UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)**

GUSTAVO CARVALHO DIAS

**Geração de linhagens celulares HEK293 *knockdown*
para as proteínas p53, ATM, mTOR e PGC1 α e estudo
do papel de p53 na resposta ao estresse oxidativo
provocado por azul de metileno**

Versão original da dissertação defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

06/12/2013

GUSTAVO CARVALHO DIAS

Geração de linhagens celulares HEK293 *knockdown* para as proteínas p53, ATM, mTOR e PGC1 α e estudo do papel de p53 na resposta ao estresse oxidativo provocado por azul de metileno

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

Orientadora: Profa. Dra. Nadjia C. de Souza Pinto

São Paulo

2013

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

Dias, Gustavo Carvalho
D541g Geração de linhagens celulares HEK293 *knockdown* para as proteínas p53, ATM, mTOR e PGC1 α e estudo do papel de p53 na resposta ao estresse oxidativo provocado por azul de metileno / Gustavo Carvalho Dias. -- São Paulo, 2013.
66p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Souza-Pinto, Nadja Cristhina de
Co-orientador: Soltys, Daniela Tathiana

1. DNA : Mitochondria 2. Azul de metileno I. T. II. Souza-Pinto, Nadja Cristhina de, orientador III. Soltys, Daniela Tathiana, co-orientador.

574.873282 CDD

Aos meus pais, Altomir e Consuelo,
e aos meus irmãos, Isabel e Humberto.

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora, profa. Nadja C. de Souza Pinto, pela orientação, dedicação e pela oportunidade de me juntar ao seu grupo para desenvolver meu trabalho. Agradeço também pela oportunidade de conhecer outros pesquisadores, com os quais mantêm contato, e por estimular e apoiar a participação em congressos e, em especial ao 11th ICEM, do qual fez parte da comissão organizadora.

A minha co-orientadora, Daniela T. Soltys, por todo o apoio que me deu ao longo do mestrado, pelo incentivo a buscar novas abordagens para o desenvolvimento do meu trabalho e também pelo carinho e amizade.

A profa. Alicia J. Kowaltowski, por permitir o uso irrestrito do seu laboratório e por reforçar meu interesse por mitocôndrias. Agradeço também a todos os integrantes do seu grupo de pesquisa, pelas valiosas discussões, auxílio técnico e pela amizade.

Ao prof. Carlos F. Menck, pelo uso de equipamentos e materiais necessários para desenvolver parte dos meus experimentos. Aos integrantes do seu laboratório, pela disposição em ajudar.

A Andressa Costa e Adriana Wendel, pela excelente organização do laboratório e pela dedicação.

A todos os membros do Laboratório de Genética Mitocondrial, antigos e atuais, pelos trabalhos desenvolvidos, pelo companheirismo e bom humor. Sobretudo, agradeço a amizade de cada um de vocês.

A minha família e aos meus amigos, pelo imenso apoio e incentivo.

Ao Instituto de Química e à Universidade de São Paulo, por sempre prezarem pela excelência no ensino e na pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro: Redoxoma (08/57721-3) e projeto temático (10/51906-1). Novamente, ao CNPq pela bolsa de mestrado (processo 13326/2010-2).

Resumo

Dias, G.C. Geração de linhagens celulares HEK293 *knockdown* para as proteínas p53, ATM, mTOR e PGC1 α e estudo do papel de p53 na resposta ao estresse oxidativo provocado por azul de metileno. 2013. (66p). Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O DNA é um alvo constante de modificações químicas, as quais resultam na ativação dos programas de reparo de danos no DNA. O DNA mitocondrial (DNAm), uma molécula circular contendo aproximadamente 16,6 kb de extensão, é constantemente exposto às espécies reativas de oxigênio (EROs) devido a sua proximidade da cadeia transportadora de elétrons, presente na membrana mitocondrial interna. Quase todas as vias de reparo de DNA presentes no núcleo atuam também na mitocôndria, entretanto, a regulação das vias mitocondriais não é bem compreendida. As proteínas p53, ATM, mTOR e PGC1 α participam, dentre outros papéis, do controle do metabolismo energético e das respostas a lesões no DNA nuclear. Dessa forma, decidimos gerar linhagens celulares com níveis reduzidos dessas proteínas como uma ferramenta para o estudo dos seus papéis na manutenção do DNAm. Para isso, foram geradas linhagens celulares de HEK293 expressando constitutivamente shRNAs alvo-específicos, cuja diminuição da expressão das proteínas alvo foi confirmada através de *western blotting*. Neste trabalho, também foi estudado o papel de p53 na resposta ao estresse oxidativo mitocondrial provocado por azul de metileno (AM). O AM é um corante fotoativo capaz de atravessar membranas biológicas e, em células de mamíferos, se acumula em organelas, tais como a mitocôndria. Uma vez que p53 participa de diversas funções celulares e transloca para a mitocôndria sob condições de estresse, onde pode induzir apoptose ou modular o reparo de DNAm, nós investigamos se p53 está envolvido na indução de morte celular após tratamento com AM fotoativado. Para isso, foram utilizados 2 clones com níveis reduzidos de p53 obtidos na primeira etapa deste trabalho. Sob condições normais, foi demonstrado que o silenciamento de p53 induziu uma forte redução do número de cópias de DNAm e estimulou a proliferação celular quando fornecemos glicose ou galactose como substratos energéticos. A depleção de p53, ou a sua inibição farmacológica, resultaram em uma ligeira proteção quando as células foram submetidas ao tratamento com AM. Também foi demonstrado que AM provoca morte celular apoptótica de uma maneira dependente de p53, uma vez que a depleção dessa proteína protegeu a população do acúmulo de células em sub-G1. Portanto, nossos resultados sugerem que AM induz morte celular apoptótica em células HEK293, de uma maneira dependente de p53. Esse efeito pode ser mediado diretamente por p53, ou ainda, pelo seu papel na manutenção do número de cópias do DNAm.

Palavras-chave: mitocôndria, DNAm, p53, azul de metileno, estresse oxidativo

Abstract

Dias, G.C. Generation of HEK293 knockdown cell lines to the proteins p53, ATM, mTOR and PGC1 α and study of the role of p53 during response to methylene blue-induced oxidative stress. 2013. (66p). Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DNA is constantly being chemically modified, which results in activation of the DNA damage response program. The mitochondrial DNA (mtDNA), a circular molecule of 16.6 kb in length, is primary target of reactive oxygen species (ROS) due its proximity to the electron transport chain, in the mitochondrial inner membrane. Almost all known DNA damage repair pathways operating in the nucleus were also found in the mitochondrion; however, their regulation remains not well understood. The proteins p53, ATM, mTOR e PGC1 α have many cellular functions, including control of energy metabolism and cell fate after stress. Thus, we hypothesized that those proteins could participate in maintaining of mtDNA, through direct or indirect roles. To test this hypothesis, we generated isogenic knockdown cell lines to further use them to study their role in the mtDNA damage response. For that, were generated HEK293 knockdown cell lines that stably express target-specific shRNAs. Efficient knockdown was checked using western blotting. Here, we also studied the role of p53 in the cellular response to mitochondrial oxidative stress induced by methylene blue (MB). MB is a photoactive dye that crosses biological membranes due to its lypophylic character and, in mammalian cells, accumulates in organelles such as mitochondria; however, its cytotoxic mechanism is not well understood. As the p53 protein participates in several cellular functions and translocates to mitochondria under stress conditions, where it can induce apoptosis or modulate mtDNA repair, we investigated whether p53 was involved in MB + light-induced cell death using p53 knockdown clones selected from the cell lines generated in the first phase of this work. Under normal conditions, p53 knockdown caused a decrease in mtDNA copy number and stimulated cellular growth supported by either glucose or galactose. After MB treatment, p53-kd cells showed a slight decrease in cell death compared to scrambled shRNA controls. Evaluation of cell death after MB treatment, using flow cytometry analysis, indicated that MB was able to induce significant levels of apoptotic cell death, which was dependent on p53 levels. Taken together, our results suggest that MB induces cell death, probably via apoptosis, in a p53 dependent manner. This effect may be mediated by p53 directly or by its role in mtDNA copy number maintenance.

Keywords: mitochondria, mtDNA, p53, methylene blue, oxidative stress

Lista de abreviaturas e siglas

AM = azul de metileno.

BER = reparo por excisão de base (do inglês *base excision repair*).

DNA = ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*).

DNAc = DNA complementar.

DNAmt = DNA mitocondrial.

DNA_n = DNA nuclear.

ERO = espécie reativa de oxigênio.

NER = reparo por excisão de nucleotídeo (do inglês *nucleotide excision repair*).

8-oxodG = 8-desoxiguanina.

pb = pares de bases.

PCR = reação da polimerase em cadeia (do inglês *polymerase chain reaction*).

PI = iodeto de propídeo (do inglês *propidium iodide*).

RNA = ácido ribonucleico (do inglês *ribonucleic acid*).

RNA_m = RNA mensageiro.

RNA_r = RNA ribossomal.

RNA_t = RNA de transferência ou RNA transportador.

RT-PCR = transcrição reversa por reação da polimerase em cadeia (do inglês *reverse transcription followed by the polymerase chain reaction*).

shRNA = sem tradução para o português (do inglês *short hairpin RNA*).

Sumário

1. Introdução	12
1.1. Mitocôndria: Uma organela com múltiplas funções	13
1.2. DNA mitocondrial: Um genoma reducionista	13
1.3. Principais causas de danos ao DNA mitocondrial	14
1.3.1. Geração de EROs mitocondrial	15
1.4. Reparo de danos no DNA mitocondrial	16
1.5. ATM: estresse oxidativo e homeostase mitocondrial	17
1.6. mTOR: metabolismo energético e mitofagia	17
1.7. PGC1 α : metabolismo e biogênese mitocondrial	18
1.8. p53: O guardião do genoma mitocondrial?	18
1.8.1. O papel de p53 dentro da mitocôndria	19
1.9. Azul de metileno	20
2. Objetivos	22
3. Materiais e métodos	23
3.1. Cultivo celular	23
3.2. Silenciamento gênico	23
3.3. Seleção de linhagens knockdown	25
3.4. Avaliação da porcentagem de silenciamento	26
3.4.1. Extração de proteínas	26
3.4.2. Preparo das amostras e SDS-PAGE	26
3.4.3. Transferência e revelação	27
3.4.4. Extração de RNA total	27
3.4.5. Reações de Transcrição Reversa e amplificação quantitativa do DNAc (qRT-PCR)	28
3.4.6. Validação dos primers	28

3.5. Seleção clonal	29
3.6. Curva de crescimento utilizando o sistema xCELLigence	29
3.7. Medida do consumo de oxigênio por células em cultura	30
3.8. Proliferação celular após o tratamento com o corante azul de metileno fotossensibilizado	30
3.9. Quantificação do número relativo de cópias de DNAm _t	31
3.10. Identificação da população sub-G1 por citometria de fluxo	32
4. Resultados	33
4.1. Geração de linhagens celulares HEK293 knockdown para ATM, mTOR, p53 e PGC1 α	33
4.1.1. Expressão de ATM em linhagens HEK293 silenciadas para esse gene	34
4.1.2. Expressão de mTOR em linhagens HEK293 silenciadas para esse gene	35
4.1.3. Expressão de PGC1 α em linhagens HEK293 silenciadas para esse gene	37
4.1.4. Expressão de p53 em linhagens HEK293 silenciadas para esse gene	38
4.1.5. Seleção clonal de HEK293 silenciada para p53	38
4.2. Estudo do papel de p53 em células HEK293 submetidas ao estresse oxidativo mitocondrial induzido pelo corante Azul de Metileno	41
4.2.1. Cinética de proliferação celular em meio de cultura contendo glicose ou galactose	41
4.2.2. Parâmetros bioenergéticos em HEK293 p53-KD	44
4.2.3. Efeito do nível de p53 na susceptibilidade de HEK293 ao estresse oxidativo gerado por azul de metileno fotoativado	48
4.2.4. Quantificação relativa do número de cópias de DNAm _t em dois clones p53 knockdown	49
4.2.5. Caracterização do tipo de morte celular induzida por estresse oxidativo mitocondrial	50
5. Discussão	52
6. Conclusão	57
7. Referências Bibliográficas	58

1. Introdução

Diversos eventos celulares ou ambientais, como a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou a incidência de radiação ultravioleta (UV), acarretam em danos para os componentes celulares, incluindo os ácidos nucleicos. A ação desses agentes, quando reconhecida com sucesso, gera uma resposta coordenada na qual a célula poderá decidir entre reparar o dano ou recorrer a um dos seus programas de morte celular. Através da ativação diferencial de diversas vias de reparo de DNA (Figura 1.1), as células evitam o acúmulo de mutações decorrentes de lesões no seu material genético ou de erros replicativos, garantindo assim a proteção da informação genética através das gerações (Harper e Elledge, 2007).

