD (Mitsunaga et al., 2007; Reiners Jr et al., 2010). Além disso, a indução de apoptose após TFD também parece estar relacionada à ativação de proteínas pró-apoptóticas como BAX, BAK e PUMA (Zawacka-Pankau et al., 2007; Mikeš et al., 2009).

Um terceiro tipo de morte induzida pela TFD é a morte celular relacionada à autofagia (Mroz et al., 2011). Também é conhecida como morte celular autofágica, cujo termo foi criado baseado na característica morfológica de extensa vacuolização do citoplasma de células em processo de morte. Esta é uma morte regulada dependente da maquinaria da autofagia (proteínas ATG, entre outras) para sua execução (Galluzzi et al., 2015). A autofagia (macroautofagia) é uma via eucariótica de degradação e reciclagem lisossomal de macromoléculas e organelas celulares. De forma resumida, o processo da autofagia se inicia com a expansão de uma membrana lipídica dupla que isola o material a ser degradado, formando uma estrutura denominada autofagossomo. Em células animais, o autofagossomo se funde com o lisossomo formando o autolisossomo, no qual ocorre a degradação do material por hidrolases lisossomais, seguida da liberação das biomoléculas resultantes de volta ao citosol a fim de serem reutilizadas. Por meio da autofagia a célula obtém nutrientes e energia para a manutenção de funções vitais em situações de privação nutricional ou outros estresses. Além disso, essa via elimina da célula organelas e agregados de proteínas danificadas e micro-organismos invasores, com papel importante na apresentação de antígenos (Feng et al., 2014). A desregulação da autofagia está relacionada a várias patologias humanas como câncer, neurodegeneração e doenças cardíacas (Levine e Kroemer, 2008).

A indução de autofagia é um efeito comum observado em resposta à TFD, ocorrendo em vários tipos celulares e não sendo limitada a fotossensibilizadores que acumulam em organelas específicas (Reiners Jr et al., 2010). Porém, ainda é controverso como a autofagia contribui para a eficiência da TFD. Se, por um lado, a autofagia atua como um mecanismo basal de citoproteção, por outro, a autofagia tem sido relacionada à morte celular induzida

pela TFD. Como mecanismo de citoproteção, a autofagia pode ser iniciada numa tentativa de remover organelas danificadas ou agregados de proteínas oxidadas, produzidas nas reações fotoquímicas (Buytaert et al., 2007). Em geral, a autofagia ocorre em paralelo à apoptose, sendo sua extensão dependente do tipo celular, do fotossensibilizador empregado e sua concentração e da dose de luz. A autofagia parece ter um papel citoprotetor em células competentes para a apoptose, enquanto parece promover a morte de células que são incapazes de morrer por apoptose (Reiners Jr et al., 2010). Kessel et al. (2006) foram os primeiros a demonstrar a indução de autofagia após TFD, propondo que a autofagia e a apoptose estabelecem um equilíbrio no qual a inibição de uma das vias resulta na ativação da outra. Células de leucemia murina (L1210) deficientes na proteína BAX tratadas com o fotossensibilizador *9-capronyloxytetrakis (methoxyethyl) porphycene* (CPO) fotoativado apresentaram uma menor indução relativa de apoptose comparado a células normais, porém não houve alteração na sobrevivência celular, mas sim a intensa manifestação de características autofágicas indicativas de que a autofagia estaria resultando na morte dessas células (Kessel e Arroyo, 2007). Contudo, nas mesmas condições, os mesmos autores observaram uma resposta citoprotetora da autofagia utilizando células L1210 deficientes em ATG7, uma proteína essencial para a autofagia, pois sua depleção resultou na redução da sobrevivência celular. Porém, ATG7 também parece estar envolvida na indução de apoptose (Kessel et al., 2012). É certo que a autofagia representa um mecanismo de sobrevivência frente a distintos estresses celulares, porém se pergunta como a autofagia faria parte também de um mecanismo de morte celular. Seria resultado de uma excessiva degradação de constituintes celulares essenciais? Trabalhos mais recentes têm defendido esses dois possíveis mecanismos para a participação da autofagia na TFD, permanecendo ainda controverso o termo morte celular autofágica (Buytaert et al., 2007; Kessel, 2015).

Uma melhor compreensão do papel da autofagia na morte celular decorrente da TFD se baseia na indução de dano em organelas que estão diretamente envolvidas no processo autofágico. Os lisossomos representam um alvo muito interessante, pois a perda de lisossomos funcionais pode comprometer o processamento dos autofagossomos, afetando a fusão autofagossomo-lisossomo ou causando a degradação incompleta do material no interior dos autolisossomos. De fato, fotossensibilizadores que se localizam em lisossomos parecem induzir uma forma abortada de autofagia (Reiners Jr et al., 2010; Agostinis et al., 2011). A vacuolização aumentada do citoplasma relacionada à autofagia pode refletir defeitos no processo autofágico e não necessariamente o aumento da autofagia (Kroemer e Levine, 2008).

Enquanto a autofagia é citoprotetora, o processo incompleto da autofagia não sustenta a ideia de citoproteção. Kessel et al. (2012) propõem que o fotodano lisossomal suprime as funções citoprotetoras da autofagia e implica em estresse adicional devido ao bloqueio do fluxo autofágico. Não se sabe exatamente como a interrupção do fluxo autofágico contribui para a morte celular induzida pela TFD. Atualmente existe uma intensa investigação acerca dos mecanismos moleculares de ação da TFD devido a seu elevado potencial de aplicação. Fotossensibilizadores estão sendo estudados quanto a sua eficiência, com foco principal na elucidação dos mecanismos particulares de morte celular. O alto grau de seletividade da TFD em danificar organelas específicas facilita esse estudo (Kessel, 2015).

1.1.3. Terapia fotodinâmica com DMMB

O fotossensibilizador 1,9-dimetil azul de metileno (DMMB) é um corante fenotiazínico derivado do azul de metileno (Figura 2). O azul de metileno é amplamente utilizado na prática médica e continua sendo alvo de intensa investigação (Ginimuge e Jyothi, 2010; Tardivo et al., 2014). O uso do DMMB, entretanto, ainda está restrito a estudos *in vitro*, nos quais apresenta também alto potencial de aplicação na TFD contra vírus, bactérias, fungos e células tumorais (Wagner et al., 2000; Harris et al., 2004; Ragàs et al., 2010; Gilaberte et al., 2014).

Figura 2. Estrutura dos fotossensibilizadores azul de metileno e 1,9-dimetil azul de metileno.

O espectro de absorção do DMMB apresenta uma banda intensa com máximo em 651 nm (Figura 4), portanto, está compreendida na janela terapêutica da TFD. O DMMB exibe um alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete, igual a 0,71 em etanol (para o azul de metileno é igual a 0,52, nas mesmas condições), sugerindo que para o DMMB as reações fotoquímicas do tipo II podem ser predominantes também em meios biológicos (Bacellar et al., 2014). Além disso, Santos (2014) mostrou que o DMMB, assim como o azul de metileno, se acumula preferencialmente em lisossomos e mitocôndrias, danificando ambas as organelas após ser fotoativado, sendo esses alvos celulares os determinantes das características que acompanham a morte celular.

Comparado ao azul de metileno, o DMMB exibe maior fototoxicidade em diferentes tipos celulares (Wainwright et al., 1997; Santos, 2014). Santos (2014) estudou a indução de morte em queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT), comparando a fototoxicidade desses dois fotossensibilizadores. Foi demonstrado que a redução da viabilidade celular a 50% poderia ser alcançada com uma concentração de DMMB fotoativado duas ordens de grandeza menor do que a de azul de metileno (10 nM versus 2 μ M). A morte das células tratadas com DMMB foi correlacionada a um brando desbalanço redox, acompanhado de acúmulo de vesículas ácidas e presença de autolisossomos, caracterizando uma morte relacionada à autofagia. Em contrapartida, para o azul de metileno foi verificada uma alta geração de EROs, porém sem a observação de características autofágicas (mesmo na concentração de 10 nM). Essa diferença foi atribuída à maior resistência do DMMB a ser reduzido nas mitocôndrias, enquanto o azul de metileno encontra-se predominantemente reduzido nessa concentração e, portanto, fotoquimicamente inativo (Wainwright et al., 1997). Além disso, deve ser destacado que Santos (2014) observou uma maior extensão do dano lisossomal resultante do DMMB fotoativado comparado ao azul de metileno. Com esse resultado, foi proposto que a morte celular relacionada à autofagia ocorreu devido ao prejuízo lisossomal, resultando na inibição da conclusão do fluxo autofágico numa etapa posterior à formação dos autolisossomos, levando ao acúmulo de vesículas ácidas devido à ineficiência digestiva dos autolisossomos. Esta hipótese concorda com as considerações feitas por Reiners Jr et al. (2010), Agostinis et al. (2011) e Kessel et al. (2012). Devido a esta característica da fototoxicidade do DMMB, este pode ser utilizado como um modelo para o estudo dos mecanismos moleculares da TFD relativos à autofagia.

Tem-se especial interesse em se entender as bases moleculares relacionadas à suscetibilidade de células tumorais à TFD (Acedo e Zawacka-Pankau, 2015). Uma característica comumente encontrada nos tumores humanos é a inativação da proteína supressora de tumor p53 (Green e Kroemer, 2009). Portanto, investigações que exploram o papel de p53 na sensibilidade a diferentes terapias são extremamente úteis. Tumores deficientes em p53 frequentemente estão relacionados à resistência à quimioterapia e radioterapia, porém pouco se sabe sobre o papel de p53 na resposta à TFD (Lowe et al., 1994; Acedo e Zawacka-Pankau, 2015).

1.2. A proteína p53

A proteína p53 é um fator de transcrição que vem sendo intensamente estudado desde a descoberta, em 1989, de sua função crucial como supressora da tumorigênese (Finlay et al., 1989). Nesse sentido, p53 responde a diversos sinais de estresse (dano no DNA, estresse oxidativo, etc.) por meio da regulação de múltiplos eventos celulares, incluindo parada do ciclo celular, reparo de DNA, apoptose, senescência e autofagia (Bieging et al., 2014). Em geral, a proteína p53 encontra-se inativa nos tumores humanos por apresentar mutações – em pelo menos metade dos cânceres (p53.free.fr/ - The p53 Website) – ou pelo aumento de inibidores da via de p53, redução de ativadores da via ou inativação de alvos *downstream* a p53 (Green e Kroemer, 2009).

A proteína p53 apresenta vários domínios, que são responsáveis pela ligação ao DNA sequência-específica, ativação transcricional, oligomerização e regulação de p53. As principais mutações em p53 encontradas em tumores se localizam no domínio de ligação ao DNA. Diferentes modificações pós-traducionais regulam a atividade de p53. Sob condições normais, p53 é mantida a níveis basais por seu regulador negativo principal, a proteína MDM2. Esta se liga ao domínio de ativação transcricional de p53 e atua como uma E3 ubiquitina ligase que marca p53 para a degradação nos proteassomos. Em resposta a distintos estresses, modificações pós-traducionais de p53, como fosforilação e acetilação em resíduos específicos, promovem sua estabilização, pois perturbam a interação entre p53 e MDM2. Além disso, essas modificações permitem a translocação de p53 para o núcleo, onde interage com fatores transcricionais e se liga ao DNA como um tetrâmero na região promotora de genes que codificam proteínas moduladoras de diversas vias, ativando sua transcrição (Bieging et al., 2014). Em adição à sua atividade nuclear, p53 apresenta também funções citoplasmáticas que são independentes de sua atividade como fator de transcrição (Green e Kroemer, 2009). Algumas das vias reguladas por p53 estão descritas abaixo: parada do ciclo celular, reparo de DNA, apoptose e autofagia.

1.2.1. p53 e ciclo celular

O processo de divisão celular é altamente ordenado e regulado. Células em divisão avançam pelas fases G1 (preparação para a divisão), S (síntese de DNA), G2 (preparação para a mitose) e M (mitose). Em resposta a estresses genotóxicos, como danos no DNA e defeitos durante a replicação, *checkpoints* são ativados a fim de garantir a progressão do ciclo celular

para a fase seguinte somente quando a anterior foi totalmente completada, dando tempo para o reparo. Assim, a ativação de *checkpoints* protege a integridade genômica e promove a sobrevivência celular (Zhou e Elledge, 2000; Giono e Manfredi, 2006).

A progressão do ciclo celular é dirigida por eventos de fosforilação mediados por complexos de ciclinas e quinases dependentes de ciclinas. A proteína p53 promove a inibição, dissociação ou sequestro no citoplasma desses complexos através da ativação da transcrição gênica. Um dos modelos propostos para a ação de p53 se baseia na ativação da proteína ATM (que fosforila a proteína quinase CHK2) em situações nas quais ocorre quebra no DNA, ou no recrutamento de ATR (que fosforila CHK1) para forquilhas de replicação paradas. A proteína p53 é um substrato para ATM e ATR, bem como CHK1 e CHK2, as quais fosforilam p53 promovendo sua estabilização. Nesse contexto, a proteína p53 parece ter um papel importante na ativação de múltiplos *checkpoints* – G1/S, S, G2/M e M. A ativação do *checkpoint* em G1/S previne a iniciação da replicação em células com DNA danificado, sendo uma resposta clássica de p53, relacionada principalmente à ativação da expressão de p21. A proteína p53 também possui um papel bem estabelecido na ativação do *checkpoint* em G2/M, garantindo que as células não iniciem a mitose na presença de danos no DNA, pois várias proteínas envolvidas neste processo são transativadas por p53, como p21, GADD45 e 14-3-3 σ . O atraso na fase S pode ser resultado da parada de forquilhas de replicação ou da detecção de dano no DNA, enquanto a parada em G2/M garante a segregação dos cromossomos somente após estes estarem perfeitamente dispostos no fuso mitótico. Embora o atraso em S e M pareça ser dependente de p53, os mecanismos moleculares envolvidos são ainda obscuros, mas provavelmente envolvem também a proteína p21 (Giono e Manfredi, 2006; Helton e Chen, 2007; Bieging et al., 2014).

1.2.2. p53 e reparo de DNA

As vias de reparo de DNA consistem numa complexa rede de mecanismos de reparo que removem conjuntos específicos de lesões no DNA a fim de manter a integridade do genoma. As vias de ativação de *checkpoints* interagem diretamente com as vias de reparo, controlando sua ativação e o movimento de proteínas de reparo para os sítios danificados (Zhou e Elledge, 2000).

A participação de p53 no reparo de DNA envolve a regulação da transcrição de genes como *XPC* e *GADD45A*, assim como a interação direta com proteínas de reparo. A proteína

p53 está envolvida nas vias de reparo de DNA nuclear por excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair*, NER), reparo por excisão de bases (*base excision repair*, BER), reparo de bases mal pareadas (*mismatch repair*, MMR), reparo por junção de extremidades não homólogas (*nonhomologous end-joining*, NHEJ) e reparo por recombinação homóloga (*homologous recombination*, HR). As duas últimas, que participam do reparo de quebras de dupla fita no DNA, parecem ser reguladas de forma negativa por p53, enquanto as demais parecem estar relacionadas à ativação por p53 (Helton e Chen, 2007; Bieging et al., 2014).

A proteína p53 também tem um papel importante na manutenção da estabilidade do genoma mitocondrial. A translocação de p53 para a mitocôndria permite sua interação com o DNA mitocondrial e com fatores de reparo (Park et al., 2016). Souza-Pinto et al. (2004) demonstraram que a via de reparo por excisão de bases é modulada por p53 na mitocôndria.

1.2.3. p53 e apoptose

Conforme discutido anteriormente (item 1.1.2), a apoptose representa uma via de morte regulada que é dependente da ativação de caspases e, no caso da ocorrência de permeabilização da membrana mitocondrial externa, requer as proteínas pró-apoptóticas BAX/BAK, cuja atividade é inibida por proteínas anti-apoptóticas como BCL-2/BCL-XL (Galluzzi et al., 2015).

O mecanismo clássico de ativação de apoptose por p53 resulta de sua atividade como fator de transcrição. A proteína p53 promove a via extrínseca de apoptose através da ativação da expressão de receptores de morte. A via intrínseca de apoptose é ativada por p53 primariamente através da transativação de genes que codificam para proteínas pró-apoptóticas como BAX e PUMA (Helton e Chen, 2007; Bieging et al., 2014).

Além da atividade dependente de transcrição de p53 na promoção de apoptose, p53 também exerce um papel direto na ativação da via intrínseca da apoptose independente de transcrição. Em resposta a sinais de estresse, p53 citoplasmática é translocada para a mitocôndria, onde interage diretamente com proteínas anti- e pró-apoptóticas para inibir ou ativá-las. Um dos mecanismos consiste na interação da proteína p53 com BCL-2 e BCL-XL, rompendo a interação destas com BAX e BAK, promovendo então a permeabilização da membrana mitocondrial externa. Curiosamente, p53 parece interagir com essas proteínas por meio do mesmo domínio com o qual se liga ao DNA. Portanto, mutações nesse domínio,

comumente encontradas em tumores, afetam ambas as atividades transcricionais e não-transcricionais de p53 (Vaseva e Moll, 2008; Green e Kroemer 2009).

1.2.4. p53 e autofagia

A autofagia é um processo de degradação e reciclagem lisossomal de macromoléculas e organelas celulares, essencial para a manutenção da sobrevivência celular em condições desfavoráveis. Paradoxalmente, a autofagia também tem sido referida como um mecanismo de morte celular, conforme anteriormente apresentado (item 1.1.2).

A regulação da autofagia por p53 depende de sua localização subcelular, apresentando, assim como para a apoptose, respostas transcricionais e não-transcricionais (Green e Kroemer, 2009). Em resposta a distintos estresses, a proteína p53 ativa diretamente a transcrição de genes que codificam componentes-chave da maquinaria autofágica. Além disso, p53 se liga a vários genes que codificam proteínas envolvidas em todas as etapas do processo autofágico – reguladores *upstream*, componentes da maquinaria autofágica e proteínas lisossomais (Broz et al, 2013). Várias dessas proteínas atuam na via de sinalização de AMPK (proteína quinase ativada por AMP), que ativa a autofagia através da inibição da via de mTOR (*mechanistic target of rapamycin*), que é supressora de autofagia. A via de AMPK é ativada em resposta ao aumento da razão AMP/ATP e resulta na inibição de processos anabólicos celulares e ativação de processos catabólicos para a produção de energia. Por outro lado, a ativação da via de mTOR promove a proliferação celular e, quando inibida, resulta na limitação do crescimento celular e na indução de processos catabólicos, como a autofagia (Feng et al., 2005). Um dos genes transativados por p53 do qual p53 parece depender para a indução da autofagia é *DRAM1*, que codifica para a proteína lisossomal DRAM (Crighton et al., 2007). Além disso, várias proteínas cuja expressão é ativada por p53 são compartilhadas pelas vias autofágica e apoptótica havendo, portanto, uma comunicação entre essas duas vias (Broz et al, 2013).

Por outro lado, sob condições basais, ou seja, na ausência de sinais de estresse, p53 citoplasmática inibe a autofagia por meio de mecanismos independentes de transcrição, uma vez que a remoção de p53 pode estimular a autofagia, mesmo em células anucleadas. Os mecanismos pelos quais p53 citoplasmática inibe a autofagia permanecem desconhecidos, mas acredita-se que se correlacionam com uma maior atividade da via de mTOR, e parecem não envolver a interação com o domínio de ligação ao DNA de p53 (Tasdemir et al., 2008;

Green e Kroemer, 2009). Um esquema das atividades de p53 abordadas neste trabalho está mostrado na Figura 3.

Figura 3. Esquema das atividades de p53 abordadas neste trabalho: nuclear dependente de transcrição, nuclear independente de transcrição e citoplasmática. Adaptado de Green e Kroemer (2009) e Bieging et al. (2014).

1.3. p53 e a terapia fotodinâmica

Conforme visto anteriormente, a proteína p53 orchestra importantes decisões celulares, as quais contribuem para sua função supressora de tumor. Embora a deficiência em p53 seja relacionada à resistência à quimioterapia e radioterapia, pouco se conhece sobre o papel de p53 na resposta à TFD (Lowe et al., 1994; Acedo e Zawacka-Pankau, 2015). Resultados contraditórios sobre o papel de p53 na sensibilidade à TFD tem sido reportados. Alguns trabalhos indicam a independência de p53 para a indução de morte celular pela TFD (Fisher et al., 1999; Lee et al., 2006). Fisher et al. (1999) utilizaram células humanas de colón (LS513) normais ou deficientes em p53 tratadas com o fotossensibilizador *photofrin* e observaram que as células normais exibiam aumento nos níveis proteicos de p53 e p21 e apresentavam maior indução relativa de apoptose após a TFD, porém as duas linhagens tiveram parada do ciclo celular em G1 de forma equivalente. Lee et al. (2006) utilizaram linhagens celulares de osteossarcoma (U2OS) com p53 normal ou inativa tratadas com *hypericin* fotoativado, entretanto não observaram aumento de p53 em resposta à TFD e relataram acúmulo de células em G2/M e indução de apoptose equivalente em ambas as linhagens.

Por outro lado, um número muito maior de trabalhos descreve a dependência de p53 para a morte celular induzida pela TFD (Fisher et al., 1997; Fisher et al., 1998; Zhang et al.,

1999; Tong et al., 2000; Barberi-Heyob et al., 2004; Lim et al., 2006; Mitsunaga et al., 2007; Zawacka-Pankau et al., 2007; Mikeš et al., 2009; Giorgi et al., 2015). Todos estes autores mostraram que células expressando níveis normais de p53 funcional foram mais sensíveis à TFD com diferentes fotossensibilizadores comparado a células que expressam p53 mutada ou não expressam p53. Fisher et al. (1997) estudaram células humanas de leucemia promielocítica (HL60) expostas aos fotossensibilizadores *photofrin* e *tin ethyl etiopurpurin* (SnET2) e observaram uma resposta apoptótica independente do status de p53. O mesmo grupo também estudou a sensibilidade de células de carcinoma de cólon (LS513 e LS1034) à TFD com *photofrin*, porém não explorou outras respostas relacionadas a p53 (Fisher et al., 1998). Zhang et al. (1999) investigaram a TFD com *2-butylamino-2-demethoxy-hypocrellin A* (2-BA-2-DMHA) em linhagens de carcinoma colorretal (HT29) e encontraram maior indução relativa de apoptose na linhagem com p53 normal. Tong et al. (2000) estudaram a TFD com *photofrin* em fibroblastos humanos normais ou com síndrome de Li-Fraumeni (LFS), observando aumento nos níveis de p53 nas células normais, mas indução de apoptose e parada em G2/M apenas nas células LFS com p53 mutante. Barberi-Heyob et al. (2004) utilizaram células humanas de câncer de cólon (HT9blk) e o fotossensibilizador *chlorin e6* e observaram que não houve aumento dos níveis proteicos de p53 após TFD, apesar de observarem um perfil característico de indução de apoptose nas células normais para p53. Lim et al. (2006) avaliaram a TFD com *Radachlorin* em células humanas de câncer cervical (CaSki) in vitro e in vivo (implantadas em camundongos). Estes autores observaram que, nas células com p53 funcional, ocorria maior indução relativa de apoptose associada ao aumento nos níveis de p53; além disso, houve maior redução no tamanho dos tumores derivados destas células após TFD. Mitsunaga et al. (2007) investigaram células humanas de câncer de cólon (HCT116) fotossensibilizadas com *ATX-S10Na(II)*. Nas células com p53 normal houve maior indução relativa de apoptose, que ocorreu tanto pela via intrínseca quanto extrínseca, mas não observaram aumento nos níveis de p53. Além disso, independente da presença de p53, houve redução nos níveis de BCL-2, BCL-XL e aumento de citocromo c citosólico e não houve aumento nos níveis de BAX. Os autores concluíram que a redução nos níveis de BCL-2 e BCL-XL, provavelmente por fotodano dessas proteínas, tem um papel na liberação de citocromo c e na apoptose induzida pela TFD. Zawacka-Pankau et al. (2007) também utilizaram células HCT116, mas com o fotossensibilizador *protoporphyrin IX* (PpIX), e demonstraram maior indução de apoptose na linhagem com níveis normais de p53, associada ao acúmulo de p53 em sua forma fosforilada e de BAK, enquanto os níveis de p21 mantiveram-se constantes e os níveis de PUMA aumentaram independente da presença de

p53. Estes autores mostraram que PpIX se liga a p53 e parece interferir na interação entre p53 e MDM2, seu regulador negativo principal, levando à ativação de apoptose dependente de p53. Mikeš et al. (2009) trataram as mesmas células HCT116 com *hypericin* fotoativado e mostraram a prevalência do processo apoptótico em células com níveis normais de p53 associado ao aumento nos níveis de p53 e BAX, que não ocorreu nas células que não expressam p53; além disso, não houve alteração nos níveis de BCL-2 nas duas linhagens e houve acúmulo de células em G2/M e S independente do status de p53. Por sua vez, Giorgi et al. (2015) relataram que a morte de fibroblastos embrionários de camundongos (MEFs) in vivo após TFD com *phthalocyanine* foi dependente de p53 e relacionada a maior indução de apoptose.

Dos resultados descritos acima, observa-se que a participação de p53 no mecanismo de sensibilidade à TFD apresenta-se bastante heterogênea. A maioria dos trabalhos reporta maior sensibilidade à TFD por células com p53 funcional e relacionada à indução de apoptose. A observação de aumento/redução/manutenção dos níveis proteicos de p53, p21, BAX e BCL-2 não foi uniforme entre os trabalhos. Em relação ao ciclo celular, os autores relataram acúmulo de células em G1, S e G2/M após TFD, entretanto estas respostas foram independentes de p53, pois foram equivalentes entre a linhagem normal e deficiente para p53, ou ocorreram apenas na linhagem mutante para p53. Porém, poucos trabalhos exploraram essa relação entre TFD, p53 e ciclo celular. Os trabalhos descritos acima foram feitos empregando-se diferentes linhagens celulares, fotossensibilizadores, doses de luz e técnicas experimentais, o que pode explicar a divergência entre os resultados.

No contexto apresentado, pode-se concluir que o status de p53 geralmente interfere na suscetibilidade à TFD, mas pouco se conhece sobre o papel de p53 em outras respostas celulares à TFD: parada do ciclo celular, reparo de DNA, autofagia, entre outros. Mitsunaga et al. (2007) não comenta sobre a relação da TFD com *ATX-S10Na(II)* e autofagia, porém parece haver um aumento na quantidade de vesículas citoplasmáticas após a fotossensibilização. Nosso grupo tem interesse em elucidar a nível molecular os efeitos da TFD com DMMB que, como mostrado anteriormente, resulta em morte celular relacionada à autofagia. Visto o papel essencial de p53 nas respostas celulares ao estresse e na sensibilidade a diferentes terapias, e dado o pouco conhecimento sobre a atividade de p53 em resposta à TFD, escolhemos investigar o papel dessa proteína nas respostas celulares à TFD com DMMB. Do nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que busca relacionar as atividades de p53 com as consequências celulares do DMMB fotoativado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o papel da proteína p53 nas respostas celulares induzidas por DMMB fotoativado.