Figura 1.1. Esquema simplificado das diferentes fontes de dano no DNA e seus respectivos processos de reparo. Abreviações: (6-4)PP, fotoproducto pirimidina (6-4) pirimidona; CPD, dímero de pirimidina *cis-syn*-ciclobutano; Cis-Pt, cisplatina; MMC, mitomicina C; BER, do inglês *base excision repair*; NER, do inglês *nucleotide excision repair* (Traduzido de (de Boer e Hoeijmakers, 2000).

Os mecanismos de reparo de lesão no DNA apresentados na Figura 1.1 acima foram inicialmente identificados e caracterizados atuando em resposta a lesões encontradas no genoma nuclear. Além do núcleo, a mitocôndria é outra organela celular que contém material genético próprio e que está sujeito aos mesmos agentes causadores de danos no DNA e, em especial, a EROs (Alexeyev et al., 2013). Dessa forma, é esperado que existam mecanismos de manutenção do genoma mitocondrial semelhantes aos nucleares. De fato, a maioria das vias de reparo de DNA nuclear (DNAn) atua também na mitocôndria contribuindo para a manutenção da integridade do DNA mitocondrial (DNAm_t).

1.1. Mitocôndria: Uma organela com múltiplas funções

As mitocôndrias são, principalmente, conhecidas como os sítios celulares de geração de energia para as células eucariotas, principalmente no que diz respeito à produção de ATP pela fosforilação oxidativa. De fato, essas organelas são essenciais para a homeostasia celular e possuem diversas funções. Para citar alguns dos processos executados pela mitocôndria, podemos listar o metabolismo de biomoléculas através do ciclo de Krebs, parte do ciclo da ureia (metabolismo de aminoácidos e balanço de nitrogênio), metabolismo de ácidos graxos, biossíntese de cardiolipina (componente da membrana interna mitocondrial), biossíntese do grupo heme (componente da hemoglobina, citocromos e clorofila em plantas) e do ubiquinol (coenzima Q) (Scheffler, 2008). Além de possuir um papel central no metabolismo energético, mitocôndrias também participam do destino celular após situações de estresse, participando dos programas de morte celular programada, tais como apoptose e necrose (Kroemer et al., 2009; Scheffler, 2008), e também são importantes sítios de geração de EROs endógenos (Kowaltowski et al., 2009).

1.2. DNA mitocondrial: Um genoma reducionista

O genoma mitocondrial humano consiste de uma molécula de DNA circular altamente conservado formado por 16.569 pares de bases (pb) e codifica para 13 cadeias polipeptídicas, todas componentes da cadeia transportadora de elétrons, além de 22 RNAs e 2 RNAs (Figura 1.2) (Anderson et al., 1981; Andrews et al., 1999). De sua totalidade, apenas cerca de 1.122 pb do DNAm_t não codificam para algum produto gênico, entretanto, essa região desempenha um papel crucial para a atividade do DNAm_t uma vez que contém a origem de replicação da fita pesada O_H (do inglês *Heavy*, em oposição a O_L que se refere a origem de replicação da fita leve, do inglês *Light*) e os promotores para transcrição das fitas leve e pesada (Bonawitz et al., 2006). Essa sequência não-codificadora é denominada alça de deslocamento (ou D-loop, do inglês *displacement loop*) e, apesar da sua importância funcional, possui somente pequenos segmentos conservados enquanto o restante da sequência é variável entre as espécies e apresenta polimorfismos, mesmo dentro de uma mesma espécie (Scheffler, 2008). A consequência direta da alta densidade de informação no genoma mitocondrial é que, mesmo pequenas alterações na sua sequência, ou acúmulo de lesões, terão um grande impacto na expressão gênica e integridade da molécula.

Figura 1.2. Mapa do genoma mitocondrial humano. O_H e O_L origens de replicação das fitas pesada (do inglês *Heavy*) e leve (do inglês *Light*) do DNAmH, respectivamente; ND1–ND6, subunidades da NADH desidrogenase (complexo I) subunidades 1–6; Cyt b, citocromo b (complexo III); COX1–COX3, subunidades da citocromo oxidase (complexo IV) subunidades 1–3; ATP6 e ATP8, subunidades 6 e 8 da ATP sintase (complexo V) (Alexeyev et al., 2013).

1.3. Principais causas de danos ao DNA mitocondrial

O genoma mitocondrial está constantemente exposto a agentes causadores de danos endógenos e exógenos. Em uma recente revisão, Alexeyev e colaboradores (2013) listaram 5 fontes relevantes de lesão ao DNAmH, e estão transcritos logo abaixo:

- i) **Alquilação:** um dano causado por agentes exógenos (agentes quimioterápicos, por exemplo) e endógenos (S-adenosilmetionina, o qual pode metilar o DNA de forma não-enzimática). Com efeito, a mitocôndria contém cerca de 30% do conteúdo celular de S-adenosilmetionina. Danos alquilantes endógenos foram demonstrados experimentalmente.
- ii) **Danos hidrolíticos:** podem ocorrer de duas maneiras: formação de sítios abásicos (como resultado da hidrólise espontânea da ligação glicosídica) e desaminação de bases, com predominância de citosina.

- iii) **Formação de adutos:** pode ter fontes endógenas (por exemplo, estrogênios) e exógenas (como cigarro, entre outros agentes químicos). Em alguns casos, a exposição a esses agentes, pode danificar o DNAm preferencialmente.
- iv) **Mal-pareamento de bases:** devido a erros durante a replicação (como a incorporação de bases erradas ou modificadas quimicamente) ou modificação química de bases nitrogenadas após a incorporação no DNA.
- v) **Quebras de fita do DNA:** pode haver quebra da ligação fosfodiéster em apenas uma ou em ambas as fitas do DNA. Os dois tipos de quebra podem ser gerados direta ou indiretamente (induzidos pela ação de agentes tóxicos, ou como resultado de falhas no processo de reparo de outras lesões no DNA).
- vi) **Danos oxidativos:** este tipo de dano é o mais estudado e também o mais prevalente no DNAm, principalmente porque as mitocôndrias são a principal fonte celular de EROs.

EROs gerados pela mitocôndria podem provocar danos em proteínas mitocondriais, lipídeos e no DNAm. Acredita-se que o DNAm é particularmente sensível aos agentes oxidantes devido à sua proximidade da membrana interna mitocondrial, onde é formada a maioria das EROs intracelulares, e também devido a falta de histonas protegendo o genoma mitocondrial (Ames et al., 1993). Embora ainda controverso na literatura, diversos autores acreditam que o ambiente mitocondrial contribua para um número elevado de 8-oxodesoxiguanina (8-oxodG) encontrados no DNAm em relação ao DNAn, um parâmetro anteriormente utilizado como marcador de estresse oxidativo mitocondrial (Anson et al., 2000; Herrero e Barja, 1999; Lim et al., 2005; Mecocci et al., 1993). A consequência direta da presença de 8-oxodG no DNA é que essa base oxidada pode gerar um pareamento de bases não usual com uma adenina, provocando uma transverso G:C para A:T após um ciclo de replicação. Os produtos de oxidação de 8-oxodG, como os ácidos oxalúrico e cianúrico, por exemplo, podem ser ainda mais mutagênicos do que o próprio 8-oxodG (Halliwell e Gutteridge, 2007). Apesar da controvérsia em relação aos níveis mitocondriais de 8-oxodG e dos protocolos utilizados, é possível acessar os danos oxidativos no DNAm através de outros parâmetros, tais como: modificação química de bases – além da própria 8-oxodG –, sítios abásicos, entre outros tipos de lesão (Cooke et al., 2003). Utilizando outra metodologia, baseada na amplificação por PCR de quase toda a extensão do DNAm, foi demonstrado que o dano no DNAm é mais extenso e persistente do que no DNAn em células humanas após sofrer estresse oxidativo (Yakes e Van Houten, 1997), confirmando novamente a maior susceptibilidade a danos ao qual essa molécula está exposta.

1.3.1. Geração de EROs mitocondrial

A primeira espécie reativa de oxigênio gerada na mitocôndria é o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), pelos complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons, resultante da redução monoelétrica do oxigênio molecular, O_2 (Kowaltowski et al., 2009). Estima-se que a produção de $O_2^{\cdot-}$ varie de cerca de 0,1 % a 4 % do consumo total de oxigênio, dependendo de suas concentrações locais (Nicholls e Ferguson, 2002). O $O_2^{\cdot-}$ é convertido ao peróxido de hidrogênio, H_2O_2 , pelas enzimas superóxido dismutase Mn-SOD e Cu,Zn-SOD presentes, respectivamente, na matriz mitocondrial e no espaço intermembranas (Kowaltowski et al., 2009; Nicholls e Ferguson, 2002). O H_2O_2 pode ser removido pela catalase, em mitocôndrias de fígado (Salvi et al., 2007) e coração (Radi et al., 1991), ou pelos três pares redox quantitativamente mais importantes na matriz mitocondrial: GSSG/GSH,

NADP⁺/NADPH e NAD⁺/NADH (Nicholls e Ferguson, 2002). Entretanto, se não degradado, pode ocorrer formação do radical hidroxila (HO·) através de reações não enzimáticas: da reação de íons metálicos, como Cu⁺ e Fe²⁺ (Reação de Fenton), com o H₂O₂; pela fissão homolítica da ligação covalente entre os átomos de oxigênio do H₂O₂, induzida por radiação UV; por ação da radiação γ a partir de água; ou por ação das quinonas e semi-quinonas, a partir de H₂O₂, com participação de ferro (Halliwell e Gutteridge, 2007). Devido à sua curta meia-vida, o HO· só pode ser removido indiretamente, ou seja, apenas os produtos da sua reação com outras biomoléculas podem ser reparados enzimaticamente (Halliwell e Gutteridge, 2007). Desta forma, como o radical hidroxila reage com biomoléculas com uma constante de reação de cerca de $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Augusto, 2006), os alvos preferenciais são aqueles que estão mais próximos de seus sítios de produção, o que torna o DNAm um alvo preferencial.

1.4. Reparo de danos no DNA mitocondrial

Para lidar com os danos causados no seu genoma, a mitocôndria conta com quase todas vias de reparo de DNA presentes também no núcleo, sendo a via de reparo por excisão de bases (ou BER, do inglês *base excision repair*) a melhor caracterizada até o momento e também a mais ativa nessa organela. A mitocôndria conta também com a via de reparo de bases mal-pareadas, reversão direta de guanina metilada provavelmente pela proteína suicida MGMT (do inglês, *O⁶-methyl-guanine DNA methyl transferase*), há também evidências da atividade de recombinação homóloga e de junção de pontas não homólogas de DNA em mitocôndrias (revisto por (Alexeyev et al., 2013; Gredilla et al., 2010; Kazak et al., 2012; Sykora et al., 2012)). Há um consenso na literatura sobre a ausência de via de reparo por excisão de nucleotídeos (ou NER, do inglês *nucleotide excision repair*) na mitocôndria e os autores concordam que danos tais como aqueles reparados pela via NER, bem como excesso de danos ou ocorrência de quebra de fita dupla de DNA, resultam em degradação de DNAm (Shokolenko et al., 2013). É importante ressaltar que a degradação de DNAm consiste em uma resposta celular possível somente pelo fato de que há muitas cópias desse genoma em cada mitocôndria.

A eficiência das vias de reparo de DNA e as respostas celulares a lesões no DNA podem ser controladas em vários níveis. Enquanto a atividade de reparo depende primariamente do nível de expressão dos seus componentes enzimáticos, muitas dessas enzimas são sujeitas a modulações por modificações pós-traducionais e por interações com outras proteínas sem atividade enzimática. Dados recentes da literatura indicam que as proteínas p53, PGC1 α , ATM e mTOR podem estar envolvidas no controle das respostas celulares a lesões no DNA, como será discutido abaixo. Essas proteínas participam de diversas vias celulares, incluindo vias centrais para o controle do metabolismo energético celular e da função mitocondrial. Entretanto, seus papéis diretos em vias de reparo de DNA, especialmente em mitocôndrias, ainda não estão bem estabelecidos.

1.5. ATM: estresse oxidativo e homeostase mitocondrial

A proteína mutada em Ataxia telangiectasia (ATM) pertence à família de fosfatidilinositol cinases (PI3/PI4-cinases), relacionadas com a manutenção da estabilidade do genoma e controle do ciclo celular. Essa proteína é rapidamente ativada em resposta às lesões no DNA, especialmente quebras de fita dupla (Banin et al., 1998). ATM sofre auto-fosforilação, além de fosforilar outros alvos subsequentes como p53 em seu resíduo Ser¹⁵, o que leva ao aumento da atividade desse fator de transcrição, reforçando seu papel no reparo de DNA e controle do ciclo celular (Banin et al., 1998; Canman et al., 1998). Mutações em *ATM* causam Ataxia Telangiectasia, uma rara doença autossomal recessiva associada com degeneração prematura do sistema nervoso central e a um contínuo estado de estresse oxidativo com elevada produção de EROs (Ito et al., 2004; Lavin e Shiloh, 1997). ATM é essencial para a manutenção do número de cópias do DNAm e para a homeostase bioenergética mitocondrial (Eaton et al., 2007). A deficiência em ATM resulta em disfunção mitocondrial, provocando redução no potencial de membrana mitocondrial, aumento da expressão de genes responsivos ao estresse oxidativo, diminuição das taxas respiratórias (Ambrose et al., 2007), diminuição da atividade de citocromo c oxidase (Patel et al., 2011) e provavelmente redução do processo de mitofagia (Valentin-Vega et al., 2012). Em resposta ao estresse oxidativo, ATM ativa a proteína de sinalização intracelular TSC2, inibindo então o complexo mTORC1, o que permite a indução de autofagia (Alexander et al., 2010). Por outro lado, um papel direto de ATM no reparo de DNAm, e sua ativação em resposta a lesões no DNAm ainda não foram demonstrados.