2.2. Objetivos específicos

- Comparar a sensibilidade ao DMMB fotoativado entre linhagens celulares que expressam diferentes quantidades da proteína p53: HEK293T *knockdown* para a proteína p53, HEK293T *scramble* e HEK293 (linhagem parental de HEK293T);
- Avaliar o dano no DNA, o status do ciclo celular e os possíveis mecanismos de morte celular (apoptose e autofagia) como consequência da fotoativação do DMMB;
- Investigar o envolvimento da proteína p53 nas respostas celulares à TFD com DMMB.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios i) Laboratório de Genética Mitochondrial e ii) Laboratório de Processos Fotoinduzidos e Interfaces, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

3.1. Linhagens e condições de cultivo

Células HEK293T (*Human embryonic kidney 293T*) *scrambre* e *knockdown* para a proteína p53, geradas pelo grupo da Prof^a. Dr^a. Nadja Cristhina de Souza Pinto (Dias, 2014); e células HEK293, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Sergio Verjovski de Almeida, foram cultivadas em meio DMEM *high glucose* suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, a 37°C em atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂. As linhagens HEK293T foram mantidas acrescentando o antibiótico puromicina 1 µg/mL ao meio de cultura. Os subcultivos, plaqueamentos e coletas das células foram feitos com o uso de PBS para lavagem e tripsina-EDTA 0,125% para dissociação das mesmas. As células, previamente estocadas em nitrogênio líquido em solução de congelamento composta de 42% de DMEM *high glucose*, 50% de soro fetal bovino e 8% de DMSO, foram mantidas em cultura subconfluente por no máximo 20 passagens, tomando as devidas precauções a fim de evitar contaminações cruzadas.

3.2. Tratamento com DMMB e fotossensibilização

A solução estoque de DMMB (Sigma) foi preparada em água ultrapura na concentração de 30 µM. A concentração foi confirmada por meio de diluição em etanol e com o uso da Lei de Lambert-Beer, sabendo que a absorvidade molar do DMMB em etanol é $\epsilon^{651} = 7,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Bacellar et al., 2014). Nos tratamentos com DMMB e luz, as células foram incubadas com DMMB diluído em PBS nas concentrações específicas, a 37°C e 5% CO₂ no escuro por 1 hora. Em seguida, as células foram irradiadas utilizando módulo com 24 LEDs (Nactus DP24 GDE) com $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão de 633 nm a uma dose de luz de 9,6 J/cm², o equivalente a potência de 2,24 mW por 40 minutos. Esta dose foi escolhida com base no trabalho de Santos (2014). Após a irradiação, as células foram coletadas ou mantidas em meio de cultura no escuro pelos tempos indicados. Nos tratamentos controle, com DMMB apenas ou LED apenas, as células foram submetidas somente à incubação com DMMB e mantidas no escuro durante o tempo de irradiação ou somente incubadas com PBS e irradiadas, respectivamente. A Figura 4A apresenta os espectros de emissão do LED e absorção do

DMMB. O espectro de emissão foi obtido em um espectrofotômetro Ocean Optics. A Figura 4B apresenta um esquema da montagem do sistema de irradiação. Na esquerda, está esquematizada a medição da potência na região central do LED, feita com o potenciômetro FieldMate Laser Power Meter Coherent. A altura do LED foi ajustada para se obter a dose de luz desejada, considerando a altura do sensor e a tampa da placa de cultura. Na direita, está esquematizada a irradiação da placa com a cultura de células sobre um fundo preto.

Figura 4. Condições de fotossensibilização. (A) Sobreposição dos espectros de absorção do DMMB e de emissão do LED utilizado para a fotoativação do DMMB. (B) Esquemas do sistema de irradiação. Na esquerda, a medição da potência do LED e, na direita, a irradiação das células.

3.3. Irradiação com UV-B

As células foram irradiadas em PBS em placas sem tampa utilizando lâmpadas tubulares de mercúrio (TL20W Philips) com $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão de 312 nm, medido com radiômetro Vilber Loumart RMX-3W (Figura 5). Para atingir a dose desejada, variou-se o tempo de irradiação. Após a irradiação, as células foram mantidas em meio de cultura pelos tempos indicados. Como controle negativo, placas com cultura de células foram cobertas com papel alumínio durante o tempo de irradiação.

Figura 5. Espectro de emissão da lâmpada UV-B, cedido pelo Laboratório de Quimiosfera do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo.

3.4. Avaliação da viabilidade celular por ensaio de MTT

Células foram plaqueadas em placas de 96 poços numa densidade de 8×10^4 células por poço. Após 48 horas, as células foram tratadas conforme descrito no **item 3.2**. O DMMB foi utilizado nas concentrações 10, 20 e 30 nM. No tempo de 24 horas após a irradiação, as células foram incubadas com 50 $\mu\text{g/mL}$ de MTT em meio de cultura por 2 horas. Apenas células viáveis metabolicamente competentes convertem o MTT em um produto de coloração roxa (formazan) (Riss et al., 2016). Cristais de formazan foram solubilizados em DMSO. Um leitor de microplaca foi usado para medir a absorbância a 550 nm e 800 nm. Foram feitos 3 experimentos independentes com 4 replicatas cada. A viabilidade celular foi calculada por meio da seguinte equação:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{[(\text{Abs } 550 \text{ nm}) - (\text{Abs } 800 \text{ nm}) \text{ do tratamento com DMMB}]}{[(\text{Abs } 550 \text{ nm}) - (\text{Abs } 800 \text{ nm}) \text{ do tratamento sem DMMB}]} \times 100\%$$

3.5. Medida da sobrevivência celular por ensaio clonogênico

Células foram plaqueadas em placas de 24 poços a uma densidade de $1,5 \times 10^5$ células por poço. No dia seguinte, as células foram tratadas segundo descrito no **item 3.2** (DMMB 5, 10 e 20 nM) ou **item 3.3** (UV-B 25 e 50 mJ/cm^2). Imediatamente após a irradiação, 1×10^3 células foram plaqueadas em placas de 60 mm e mantidas a 37°C e 5% CO_2 por 7 dias. Após esse tempo, as placas foram lavadas com PBS e as colônias foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS. Em seguida, estas foram coradas com cristal violeta 0,5% em água, lavadas com água de torneira e contadas manualmente. Foram feitos 4 experimentos independentes com 3 replicatas cada. A sobrevivência celular foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Fração sobrevivente (\%)} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ de colônias do tratamento com DMMB})}{(\text{n}^\circ \text{ de colônias do tratamento sem DMMB})} \times 100\%$$

3.6. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo

Células foram plaqueadas em placas de 6 poços numa densidade de 5×10^5 células por poço. No dia seguinte, as células foram tratadas segundo descrito no **item 3.2**. O DMMB foi utilizado na concentração 20 nM. Após 6 e 24 horas, todas as células foram recolhidas, lavadas com PBS, ressuspensas em etanol 70% gelado e armazenadas a -20°C . No dia da

análise, estas foram lavadas com PBS, ressuspensas na solução de marcação (iodeto de propídeo 40 µg/mL, RNase 200 µg/mL e Triton X-100 0,1% em PBS) e incubadas por 40 minutos a temperatura ambiente. Foram analisadas 5×10^4 células no citômetro de fluxo BD FACSVerse ou Millipore Guava EasyCyte Plus. Os dados obtidos foram analisados para quantificação da população de células em sub-G1, G1, S e G2 utilizando o *software* Flowing Software 2 v2.5.1. Foram feitos 3 experimentos independentes com 3 replicatas cada.

3.7. Avaliação da integridade do DNA por PCR de longa extensão

Células foram plaqueadas em placas de 60 mm a uma densidade de 1×10^6 células por placa. No dia seguinte, as células foram tratadas conforme descrito no **item 3.2**. O DMMB foi utilizado na concentração 10 nM. Imediatamente e 24 horas após o tratamento, o DNA total das células foi extraído utilizando o kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen). Como controle positivo, 50 ng/µL de DNA total do tratamento HEK293T *scramble* DMMB (-) luz (+) foram tratados diretamente com DMMB 10 nM seguido de irradiação, também havendo um controle no escuro. As amostras de DNA foram quantificadas, diluídas para 6 ng/µL e utilizadas nas reações de amplificação, segundo protocolo adaptado de Kovalenko e Santos (2009). Este ensaio se baseia na capacidade de diferentes tipos de lesões no DNA nuclear e mitocondrial bloquearem a progressão da DNA polimerase ou reduzirem sua processividade na amplificação de um fragmento longo. A amplificação de um fragmento curto, com menor probabilidade de sofrer lesão, também é realizada para normalizar a quantidade de DNA molde empregada na PCR. A quantidade de DNA molde utilizada em cada reação foi padronizada previamente (Apêndice A). Para a amplificação dos fragmentos longos, foi utilizado o kit AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). Para o fragmento longo mitocondrial usou-se 30 ng de DNA como molde, e as seguintes condições de amplificação: 94°C por 30 segundos (1 ciclo); 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 68°C por 18 minutos (26 ciclos). Para o fragmento longo do gene nuclear HPRT usou-se 120 ng de DNA, segundo o programa: 94°C por 30 segundos (1 ciclo); 94°C por 30 segundos, 66°C por 30 segundos, 68°C por 15 minutos (35 ciclos). Para a amplificação dos fragmentos curtos, foi utilizado o kit Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen). Para o fragmento curto do gene mitocondrial ND1 usou-se 3 ng de DNA, segundo o programa: 94°C por 3 minutos (1 ciclo); 94°C por 45 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto (22 ciclos). Para a amplificação do fragmento curto do gene nuclear HPRT usou-se 60 ng de DNA, segundo o programa: 94°C por 3 minutos (1 ciclo); 94°C por 45 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto (31 ciclos). Os *primers* utilizados estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - *Primers* utilizados na PCR de longa extensão

Descrição	Tamanho (pb)	Sequência 5'→ 3'
Fragmento longo mitocondrial <i>forward</i>	16540	TGAGGCCAAATATCATTCTGAGGGGC
Fragmento longo mitocondrial <i>reverse</i>		TTTCATCATGCGGAGATGTTGGATGG
Fragmento curto mitocondrial (ND1) <i>forward</i>	140	ACTACGCAAAGGCCCAACG
Fragmento curto mitocondrial (ND1) <i>reverse</i>		GAGCTAAGGTCGGGGCGGTG
Fragmento longo nuclear (HPRT) <i>forward</i>	9713	GCAGGGAGGACGGAATGGCG
Fragmento longo nuclear (HPRT) <i>reverse</i>		TGGACCAGGACATGCCCCTGG
Fragmento curto nuclear (HPRT) <i>forward</i>	177	TGACATGTGCCGCTGCGAG
Fragmento curto nuclear (HPRT) <i>reverse</i>		GTGGTCGCTTTCCGTGCCGA

O produto de amplificação dos fragmentos longos foi fracionado em gel de agarose 1% e dos fragmentos curtos em gel de poliacrilamida 10% não-desnaturante. Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz UV. A intensidade das bandas foi quantificada por meio do *software* ImageJ v1.48, considerando como controle o tratamento HEK293T *scramble* DMMB (-) luz (+). Foram feitos 3 experimentos independentes.

3.8. Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real

Células foram plaqueadas em placas de 6 poços numa densidade de 1×10^6 células por poço. No dia seguinte, as células foram tratadas conforme descrito no **item 3.3**. Foi utilizada a dose de UV-B igual a 50 mJ/cm^2 . A fim de inibir a atividade transcricional de p53, foi feito o tratamento paralelo de HEK293 com Pifithrin- α 30 μM , adicionada ao meio de cultura 5 horas antes do tratamento com UV-B e novamente após a irradiação. Passadas 6 horas da irradiação, as células foram recolhidas e delas foi extraído RNA utilizando o kit PureLink RNA (Life Technologies). O RNA purificado foi quantificado e sua qualidade foi avaliada pelas razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} (Apêndice B). As amostras de RNA foram submetidas a tratamento com DNase utilizando o kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega). A partir destas fez-se a síntese de

cDNA utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Para quantificação relativa de mRNA, foi feita uma solução estoque utilizando Power Sybr Green (Applied Biosystems), 200 nM de cada par de *primers* para um gene específico (listados na tabela 2) e 100 ng de cDNA.

Tabela 2 - *Primers* utilizados na PCR em tempo real

Descrição	Tamanho (pb)	Sequência 5'→ 3'
HDM2 <i>forward</i>	77	GTGAATCTACAGGGACGCCAT
HDM2 <i>reverse</i>		CTGATCCAACCAATCACCTGAA
p21 <i>forward</i>	89	ACTCAGCAGAGCTTTCACCC
p21 <i>reverse</i>		CTGAGTGACTGCACGACCTT
β -actina <i>forward</i>	116	CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT
β -actina <i>reverse</i>		AGCACTGTGTTGGCGTACAG

A construção das curvas de calibração foi feita utilizando 25, 50, 100 e 200 ng de cDNA para se estimar o valor de eficiência da PCR para cada par de *primers* (Apêndice B). As curvas de calibração e as análises para quantificação relativa de mRNA foram feitas em termociclador ABI 7500 *software* v2.0.6 (Applied Biosystems) segundo o programa: 50°C por 2 minutos (1 ciclo); 95°C por 10 minutos (1 ciclo); 95°C por 1 minuto, 60°C por 30 segundos (40 ciclos). Finalizada a reação de amplificação, foi feita a análise da curva de dissociação (Apêndice B) para investigar a dimerização e garantir a pureza dos produtos amplificados, segundo o programa: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, 95°C por 15 segundos (1 ciclo). Os resultados foram calculados usando o modelo matemático de Pfaffl para a expressão relativa do gene alvo em relação ao gene de referência β -actina, conforme a equação abaixo. Foi considerado como controle o tratamento HEK293 UV-B (-) PFT α (-). Foram feitos 2 experimentos independentes com 2 replicatas cada.

$$\text{Nível relativo de mRNA} = \frac{(\text{eficiência gene alvo})^{\Delta\text{Ct gene alvo (controle} - \text{amostra)}}}{(\text{eficiência } \beta\text{-actina})^{\Delta\text{Ct } \beta\text{-actina (controle} - \text{amostra)}}$$

3.9. Avaliação do acúmulo de vesículas ácidas por microscopia de fluorescência

Células foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro estéreis tratadas previamente com poli-L-lisina 0,01% em placas de 6 poços a uma densidade de 5×10^5 células por poço. No dia seguinte, as células foram tratadas segundo descrito no **item 3.2**. O DMMB foi utilizado na concentração 20 nM. Como controle positivo, foi feito o tratamento paralelo de HEK293T *scramble* com cloroquina 60 μ M em meio de cultura. Passadas 24 horas, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS e incubadas com a solução de marcação de vesículas ácidas – laranja de acridina 1 μ g/mL em PBS – a 37°C e 5% CO₂ por 10 minutos. A marcação com o corante laranja de acridina é amplamente utilizada para a identificação de compartimentos celulares ácidos. Esse corante se difunde através de membranas em pH neutro, mas se torna impermeável a membranas em pH baixo, se acumulando então em vesículas ácidas. Isso resulta em sua agregação e consequente mudança no espectro de emissão de fluorescência, emitindo na região do vermelho, enquanto em outros ambientes celulares emite fluorescência verde (Swanson, 1989). As células foram então lavadas com PBS e as lamínulas foram montadas sobre uma gota de PBS em lâminas para visualização e captura de imagens no microscópio de fluorescência Zeiss Axiovert 200 com objetiva de 40 vezes com imersão em água, excitação a 450-490 nm e emissão com filtro *long pass* de 515 nm. O acúmulo de vesículas ácidas foi avaliado pela razão da intensidade de fluorescência vermelha sobre a intensidade de fluorescência verde, quantificadas utilizando o *software* ImageJ v1.48, considerando como controle o tratamento HEK293T *scramble* DMMB (+) luz (-). Foram feitos 3 experimentos independentes com 3 replicatas cada.

3.10. Avaliação da localização subcelular de p53 por microscopia de fluorescência

Células HEK293 e HEK293T *scramble* foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro estéreis tratadas previamente com poli-L-lisina 0,01% em placas de 6 poços a uma densidade de 5×10^5 células por poço. No dia seguinte, as células foram tratadas segundo descrito no **item 3.2**. O DMMB foi utilizado na concentração 20 nM. Como controle, foi feito o tratamento paralelo das células com H₂O₂ 1 mM em meio de cultura. Passadas 24 horas do tratamento com DMMB e 6 horas do tratamento com H₂O₂, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS gelado. Estas foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS por 15 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS por 3 vezes de 5 minutos cada a temperatura ambiente. Estas foram incubadas com a solução de bloqueio – BSA 1% e Triton X-100 0,3% em PBS – por 1 hora a temperatura ambiente. Então, as células

foram incubadas *overnight* com a solução contendo os anticorpos primários em PBS adicionado de BSA 1%, Triton X-100 0,3%, anticorpo anti-p53 (DAKO #M7001) 1:200 e anticorpo anti-COXIV (Cell Signaling #4850) 1:200. Foi feito um controle sem anticorpo primário. As células foram lavadas com PBS por 3 vezes de 5 minutos cada a temperatura ambiente. Após, foram incubadas por 1 hora com a solução contendo os anticorpos secundários em PBS adicionado de BSA 1%, Triton X-100 0,3%, anticorpo anti-*mouse* (Life Technologies #A11001) 1:500 e anticorpo anti-*rabbit* (Invitrogen #A11035) 1:500. As células foram lavadas com PBS por 3 vezes de 5 minutos cada a temperatura ambiente. As lâminulas foram montadas sobre uma gota de Prolong Diamond Antifade Mountant with DAPI (Life Technologies) em lâminas e seladas com esmalte. Estas foram visualizadas e fotografadas no microscópio de fluorescência Nikon Eclipse TE300, com objetiva de 100 vezes com imersão em óleo, utilizando os filtros para luz azul, verde e vermelho. Foram contabilizadas as células com p53 presente em ambos núcleo e citoplasma, ou com localização predominante no núcleo ou no citoplasma. Foram feitos 3 experimentos independentes.

3.11. Análises por Western blot

Células foram plaqueadas em placas de 100 mm a uma densidade de $2,5 \times 10^6$ células por placa. No dia seguinte, as células foram tratadas segundo descrito no **item 3.2** (DMMB 20 nM) ou **item 3.3** (UV-B 50 mJ/cm²). Após 6 horas do tratamento com UV-B e 24 horas do tratamento com DMMB, as células foram recolhidas e extratos de proteínas totais foram obtidos utilizando tampão de lise – tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, SDS 0,05%, deoxicolato de sódio 0,5%, NP-40 0,5% – acrescido de Protease Inhibitor Cocktail (Roche) por 20 minutos no gelo, seguido de sonicação (3 ciclos de 15 segundos mais 45 segundos de descanso com amplitude de 20%) e centrifugação a 16000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi quantificado utilizando o Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad). As amostras foram resolvidas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) e transferidas a membranas de PVDF (GE Healthcare). As membranas foram bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente em tampão TBS-T 0,05% acrescido de 5% de leite em pó desnatado ou 5% de BSA. Estas foram então incubadas *overnight* a 4°C em TBS-T com 1% de leite em pó desnatado ou 1% de BSA e com os anticorpos primários: anti-p53 (DAKO #M7001) 1:5000, anti- β -actina (Abcam #ab6276) 1:10000, anti-BAX (Abcam #ab32503) 1:1000, anti-LC3B (Sigma #L7543) 1:500, anti-BECLIN-1 (Abcam #ab114071) 1:250, anti-CHK1 fosforilado em Ser345 (Cell Signaling #133D3) 1:500, anti-gamma H2AX fosforilado em Ser139 (Abcam #ab2893) 1:1000. Após lavadas com TBS-T por 3 vezes de 5

minutos cada a temperatura ambiente, as membranas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com o anticorpo secundário correspondente: anti-*rabbit* (LI-COR #926-68073) 1:10000 ou anti-*mouse* (LI-COR #926-32210) 1:10000. As membranas foram lavadas com TBS-T por 3 vezes de 5 minutos cada a temperatura ambiente e visualizadas no equipamento Odyssey (LI-COR). A intensidade das bandas foi quantificada por meio do software ImageJ v1.48, considerando como controle o tratamento HEK293T *scramble* DMMB (+) luz (-). Foram feitos pelo menos 3 experimentos independentes.

3.12. Análises estatísticas

Os dados obtidos estão representados graficamente como média $\pm$ desvio padrão, exceto quando indicado. Comparações entre tratamentos foram feitas utilizando teste t, *one-way* ANOVA e *post test* Tukey, ou *two-way* ANOVA e *post test* Bonferroni com o *software* GraphPad Prism 5 v5.01. Diferenças com p-valor menor que 0,05 foram consideradas significativas (*p < 0,05; ns, não significativo).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização das linhagens

Utilizamos como modelos experimentais as linhagens HEK293 e HEK293T *scramble* e *knockdown* para a proteína p53. HEK293 é a linhagem parental da linhagem HEK293T, a qual foi modificada (HEK293T *knockdown* para p53) para expressar quantidade reduzida da proteína p53. A linhagem HEK293T *scramble* representa o controle para essa modificação. Nosso objetivo foi usar estes modelos para avaliar o efeito de p53 na resposta celular à TFD com DMMB.

A linhagem HEK293T foi gerada a partir da transfecção estável de células HEK293 com plasmídeo derivado do vírus SV40 (Lin et al., 2014). As células HEK293T expressam a proteína LTag (*large T-antigen*) do vírus, a qual interage com a proteína p53 na região adjacente e que se sobrepõe à superfície de ligação ao DNA de p53 (Lilyestrom et al., 2006). Portanto, a ligação de LTag a p53 pode interferir na atividade de p53. Sendo assim, a linhagem HEK293 foi utilizada neste trabalho como um controle para que os efeitos observados da fotoativação do DMMB não fossem confundidos com essa possível interferência na atividade de p53.

As linhagens HEK293T *scramble* e *knockdown* para p53 foram geradas por meio da transfecção de células HEK293T com plasmídeos pGFP-V-RS (Dias, 2014). Esse plasmídeo expressa um *short-harpin* RNA (*shRNA*) de sequência aleatória, que funciona como controle negativo da transfecção (linhagem *scramble*) ou um *shRNA* com sequência específica para o silenciamento de p53 (linhagem *knockdown*). As linhagens utilizadas aqui são linhagens clonais obtidas após seleção das populações inicialmente transfectadas.

Para verificar a quantidade relativa da proteína p53 expressa por estas linhagens, avaliamos os níveis de p53 através de *Western blot* após a fotossensibilização com DMMB ou no escuro. Observamos que, nos tratamentos no escuro, a linhagem HEK293T *knockdown* para p53 expressa apenas 15% desta proteína em relação à linhagem HEK293T *scramble* (Figura 6), ou seja, apresenta supressão da expressão de p53 de 85%. É importante ressaltar que este nível de expressão se manteve estável durante o desenvolvimento deste trabalho.

Figura 6. *Western blot* mostrando a quantidade da proteína p53, normalizada pela quantidade de β-actina, nas linhagens HEK293T *scramble* (SC) e *knockdown* para p53 (p53KD) e HEK293, 24 horas após o tratamento com DMMB 20 nM, no escuro (luz -) ou irradiado (luz +). (*p < 0,05, teste Bonferroni após *two-way* ANOVA).

Nota-se também que não há diferença na quantidade de p53 entre os tratamentos com DMMB no escuro e irradiado, para as três linhagens (Figura 6). Este resultado indica que não está ocorrendo estabilização de p53 em resposta à fotoativação do DMMB, que é geralmente observada após exposição a uma grande variedade de estresses, inclusive em resposta à TFD com diferentes fotossensibilizadores (Fisher et al., 1999; Tong et al., 2000; Lim et al., 2006; Zawacka-Pankau et al., 2007; Mikeš et al., 2009). Por outro lado, Mitsunaga et al. (2007) não observaram acúmulo de p53 em células tratadas com o fotossensibilizador *ATX-S10Na(II)*, embora descreveram a indução de morte celular como sendo dependente de p53. Desta forma, esse resultado não descarta a participação de p53 na resposta celular ao DMMB fotoativado.

A fim de confirmar o efeito da expressão da proteína LTag, expressa nas linhagens derivadas de HEK293T, na atividade transcricional de p53, avaliamos por meio de PCR em tempo real a expressão de mRNA de 2 genes efetores *downstream* a p53 (p21 e HMD2) após irradiação com UV-B. A alteração na expressão destes genes após exposição a UV-B corresponde a uma resposta clássica da ativação de p53 (Pedeux et al., 2002). A dose de UV-B utilizada neste experimento foi determinada previamente por meio de ensaio clonogênico com a linhagem HEK293T *scramble* (Figura 7). Foi escolhida a dose 50 mJ/cm², que resulta em mais de 50% de morte celular.

Figura 7. Curva de sobrevivência obtida por ensaio clonogênico da linhagem HEK293T *scramble* após irradiação com UV-B 25 e 50 mJ/cm².

Como controle negativo para a ativação da transcrição gênica dependente de p53, foi empregado o inibidor reversível *pifithrin-α*. Este pode inibir a transcrição mediada por p53 atuando num estágio posterior à translocação de p53 para o núcleo (Murphy et al., 2004). Nota-se que a expressão de p21 foi aumentada após exposição a UV-B apenas na linhagem HEK293 (Figura 8A). Esta resposta é dependente de p53, pois a quantidade de mRNA de p21 foi reduzida com o emprego concomitante de *pifithrin-α*. Como as linhagens HEK293T não respondem da mesma maneira, concluímos que a via de resposta de p53 *downstream* a p21 não está funcional nestas linhagens.

Por outro lado, notamos que a expressão de HDM2 após irradiação com UV-B seguiu um padrão diferente de p21 (Figura 8B). A expressão de HDM2 foi reduzida nas três linhagens, porém, diferente do esperado, esta resposta parece ser independente da regulação transcricional por p53, pois não foi afetada com a utilização de *pifithrin-α*. Curiosamente, os níveis de expressão basal de HDM2 e p21 parecem ser diferentes entre as linhagens, sugerindo que p53 afeta de alguma forma a expressão desses genes mesmo na ausência de estresse induzido.

Baseado nos resultados descritos acima, confirmamos que a atividade de p53 está alterada nas linhagens HEK293T, que expressam LTag, pelo menos para a via de p21 e provavelmente também para outras vias dependentes de p53. Embora haja exceções, a proteína p53 (pelo menos a nível transcricional) é considerada por muitos autores como sendo não funcional em células expressando LTag (Thakur et al., 2012). Portanto, a utilização paralela nos experimentos da linhagem controle HEK293 é de extrema importância para que os efeitos observados da fotoativação do DMMB sejam corretamente interpretados.