1.6. mTOR: metabolismo energético e mitofagia

A proteína mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) é uma serina/treonina cinase que regula o crescimento, tamanho e sobrevivência celular em resposta aos estímulos metabólicos extracelulares, como insulina e aminoácidos. A inibição por rapamicina do complexo mTORC1, do qual mTOR é um constituinte, diminui os níveis de respiração mitocondrial e da respiração completamente desacoplada, induzindo um estado de dependência aumentada da glicólise aeróbica (Schieke et al., 2006). A inibição de mTORC1 também reduz a expressão de reguladores da transcrição mitocondrial, como PGC1 α e NRF-1, e o consumo de oxigênio estando, portanto, relacionado com o controle do metabolismo mitocondrial (Cunningham et al., 2007). mTORC1 controla a atividade e a biogênese mitocondrial ao promover seletivamente a tradução dos mRNA codificadores de proteínas mitocondriais (Morita et al., 2013) estabelecendo, portanto, a ligação entre a síntese proteica e o metabolismo energético. Além disso, mTOR pode ser encontrado na membrana externa mitocondrial em um complexo com VDAC1 e Bcl-xl, que são proteínas envolvidas no controle da apoptose pela via mitocondrial (Ramanathan e Schreiber, 2009). E essa observação sugere que mTOR pode estar associado ao controle da apoptose em condições de estresse. Adicionalmente, mTOR também participa da regulação negativa do processo de autofagia e sua atividade está sob a influência de p53 (Feng e Levine, 2010). Além disso, a produção aumentada de EROs durante déficit nutricional ou dano mitocondrial desencadeia a autofagia através da inibição de mTOR (Essick e Sam, 2010). Em um modelo celular contendo DNAm heteroplásmico carregando uma mutação patogênica, a administração de rapamicina estimulou a mitofagia e, conseqüentemente, resultou na redução dos níveis de DNAm mutado além de restaurar parcialmente os níveis de ATP (Dai et al., 2013). A inibição do mTORC1 por rapamicina em modelo murino para a síndrome de Leigh, caracterizada pela

deficiência da proteína Ndufs4 do complexo I mitocondrial, retardou os sintomas neurológicos dessa doença mitocondrial (Johnson et al., 2013). Juntos, esses dados mostram que a proteína mTOR possui um importante papel no que diz respeito ao metabolismo do DNAm e função mitocondrial.

1.7. PGC1 α : metabolismo e biogênese mitocondrial

PGC1 α é um co-ativador transcricional, membro de uma família de co-ativadores que atuam em conjunto com as proteínas proliferadoras de peroxissoma, como PPAR γ . Wu et al. (1999) demonstraram que PGC1 α estimula a biogênese mitocondrial e aumenta a respiração em células musculares através da indução da proteína desacopladora 2 (UCP-2) e da regulação de fatores respiratórios nucleares (NRFs). Segundo os mesmos autores, a ativação de PGC1 α também controla o metabolismo de DNAm indiretamente, pois ele aumenta a expressão do fator de transcrição A mitocondrial (TFAM), um regulador da replicação e transcrição do DNAm. Como descreveram Uldry et al. (2006), a ausência de PGC1 α reduz severamente a indução de genes termogênicos em tecido adiposo marrom de camundongos. Ainda segundo esses autores, a deficiência de PGC1 α ou de PGC1 β provoca uma significativa redução da expressão gênica mitocondrial, e a ausência concomitante das duas formas causa perda total da biogênese mitocondrial ligada à diferenciação do tecido marrom e da respiração. PGC1 α exerce um efeito protetor em células neuronais em cultura diante da ação de oxidantes, ativando diretamente um programa transcricional antioxidante (St-Pierre et al., 2006). Em células endoteliais vasculares, PGC1 α age em parceria com Foxo3a em resposta ao estresse oxidativo regulando a expressão de *SOD2* e catalase (Olmos et al., 2009). O aumento da expressão de PGC1 α em certos tipos de melanoma resulta em diminuição da glicólise e aumento de metabolismo mitocondrial bem como da resistência ao estresse oxidativo (Haq et al., 2013; Vazquez et al., 2013). Entretanto, um papel para PGC1 α em controle de reparo de DNA ainda não foi demonstrado.

1.8. p53: O guardião do genoma mitocondrial?

Os primeiros registros da proteína p53 foram publicados em 1979, quando três grupos a identificaram em células transformadas por agentes químicos, irradiação ou vírus, bem como em células transformadas espontaneamente (DeLeo et al., 1979; Lane e Crawford, 1979; Linzer e Levine, 1979). Nos anos seguintes, p53 rapidamente tornou-se um grande objeto de estudo devido ao seu importante papel na resposta a danos celulares e agentes mutagênicos, contribuindo, dessa forma, para a manutenção da estabilidade genômica. Pelo seu papel na proteção do genoma nuclear, como parada do ciclo celular ou indução de morte programada, p53 recebeu o título de “o guardião do genoma” (Lane, 1992). Os estudos que se seguiram contribuíram para o acúmulo de um enorme volume de informações a respeito dessa proteína supressora de tumor, e será brevemente resumido a seguir.

A proteína p53 é um fator de transcrição sequência-específico responsável pelo controle de uma série de eventos celulares que incluem regulação do ciclo celular, indução de apoptose, reparo e replicação de DNA, proliferação celular, resposta a estresse e regulação negativa do próprio p53 (Holley e St Clair, 2009). Em condições fisiológicas normais p53 está inativa e em baixas

concentrações devido à presença de proteínas repressoras MDM2 e MDMX. Sua ativação, sob condições de estresse, é dependente de modificações pós-traducionais tais como fosforilação, acetilação ou ubiquitinação, para citar algumas (Kruse e Gu, 2009). Mutações em p53 que causam a perda de sua atividade são associadas com diversos tipos de cânceres e vários grupos têm proposto que mutações nesse gene são eventos iniciais no processo de transformação tumorigênica, uma vez que p53 é necessário para a manutenção da estabilidade genômica da célula (Garritano et al., 2013; Greenblatt et al., 1994). A proteína p53 é ativada em resposta a uma gama variada de estresses, que incluem choque térmico, estresse metabólico, hipóxia e danos no DNA (radiação UV e ionizante, depurinação e alquilação de bases e danos induzidos por EROs, entre outros) (Harris e Levine, 2005).

No que diz respeito ao papel dessa proteína no reparo de dano no DNA, a p53 facilita o recrutamento de fatores da via NER para sítios danificados no DNA após irradiação com luz UVB, sendo que esses fatores são proteínas envolvidas nos estágios iniciais de NER: XPD (componente do fator de transcrição TFIIH) XPC e CSB; por outro lado, a ausência de p53 torna mais lenta a resposta apoptótica induzida por UVB (Ikehata et al., 2010; Wang et al., 2003). Foi demonstrado que p53 estimula a via BER, independente de sua atividade transcricional, e exibe um pico de atividade entre as fases G0 e G1 do ciclo celular após estresse genotóxico (Offer et al., 2001a; Offer et al., 1999; Offer et al., 2001b). A proteína p53 interage com enzimas do eixo central de BER, AP endonuclease e DNA Polimerase β , estabilizando a interação desta última com sítios abásicos no DNA, além de estar aparentemente envolvida no controle da expressão da Pol β (Seo et al., 2002; Zhou et al., 2001).

1.8.1. O papel de p53 dentro da mitocôndria

Mudanças na função mitocondrial, com consequente alteração na produção de EROs, podem afetar a atividade de p53 e sua localização subcelular e, de fato, p53 realoca para a mitocôndria em resposta a estímulos que induzem apoptose (Holley et al., 2010; Marchenko et al., 2000). Por sua vez, a proteína p53 pode afetar a produção de EROs mitocondrial regulando a expressão e interagindo diretamente com Mn-SOD, após translocar-se para a mitocôndria sob condições de estresse (Zhao et al., 2005). A proteína p53 regula ainda a transição entre a respiração aeróbica e a glicólise controlando a expressão de SCO2, PGM e TIGAR (Feng e Levine, 2010).

Sob condições de estresse oxidativo, p53 provoca abertura do poro de transição de permeabilidade de membrana mitocondrial através da interação com a proteína ciclofilina D provocando morte celular por necrose (Vaseva et al., 2012). A localização mitocondrial de p53 – espaço intermembrana e matriz – na ausência de estresse estimula o consumo de oxigênio e diminui a produção de superóxido (Bergeaud et al., 2013), provavelmente por estimular a enzima Mn-SOD (Zhao et al., 2005). A proteína p53 interage com a proteína sensível à oligomicina OSCP, uma subunidade do complexo FoF1 da ATP sintase, e está aparentemente envolvida com a montagem desse complexo (Bergeaud et al., 2013). Dessa forma, a proteína p53 desempenha, dentre tantos papéis, a comunicação entre núcleo e mitocôndria, contribuindo para o controle do estado redox e metabólico celular.

No que diz respeito à manutenção do genoma mitocondrial, estudos *in vitro* mostraram que p53 promove a estabilidade do DNAm através de uma interação funcional com a DNA polimerase γ (pol γ), além de estimular a remoção de uracila e 8-oxoguanina pelas glicosilases da via BER (Achanta

et al., 2005; Chen et al., 2006; de Souza-Pinto et al., 2004). Dentro da mitocôndria, p53 também aumenta a acurácia da síntese de DNAm através de sua atividade 3'-5' exonucleásica, dessa forma, atua como revisora da atividade de pol γ (Bakhanashvili et al., 2008). A ligação de mtSSB à p53 aumenta sua atividade 3'-5' exonucleásica, particularmente na hidrólise de 8-oxoguanina (Wong et al., 2009) reforçando ainda mais o papel de p53 mitocondrial para a síntese e reparo de DNAm. De e colaboradores (2012) revelaram que p53 e a DNA helicase dependente de ATP RECQL4 colocalizam com os nucleóides mitocondriais na ausência de danos ao DNA, sugerindo que RECQL4 pode contribuir para o recrutamento de p53 durante a replicação do genoma mitocondrial.

Além disso, Canugovi e colaboradores (2010) demonstraram que a proteína TFAM, componente essencial do nucleóide mitocondrial, pode impedir o acesso de proteínas da via BER ao DNAm, inibindo a atividade dessa via. In vitro, p53 promove a remoção de TFAM do DNA, facilitando o acesso das proteínas de reparo. Desta forma, p53 pode também contribuir para a manutenção da integridade do DNAm através de sua interação funcional com TFAM.

1.9. Azul de metileno

O azul de metileno (AM) é um composto fenotiazínico de estrutura tricíclica, encontrando-se normalmente na forma catiônica quando em solução. Caracterizado como fotossensibilizador, apresenta o máximo de absorção em 656 nm (Calzavara-Pinton et al., 2012) e, como a maioria dos fotossensibilizadores, gera oxigênio singlete de forma eficiente por reações fotoquímicas do tipo II (Oleinick et al., 2002). Em células tratadas com o AM, esse possui localização lisossomal e colocaliza com o núcleo após fotoativação (Mellish et al., 2002; Walker et al., 2004). Suspensões de mitocôndrias também são capazes de acumular AM eficientemente, de maneira dependente do potencial de membrana mitocondrial (Gabrielli et al., 2004).

Diversos trabalhos demonstraram a ação antimicrobiana do azul de metileno e seus derivados em terapia fotodinâmica (TFD) contra bactérias gram positivas e negativas, *Candida albicans* (Paz-Cristobal et al., 2013; Souza et al., 2010), entre outros fungos patogênicos (Calzavara-Pinton et al., 2012), e se mostrou vantajosa por ser um método não invasivo, de baixo custo, além de representar uma alternativa promissora contra a resistência dos microrganismos aos antibióticos. O uso de azul de metileno no tratamento de dermatites, parasitoses cutâneas e inativação de agentes infecciosos em bancos de sangue têm sido extensivamente descrito e recomendado (Wainwright e Baptista, 2011).

O AM fotoativado induz apoptose em células de câncer de pulmão (Lim et al., 2013) e em melanomas (Chen et al., 2008) a partir de uma série de reações desencadeadas pela geração de EROs, resultando em redução do potencial de membrana mitocondrial, comprometimento da cadeia transportadora de elétrons e ativação da apoptose pela via intrínseca dependente de caspase-3. Em modelos de camundongos para a doença de Alzheimer, a administração de AM protegeu os animais contra o déficit cognitivo, deposição de placa beta-amilóide no hipocampo e córtex adjacente, além de restaurar os níveis de metabólitos relacionados com o metabolismo mitocondrial (Paban et al., 2014). Em suma, há diversas aplicações do uso do AM.