Figura 8. Análise por PCR em tempo real da expressão de mRNA dos genes (A) p21 e (B) HDM2, normalizada pela quantidade expressa de β-actina, das linhagens HEK293T *scramble* (SC) e *knockdown* para p53 (p53KD) e HEK293, 6 horas após tratamento com UV-B 50 mJ/cm² e pifithrin-α (PFTα) 30 μM.

4.2. Relação entre p53 e DMMB fotoativado

Na Figura 6 observamos que não houve estabilização de p53 em resposta à fotoativação do DMMB. Mitsunaga et al. (2007) também não registraram aumento nos níveis de p53 após a TFD com *ATX-S10Na(II)*, mas reportaram que células *knockout* para p53 foram menos sensíveis à TFD, enquanto células competentes para p53 apresentaram um perfil apoptótico dependente de p53. Zawacka-Pankau et al. (2008) relacionaram a ausência de acúmulo de p53 registrada por Mitsunaga et al. (2007) com o envolvimento da proteína p53 citoplasmática na indução de morte celular. Sabemos que a proteína p53 apresenta funções citoplasmáticas que são independentes de sua atividade transcricional (Green e Kroemer, 2009). Desse modo, decidimos investigar se p53 citoplasmática poderia estar associada à TFD com DMMB no nosso modelo.

A translocação de p53 do compartimento citosólico para o núcleo é observada após exposição a peróxido de hidrogênio e resulta na alteração da expressão de genes *downstream* a p53 (Uberti et al., 1999). Da mesma forma, a realocização de p53 do núcleo para o citoplasma é importante para as funções citoplasmáticas de p53 (Horn e Vousden, 2007; Turinetti et al., 2009). Decidimos então verificar, através de microscopia de fluorescência, se ocorre alteração na distribuição subcelular de p53 nas células HEK293T *scramble* e HEK293 após fotossensibilização com DMMB. Como controle positivo para a localização nuclear de p53, fizemos o tratamento das células com peróxido de hidrogênio. As células foram marcadas com anticorpos anti-p53 e anti-COXIV (marcador mitocondrial, para visualização

do citoplasma das células) e coradas com DAPI (marcador nuclear). Células com p53 presente em ambos núcleo e citoplasma, ou com localização predominante no núcleo ou no citoplasma foram contadas. Podemos observar que as células apresentam um aumento de p53 no citoplasma de ambas as linhagens, sugerindo uma realocação ativa em resposta à fotossensibilização com DMMB (Figuras 9 e 10). Apesar de ter sido feita a marcação das mitocôndrias com anti-COXIV, não foi possível fazer uma análise da localização mitocondrial de p53 por causa da qualidade das imagens.

Figura 9. Imagens representativas obtidas por microscopia de fluorescência para a análise da distribuição subcelular de p53 nas linhagens HEK293T *scramble* (SC) e HEK293, 24 horas após o tratamento com DMMB 20 nM, no escuro ou irradiado, e 6 horas após o tratamento com H₂O₂ 1 mM.

Figura 10. Distribuição subcelular de p53 obtida por microscopia de fluorescência (ver Figura 9) das linhagens HEK293T *scramble* (SC) e HEK293, 24 horas após o tratamento com DMMB 20 nM, no escuro (luz -) ou irradiado (luz +), ou 6 horas após o tratamento com H₂O₂ 1 mM.

A realocização de p53 para o citoplasma observada em resposta ao DMMB fotoativado sugere que p53 citoplasmática participa da resposta celular à TFD com DMMB. Conforme discutido anteriormente, a proteína p53 possui atividades nucleares e citoplasmáticas (resumidas na Figura 3). Estas atividades estão associadas à regulação de apoptose e autofagia, sendo que p53 no núcleo ativa a apoptose e a autofagia, enquanto no citoplasma ativa a apoptose, mas inibe a autofagia em condições basais (Green e Kroemer, 2009). A seguir serão exploradas algumas respostas celulares à TFD com DMMB possíveis de serem moduladas por p53: fototoxicidade, dano no DNA e reparo, ciclo celular e autofagia.

4.3. Fototoxicidade

Inicialmente, de modo a comparar a sensibilidade das linhagens HEK293 e HEK293T *scramble* e *knockdown* para p53 após a fotossensibilização com DMMB, avaliamos a viabilidade celular pelo ensaio de MTT 24 horas após a fotoativação do DMMB em diferentes concentrações. Corroborando com resultados obtidos anteriormente (Santos, 2014), observamos que o DMMB não é citotóxico no escuro, nas concentrações estudadas (Figura 11). Além disso, observamos que cerca de 50% das células se mantêm viáveis após fotoativação de DMMB 10-20 nM, novamente concordando com os resultados de Santos (2014), que obteve o valor de 10 nM para HaCaT. Entretanto, foi observado que não houve diferença significativa de viabilidade entre as linhagens pelo ensaio de MTT (Figura 11), o que sugere que a fototoxicidade do tratamento com DMMB fotoativado para células HEK293 e HEK293T independe de p53.

Figura 11. Viabilidade celular pelo ensaio de MTT das linhagens HEK293T *scramble* (SC) e *knockdown* para p53 (p53KD) e HEK293, 24 horas após o tratamento com DMMB, no escuro (luz -) ou irradiado (luz +). (ns, não significativo; teste Bonferroni após *two-way* ANOVA).

O ensaio de MTT mede a atividade mitocondrial e, portanto, quantifica células que estão metabolicamente competentes no momento do ensaio (Riss et al., 2016). Células danificadas, mas que se encontram metabolicamente ativas e, no entanto, incapazes de proliferar não são diferenciadas pelo MTT. Em contrapartida, o ensaio clonogênico, que é baseado na capacidade de uma única célula se dividir até formar uma colônia visível a olho nu, mede a integridade reprodutiva e a habilidade das células de proliferarem e, portanto, fornece uma resposta mais acurada da sobrevivência celular. Desse modo, medimos a sobrevivência celular por ensaio clonogênico após a fotossensibilização com DMMB. Este método nos permitiu verificar uma diferença significativa no número de colônias crescidas após uma semana da fotossensibilização com DMMB 20 nM (Figura 12). A linhagem HEK293T *knockdown* para p53 foi menos sensível ao DMMB fotoativado em relação às linhagens HEK293T *scramble* e HEK293. Este resultado indica que a indução de morte celular por DMMB fotoativado é, pelo menos parcialmente, dependente da proteína p53.

Em geral, a inativação de p53 produz tumores resistentes à quimioterapia e radioterapia (Lowe et al., 1994). Algumas estratégias para tentar superar o câncer envolvem, por exemplo, a combinação da quimioterapia a drogas reativadoras de p53 (Wang e Sun, 2010). O papel de p53 na resposta celular à TFD é, por sua vez, menos explorado. Conforme foi discutido no **item 1.3**, os trabalhos existentes descrevem a dependência de p53 para a morte celular induzida por TFD com diferentes fotossensibilizadores e em distintos tipos celulares, observando uma menor sensibilidade à TFD em células com deficiência em p53 – seja pela ausência da proteína ou pela presença de mutações (Fisher et al., 1997; Fisher et al., 1998; Zhang et al., 1999; Tong et al., 2000; Barberi-Heyob et al., 2004; Lim et al., 2006; Mitsunaga et al., 2007; Zawacka-Pankau et al., 2007; Mikeš et al., 2009; Giorgi et al., 2015).

Logo, o resultado obtido para DMMB concorda com os dados da literatura para células com status similar de p53 tratadas com outros fotossensibilizadores, dando suporte experimental à hipótese que p53 está de fato envolvida na resposta à TFD.

Figura 12. Curvas de sobrevivência obtidas por ensaio clonogênico das linhagens HEK293T *scramble* (SC) e *knockdown* para p53 (p53KD) e HEK293, após o tratamento com DMMB, no escuro ou irradiado (+ luz). Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. (* $p < 0,05$; teste t).

Porque obtivemos a diferença observada na sobrevivência celular na concentração de DMMB de 20 nM (Figura 12), que também corresponde à dose de indução de 50% de morte celular 24 horas após a fotoativação (Figura 11), esta concentração foi mantida em experimentos posteriores. É interessante destacar que não foi observada diferença de sobrevivência entre as linhagens HEK293T *scramble* e HEK293 (Figuras 11 e 12). Portanto, a presença de LTag nas linhagens HEK293T não teve influência sobre a morte celular induzida por DMMB fotoativado. Conforme discutido anteriormente, p53 citoplasmática provavelmente está contribuindo para a resposta celular ao DMMB fotoativado nestas linhagens, o que poderia explicar a ausência de influência de LTag na sobrevivência celular, se considerarmos que LTag interfere apenas na atividade transcricional de p53.

Com o propósito de entender o mecanismo molecular responsável pela diferença observada na fotossensibilidade ao DMMB dependente de p53, quantificamos a população de células em estágio sub-G1 do ciclo celular após 24 horas da fotoativação do DMMB, por citometria de fluxo. Este ensaio é considerado uma medida de morte celular por apoptose, uma vez que a fragmentação do DNA nuclear característica deste tipo de morte resulta em células com conteúdo inferior de DNA ao conteúdo normal encontrado em G1 (Huang et al., 2005). Note que houve aumento da população sub-G1 apenas nas células HEK293 e HEK293T *scramble* tratadas com DMMB fotoativado (Figura 13). Este resultado indica que

um nível normal de expressão de p53 é essencial para a indução de apoptose após TFD com DMMB. Além disso, pode explicar os resultados de sobrevivência celular, uma vez que o aumento no número de células em sub-G1 é observado nas linhagens mais sensíveis ao DMMB fotoativado. Mitsunaga et al. (2007) obtiveram resultados similares após fotossensibilização com *ATX-S10Na(II)*. Eles relataram que células humanas de câncer de cólon (HCT116) tiveram maior acúmulo de células em sub-G1 em relação a HCT116 *knockout* para p53. Os resultados descritos até o momento sugerem o envolvimento da proteína p53 citoplasmática na indução de apoptose como consequência da TFD com DMMB.

Figura 13. Quantificação da população de células em estágio sub-G1 por citometria de fluxo das linhagens HEK293T *scrambre* (SC) e *knockdown* para p53 (p53KD) e HEK293, 24 horas após o tratamento com DMMB 20 nM, no escuro (luz -) ou irradiado (luz +). Histogramas representativos podem ser visualizados na Figura 16. (* $p < 0,05$; ns, não significativo; teste t).

Santos (2014) constatou que o DMMB se localiza preferencialmente em mitocôndrias, e também lisossomos, de células HaCaT, sendo uma das consequências da fotoativação do DMMB a alteração do potencial de membrana mitocondrial. A proteína BAX é uma das proteínas cujo aumento de expressão geralmente acompanha a ativação de apoptose por disfunção mitocondrial. Este aumento, por exemplo, foi observado como resultado da TFD com o fotossensibilizador *pyropheophorbide- α methyl ester* (MPPa), que se localiza na mitocôndria (Huang et al., 2016). Também foi observado por Mikeš et al. (2009) com o fotossensibilizador *hypericin*, que também apresenta localização mitocondrial, associado à indução de apoptose. Decidimos então avaliar por *Western blot* se o aumento da expressão de BAX é observado no nosso modelo. Entretanto, não observamos aumento nos níveis de BAX em células HEK293 e HEK293T *scramble* após fotossensibilização do DMMB (Figura 14).

Mitsunaga et al. (2007) também não observaram mudança aparente nos níveis de BAX em resposta à fotossensibilização com *ATX-S10Na(II)*, que se localiza em lisossomos. Entretanto, estes autores conseguiram verificar, por meio de ensaios de sobrevivência usando linhagem *knockout* para BAX e por análise de outras proteínas envolvidas na via apoptótica, que a fotossensibilidade foi dependente de BAX e estava relacionada à indução de apoptose. Portanto, outras proteínas da via apoptótica devem ser analisadas a fim de confirmar o resultado obtido de aumento de células em sub-G1 indicativo de morte por apoptose.

Figura 14. *Western blot* mostrando a quantidade da proteína BAX, normalizada pela quantidade de β-actina, nas linhagens HEK293T *scramble* (SC) e HEK293, 24 horas após o tratamento com DMMB 20 nM, no escuro (luz -) ou irradiado (luz +). Não há diferença significativa entre os tratamentos pelo teste Bonferroni após *two-way* ANOVA.

Outra observação que devemos fazer é que o aumento de células em sub-G1 foi mais acentuado para a linhagem HEK293 em relação a HEK293T *scramble* (Figura 13), apesar de não haver diferença aparente na sobrevivência destas linhagens (Figuras 11 e 12). Não conseguimos explicar esse resultado, mas podemos especular que haja uma diferença na cinética de morte celular, que poderá ser confirmada se acompanharmos o aumento da população em sub-G1 em tempos mais longos após o tratamento. Também podemos especular que o motivo de uma possível alteração na cinética de indução de apoptose poderia decorrer da presença de LTag na linhagem HEK293T *scramble*, já que LTag se liga ao domínio de ligação ao DNA de p53 e este mesmo domínio interage com BCL-2 e BCL-XL para a indução de apoptose por p53 citoplasmática (Lilyestrom et al., 2006; Vaseva e Moll, 2009). Ainda mais importante é o fato de não termos verificado aumento de células em sub-G1 para a linhagem HEK293T *knockdown* para p53, apesar da fototoxicidade observada nestas células. Dessa forma, apenas a apoptose não explicaria a elevada fototoxicidade induzida pelo DMMB fotoativado nas linhagens estudadas. A indução de outros mecanismos de morte celular

também deve ser investigada. A relação entre autofagia e morte celular induzida por DMMB fotoativado será explorada mais tarde neste trabalho.