Neste trabalho, o AM fotoativado foi empregado como agente indutor de estresse oxidativo em células HEK293, como descrito em maiores detalhes em Materiais e Métodos.

2. Objetivos

Dentro do contexto apresentado na Introdução, nosso objetivo é entender as interações funcionais que contribuem para a estabilidade genômica e funcional da mitocôndria em células humanas. Para isso, propomos os seguintes objetivos específicos:

2.1. Estabelecer linhagens celulares de HEK293 *knockdown* para as proteínas p53, ATM, mTOR e PGC1 α .

2.2. Estudar o papel de p53 para a toxicidade do azul de metileno usando linhagens celulares de HEK293 p53 *knockdown*.

3. Materiais e métodos

3.1. Cultivo celular

Células humanas HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293*), obtidas através de uma doação do *Laboratory of Molecular Gerontology*, NIA, NIH, EUA, foram rotineiramente cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* - DMEM contendo 25 mM de glicose (LGC Biotecnologia), 10% de soro fetal bovino (GIBCO), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de streptomicina. O meio de cultura contendo todos esses aditivos passa a ser denominado meio completo a partir de agora. As culturas foram mantidas em incubadora a 37 °C e a 5% de CO₂, em uma atmosfera úmida.

A manutenção da cultura era realizada sempre que a mesma atingia 80 a 90% de confluência. Para isso, o meio era removido por sucção, utilizando pipetas *Pasteur* acopladas em bomba a vácuo, e a cultura lavada com *Phosphate Buffered Saline* - PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM pH 7,6) estéril a 37 °C. Em seguida, as células eram dissociadas pela adição de 300 µL de tripsina 0,25 % (m/v) a 37 °C por cerca de 2 minutos ou até se desprenderem do substrato onde estavam sendo cultivadas. Após essa etapa, as células eram ressuspensas em meio completo, diluídas de 5 a 10 vezes e novamente plaqueadas e mantidas em incubadora. A esse procedimento padrão denominamos replicagem.

3.2. Silenciamento gênico

O silenciamento da expressão dos genes escolhidos foi obtido pela transfecção de células HEK293 com vetores plasmidiais expressando *short hairpin* RNAs (shRNAs) específicos para cada gene (*Hush shRNA plasmid 29-mer*, OriGene Technologies, EUA). Este sistema de silenciamento gênico consiste de um conjunto de 1 vetor controle vazio (sem a sequência codificadora do shRNA), 1 vetor controle com a sequência codificadora embaralhada e 4 vetores com diferentes sequências codificadoras de shRNA contra o alvo específico. Dessa forma, foram gerados inicialmente seis linhagens transfectadas para cada proteína cuja expressão desejamos diminuir (ATM, mTOR, PGC1α e p53), resultando num total de 24 linhagens. Os mapas dos vetores plasmidiais utilizados neste trabalho estão representados na Figura 3.1, identificando o sítio de inserção do shRNA específico, quando for o caso, e a sequência codificadora dos shRNAs está apresentada na Tabela 3.1.

Para a geração das linhagens celulares silenciadas, células HEK293 mantidas em cultura com meio completo tiveram o meio removido e, então, foram lavadas com PBS estéril. Em seguida, a cultura foi tratada por 2 minutos com tripsina pré-aquecida a 37 °C em banho-maria até as células se desprenderem. As células foram ressuspensas em meio completo, contadas em câmara de Neubauer, semeadas ($3,0 \times 10^5$ células/poço) em placas de 6 poços, em um volume de 2 mL de meio completo e mantidas em incubadora por 24 horas (ou até atingir 50% de confluência).

Figura 3.1. Mapa dos vetores pGFP-V-RS e pRFP-C-RS. Abreviações: U6 Pr, promotor do pequeno RNA nuclear U6; SV40 Pr, promotor de SV40; Puro^r, gene de resistência a puromicina N-acetil transferase; LTR, repetição terminal longa retroviral; TGFP, proteína fluorescente verde turbo; RFP, proteína fluorescente vermelha; CMV Pr, promotor de citomegalovírus; MCS, sítio múltiplo de clonagem; Kan^r, gene de resistência a kanamicina; Cam^r, gene de resistência ao cloranfenicol. (Traduzido de *Hush shRNA plasmid 29-mer Application Guide*, OriGene Technologies, EUA)

Tabela 3.1. Linhagens obtidas expressando shRNA. Sequência codificadora dos shRNAs utilizados precedida pelo nome das linhagens geradas a partir da transfecção com os respectivos vetores plasmidiais.

Nome da linhagem	Sequência codificadora de shRNA
ATM KD1	GAA GTA GAA GGA ACC AGT TAC CAT GAA TC
ATM KD2	CTG GAG TTT CTG AAG TCA ATG GCA TGA TG
ATM KD3	AGT TTA CCT AAC TGT GAG CTG TCT CCA TT
ATM KD4	TGA TGA GGT GAA GTC CAT TGC TAA TCA GA
mTOR KD1	TAC GAC CTG AGC CGT CAG ATT CCA CAG CT
mTOR KD2	GCA GGT GGA TGC CAC AGT CTT CAC TTG CA
mTOR KD3	GCC GCA TTG TCT CTA TCA AGT TAC TGG CT
mTOR KD4	GTG GCT CTG AAT GAC CAG GTG TTT GAG AT
p53 KD1	CAG CCA AGT CTG TGA CTT GCA CGT ACT CC
p53 KD2	CCG GAC GAT ATT GAA CAA TGG TTC ACT GA
p53 KD3	CTC CTC AGC ATC TTA TCC GAG TGG AAG GA
p53 KD4	CTC AGA CTG ACA TTC TCC ACT TCT TGT TC
PGC1-α KD1	TGC TTC CAC CAA GAG CAA GTA TGA CTC TC
PGC1-α KD2	GAT AGA TGA AGA GAA TGA GGC AAA CTT GC
PGC1-α KD3	CTC TTA CTG GCA CCA GCC AAC ACT CAG CT
PGC1-α KD4	CAG GAG GCA GAA GAG CCG TCT CTA CTT AA

A preparação do vetor plasmidial e o procedimento para a transfecção foram realizados 24 horas após o plaqueamento das células, seguindo as recomendações do fabricante. Os diferentes vetores foram inseridos nas células selvagens através do uso do reagente lipofílico Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Durante o procedimento de transfecção, para cada vetor utilizado foram preparados dois tubos de reação, como descrito na Tabela 3.2.

As soluções dos tubos 1 e 2 foram combinadas, misturadas gentilmente e incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente. O meio de cultura das células plaqueadas foi trocado por meio DMEM sem soro e antibióticos, e a solução resultante da mistura dos dois tubos foi adicionada a cada poço correspondente. Em seguida, as placas com as culturas recém-transfectadas foram transferidas para a incubadora, nas condições padrão. Doze a dezoito horas após a adição dos vetores, o meio de incubação foi suplementado com a adição de soro fetal bovino e antibiótico suficiente para atingir a mesma concentração do meio completo. Quando atingiram a confluência, as células foram repicadas e transferidas para garrafas de cultura contendo meio completo e 0,5 µg/mL do antibiótico de seleção, a puomicina. A partir deste ponto, as culturas transfectadas foram mantidas nessas condições.

Tabela 3.2. Reação de transfecção. Os reagentes foram adicionados aos tubos 1 e 2 nos volumes indicados, segundo instruções do fabricante (OriGene Technologies, EUA).

	DMEM	Vetor (100 ng/µl)	Lipofectamina	Total
Tubo 1	40 µL	10 µL	-	50 µL
Tubo 2	47,5 µL	-	2,5 µL	50 µL

Uma vez que os vetores plasmidiais utilizados codificam as proteínas fluorescentes verde (GFP) e vermelha (RFP), a eficiência das transfecções foi estimada pela visualização das culturas em microscópio de fluorescência *Nikon Eclipse TE300 Inverted Fluorescence Microscope* (Japão). Apenas culturas que apresentavam mais de 50% das células expressando as proteínas fluorescentes foram mantidas.

3.3. Seleção de linhagens knockdown

Os vetores plasmidiais usados para a transfecção contêm uma sequência que codifica para a enzima puomicina-N-acetil transferase (como mostrado na Figura 3.1), a qual confere resistência ao antibiótico puomicina e está sob o controle de um promotor forte, o SV40 *early promoter*. Dessa maneira, ao adicionarmos puomicina ao meio de cultura apenas as células que incorporaram o plasmídeo e expressam seus genes sobreviverão. Este procedimento garante a seleção de células nas quais a integração e expressão dos genes de interesse ocorre de forma eficiente, nesse caso o shRNA alvo-específico. Para selecionarmos células com expressão estável do shRNA por tempo prolongado foi feito uso contínuo do antibiótico, cujas concentrações variaram gradualmente de 0,5 µg/mL (em passagens iniciais) até 2,0 µg/mL após um número maior de repicagens da cultura, mantendo a pressão seletiva.

3.4. Avaliação da porcentagem de silenciamento

Com o objetivo de avaliar a eficiência do silenciamento gênico obtido pelo uso dos vetores expressando os shRNAs específicos, nós quantificamos as proteínas p53, ATM e mTOR pela metodologia de *western blotting*. Uma vez que os anticorpos comerciais disponíveis para a proteína PGC1 α humana não são sensíveis o suficiente para a detecção da proteína endógena (Marcus Cooper, *Boston University*, EUA, comunicação pessoal), o silenciamento da expressão deste gene foi feito verificando os níveis de mRNA de PGC1 α através de PCR quantitativo utilizando DNAc. As metodologias aplicadas estão descritas logo abaixo.

3.4.1. Extração de proteínas

Células em cultura tiveram seus meios de cultura removidos, foram lavadas com PBS e tripsinizadas em seguida. As células foram, então, coletadas e ressuspensas em tampão de extração RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM; SDS 0,05%; desoxicolato de sódio 0,5%; NP40 0,5%) acrescido de inibidor de proteases *Protease inhibitor cocktail tablets* (Roche), na diluição final de 1X. Este material recebeu três pulsos de ultrassom de 100 W (Vibra-Cell VC 505, EUA) com 15 segundos de duração e intervalos intercalados de 15 segundos, em banho de gelo. Após esse procedimento as amostras foram centrifugadas a 15.000 g durante 20 minutos e o sobrenadante contendo as proteínas foi coletado. As proteínas foram quantificadas utilizando reagente de Bradford (Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent, Bio-Rad) segundo recomendações do fabricante. Para essa finalidade foi utilizada microplaca transparente de 96 poços (Greiner Bio-one, Brasil) e a leitura da absorvância a 595 nm foi realizada em espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices). A curva-padrão para a quantificação de proteínas foi construída utilizando gamma globulina bovina (Bio-Rad).

3.4.2. Preparo das amostras e SDS-PAGE

As proteínas foram separadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE). O gel para empacotamento continha acrilamida: bis-acrilamida (37,5:1) 6%, Tris-HCl 300 mM pH 6,8; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,1%; 1 μ L/mL de TEMED. O gel de separação continha acrilamida: bis-acrilamida (37,5:1) 8% (mTOR e ATM) ou 15% (p53); Tris-HCl 380 mM pH 8,8; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,1%; 0,4 μ L/mL de TEMED. Os extratos proteicos foram acrescidos de tampão de amostra (Tris-HCl 40 mM pH 6,8; glicerol 8%; SDS 2%; DTT 100 mM; azul de bromofenol 0,1%), contendo 10% (V/V) do agente redutor β -mercaptoetanol, aquecidos a 95 °C por 10 minutos e aplicados no gel. As amostras foram separadas em tampão de corrida (Novex® *Tris-Glycine SDS Running Buffer*, Invitrogen) pela aplicação de uma voltagem de 110 V por cerca de 2 horas, ou até que a frente de corrida atingisse o final do gel.

3.4.3. Transferência e revelação

Após a separação das proteínas por SDS-PAGE, as mesmas foram transferidas para membrana de PVDF (*polivinidileno difluoreto*, GE Healthcare) em tampão de transferência (Novex® *Tris-Glycine Transfer Buffer*, Invitrogen) a uma voltagem constante de 90 V, durante 90 minutos, em banho de gelo. Ao final da transferência a membrana foi bloqueada, durante 2 horas, por incubação em 10 mL de solução tampão TBS-T (Tris-HCl 10 mM pH 7,6; NaCl 150 mM; Tween 0,05%) contendo 5% (m/V) de leite desnatado, sob condições de leve agitação a 25 °C.

A membrana bloqueada foi incubada com o anticorpo primário por 12 horas em solução de TBS-T contendo 0,1% (m/V) de leite desnatado e sob leve agitação, a 4°C. Nesse trabalho, foram usados os anticorpos primários anti-p53 (clone DO-7, Dako, diluição 1:5000 ou clone B20.1, Santa Cruz, diluição 1:500), anti-ATM (clone 1B10, Santa Cruz, diluição 1:500), anti-mTOR (lote 4, Cell Signaling, diluição 1:500), anti-PCNA (clone F-2, Santa Cruz, diluição 1:500). Após a incubação com o anticorpo primário a membrana foi submetida a 3 lavagens de 15 minutos em TBS-T, sendo em seguida transferida para uma solução contendo o anticorpo secundário diluído 1:5000 em solução de TBS-T contendo 0,1% (m/V) de leite desnatado por 2 horas com agitação leve. Os anticorpos secundários conjugados com *Horse Radish Peroxidase* (HRP) foram: anti-mouse (sc 2047, Santa Cruz), anti-rabbit (sc 2034, Santa Cruz). O excesso de anticorpo secundário foi removido através de 3 lavagens da membrana com TBS-T.

Para a revelação do *western blot* foi usado o reagente *ECL Western Blotting Detection System* (GE Healthcare), o qual se baseia no princípio da quimioluminescência produzida pela reação de oxidação de um composto derivado do luminol pela enzima HRP – conjugada ao anticorpo secundário – na presença de peróxido, em meio alcalino. O sinal produzido foi capturado pela exposição das membranas ao filme radiográfico *Amersham Hyperphilm ECL* (GE Healthcare), e as imagens obtidas foram escaneadas e analisadas com o programa *ImageQuant* (Amersham Biosciences).

3.4.4. Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente TRIzol® LS (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante, com pequenas modificações. As culturas celulares foram crescidas em placas de 100 cm² até atingirem a confluência. Após o meio ter sido removido, foram adicionados 5 mL de TRIzol® LS diretamente sobre a cultura. A mistura foi homogeneizada por 15 minutos à temperatura ambiente e o lisado resultante transferido para tubos de 15 mL. Foi acrescentado 1 mL de salina 0,9% m/V (NaCl em água tratada com dietilpirocarbonato – DEPC) e 1 mL de clorofórmio. O tubo foi agitado com vigor por 15 segundos e as amostras incubadas por 2 a 3 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12.000 g durante 15 minutos em centrífuga refrigerada e, ao final, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos. Para a precipitação do RNA foram adicionados 5 mL de isopropanol e as amostras incubadas *overnight* em freezer a -20 °C. Posteriormente, seguiu-se outro passo idêntico de centrifugação, após o qual o sobrenadante foi descartado. O precipitado resultante foi lavado duas vezes com etanol 75% em água tratada com DEPC e centrifugado por 5 minutos a 8.000 g, sob refrigeração. O precipitado

contendo RNA foi suspenso em água tratada com DEPC, aliquotado e armazenado em freezer a -80 °C.

A integridade do RNA foi verificada submetendo as amostras à eletroforese em gel de agarose 2% (m/V) em tampão TAE (Tris base 40 mM, EDTA 1 mM, ácido acético para pH 8,0). Posteriormente, o gel foi incubado em solução contendo brometo de etídeo (2 µg/mL) e, então, analisado no equipamento *Typhoon Trio* (GE Healthcare), utilizando os filtros de 526 nm e 610 nm para excitação e emissão, respectivamente.

3.4.5. Reações de Transcrição Reversa e amplificação quantitativa do DNAc (qRT-PCR)

As amostras de RNA total foram tratadas com *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega, EUA), segundo as instruções do fabricante, com o objetivo de eliminar qualquer contaminação com DNA genômico antes da síntese do DNA complementar (DNAc) de fita simples. A síntese de DNAc foi realizada com a utilização do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, EUA), também seguindo as especificações do fabricante. As reações foram realizadas em volumes de 20 µl utilizando cerca de 2 µg de RNA total.

A análise da expressão do mRNA do gene *PGC1α* foi realizada pela execução do PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), utilizando 100 ng de amostras de DNAc das culturas controle e transfectadas com shRNA contra o alvo *PGC1α*. Para esse experimento foram montadas reações de 20 µl utilizando *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, EUA) e as amplificações foram realizadas no equipamento *7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystems, EUA), ambas seguindo especificações do fabricante. Durante a reação de quantificação relativa utilizamos como controle endógeno a amplificação de mRNA para β-actina e fosfoglicerato cinase 1 (*PGK1*). A sequência dos primers utilizados para as reações de amplificação está descrita na Tabela 3.3. A análise dos dados seguiu a equação proposta por Pfaffl (Pfaffl, 2001).

3.4.6. Validação dos primers

Anteriormente às reações de qRT-PCR dos transcritos do gene *PGC1α* foi realizada a validação dos primers utilizados para a determinação da eficiência e especificidade de amplificação. Para tal análise, foi utilizada uma amostra de DNAc da linhagem controle para *PGC1α*. A partir de diluições seriadas, foram preparadas reações de PCR na qual foram utilizados 1, 10 e 100 ng de DNAc, em triplicata. Todas as reações foram montadas utilizando os mesmos reagentes e equipamentos descritos acima.

Tabela 3.3. Primers utilizados no qRT-PCR. As sequências dos pares de primers utilizados na quantificação relativa dos transcritos do gene *PGC1α* estão descritas abaixo.

Nome do primer	Sequência de nucleotídeos
PGC1α Forward	AGA CAC CGC ACG CAC CGA AAT
PGC1α Reverse	AGC TGT CAT ACC TGG GCC GAC G
PGK1 Forward	GAA GCG GGT CGT TAT GAG AG
PGK1 Reverse	AAT TTG ATG CTT GGG ACA GC
β-Actina Forward	CTC TTC CAG CCT TCC TTC CT
β-Actina Reverse	AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG

3.5. Seleção clonal

Após as avaliações do grau de silenciamento por shRNA, descritas nos tópicos anteriores, foram selecionadas linhagens clonais para cada produto gênico em estudo. A seleção clonal é necessária para obtenção de uma população geneticamente homogênea, uma vez que o plasmídeo de silenciamento integra no genoma nuclear das células transfectadas de forma aleatória. Isso reduz derivações genéticas na população e, portanto, contribui para diminuir as variações experimentais. O técnica utilizada neste trabalho para a geração dos clones consiste em semear as células em uma densidade de 1 célula/poço em placa de 96 poços e cultivá-las em meio completo seguindo o procedimento padrão. Dessa maneira, espera-se que alguns poços recebam somente uma única célula capaz de se multiplicar e gerar uma colônia.

As linhagens celulares que apresentaram maiores índices de silenciamento gênico foram selecionadas, juntamente com seu par controle, e submetidas ao procedimento de seleção clonal, como descrito acima. As placas de 96 poços contendo as células foram mantidas em incubadora por cerca de 10 dias. Ao final desse período as culturas foram observadas ao microscópio ótico, e os poços que apresentaram colônias individualizadas foram expandidos. Os clones obtidos foram cultivados e, novamente, avaliados quanto ao silenciamento gênico através de *western blotting*, como já descrito anteriormente.

3.6. Curva de crescimento utilizando o sistema xCELLigence

A cinética de crescimento celular para dois clones p53 *knockdown* e seu respectivo controle foi obtida utilizando o equipamento *xCELLigence* (Roche, EUA), seguindo as recomendações indicadas pelo fabricante. Nessa metodologia é possível verificar a quantidade de células em tempo real com medidas de impedância celular, monitoradas pelo equipamento, através da interface com a placa eletrônica. Em uma placa eletrônica (*E-plate*, Roche) de 96 poços foram semeadas 6×10^3 células/poço em meio completo contendo 25 mM de glicose ou 25 mM de galactose. O meio foi também suplementado com piruvato e uridina na concentração final de 0,1 g/l. As culturas foram mantidas até a saturação das curvas de crescimento e medidas da impedância celular, apresentadas como *cell index*, foram realizadas em tempo real. Foi realizado um experimento contendo quatro repetições técnicas seguidos de análise por teste t para as médias obtidas.

3.7. Medida do consumo de oxigênio por células em cultura

As medidas das taxas de consumo de oxigênio e a acidificação do meio de cultura em células aderidas foram realizadas utilizando o equipamento *Seahorse XF24 Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse Bioscience, EUA). O aparato contém dois eletrodos, um sensível a mudanças no pH e outro sensível a mudanças na concentração de oxigênio. A taxa de acidificação do meio extracelular é proporcional à taxa de produção de lactato pela glicólise funcionando, portanto, como uma medida desta via. O eletrodo de oxigênio mede a concentração de oxigênio dissolvido no meio extracelular, que é diretamente proporcional ao consumo de oxigênio pelas células, e permite inferir a taxa de fosforilação oxidativa.

As células foram semeadas em *XF24-well cell culture microplates* (Seahorse) numa densidade de 3×10^4 células/poço e incubadas por 24 horas a 37 °C. Foi utilizado meio de cultura DMEM completo contendo 10 mM de glicose ou galactose, ambos suplementados com piruvato e uridina na concentração final de 0,1 g/l. Antes do ensaio no *Seahorse*, as células foram incubadas por 1 hora sem CO₂ em meio completo sem bicarbonato de sódio. Uma vez dentro do equipamento, todo o processo é automatizado, iniciando-se na ausência de inibidores da respiração mitocondrial para estabelecer a linha de base. Medidas adicionais foram realizadas após a injeção de quatro compostos que afetam a capacidade bioenergética: oligomicina (1 µM) na porta A, CCCP (1 µM) na porta B, e uma mistura de antimicina e rotenona na porta C, ambas na concentração de 1 µM. Os experimentos foram realizados medindo-se simultaneamente as taxas de consumo de O₂ e a acidificação do meio em tempo real através da média de 5 a 7 replicatas técnicas para cada tratamento, em dois ensaios independentes. Os dados são apresentados como porcentagem em relação à linha de base. Foi realizado teste t para comparar a função mitocondrial na linhagem controle Ctrl1 clone na presença de glicose ou galactose.

3.8. Proliferação celular após o tratamento com o corante azul de metileno fotossensibilizado

Para avaliar o efeito citostático e citotóxico do tratamento com azul de metileno (AM) fotossensibilizado utilizamos a medida da proliferação celular em 24 horas após o tratamento. Para isso, $1,5 \times 10^5$ células/poço foram semeadas em placa de 24 poços, em meio completo. No dia seguinte, as soluções de AM, em meio DMEM *High Glucose* sem soro ou antibióticos, foram preparadas nas concentrações de 50, 25, 10, 5, 1 e 0,5 µM a partir de diluições seriadas. Imediatamente antes do tratamento, o meio completo das culturas foi removido e cada poço lavado com tampão PBS estéril. Deste passo adiante, todo o procedimento é realizado no escuro, utilizando apenas luz azul indireta. Neste ponto, foram fixados três poços com solução de ácido tricloroacético (TCA) 10%, para a determinação da população inicial no momento do tratamento. Os outros poços receberam somente DMEM (controle) ou DMEM + AM, em triplicata. As placas foram mantidas em incubadora durante 30 minutos para haver a incorporação do corante. Em seguida, o meio contendo AM foi removido e as culturas lavadas duas vezes com PBS estéril, sendo que na segunda lavagem manteve-se o PBS. As placas foram então irradiadas com LED vermelho ($\lambda \approx 700$ nm) por 30 minutos, a 12 centímetros de distância das células, que corresponde a uma energia de $4,24 \text{ J cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$.

Após a fotossensibilização do AM, o PBS foi substituído por meio completo e as placas mantidas em incubadora por 24 horas. Ao final desse tempo o meio de cultura foi removido, as culturas lavadas com PBS e fixadas com TCA 10%.

A proliferação celular após o tratamento com AM foi verificada através da quantificação do conteúdo de ácidos nucleicos em espectrofotômetro *Spectra Max M3* (Molecular Devices, EUA), pela leitura da absorbância a 260 nm. Para essa finalidade, as células fixadas foram lisadas com solução de hidróxido de sódio 1 M e homogeneizadas para a liberação do conteúdo celular antes das respectivas quantificações. A medida da proliferação celular foi calculada da seguinte forma:

$$\frac{\text{absorbância das culturas tratadas com AM} \text{ menos} \\ \text{absorbância da cultura fixada antes do tratamento}}{\text{absorbância da cultura não tratada com AM fixada 24 h após a irradiação} \text{ menos} \\ \text{absorbância da cultura fixada antes do tratamento}}$$

Foi realizado outro experimento para avaliar o efeito sobre a proliferação celular da indução de estresse oxidativo utilizando AM, entretanto, desta vez foi usada a linhagem HEK293 selvagem, na presença de pifitrina- α . Foram plaqueadas 10^5 células/poço em três placas de 24 poços em meio de cultura completo. Após 12 horas de incubação uma das placas foi tratada com pifitrina- α a uma concentração de 10 μ M, permanecendo por 24 horas nessa condição até momento do tratamento com AM. Passadas 36 horas do plaqueamento, as três placas foram tratadas com azul de metileno nas concentrações de 50, 25, 10, 5, 1 e 0,5 μ M de forma semelhante ao tratamento citado anteriormente. Ao final do tratamento com AM, a placa que havia recebido pifitrina- α foi preenchida com meio completo apenas. Uma segunda placa recebeu agora o mesmo tratamento com pifitrina- α a 10 μ M e a terceira placa foi utilizada como controle, sem pifitrina- α . Após 24 horas do tratamento com azul de metileno, as células foram fixadas com TCA 10%, lisadas com solução de NaOH 1 M, homogeneizadas e o conteúdo de ácidos nucleicos foi quantificado e analisado como descrito anteriormente.