4.4. Lesão no DNA nuclear e mitocondrial

A proteína p53 é conhecida como a proteína guardiã do genoma, devido às suas atividades essenciais na manutenção da integridade do DNA, tanto no núcleo quanto na mitocôndria (Park et al., 2016). Resolvemos verificar o potencial do DMMB fotoativado em induzir lesões no DNA. Para isso, investigamos a formação de lesão no DNA nuclear e mitocondrial pelo ensaio de PCR de longa extensão descrito por Kovalenko e Santos (2009) em resposta à fotossensibilização com DMMB, e o reparo de DNA em caso de haver dano imediato após o tratamento. Esse ensaio se baseia no princípio de que a presença de lesões bloqueadoras no DNA molde reduz a eficiência de amplificação da PCR, fornecendo uma medida quantitativa da indução de dano no DNA.

Conforme visto na Figura 15A, não foram detectadas lesões específicas no DNA nuclear das linhagens desafiadas com DMMB fotoativado. Como controle positivo para a indução de lesão no DNA nuclear, o tratamento com DMMB e irradiação foi realizado também em uma amostra de DNA total extraído previamente. Este controle, que consiste em DNA totalmente exposto (fora do ambiente celular e sem proteínas ligadas a ele), foi significativamente danificado após a irradiação.

Em contrapartida, observamos que houve indução de lesão no DNA mitocondrial (mtDNA) como consequência da fotoativação do DMMB (Figura 15B). Estes resultados indicam que o DMMB fotoativado induz dano seletivo no mtDNA. Esse efeito era esperado, pois é uma consequência da localização preferencial de DMMB em mitocôndrias, acompanhada da fotoindução de dano nesta organela (Santos, 2014). Do nosso conhecimento, esse é o primeiro trabalho que mostra o dano seletivo ao DNA mitocondrial decorrente da TFD com DMMB. Um pré-requisito para o estudo do reparo de mtDNA (sem interferência de fatores nucleares) é que o dano no mtDNA seja realmente seletivo, sem induzir dano residual no DNA nuclear. Wisnovsky et al. (2016) venceram esse desafio projetando transportadores capazes de translocar pequenas moléculas indutoras de dano no DNA especificamente para a mitocôndria. A habilidade do DMMB em induzir lesão seletiva no DNA mitocondrial também representa uma ferramenta potencial para estudos de mecanismos e identificação de novos fatores de reparo de mtDNA.

Figura 15. Análise por PCR de longa extensão da presença de lesão no DNA (A) nuclear (região do gene HPRT), normalizada pela amplificação de 177 pb do gene nuclear HPRT, e (B) mitocondrial, normalizada pela amplificação de 140 pb do gene ND1, nas linhagens HEK293T *scramble* (SC) e *knockdown* para p53 (p53KD), HEK293 e DNA controle, imediatamente e 24 horas após o tratamento com DMMB 10 nM, no escuro (luz -) ou irradiado (luz +). Para (A): * $p < 0,05$; teste t, comparado a DNA controle não irradiado; não há diferença significativa entre os tratamentos pelo teste Tukey após *one-way* ANOVA. Para (B): * $p < 0,05$; teste Tukey após *one-way* ANOVA.

É interessante notar que o dano fotoinduzido no mtDNA é tão intenso que, mesmo após 24 horas da fotossensibilização com DMMB, as lesões não foram reparadas (Figura 15B). Porque não houve reparo de DNA, não obtivemos uma resposta sobre o possível papel de p53 no reparo de mtDNA após o dano fotoinduzido por DMMB. Esses dados também sugerem que a indução de danos ao mtDNA pode contribuir para a disfunção mitocondrial induzida por DMMB, que pode estar relacionada à autofagia, como será explorado adiante.

4.5. Ciclo celular

A proteína p53 regula a expressão de vários genes que desempenham papéis importantes em múltiplos *checkpoints* – G1/S, S, G2/M e M (Giono e Manfredi, 2006; Helton e Chen, 2007). Com a intenção de verificar o status do ciclo celular como consequência da fotoativação do DMMB, assim como o papel de p53 nesta resposta, avaliamos a distribuição da população de células em cada fase do ciclo celular – G1, S, G2 – por citometria de fluxo, após 24 horas da fotossensibilização com DMMB (Figura 16). Nota-se que há acúmulo significativo de células na fase S para as três linhagens após a fotoativação do DMMB, acompanhado de redução na proporção de células em G1. Portanto, conclui-se que o bloqueio da progressão do ciclo celular na fase S é independente de p53 nestas células.

Figura 16. Distribuição de células nas fases do ciclo celular – G1, S, G2 – determinada por citometria de fluxo, das linhagens HEK293T *scramble* (SC) e *knockdown* para p53 (p53KD) e HEK293, 24 horas após o tratamento com DMMB 20 nM, no escuro (luz -) ou irradiado (luz +). Histogramas representativos estão mostrados para cada linhagem. (* $p < 0,05$; teste t).

O atraso na fase S do ciclo celular pode acontecer em resposta à limitação de fatores para a replicação do DNA que podem levar à redução na velocidade da forquilha de replicação e induzir o estresse replicativo, por exemplo: depleção de dNTPs e inibição de

componentes da maquinaria de replicação (Zeman e Cimprich, 2014). Durante o estresse replicativo, lesões no DNA são reconhecidas pela proteína ATR, que transduz o sinal de estresse através da fosforilação de CHK1 (pCHK1) que, por sua vez, irá induzir uma resposta que envolve parada do ciclo celular, estabilização de forquilhas de replicação, aumento nos níveis de dNTP, reprogramação transcricional, dentre outras (Labib e Piccoli, 2011). Além disso, ATR também é responsável pela fosforilação de H2AX no resíduo de serina 139 (γ H2AX), criando na cromatina uma plataforma de recrutamento de proteínas envolvidas na resposta de dano ao DNA (Mejia-Ramirez et al., 2015). Visto que tanto pCHK1 como γ H2AX são importantes marcadores do estresse replicativo, resolvemos analisar os níveis dessas proteínas após 24 horas da fotossensibilização com DMMB, e para γ H2AX também imediatamente após a fotossensibilização apenas para a linhagem HEK293 (Figuras 17 e 18).

Podemos observar que houve aumento dos níveis de CHK1 fosforilada (Figura 17), assim como de γ H2AX (Figura 18) para as três linhagens. Esses resultados indicam que o desafio dessas células com DMMB fotoativado induz estresse replicativo e a ativação da resposta de *checkpoint* dependente de CHK1 que leva a um prolongamento da fase S do ciclo celular independente de p53. Também se nota que não houve aumento nos níveis de γ H2AX imediatamente após a fotossensibilização (0h) na linhagem HEK293 (Figura 18). A fosforilação de H2AX pode também ser relacionada com a presença de quebras de dupla fita de DNA (Mah et al., 2010). Assim, este resultado concorda com o resultado da detecção de lesão no DNA, em que não fomos capazes de detectar dano no DNA nuclear também imediatamente após a irradiação (Figura 15A). Logo, não observamos dano no DNA nuclear induzido diretamente pelo DMMB fotoativado, o que é esperado pois sua localização preferencial seriam lisossomos e mitocôndrias (Santos, 2014). O estresse replicativo, por sua vez, foi observado 24 horas após a fotossensibilização (Figuras 16, 17 e 18).

Encontramos poucos trabalhos na literatura que demonstram a relação entre a TFD e o atraso na fase S do ciclo celular, sendo muito mais frequente a observação de parada em G1/S ou G2/M. Os trabalhos de Xia et al. (2011) e Li et al. (2013) mostraram o acúmulo de células na fase S para outros fotossensibilizadores – PpIX e *tetra- α -(4-carboxyphenoxy) phthalocyanine zinc* (T α PcZn), relacionando o atraso em S apenas à inibição da proliferação celular e à ativação de p21, sem investigação mais aprofundada. O único trabalho do qual temos conhecimento que relatou o acúmulo de células em S (e também em G2/M) relacionando tal efeito à funcionalidade da proteína p53 foi o de Mikeš et al. (2009). Estes autores mostraram que a TFD com *hypericin* resulta no acúmulo de células em S e G2/M

independente do status de p53. Portanto, nossos resultados concordam com os dados disponíveis na literatura. Além disso, podemos destacar que este é o primeiro trabalho que mostra a indução do atraso na fase S do ciclo celular em resposta à TFD com DMMB.

Figura 17. Western blot mostrando a quantidade da proteína CHK1 fosforilada em Ser345 nas linhagens HEK293T *scramble* (SC) e *knockdown* para p53 (p53KD) e HEK293, 24 horas após o tratamento com DMMB 20 nM, no escuro (luz -) ou irradiado (luz +), ou 6 horas após exposição a UV-B 50 mJ/cm² (controle positivo). β-actina foi utilizada como controle de carregamento das amostras.

Figura 18. Western blot mostrando a quantidade da proteína H2AX fosforilada em Ser 139 (γH2AX) nas linhagens HEK293T *scramble* (SC) e *knockdown* para p53 (p53KD) e HEK293, imediatamente (para HEK293) e 24 horas após o tratamento com DMMB 20 nM, no escuro (luz -) ou irradiado (luz +), ou 6 horas após exposição a UV-B 50 mJ/cm² (controle positivo). β-actina foi utilizada como controle de carregamento das amostras.

Sabemos que a mitocôndria, além do lisossomo, é uma organela bastante danificada após a fotoativação do DMMB, como foi mostrado por Santos (2014) e pelo resultado de indução de lesão no DNA mitocondrial (Figura 15B). A disfunção mitocondrial pode afetar o *pool* de dNTPs e o nível de ATP, entretanto estes podem não estar necessariamente correlacionados (Desler et al., 2007). Desler et al. (2010) apontam que a disfunção mitocondrial pode afetar o metabolismo de nucleotídeos citosólicos, pois, por exemplo,

algumas enzimas envolvidas na via de síntese de novo de nucleotídeos, como diidroorotato desidrogenase, estão localizadas na mitocôndria. Logo, uma explicação possível para os efeitos observados de acúmulo de células em S e estresse replicativo seria a limitação dos níveis disponíveis de dNTPs para a síntese de DNA. Essa hipótese deverá ser confirmada posteriormente por meio da quantificação dos níveis de dNTPs e também ATP/ADP. Tsai et al. (2005), no seu trabalho envolvendo a fotossensibilização mediada pelo ácido 5-aminolevulínico, verificaram redução no conteúdo de ATP associado ao dano mitocondrial. O mesmo grupo relacionou a autofagia com a disfunção mitocondrial observada previamente (Ji et al., 2010). A relação da autofagia com o dano fotoinduzido por DMMB será discutida abaixo.

4.6. Autofagia e morte celular

Foi demonstrado que a morte celular induzida por DMMB fotoativado é acompanhada do acúmulo de vesículas ácidas em células HaCaT, característica indicativa da ocorrência de morte celular relacionada à autofagia (Santos, 2014). Neste trabalho, a relação com a autofagia foi confirmada pela detecção da presença de autolisossomos, organela própria da via autofágica. A fim de determinar nas linhagens HEK293 e HEK293T *knockdown* para p53 e *scramble* se a morte induzida por DMMB fotoativado também está relacionada à autofagia, avaliou-se, após 24 horas da fotossensibilização, o acúmulo de vesículas ácidas por meio de marcação das células com laranja de acridina.

Verifica-se que as três linhagens exibem acúmulo de vesículas ácidas, evidenciadas pela emissão de fluorescência vermelha pelo laranja de acridina, após a fotossensibilização com DMMB (Figura 19). O tratamento com cloroquina foi utilizado como controle positivo, uma vez que a cloroquina inibe a autofagia por meio do aumento do pH lisossomal, o que leva à inibição da fusão de autofagossomos com lisossomos e também da atividade de hidrolases lisossomais (Shintani e Klionsky, 2004). A medida da razão da intensidade de fluorescência vermelha sobre verde revela que houve acúmulo significativo de vesículas ácidas após o tratamento com DMMB fotoativado, indicando a ocorrência de morte celular relacionada à autofagia, conforme relatado por Santos (2014). No entanto, não observamos diferença entre as linhagens, o que indica que p53 não influencia a resposta autofágica ao tratamento.

A fim de confirmar o envolvimento da autofagia na resposta ao DMMB fotoativado, decidimos verificar alguns marcadores específicos da via autofágica. Primeiramente,

analisamos por *Western blot* a proteína LC3-II, 24 horas após a fotossensibilização. A proteína LC3 pode ser encontrada em duas formas: LC3-I, que é citosólica e solúvel, e LC3II, a qual se encontra associada à membrana de autofagossomos, cuja formação é acompanhada do aumento na quantidade de LC3-II (Kabeya et al., 2000). Tanto o aumento da autofagia quanto sua inibição (com redução do processamento dos autofagossomos) podem resultar em maiores níveis de LC3-II (Kroemer e Levine, 2008). Podemos observar que o tratamento com DMMB fotoativado aumenta os níveis proteicos de LC3-II, sem diferença significativa entre as linhagens, concordando com o resultado obtido de acúmulo de vesículas ácidas (Figura 20).

Figura 19. Imagens representativas obtidas por microscopia de fluorescência para a detecção de vesículas ácidas por meio de marcação com o corante laranja de acridina, nas linhagens HEK293T *scramble* (SC) e *knockdown* para p53 (p53KD) e HEK293, 24 horas após o tratamento com DMMB 20 nM, no escuro ou irradiado, e 24 horas após o tratamento com cloroquina 60 μ M (controle positivo). Abaixo a direita, quantificação das vesículas ácidas expressa como a razão da intensidade de fluorescência vermelha sobre verde. (* $p < 0,05$; ns, não significativo; teste Bonferroni após *two-way* ANOVA).