3.9. Quantificação do número relativo de cópias de DNAMt

Para a quantificação do número de cópias de DNAMt, o DNA total das células em cultura foi extraído com o kit *DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen, Alemanha), segundo as recomendações do fabricante. O DNA, ao final da extração, foi suspenso em 100 μ l de tampão AE, fornecido juntamente com o kit utilizado, e quantificado em espectrofotômetro *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific) a 260 nm. As reações de PCR (volume final de 25 μ l) foram montadas utilizando, cada uma, 20 ng de DNA total e a mistura de reação provida pelo *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, EUA), seguindo instruções do fabricante. Os experimentos foram realizados no equipamento *7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystems, EUA). Foram utilizados primers que amplificam um pequeno fragmento no interior do gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 1 (ND1) e do gene nuclear hipoxantina fosforibosiltransferase 1 (HPRT1), cujas sequências estão descritas na Tabela 3.4. A determinação do número de cópias de DNAMt foi obtida

pela quantificação relativa entre os fragmentos amplificados mitocondrial e nuclear. A análise dos dados seguiu a equação proposta por Pfaffl (Pfaffl, 2001). Após a realização de 3 experimentos independentes, foi realizado teste t para comparar as médias obtidas.

Tabela 3.4. Primers utilizados para a quantificação do DNAm. As sequências dos pares de primers utilizados na obtenção de número relativo de cópias de DNAm estão descritas abaixo.

Nome do primer	Sequência de nucleotídeos
ND1 Forward	ACT ACG CAA AGG CCC CAA CG
ND1 Reverse	GAG CTA AGG TCG GGG CGG TG
HPRT1 Forward	TGA CAT GTG CCG CCT GCG AG
HPRT1 Reverse	GTG GTC GCT TTC CGT GCC GA

3.10. Identificação da população sub-G1 por citometria de fluxo

A determinação da indução de apoptose foi feita pela medida da população sub-G1 em células tratadas com AM, através de análises em citômetro de fluxo utilizando o agente intercalante de DNA iodeto de propídeo (Sigma). Para esses experimentos, foram utilizados dois clones p53 *knockdown* e um clone controle. As células foram plaqueadas numa densidade de 3×10^5 células/poço em placa de 6 poços, em meio completo. As placas utilizadas ao longo do experimento foram previamente tratadas com polilisina para melhorar a adesão celular, evitando perda de células durante as trocas de meio e lavagens com PBS. Após 48 horas em cultura, as células foram tratadas com AM e irradiadas, como descrito anteriormente. Neste experimento foram utilizadas três concentrações do corante: 1, 5 e 25 μ M.

Ao final de 24 horas após o tratamento com AM, o meio de cultura foi transferido para tubos de 15 mL e as células foram lavadas duas vezes com tampão PBS, sendo que o PBS também foi recolhido. As células que estavam aderidas foram desprendidas com o uso de tripsina e transferidas para os respectivos tubos contendo o meio de cultura e PBS previamente recolhidos. Os tubos foram centrifugados a 1.000 g por 10 minutos, o precipitado celular resultante foi suspenso em 1 mL de PBS e, então, transferido para microtubos. Esses foram submetidos a uma nova centrifugação (1000 g, 10 minutos) e os precipitados foram suspensos em etanol 70% gelado e armazenados a -20 °C até o dia da análise no citômetro.

No dia da análise de citometria, amostras foram centrifugadas a 3.200 g por 15 min a 4 °C, e o precipitado foi suspenso em 1 mL de PBS. A amostra foi novamente centrifugada a 3.200 g por 15 min a 4 °C, e o precipitado suspenso em 300 μ L de solução contendo PI (RNase A 200 μ g/mL, PI 20 μ g/mL, Triton-X 100 0,1 % em PBS). As amostras foram mantidas por 1 hora a temperatura ambiente e protegidas da luz. O material foi então analisado no citômetro de fluxo *Guava® PCA-96 System* (Millipore, EUA). Os resultados foram analisados com o software *CytoSoft 5.1* (Millipore, EUA). Foram realizados três experimentos independentes, em triplicata. Os resultados obtidos foram analisados pela ANOVA.

4. Resultados

4.1. Geração de linhagens celulares HEK293 knockdown para ATM, mTOR, p53 e PGC1 α

O objetivo inicial deste estudo foi gerar linhagens de células humanas que apresentem uma diminuição constitutiva na expressão de quatro proteínas que podem estar envolvidas na modulação de atividades de reparo de DNA, e nas respostas a lesões no DNA mitocondrial em células humanas. Para isso, propusemos utilizar RNAs inibidores específicos para cada proteína de interesse, constitutivamente expressos na forma de shRNAs codificados em plasmídeos selecionáveis através de resistência a antibióticos. Para cada gene de interesse foram realizadas seis transfecções independentes: dois controles negativos, o plasmídeo vazio e o plasmídeo codificando um shRNA de sequência embaralhada, que não reconhece nenhum alvo no transcriptoma humano; e 4 plasmídeos com sequências distintas específicas para os mRNA das proteínas ATM, mTOR, p53 e PGC1 α . Os plasmídeos foram obtidos da OriGene Technologies, EUA, e foram descritos na seção de Materiais e Métodos.

Os procedimentos de transfecção e seleção das culturas foram realizados como descrito em Materiais e Métodos, e a eficiência das transfecções foi verificada por microscopia de fluorescência de cada cultura, uma vez que os plasmídeos utilizados também expressam as proteínas fluorescentes *green fluorescent protein* (GFP) ou *red fluorescent protein* (RFP), como indicado. Imagens representativas de uma dessas análises estão apresentadas na Figura 4.1. Após seleção com puomicina por 3-5 passagens, os níveis de inibição da expressão dos alvos foram verificados em extratos celulares totais, como descrito a seguir.

Figura 4.1. Eficiência de transfecção em células HEK293. Culturas de células HEK293 transfectadas com plasmídeos de silenciamento gênico e que expressam a proteína GFP foram observadas em microscópio de fluorescência. As imagens das células com aumento de 200 X foram adquiridas em (a) fase clara, (b) sob luz fluorescente para evidenciar a proteína GFP e, então, (c) foram sobrepostas para analisar a eficiência de transfecção.

4.1.1. Expressão de ATM em linhagens HEK293 silenciadas para esse gene

Os níveis da proteína ATM nas linhagens controle e *knockdown* foram quantificados por *western blotting*, e os resultados estão mostrados na Figura 4.2. Comparadas ao controle ATM Ctrl1 (plasmídeo vazio), todas as sequências de shRNA induziram a diminuição na expressão de ATM. No entanto, a eficiência de redução da expressão de ATM variou significativamente entre as 4 sequências específicas utilizadas, de cerca de 20% de silenciamento para a sequência KD2 até mais de 90% em células transfectadas com a sequência KD4. Esta última foi a mais efetiva no silenciamento da expressão de ATM e foi, portanto, escolhida para experimentos posteriores.

Figura 4.2. Eficiência de silenciamento da expressão de ATM por shRNA. Os níveis proteicos de ATM em células HEK293 expressando constitutivamente shRNA contra o mRNA que codifica para essa proteína foram verificados por *western blotting*. A intensidade da banda referente a ATM na linhagem ATM Ctrl1, expressando o plasmídeo vazio, foi considerada 100% de expressão. ATM Ctrl2 expressa a sequência do shRNA embaralhada. ATM KD1 a KD4 são as linhagens celulares *knockdown* (KD) para ATM e expressam, cada uma, uma sequência diferente de shRNA. Neste experimento, 50 µg de extrato proteico foram utilizados. A intensidade das bandas foi quantificada usando o programa ImageJ; os dados apresentados no gráfico representam a quantificação de 1 experimento.

Após a identificação da linhagem com a maior redução na expressão de ATM (KD4), medimos o efeito dessa redução na proliferação celular. Para isso, realizamos curvas de crescimento das linhagens ATM Ctrl1 e ATM KD4. Os resultados estão apresentados na Figura 4.3. As curvas obtidas indicam que a redução nos níveis de ATM causou uma diminuição significativa na taxa de crescimento celular, o que se reflete nos tempos de duplicação da população (*population doubling*

time, PDL) obtidos a partir das curvas: 18,72 horas ($\pm 1,77$) para ATM Ctrl1 e 20,86 horas ($\pm 1,56$) para ATM KD4.

Figura 4.3. Curvas de crescimento das linhagens ATM Ctrl1 e ATM KD4. $1,0 \times 10^4$ células de cada linhagem foram semeadas no tempo 0, e a densidade da população foi acompanhada por 5 dias, monitorando-se o número de células a cada 24 h por contagem direta em câmara de Neubauer. Os resultados são de um experimento em triplicata e cada ponto representa as médias $\pm$ erro. (*) e (**) indicam, respectivamente, valores de $p < 0,05$ e $p < 0,01$.

4.1.2. Expressão de mTOR em linhagens HEK293 silenciadas para esse gene

Os níveis da proteína mTOR nas linhagens controle e *knockdown* são mostrados na Figura 4.4. Similarmente ao que foi observado para as linhagens silenciadas para *ATM*, comparadas ao controle mTOR Ctrl2 (sequência embaralhada do shRNA), os 4 diferentes shRNAs para *mTOR* apresentaram eficiências distintas de silenciamento, variando de cerca de 30% para o shRNA mTOR KD4 até cerca de 70% para o mTOR KD2. Esta linhagem apresentou 73% de silenciamento comparado ao mTOR Ctrl2 e 67% quando comparado ao mTOR Ctrl1. A sequência KD2 foi a mais efetiva no silenciamento da expressão de mTOR e foi, portanto, escolhida para os experimentos subsequentes.

Depois da seleção da linhagem com maior redução da expressão de mTOR, foram realizadas curvas de crescimento para mTOR Ctrl1 e mTOR KD2, a fim de verificar o efeito da diminuição dessa proteína sobre a proliferação celular. Os resultados estão apresentados na Figura 4.5. As curvas obtidas demonstram que não houve nenhuma alteração nas taxas de crescimento em células com expressão de mTOR reduzida, visto que os *PDLs* obtidos foram 17,38 horas ($\pm 1,44$) para mTOR Ctrl1 e 16,38 horas ($\pm 0,91$) para mTOR KD2.

Figura 4.4. Eficiência de silenciamento da expressão de mTOR por shRNA. Os níveis proteicos de mTOR em células HEK293 expressando constitutivamente shRNA contra o mRNA de mTOR foram verificados por *western blotting*. mTOR Ctrl1 e mTOR Ctrl2 indicam as linhagens celulares controle contendo o plasmídeo vazio e a sequência do shRNA embaralhada, respectivamente. A intensidade da banda correspondente a mTOR na linhagem expressando o plasmídeo vazio foi considerada 100% de expressão. mTOR KD1 a KD4 são as linhagens celulares *knockdown* (KD) para mTOR e expressam, cada uma, uma sequência diferente de shRNA. Neste experimento, foram utilizados 50 µg de extrato proteico. A intensidade das bandas foi quantificada usando o programa ImageJ; os dados apresentados no gráfico representam a quantificação de 1 experimento.

Figura 4.5. Curva de crescimento das linhagens mTOR Ctrl1 e mTOR KD2. 1,0 × 10⁴ células de cada linhagem foram semeadas no tempo 0, e a densidade da população foi acompanhada por 5 dias,

monitorando-se o número de células a cada 24 h por contagem direta em câmara de Neubauer. Os resultados apresentados são a média $\pm$ desvio de um experimento em triplicata.

4.1.3. Expressão de *PGC1 α* em linhagens HEK293 silenciadas para esse gene

A detecção da expressão do co-ativador transcricional *PGC1 α* através de *western blot* é pouco confiável, uma vez que os anticorpos disponíveis comercialmente apresentam sensibilidade baixa para os níveis endógenos da proteína em células humanas (Marcus Cooper, *Boston University*, EUA, comunicação pessoal). Desta forma, a expressão de *PGC1 α* nas linhagens *knockdown* foi verificada através da quantificação relativa dos seus mRNAs através de qRT-PCR. Os níveis relativos de mRNA de *PGC1 α* nas linhagens controle e *knockdown* foram normalizados pela expressão de dois mRNAs expressos constitutivamente, *β -actina* e *PGK1*, e estão apresentados na Figura 4.6. Os resultados obtidos mostram que, comparados com o controle *PGC1 α Ctrl1*, expressando shRNA de sequência embaralhada, todos os 4 shRNAs reduziram a expressão de *PGC1 α* em mais do que 50%. A sequência *PGC1 α KD3* induziu o maior nível de redução na expressão de *PGC1 α* , de 77%, independente do mRNA utilizado como normalizador.