Figura 20. *Western blot* mostrando a quantidade das proteínas LC3-I e LC3-II, sendo LC3-II normalizada pela quantidade de β-actina, nas linhagens HEK293T *scramble* (SC) e *knockdown* para p53 (p53KD) e HEK293, 24 horas após o tratamento com DMMB 20 nM, no escuro (luz -) ou irradiado (luz +). (* $p < 0,05$; ns, não significativo; teste Bonferroni após *two-way* ANOVA).

Os trabalhos que evidenciam a indução de autofagia geralmente demonstram o aumento dos níveis proteicos de LC3-II acompanhado do aumento concomitante dos níveis de BECLIN-1 (Lihuan et al., 2014; Huang et al., 2016). A proteína BECLIN-1 possui um papel importante na iniciação da autofagia, permitindo o recrutamento de proteínas envolvidas na nucleação do autofagossomo (McKnight e Zhenyu, 2013). Analisamos por *Western blot* a proteína BECLIN-1 após 24 horas da fotoativação do DMMB. Nota-se que não houve aumento dos níveis de BECLIN-1 após a fotossensibilização (Figura 21). Portanto, o aumento de marcadores da autofagia foi observado na etapa intermediária (LC3-II associada aos autofagossomos), e não na iniciação da via autofágica (BECLIN-1). Além disso, a marcação com laranja acridina (Figura 19) indica que houve acúmulo de vesículas ácidas, ou seja, autolissomos (estágio final da autofagia). Estes resultados sugerem o possível bloqueio da resolução da via autofágica como consequência da fotossensibilização com DMMB. Santos (2014) fez essa mesma proposta ao observar uma maior extensão do dano lisossomal após o

desafio de células HaCaT com DMMB fotoativado, comparado ao tratamento com azul de metileno que não resultou em morte com características autofágicas.

Figura 21. Western blot mostrando a quantidade da proteína BECLIN-1, normalizada pela quantidade de β-actina, nas linhagens HEK293T *scramble* (SC) e *knockdown* para p53 (p53KD) e HEK293, após 24 horas do tratamento com DMMB 20 nM, no escuro (luz -) ou irradiado (luz +). (Não há diferença significativa entre os tratamentos pelo teste Bonferroni após *two-way* ANOVA).

A indução de autofagia, em adição à apoptose, é um efeito comum da TFD (Reiners Jr et al., 2010). À autofagia é atribuído um papel duplo, que varia desde a citoproteção até a implicação na morte celular autofágica. Lihuan et al. (2014) demonstraram tanto o acúmulo de vesículas ácidas quanto o aumento nos níveis de LC3-II em resposta à fotoativação de clorofilina f, o qual também possui afinidade por mitocôndrias e lisossomos. Estes autores atribuíram à autofagia um papel citoprotetor, pois sua inibição resultou no aumento de morte celular. Por sua vez, Ji et al. (2010) relacionaram a morte mediada pelo ácido 5-aminolevulínico à autofagia, mostrando aumento da formação de autofagossomos e dos níveis de LC3-II, pois verificaram que a morte celular foi reduzida ao se inibir a autofagia. Além disso, o bloqueio da autofagia parece estar relacionado à indução de morte pela TFD com fotossensibilizadores que têm localização lisossomal (Reiners Jr et al., 2010; Agostinis et al., 2011; Kessel et al., 2012). Nossa hipótese é que o dano lisossomal induzido por DMMB fotoativado mostrado por Santos (2014) bloqueia a autofagia, leva a uma reciclagem ineficiente de biomoléculas pela via autofágica, resultando no acúmulo fatal de intermediários não processados. Acreditamos que, desse modo, a autofagia estaria contribuindo para a morte celular induzida por DMMB fotoativado.

Uma das consequências drásticas do déficit autofágico é o comprometimento do *turnover* mitocondrial. Como postulado por Terman et al. (2006), a imperfeita degradação

lisossomal pode levar ao acúmulo de mitocôndrias defeituosas, resultando na redução da produção de ATP e aumento do estresse oxidativo. Nesse sentido, a autofagia tem um papel essencial na manutenção do balanço de dNTPs para a síntese de DNA e, portanto, contribui na prevenção da instabilidade genômica (Vessoni et al., 2013). Nossos resultados reforçam esse conceito. A morte celular induzida por DMMB fotoativado é consequência da disfunção lisossomal e mitocondrial (Santos, 2014). O dano lisossomal justifica a autofagia ineficiente, incapaz de recuperar as mitocôndrias lesadas. Isso poderia resultar em alterações na dinâmica do ciclo celular, afetando a maquinaria de replicação do DNA (estresse replicativo, bloqueio da progressão na fase S via CHK1). Nesse contexto, a proteína p53 apresentaria fundamentalmente um papel citoplasmático (localização citoplasmática) relacionado provavelmente à indução de apoptose (células em sub-G1). Estudos mais aprofundados devem ser feitos para confirmar essa hipótese.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mostramos que as respostas celulares à TFD com DMMB podem ser dependentes ou independentes da proteína p53. A linhagem HEK293T *knockdown* para p53 mostrou-se menos sensível ao DMMB fotoativado comparado ao controle HEK293T *scramble*. A maior sensibilidade da linhagem controle foi relacionada ao acúmulo de células em sub-G1, que indica a ocorrência de morte por apoptose, o que não foi observado para a linhagem *knockdown*. Apesar de não termos observado a estabilização dos níveis proteicos de p53 após o tratamento, mostramos a realocização de p53 para o citoplasma em resposta à fotoativação do DMMB, indicando que a atividade citoplasmática de p53 pode estar contribuindo para a morte celular com características apoptóticas. No entanto, não observamos, nessas condições, aumento nos níveis proteicos de BAX. Outros experimentos devem ser feitos a fim de confirmar o envolvimento da apoptose na morte induzida por TFD com DMMB, avaliando-se outras proteínas da via apoptótica. Extrapolando para a área clínica, a maior sobrevivência das células HEK293T *knockdown* à TFD com DMMB poderia resultar na recorrência de tumores e, portanto, uma possível estratégia seria aliar a TFD a drogas reativadoras de p53.

Por outro lado, também encontramos respostas à TFD com DMMB que são independentes de p53: no ciclo celular e na autofagia. Observamos o acúmulo de células na fase S do ciclo celular associado à fosforilação de CHK1 e H2AX, indicativo de indução de estresse replicativo. A relação com a autofagia foi confirmada pelo acúmulo de vacúolos ácidos e aumento nos níveis proteicos de LC3-II, porém sem alteração nos níveis de BECLIN-1. Propomos que a morte celular decorrente da TFD com DMMB está relacionada à autofagia devido a um bloqueio na conclusão da via autofágica. Nossa hipótese é que o prejuízo lisossomal e mitocondrial induzido por DMMB fotoativado leva a uma autofagia ineficiente, comprometendo a eliminação de mitocôndrias danificadas, paralelamente prejudicando a síntese de ATP e/ou *pool* de dNTPs e levando a alterações na dinâmica do ciclo celular. Estudos mais aprofundados devem ser feitos para confirmar essa hipótese, avaliando-se a eficiência da autofagia de mitocôndrias (mitofagia) e o balanço de ATP/ADP e dNTPs.

Além disso, a fotoativação do DMMB resultou em dano seletivo ao DNA mitocondrial, porém este não foi reparado nas 24 horas subsequentes e, portanto, não conseguimos avaliar algum possível papel de p53 no reparo de lesões no DNA mitocondrial decorrentes do DMMB fotoativado, mas acreditamos que o DMMB pode servir como um

modelo para estudos futuros de mecanismos de resposta a danos no DNA específicos para a mitocôndria.

É importante destacar que os resultados obtidos foram similares para as linhagens HEK293T *scramble* e HEK293, a qual é a linhagem parental da linhagem HEK293T. Nossa preocupação era que a ausência de diferença entre as linhagens HEK293T *scramble* e *knockdown* para p53 observada nas respostas de ciclo celular e autofagia após a fotoativação do DMMB fossem devidas à interferência da proteína LTag sobre a atividade transcricional de p53. Portanto, por meio da utilização da linhagem HEK293 como um controle adicional, confirmamos que de fato as respostas relacionadas à autofagia e ciclo celular foram independentes de p53.

REFERÊNCIAS

- Acedo, P.; Zawacka-Pankau, J. p53 family members – important messengers in cell death signaling in photodynamic therapy of cancer? **Photochemical & Photobiological Sciences**. 14(8): 1390-1396, 2015.
- Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. 61: 250-281, 2011.
- Bacellar, I. O. L.; Pavani, C.; Sales, E. M.; Itri, R.; Wainwright, M.; Baptista, M. S. Membrane damage efficiency of phenothiazinium photosensitizers. **Photochemistry and Photobiology**. 90(4): 801-813, 2014.
- Bacellar, I. O. L.; Tsubone, T. M.; Pavani, C.; Baptista, M. S. Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death. **International Journal of Molecular Sciences**. 16: 20523-20559, 2015.
- Barberi-Heyob, M.; Védrine, P. O.; Merlin, J. L.; Millon, R.; Abecassis, J.; Poupon, M. F.; et al. Wild-type p53 gene transfer into mutated p53 HT29 cells improves sensitivity to photodynamic therapy via induction of apoptosis. **International Journal of Oncology**. 24: 951-958, 2004.
- Biegging, K. T.; Mello, S. S.; Attardi, L. D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. **Nature Reviews Cancer**. 14(5): 359-370, 2014.
- Broz, K. D.; Mello, S. S.; Biegging, K. T.; Jiang, D.; Dusek, R. L.; Brady, C. A.; et al. Global genomic profiling reveals an extensive p53-regulated autophagy program contributing to key p53 responses. **Genes & Development**. 27(9): 1016-1031, 2013.
- Buytaert, E.; Dewaele, M.; Agostinis, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1776: 86-107, 2007.
- Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. 1: 279-293, 2004.
- Crichton, D.; Wilkinson, S.; Ryan, K. M. DRAM Links Autophagy to p53 and Programmed Cell Death. **Autophagy**. 3(1): 72-74, 2007.
- Desler, C.; Munch-Petersen, B.; Stevnsner, T.; Matsui, S.; Kulawiec, M.; Singh, K. K.; Rasmussen, L. J. Mitochondria as determinant of nucleotide pools and chromosomal stability. **Mutation Research**. 625: 112-124, 2007.
- Desler, C.; Lykke, A.; Rasmussen, L. J. The effect of mitochondrial dysfunction on cytosolic nucleotide metabolism. **Journal of Nucleic Acids**. 2010: 701518, 2010.
- Dias, G. C. **Geração de linhagens celulares HEK293 knockdown para as proteínas p53, ATM, mTOR e PGC1α e estudo do papel de p53 na resposta ao estresse oxidativo provocado por azul de metileno**. 66 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- Edinger, A. L.; Thompson, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**. 16: 663-669, 2004.

- Ewald, B.; Sampath, D.; Plunkett, W. H2AX phosphorylation marks gemcitabine-induced stalled replication forks and their collapse upon S-phase checkpoint abrogation. **Molecular Cancer Therapeutics**. 6(4):1239–1248, 2007.
- Feng, Y.; He, D.; Yao, Z.; Klionsky, D. J. The machinery of macroautophagy. **Cell Research**. 24: 24–41, 2014.
- Feng, Z.; Zhang, H.; Levine, A. J.; Jin, S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 102(23): 8204–8209, 2005.
- Finlay, C. A.; Hinds, P. W.; Levine, A. J. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. **Cell**. 57(7): 1083–1093, 1989.
- Fisher, A. M. R.; Danenberg, K.; Banerjee, D.; Bertino, J. R.; Danenberg, P.; Gomer, C. J. Increased photosensitivity in HL60 cells expressing wild-type p53. **Photochemistry and Photobiology**. 66(2): 265–270, 1997.
- Fisher, A. M. R.; Rucker, N.; Wong, S.; Gomer, C. J. Differential photosensitivity in wild-type and mutant p53 human colon carcinoma cell lines. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. 42(2): 104–107, 1998.
- Fisher, A. M.; Ferrario, A.; Rucker, N.; Zhang, S.; Gomer, C. J. Photodynamic therapy sensitivity is not altered in human tumor cells after abrogation of p53 function. **Cancer Research**. 59: 331–335, 1999.
- Galluzzi, L.; Bravo-San Pedro, J. M.; Vitale, I.; Aaronson, S. A.; Abrams, J. M.; Adam, D.; et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. **Cell Death and Differentiation**. 22: 58–73, 2015.
- Gilaberte, Y.; Aspiroz, C.; Alejandre, M. C.; Andres-Ciriano, E.; Fortuño, B.; Charlez, L.; et al. Cutaneous sporotrichosis treated with photodynamic therapy: An in Vitro and in Vivo Study. **Photomedicine and Laser Surgery**. 32(1): 54–57, 2014.
- Ginimuge, P. R.; Jyothi, S. D. Methylene Blue: Revisited. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**. 26(4): 517–520, 2010.
- Giono, L. E.; Manfredi, J. J. The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. **Journal of Cellular Physiology**. 209: 13–20, 2006.
- Giorgi, C.; Bonora, M.; Missiroli, S.; Poletti, F.; Ramirez, F. G.; Morciano, G.; et al. Intravital imaging reveals p53-dependent cancer cell death induced by phototherapy via calcium signaling. **Oncotarget**. 6(3): 1435–1445, 2015.
- Green, D. R.; Kroemer, G. Cytoplasmic functions of the tumor suppressor p53. **Nature**. 458: 1127–1130, 2009.
- Harris, F.; Sayed, Z.; Hussain, S.; Phoenix, D. A. An investigation into the potential of phenothiazinium-based photo-sensitisers to act as PDT agentes. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. 1(3): 231–239, 2004.
- Helton, E. S.; Chen, X. p53 modulation of the DNA damage response. **Journal of Cellular Biochemistry**. 100: 883–896, 2007.