Figura 4.6. Eficiência de silenciamento da expressão de *PGC1 α* via shRNA. A expressão relativa de *PGC1 α* em células HEK293 expressando constitutivamente shRNA contra o mRNA de *PGC1 α* foi verificada por qRT-PCR, utilizando como normalizadores os mRNAs das proteínas constitutivas *β -Actina* e *PGK1*. *PGC1 α Ctrl1* representa a linhagem celular transfectada com plasmídeo contendo a sequência de shRNA embaralhada, e foi considerada 100% de expressão de *PGC1 α* . *PGC1 α KD1* a *KD4* são as linhagens celulares *knockdown* (KD) para *PGC1 α* e expressam, cada uma, uma sequência diferente de shRNA. Os resultados são a média de um experimento em triplicata.

4.1.4. Expressão de p53 em linhagens HEK293 silenciadas para esse gene

A última série de shRNAs utilizada foi contra o mRNA da proteína p53. Os níveis da proteína p53 nas linhagens controle e *knockdown* são apresentados na Figura 4.7. Comparadas à linhagem controle p53 Ctrl1 (sequência embaralhada do shRNA), as 4 sequências de shRNA apresentaram eficiências de silenciamento distintas. A linhagem p53 KD1 apresentou, em média, redução de cerca de 80% de expressão de p53 sendo, portanto, a mais eficaz. As sequências KD2, 3 e 4 induziram pouca inibição da expressão de p53, menos de 50%.

Figura 4.7. Eficiência de silenciamento da expressão de p53 via shRNA. Os níveis proteicos de p53 em células HEK293 expressando constitutivamente shRNA contra o mRNA de p53 foram verificados por *western blotting*. A intensidade da banda correspondente a p53 na linhagem p53 Ctrl1, transfectada com a sequência embaralhada, foi considerada 100% de expressão. p53 KD1 a KD4 expressam, cada uma, uma sequência diferente de shRNA contra p53. Neste ensaio, foram usados 10 µg de extrato proteico. A intensidade das bandas de p53 foi quantificada usando o programa *ImageJ*; os dados apresentados no gráfico representam a média $\pm$ erro da quantificação de 2 experimentos.

4.1.5. Seleção clonal de HEK293 silenciada para p53

A criação de linhagens celulares de HEK293 expressando constitutivamente shRNAs contra p53 produziu diferentes níveis de silenciamento entre as quatro sequências utilizadas. A sequência expressa na linhagem p53 KD1 induziu o maior nível de silenciamento dentre as quatro utilizadas, de cerca de 80% de diminuição. Entretanto, é importante ressaltar que o nível de expressão medido no experimento apresentado na Figura 4.7 representa a média da expressão de p53 em uma população heterogênea expressando, individualmente, diferentes níveis do shRNA alvo-específico. Esse efeito é bastante conhecido quando da transfecção de células de mamíferos, uma vez que em cada célula o

plasmídeo pode se integrar em sítios diferentes do genoma e o número de plasmídeos integrados por célula (após a transfecção) também pode variar. Por isso, dentro da população pode existir uma grande variação entre os níveis de expressão do shRNA, uma vez que não é um fenômeno controlado pelo método de transfecção empregado. Dessa maneira, o conteúdo de shRNA presente em uma célula será uma consequência do número de plasmídeos incorporados e do local onde foi integrado no genoma.

Para eliminar o efeito de variabilidade dentro da população, como discutido acima, é recomendado realizar a seleção de clones, derivados de uma única célula. Desta forma, cada clone é geneticamente homogêneo e, portanto, mais adequado à realização de experimentos que pretendem comparar os efeitos da diminuição dos níveis proteicos de p53 em condições verdadeiramente isogênicas. Desta forma, realizamos a seleção de clones, como descrito na seção 3.5 de Materiais e Métodos, a partir das linhagens p53 Ctrl1 e p53 KD1, que apresentou o melhor silenciamento entre as quatro sequências testadas. De cada linhagem foram recuperados entre 10-14 clones, que foram testados para o nível de expressão de p53. Os resultados de *western blotting* para quatro clones *knockdown* e um clone controle estão mostrados na Figura 4.8.

Figura 4.8. Seleção de clones com alto silenciamento de p53. Quantificação da expressão de p53 em clones de HEK293 derivados de seleção clonal das linhagens p53 Ctrl1 e p53 KD1. Ctrl1 clone representa um clone obtido da linhagem transfectada com plasmídeo contendo a sequência codificadora do shRNA embaralhada. KD1 clones 1 a 4 são derivadas de seleção clonal da linhagem p53 KD1. Os níveis de p53 foram normalizados pelo conteúdo de PCNA. Para cada amostra, foram utilizados 10 µg de extrato proteico. Os resultados apresentados representam a média $\pm$ erro de dois experimentos independentes.

Dos quatro clones analisados, os clones 1, 2 e 4 apresentaram cerca de 50% de silenciamento, enquanto que o clone 3 apresentou um silenciamento de cerca de 90% da expressão

de p53. Após a caracterização de clones p53 *knockdown* mostrados acima, foram selecionados os clones 1 e 3 para serem utilizados nos experimentos posteriores.

Neste trabalho foram geradas 22 linhagens celulares transfectadas e selecionadas, das quais 16 foram *knockdown* para as proteínas ATM, mTOR, PGC1 α e p53 (4 linhagens para cada gene) e 6 linhagens controle, uma vez que alguns controles eram comuns a mais de um conjunto de vetores. Para a proteína p53, foram gerados também 33 clones estáveis. A redução da expressão gênica foi verificada através da análise do conteúdo de mRNA, para PGC1 α , e proteína para ATM, mTOR e p53, através das técnicas de qRT-PCR e *western blotting*. Os resultados obtidos mostraram uma grande variação na eficiência de silenciamento de cada gene para os quatro shRNAs utilizados. Esses resultados indicam que a eficiência do sistema de RNA de interferência é dependente da região sobre a qual o shRNA parecia com o seu mRNA alvo. No entanto, em todos os casos obtivemos pelo menos uma linhagem com redução da expressão da proteína de interesse maior do que 70%, que podem ser utilizadas em experimentos funcionais.

4.2. Estudo do papel de p53 em células HEK293 submetidas ao estresse oxidativo mitocondrial induzido pelo corante Azul de Metileno

A proteína p53 controla as respostas celulares a vários tipos de estresse, incluindo o estresse oxidativo. Uma dessas possíveis respostas inclui a translocação de p53 para a mitocôndria (Marchenko et al., 2000), aonde pode controlar a indução de apoptose ou participar do reparo de lesões oxidadas no DNAmt através do estímulo da atividade de DNA polimerase gama (de Souza-Pinto et al., 2004). Entretanto, a maioria dos estudos já publicados na literatura sobre o papel de p53 em resposta ao estresse oxidativo utilizam linhagens celulares não-isogênicas, como linhagens obtidas de pacientes, o que pode dificultar a interpretação dos resultados devido a variações interindividuais comuns. Nesse contexto, as linhagens isogênicas com expressão diminuída de p53 geradas neste trabalho constituem excelentes modelos para estudarmos o papel de p53 em resposta ao estresse oxidativo mitocondrial.

Para esse fim, propomos utilizar o corante fenotiazínico azul de metileno (AM), que quando fotoativado gera oxigênio singlete e radical ânion superóxido através de reações fotoquímicas do tipo I e II (Wainwright e Crossley, 2002). Nós demonstramos recentemente (Romagna, 2012) que a toxicidade de AM está diretamente relacionada ao seu acúmulo nas mitocôndrias, e depende da presença de DNA mitocondrial, uma vez que células rho⁻, com diminuição do conteúdo de DNA mitocondrial, são menos sensíveis aos efeitos citotóxicos de AM.

4.2.1. Cinética de proliferação celular em meio de cultura contendo glicose ou galactose

A diminuição da expressão de p53, uma proteína que possui papel ativo no controle do ciclo celular e da morte celular, pode resultar em alterações na cinética de proliferação. Para verificarmos essa hipótese, foram realizadas curvas de crescimento com o auxílio do equipamento xCELLigence (ACEA Biosciences, USA). Através dessa metodologia é possível acompanhar o crescimento e proliferação celular em tempo real, baseado em medidas de impedância elétrica provocada pelo contato que as células fazem com a superfície da placa de cultivo.

Utilizando um clone controle e dois clones *knockdown*, medimos a velocidade de proliferação celular em meio de cultura contendo glicose ou galactose, como substratos energéticos. Este enfoque experimental foi escolhido para diferenciar os efeitos de p53 sobre a proliferação de células crescendo em condições glicolíticas, ou seja, em meio com alta concentração de glicose, dos efeitos observados em células crescendo apenas com galactose, uma condição na qual o metabolismo energético é primariamente oxidativo (Aguer et al., 2011). A curva de crescimento, nessas condições, apresentada na Figura 4.9, revela que células HEK293 apresentam velocidades de crescimento similares quando cultivadas com glicose ou galactose como substratos energéticos. No entanto, o índice de proliferação das células crescendo em galactose foi cerca de 40% menor do que células utilizando glicose.

Figura 4.9. Proliferação celular da linhagem HEK293 controle em meio contendo glicose ou galactose. (a) As curvas mostram a proliferação celular do clone controle Ctrl1 em meio contendo 25 mM de glicose (em vermelho) ou galactose (em rosa), como substratos energéticos. (b) O gráfico de barras mostra que não há diferença significativa no crescimento celular 184 horas após o plaqueamento.

Quando os clones p53 KD são comparados ao clone controle, mostrado na Figura 4.10, uma diferença significativa entre a velocidade de crescimento, para ambos os substratos energéticos fornecidos, é observada. Tanto em meio de cultura contendo glicose como contendo galactose, os clones com os níveis diminuídos da proteína p53 apresentaram maior proliferação celular. Após 184 horas do início da curva de crescimento, a diferença observada foi de cerca de 4,5 vezes para as culturas mantidas em glicose e de aproximadamente 3 vezes para as culturas mantidas em galactose, o que evidencia o papel de p53 no controle da proliferação celular, mesmo em condições basais de crescimento, sem a indução de estresse. Vale ressaltar que ambos os clones 1 e 3, que apresentam níveis de silenciamento distintos, apresentaram índice de proliferação similar, indicando que pequenas mudanças na expressão de p53 já são suficientes para induzir uma perda no controle intrínseco de proliferação.

Figura 4.10. Proliferação celular de HEK293 p53 KD em meio contendo glicose ou galactose. As curvas mostram a proliferação celular de HEK293 Ctrl1 clone e das linhagens *knockdown* p53 KD1 clone1 e clone3 em meio contendo (a) 25 mM de glicose ou (b) 25 mM de galactose, como substratos energéticos. (c) O gráfico de barras evidencia a grande diferença de crescimento entre os clones controle e p53 KD, para ambos substratos energéticos utilizados, após 184 horas de plaqueamento. Os resultados apresentados representam a média $\pm$ desvio de um experimento, com quadruplicatas experimentais. (***) $p < 0,001$ comparados com os respectivos controles.

4.2.2. Parâmetros bioenergéticos em HEK293 p53-KD

A observação de que as diferenças de crescimento celular das células p53 KD em relação as células controle eram mais pronunciadas quando o substrato energético empregado foi glicose sugeriu que os níveis intracelulares de p53 poderiam modular o metabolismo energético das células. Desta forma, determinamos o consumo de oxigênio e a acidificação extracelular em células intactas, como indicadores do metabolismo mitocondrial e da atividade glicolítica, respectivamente. Esses experimentos foram realizados utilizando o equipamento Seahorse XF24 Extracellular Flux Analyzer, que mede o consumo de oxigênio e a acidificação do meio.

O primeiro passo foi avaliar os parâmetros bioenergéticos consumo de oxigênio e acidificação do meio na linhagem controle HEK293 Ctrl1 clone na presença dos substratos energéticos glicose ou galactose, como apresentado na Figura 4.11. O consumo de oxigênio basal é praticamente idêntico, independente do substrato energético utilizado, sugerindo que a glicólise está fornecendo substratos para a fosforilação oxidativa. Isso é reforçado pela observação de que a respiração é igualmente inibida por oligomicina, que inibe a fosforilação do ADP pela ATP sintase. A diferença significativa entre as duas condições é observada após a adição do desacoplador mitocondrial CCCP, para a medida da taxa de respiração máxima. Nessas condições, as células crescendo em glicose não são capazes de manter a respiração por tempo prolongado, indicando que a velocidade da glicólise está limitando o suprimento de substratos respiratórios para a mitocôndria.

Por outro lado, a curva de acidificação do meio extracelular mostra que, em condições normais, as células estão utilizando o metabolismo oxidativo para a manutenção dos níveis de ATP mesmo na presença de glicose, uma vez que a adição de oligomicina (inibição da fosforilação oxidativa) induz uma elevação significativa da acidificação do meio, indicando uma mudança para o metabolismo anaeróbico.

Em seguida, verificamos o consumo de oxigênio em dois clones p53 KD na presença de diferentes substratos energéticos, como mostrado na Figura 4.12. Surpreendentemente, não houve diferença nas taxas de consumo de oxigênio entre as linhagens celulares controle e aquelas com níveis reduzidos da proteína p53, independente do substrato energético utilizado. Na presença de glicose, o mesmo comportamento observado na Figura 4.11 foi percebido quando da presença do desacoplador CCCP.