- Horn, H. F.; Vousden, K. H. Coping with stress: multiple ways to activate p53. **Oncogene**. 26: 1306-1316, 2007.
- Huang, X.; Halicka, H. D.; Traganos, F.; Tanaka, T.; Kurose, A.; Darzynkiewicz, Z. Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. **Cell Proliferation**. 38: 223-243, 2005.
- Huang, Q.; Ou, Y.; Tao, Y.; Yin, H.; Tu, P. Apoptosis and autophagy induced by pyropheophorbide- α methyl ester- mediated photodynamic therapy in human osteosarcoma MG-63 cells. **Apoptosis**. 21: 749-760, 2016.
- Ji, H. T.; Chien, L. T.; Lin, Y. H.; Chien, H. F.; Chen, C. T. 5-ALA mediated photodynamic therapy induces autophagic cell death via AMP-activated protein kinase. **Molecular Cancer**. 9: 91, 2010.
- Kabeya, Y.; Mizushima, N.; Ueno, T.; Yamamoto, A.; Kirisako, T.; Noda, T.; et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. **The EMBO Journal**. 19(21): 5720-5728, 2000.
- Kessel, D. Autophagic death probed by photodynamic therapy. **Autophagy**. 11(10): 1941-1943, 2015.
- Kessel, D.; Arroyo, A. S. Apoptotic and autophagic responses to Bcl-2 inhibition and photodamage. **Photochemical & Photobiological Sciences**. 6(12): 1290-1295, 2007.
- Kessel, D. H.; Price, M.; Reiners Jr, J. J. ATG7 deficiency suppresses apoptosis and cell death induced by lysosomal photodamage. **Autophagy**. 8(9): 1333-1341, 2012.
- Kessel, D.; Vicente, M. G. H.; Reiners, J. J. Initiation of Apoptosis and Autophagy by Photodynamic Therapy. **Lasers in Surgery and Medicine**. 38(5): 482-488, 2006.
- Kovalenko, O. A.; Santos, J. H. Analysis of oxidative damage by gene-specific quantitative PCR. **Current Protocols in Human Genetics**. 19(1): 1-13, 2009.
- Kroemer, G.; Levine, B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 9(12): 1004-1010, 2008.
- Kübler, A. C. Photodynamic therapy. **Medical Laser Application**. 20: 37-45, 2005.
- Labib, K.; Piccoli, G. Surviving chromosome replication: the many roles of the S-phase checkpoint pathway. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**. 366(1584): 3554-3561, 2011.
- Lee, H. B.; Ho, A. S. H.; Teo, S. H. p53 Status does not affect photodynamic cell killing induced by hypericin. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. 58: 91-98, 2006.
- Levine, B.; Kroemer, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. **Cell**. 132(1): 27-42, 2008.
- Li, Q.; Wang, X.; Zhang, K.; Li, X.; Liu, Q.; Wang, P. DNA damage and cell cycle arrest induced by protoporphyrin IX in sarcoma 180 cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**. 32: 778-788, 2013.
- Lihuan, D.; Jingcun, Z.; Ning, J.; Guozeng, W.; Yiwei, C.; Wei, L.; et al. Photodynamic therapy with the novel photosensitizer chlorophyllin f induces apoptosis and autophagy in human bladder cancer cells. **Lasers in Surgery and Medicine**. 46: 319-334, 2014.

- Lilyestrom, W.; Klein, M. G.; Zhang, R.; Joachimiak, A.; Chen, X. S. Crystal structure of SV40 large T-antigen bound to p53: interplay between a viral oncoprotein and a cellular tumor suppressor. **Genes & Development**. 20: 2373-2382, 2006.
- Lim, D. S.; Bae, S. M.; Kwak, S. Y.; Park, E. K.; Kim, J. K.; Han, S. J.; et al. Adenovirus-mediated p53 treatment enhances photodynamic antitumor response. **Human Gene Therapy**. 17(3): 347-352, 2006.
- Lin, Y. C.; Boone, M.; Meuris, L.; Lemmens, I.; Roy, N. V.; Soete, A.; et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. **Nature Communications**. 5: 4767, 2014.
- Lowe, S. W.; Bodis, S.; McClatchey, A.; Remington, L.; Ruley, H. E.; Fisher, D. E.; et al. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. **Science**. 266(5186): 807-10, 1994.
- Mah, L. J.; El-Osta, A.; Karagiannis, T. C. γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. **Leukemia**. 24: 679-686, 2010.
- McKnight, N. C.; Zhenyu, Y. Beclin 1, an essential component and master regulator of PI3K-III in health and disease. **Current Pathobiology Reports**. 1(4): 231-238, 2013.
- Mejia-Ramirez, E.; Limbo, O.; Langerak, P.; Russell, P. Critical function of γ H2A in S-phase. **PLOS Genetics**. 11(9): e1005517, 2015.
- Mikeš, J.; Koval', J.; Jendželovský, R.; Sačková, V.; Uhrinová, I.; Kello, M.; et al. The role of p53 in the efficiency of photodynamic therapy with hypericin and subsequent long-term survival of colon cancer cells. **Photochemical & Photobiological Sciences**. 8(11) 1558-1567, 2009.
- Mitsunaga, M.; Tsubota, A.; Nariai, K.; Namiki, Y.; Sumi, M.; Yoshikawa, T.; et al. Early apoptosis and cell death induced by ATX-S10Na(II)-mediated photodynamic therapy are Bax- and p53-dependent in human colon cancer cells. **World Journal of Gastroenterology**. 13(5): 692-698, 2007.
- Mroz, P.; Yaroslavsky, A.; Kharkwal, G. B.; Hamblin, M. R. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. **Cancers**. 3: 2516-2539, 2011.
- Murphy, P. J. M.; Galigniana, M. D.; Morishima, Y.; Harrell, J. M.; Kwok, R. P. S.; Ljungman, M.; et al. Pifithrin- α inhibits p53 signaling after interaction of the tumor suppressor protein with hsp90 and its nuclear translocation. **The Journal of Biological Chemistry**. 279: 30195-30201, 2004.
- Park, J. H.; Zhuang, J.; Li, J.; Hwang, P. M. p53 as a guardian of the mitochondrial genome. **FEBS Letters**. 590(7): 924-934, 2016.
- Pedoux, R.; Lefort, K.; Cuenin, C.; Cortes, U.; Kellner, K.; Doré, J. F.; et al. Specific induction of gadd45 in human melanocytes and melanoma cells after UVB irradiation. **Cancer Cell Biology**. 98: 811-816, 2002.
- Ragàs, X.; Dai, T.; Tegos, G. P.; Agut, M.; Nonell, S.; Hamblin, M. R. Photodynamic inactivation of *Acinetobacter baumannii* using phenothiazinium dyes: in vitro and in vivo studies. **Lasers in Surgery and Medicine**. 42(5): 384-390, 2010.
- Reiners Jr, J. J.; Agostinis, P.; Berg, K.; Oleinick, N. L.; Kessel, D. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. **Autophagy**. 6(1): 7-18, 2010.

Riss, T. L.; Moravec, R. A.; Niles, A. L.; Duellman, S.; Benink, H. A.; Worzella, T. J.; et al. **Assay guidance manual: cell viability assays**. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>, 2016.

Santos, N. F. **Relação entre estresse oxidativo fotoinduzido e morte celular autofágica**. 100 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Shintani, T.; Klionsky, D. J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. **Science**. 306 (5698): 990-995, 2004.

Souza-Pinto, N. C.; Harris, C. C.; Bohr, V. A. p53 functions in the incorporation step in DNA base excision repair in mouse liver mitochondria. **Oncogene**. 23(39): 6559-6568, 2004.

Swanson, J. **Fluorescence microscopy of living cells in culture, part A: Fluorescent labeling of endocytic compartments**. Academic Press. 9:137-151, 1989.

Tardivo, J. P.; Adami, F.; Correa, J. A.; Pinhal, M. A. S.; Baptista, M. S. A clinical trial testing the efficacy of PDT in preventing amputation in diabetic patients. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. 11: 342-350, 2014.

Tasdemir, E.; Maiuri, M. C.; Galluzzi, L.; Vitale, I.; Djavaheri-Mergny, M.; D'Amelio, M.; et al. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. **Nature Cell Biology**. 10(6): 676-687, 2008.

Terman, A.; Gustafsson, B.; Brunk, U. F. The lysosomal-mitochondrial axis theory of postmitotic aging and cell death. **Chemico-Biological Interactions**. 163: 29-37, 2006.

Thakur, B. K.; Dittrich, T.; Chandra, P.; Becker, A.; Lippka, Y.; Selvakumar, D.; et al. Inhibition of NAMPT pathway by FK866 activates the function of p53 in HEK293T cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 424(3): 371-377, 2012.

Tong, Z.; Singh, G.; Rainbow, A. J. The role of the p53 tumor suppressor in the response of human cells to photofrin-mediated photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**. 71(2): 201-210, 2000.

Tsai, J. C.; Wu, C. L.; Chien, H. F.; Chen, C. T. Reorganization of cytoskeleton induced by 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy and its correlation with mitochondrial dysfunction. **Lasers in Surgery and Medicine**. 36: 398-408, 2005.

Turinetto, V.; Porcedda, P.; Orlando, L.; Marchi, M. D.; Amoroso, A.; Giachino, C. The cyclin-dependent kinase inhibitor 5,6-dichloro-I-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole induces nongenotoxic, DNA replication-independent apoptosis of normal and leukemic cells, regardless of their p53 status. **BMC Cancer**. 9:281, 2009.

Uberti, D.; Yavin, E.; Gil, S.; Ayasola, K. R.; Goldfinger, N.; Rotter, V. Hydrogen peroxide induces nuclear translocation of p53 and apoptosis in cells of oligodendroglia origin. **Molecular Brain Research**. 65(2): 167-175, 1999.

Vaseva, A. V.; Moll, U. M. The mitochondrial p53 pathway. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1787(5): 414, 2009.

Vessoni, A. T.; Filippi-Chiela, E. C.; Menck, C. F. M.; Lenz, G. Autophagy and genomic integrity. **Cell Death & Differentiation**. 20(11): 1444-1454, 2013.

Wagner, S. J.; Skripchenko, A.; Robinette, D.; Mallory, D. A.; Hirayama, J.; Cincotta, L.; et al. The use of dimethylmethylene blue for virus photoinactivation of red cell suspensions. **Journal of Developmental Biology**. 102: 125-129, 2000.

Wainwright, M.; Phoenix, D. A.; Rice, L.; Burrow, S. M.; Waring, J. Increased cytotoxicity and phototoxicity in the methylene blue series via chromophore methylation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. 40: 233-239, 1997.

Wang, Z.; Sun, Y. Targeting p53 for Novel Anticancer Therapy. **Translational Oncology**. 3(1): 1-12, 2010.

Wisnovsky, S.; Jean, S. R.; Kelley, S. O. Mitochondrial DNA repair and replication proteins revealed by targeted chemical probes. **Nature Chemical Biology**. 12: 567-573, 2016.

Xia, C.; Wang, Y.; Chen, W.; Yu, W.; Wang, B.; Li, T. New Hydrophilic/Lipophilic Tetra- α -(4-carboxyphenoxy) Phthalocyanine Zinc-Mediated Photodynamic Therapy Inhibits the Proliferation of Human Hepatocellular Carcinoma Bel-7402 Cells by Triggering Apoptosis and Arresting Cell Cycle. **Molecules**. 16: 1389-1401, 2011.

Zawacka-Pankau, J.; Issaeva, N.; Hossain, S.; Pramanik, A.; Selivanova, G.; Podhajska, A. J. Protoporphyrin IX interacts with wild-type p53 protein in vitro and induces cell death of human colon cancer cells in a p53-dependent and -independent manner. **The Journal of Biological Chemistry**. 282(4): 2466-2472, 2007.

Zawacka-Pankau, J.; Krachulec, J.; Grulkowski, I.; Bielawski, K.; Selivanova, G. The p53-mediated cytotoxicity of photodynamic therapy of cancer: Recent advances. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 232: 487-497, 2008.

Zeman, M. K.; Cimprich, K. A. Causes and consequences of replication stress. **Nature Cell Biology**. 16: 2-9, 2014.

Zhang, W. G.; Li, X. W.; Ma, L. P.; Wang, S. W.; Yang, H. Y.; Zhang, Z. Y. Wild-type p53 protein potentiates phototoxicity of 2-BA-2-DMHA in HT29 cells expressing endogenous mutant p53. **Cancer Letters**. 138(1-2): 189-195, 1999.

Zhou, B. B.; Elledge, S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature**. 408(6811): 433-439, 2000.

APÊNDICE A - PCR de longa extensão

Figura 22. Curvas para a padronização da quantidade de DNA molde utilizada na PCR de longa extensão.

APÊNDICE B - PCR em tempo real

Figura 23. Espectros de absorção representativos de diferentes amostras de RNA para quantificação e análise da qualidade pelas razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} , as quais sempre resultaram em valores próximos de 2 e 5, respectivamente.

Figura 24. Curvas de dissociação representativas dos produtos obtidos na PCR em tempo real para cada par de *primers*.

Tabela 3. Eficiência da PCR

Par de <i>primers</i>	Inclinação	R ²	Eficiência	Eficiência (%)
p21	-2,929	0,991	2,195	119,5
HDM2	-2,883	0,998	2,222	122,2
β-Actin	-3,447	0,982	1,950	95