Simultaneamente, foram obtidas as taxas de acidificação do meio extracelular para as linhagens controle e p53 KD1 clone 1 e KD1 clone3, apresentado na Figura 4.13.

Figura 4.11. Parâmetros bioenergéticos em HEK293 com diferentes substratos energéticos. (a) O consumo de oxigênio (pmol/minuto) pelo clone HEK293 Ctrl1 foi medido na presença de 10 mM de glicose ou de 10 mM de galactose. (a) A curva mostra o consumo de O_2 em relação à respiração basal, na ausência de inibidores de cadeia respiratória. (b) A acidificação do meio extracelular mostra a dependência do metabolismo glicolítico quando as células são cultivadas em meio contendo glicose na presença de inibidores da cadeia respiratória mitocondrial. As linhas verticais indicam o momento em que foram adicionados os inibidores (A) oligomicina, (B) CCCP e (C) rotenona e antimicina A. (***) indica $p < 0,001$.

Figura 4.12. Respiração mitocondrial em linhagens HEK293 p53 KD com diferentes substratos energéticos. Foi obtido o consumo de oxigênio em um clone controle e em dois clones p53 KD quando cultivados com (a) 10 mM de glicose ou (b) 10 mM de galactose. As medidas foram realizadas em tempo real e em células intactas na presença dos inibidores da cadeia respiratória mitocondrial (A) oligomicina, (B) CCCP e (C) rotenona e antimicina A.

Figura 4.13. Acidificação do meio extracelular em culturas de HEK293 p53 KD com diferentes substratos energéticos. A acidificação do meio é um reflexo da capacidade glicolítica das células e foi obtida para linhagens de HEK392 controle e p53 KD cultivadas em meio de cultura contendo (a) 10 mM de glicose ou (b) 10 mM de galactose. As medidas foram realizadas em tempo real e em células intactas na presença dos inibidores da cadeia respiratória mitocondrial (A) oligomicina, (B) CCCP e (C) rotenona e antimicina A.

4.2.3. Efeito do nível de p53 na susceptibilidade de HEK293 ao estresse oxidativo gerado por azul de metileno fotoativado

A translocação de p53 para a mitocôndria pode desempenhar um papel importante na susceptibilidade celular a diferentes estresses. Desta forma, avaliamos o efeito da diminuição dos níveis proteicos de p53 na sensibilidade de células HEK293 ao estresse oxidativo mitocondrial causado por AM fotoativado. Para estes ensaios, células HEK293 p53-KD foram incubadas com cinco concentrações do corante e, posteriormente, irradiadas com luz vermelha como descrito na seção 3.8 de Materiais e Métodos. Neste ensaio, medimos a proliferação das culturas em um período de 24 h após o tratamento, e os efeitos citostáticos e/ou citotóxicos são observados como uma diminuição da proliferação relativa à proliferação das células não tratadas com o corante. O resultado obtido (Figura 4.14) mostra que células com menor conteúdo de p53 (KD1 clones 1 e 3) são apenas ligeiramente mais resistentes ao estresse oxidativo causado pelo tratamento AM+luz do que as células controle, uma vez que a inibição na proliferação em 24 h em células tratadas com concentrações crescentes de AM foi menor em ambas as linhagens KD do que na linhagem controle.

Figura 4.14. Proliferação de células HEK293 p53-KD tratadas com azul de metileno + luz em 24 horas após a exposição. Células controle (Ctrl1 clone) e células de dois clones p53-KD (KD1 clones 1 e 3) foram tratadas com concentrações crescentes AM e irradiadas (30 min, $\lambda \approx 700$ nm). A taxa de proliferação celular foi determinada 24 h após o tratamento, como descrito em Materiais e Métodos, na seção 3.8. Os resultados apresentados são a média de um experimento em triplicata.

O papel de p53 na sensibilidade de células HEK293 ao estresse oxidativo mitocondrial foi testado utilizando outro enfoque experimental, para confirmar os resultados obtidos utilizando as linhagens *knockdown*. Desta forma, utilizamos pifitrina- α (PFT α), um inibidor de baixa massa molar da atividade transcricional de p53 (Komarov et al., 1999) e que também pode bloquear apoptose de maneira independente de p53 (Sohn et al., 2009). Para testar o efeito da inibição farmacológica de p53 sobre a resposta das células ao tratamento com AM+luz, células HEK293 foram incubadas com

PFT α por 24 horas antes do tratamento, ou, alternativamente, foram mantidas em presença de PFT α pelas 24 horas seguintes ao tratamento com AM.

A inibição farmacológica de p53 pela adição de PFT α não modificou a sensibilidade de células HEK293 ao estresse oxidativo mitocondrial, independente de o inibidor ter sido adicionado antes ou após o tratamento com AM+luz. As células que receberam PFT α apresentaram uma pequena diminuição do efeito citostático após o tratamento, que, no entanto, não foi estatisticamente significativa (Figura 4.15).

Figura 4.15. Efeito de pifitrina- α em na sensibilidade de células HEK293 ao estresse oxidativo gerado por azul de metileno + luz. Células HEK293 foram incubadas com pifitrina- α (PFT) por 24 h antes ou depois do tratamento com as concentrações indicadas de azul de metileno + luz (30 min, $\lambda \approx 700$ nm). A taxa de proliferação celular foi determinada 24 h após o tratamento, como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados apresentados são a média $\pm$ erro de dois experimentos independentes, realizados em triplicata.

4.2.4. Quantificação relativa do número de cópias de DNAmT em dois clones p53 knockdown

Romagna (2012) demonstrou que células Hela p⁻ são mais resistentes aos efeitos citotóxicos do AM do que células com conteúdo normal de DNAmT. Como os clones de células HEK293 com conteúdo reduzido de p53 se mostraram também levemente mais resistentes ao tratamento com AM+luz, medimos o número relativo de cópias de DNAmT nessas células para verificar se essa resposta pode estar associada a alterações no conteúdo de DNAmT causadas pela perda parcial de p53. Para tal finalidade, foi realizado PCR utilizando amostras de DNA total de células controle (Ctrl1) e dos clones p53 KD utilizados nos ensaios de proliferação celular. O número relativo de cópias de DNAmT (Figura 4.15) reflete a amplificação de um gene mitocondrial *ND1* normalizada pela

amplificação de um gene nuclear de cópia única, *HPRT1*, como descrito na seção 3.9 de Materiais e Métodos.

Os resultados apresentados na Figura 4.16 indicam que a diminuição dos níveis proteicos de p53 resulta na redução significativa do número de cópias de DNAm por célula, sugerindo que p53 desempenha um papel importante na estabilidade genética mitocondrial.

Figura 4.16. Número de cópias relativas de DNAm em células HEK293 p53-KD. O conteúdo relativo de DNAm no clone controle, e em dois clones p53 KD1. Para cada linhagem, o conteúdo relativo de DNAm foi obtido através da razão entre a amplificação de um gene mitocondrial *ND1* e um gene nuclear de cópia única *HPRT1*. A razão obtida para o clone controle foi considerada 1 e os clones p53 KD foram normalizados contra este valor. Os resultados apresentados representam a média ± desvio padrão de quatro experimentos independentes, com triplicatas técnicas. (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$ comparados com o controle.

4.2.5. Caracterização do tipo de morte celular induzida por estresse oxidativo mitocondrial

Os resultados obtidos durante a avaliação do efeito de AM+luz sobre a proliferação celular indicaram que, além de causar uma parada de proliferação dependente de dose, o tratamento com AM+luz também induziu morte das células, detectada naquele desenho experimental como "proliferação negativa". Desta forma, caracterizamos o tipo de morte celular induzida nessas condições experimentais medindo a porcentagem da população em estágio sub-G1, considerado um indicador de morte celular apoptótica, através de análise por citometria de fluxo de células marcadas com iodeto de propídio. Para isso, células controle e p53 KD foram tratadas com três concentrações de AM+luz, e 24 horas após o tratamento as células foram coletadas e analisadas.

Os resultados apresentados na Figura 4.17 indicam que, em células controle, AM+luz induzem morte celular 24 horas após o tratamento com 5 e 25 μM do corante. Na linhagem p53 KD1 clone 1 houve indução de morte celular somente com 25 μM de AM, diferente do clone 3 em que não houve morte celular significativa em nenhuma das concentrações de AM utilizadas. As diferenças

nos níveis de p53 entre as linhagens testadas neste experimento, como mostrado na Figura 4.8, indicam que a indução de morte celular apoptótica em resposta ao estresse oxidativo mitocondrial induzido por azul de metileno depende de p53, uma vez que esta é significativamente inibida em células com níveis de p53 reduzido.

Figura 4.17. Indução de morte celular – população sub-G1 – em células HEK293 p53-KD após o tratamento com azul de metileno + luz. Células controle e p53-KD tratadas com 1, 5 e 25 μM de azul de metileno + luz (30 min, $\lambda \approx 700$ nm) foram coletadas 24h após o tratamento, para quantificação de população sub-G1 por citometria de fluxo. Os resultados apresentados são a média $\pm$ erro de três experimentos independentes, realizados em triplicata. (*) e (***) indicam, respectivamente, $p < 0,05$ e $p < 0,001$ comparado com 0, 1 e 5 μM para a mesma linhagem; (#) indica $p < 0,05$ comparado com linhagem controle não tratada com azul de metileno.

5. Discussão

O presente trabalho foi dividido em duas etapas, as quais foram caracterizadas pela geração de linhagens celulares de HEK293 com a expressão reduzida das proteínas p53, ATM, mTOR e PGC1 α e, posteriormente, a avaliação da linhagem celular com conteúdo de p53 diminuído frente ao estresse oxidativo mitocondrial provocado por azul de metileno.

A obtenção das linhagens *knockdown* tem como objetivo gerar modelos celulares isogênicos para compreender e desvendar uma possível participação das proteínas selecionadas em condições nas quais o DNAm^t deve acumular lesões, principalmente lesões oxidadas, como em células tratadas com azul de metileno fotoativado. A geração das linhagens celulares com conteúdo diminuído das proteínas de interesse foi realizada com sucesso através da inserção de um vetor plasmidial o qual expressa pequenos RNA interferentes (shRNA) constitutivamente. Diferentes sequências direcionadas contra um mesmo mRNA podem resultar em diferentes eficiências de silenciamento gênico. Por isso, foram testados quatro diferentes shRNA para cada um dos mRNA alvos escolhidos, como procedimento padrão, a fim de selecionar aquela sequência que induzisse a diminuição mais acentuada da expressão gênica. O sistema de silenciamento empregado neste trabalho, descrito primeiramente por Brummelkamp et al. (2002), é capaz de provocar a redução da expressão gênica de maneira específica, eficiente e constitutiva, uma vez que o vetor de expressão é integrado ao genoma. O silenciamento efetivo dos quatro alvos usados aqui está claramente mostrado nas Figuras 4.2, 4.4, 4.6, 4.7 e 4.8, em que se demonstrou a redução dos conteúdos proteicos ou de mRNA dos alvos.

Dos alvos testados, apenas o silenciamento de ATM e p53 alterou as taxas de proliferação celular, em condições normais de crescimento. A curva de proliferação celular para a linhagem ATM KD4 (Figura 4.3) apresentou diminuição significativa na taxa de crescimento celular a partir de 96 horas de cultivo. Segundo Kim e Wong (2009), astrócitos de camundongos *Atm*^{-/-} apresentam diminuição na velocidade de crescimento quando comparados com o controle selvagem, sendo esse efeito parcialmente revertido na presença do antioxidante N-acetil-L-cisteína. De acordo com os autores, a proteína ATM é requerida para o crescimento normal dos astrócitos devido a sua capacidade de estabilizar o equilíbrio redox celular intracelular. Embora haja evidências da localização mitocondrial de ATM (Ambrose et al., 2007; Valentin-Vega et al., 2012), a presença da proteína na mitocôndria ainda é bastante discutida na literatura. Uma vez que extratos mitocondriais impuros, contendo contaminações citosólicas, podem resultar em falsos positivos para a localização mitocondrial dessa proteína, não se chegou a um consenso até o presente momento. Ainda não foi demonstrado um papel direto (ou indireto) de ATM no reparo de danos no DNAm^t. Portanto, acredita-se que um possível envolvimento de ATM em vias de reparo de DNAm^t ocorra de forma indireta, através da ativação de alvos que possuem um papel conhecido na resposta a danos no DNA e que são capazes de translocar para a mitocôndria após sua ativação, dentre eles, p53 e mTOR (Ambrose e Gatti, 2013).

A proliferação celular da linhagem mTOR KD2 (Figura 4.5) não apresentou alteração em relação ao controle. O resultado obtido contrasta com a literatura, uma vez que a inibição de mTOR

provoca redução no tamanho celular e inibe a proliferação celular e a progressão do ciclo celular (Fingar et al., 2002). Como a inibição de mTOR por rapamicina provoca uma alteração tão significativa no crescimento e ciclo celular, é possível que o *knockdown* desta proteína tenha gerado uma pressão seletiva negativa nas células transfectadas. Por se tratar de um *pool* de células expressando constitutivamente RNAs inibitórios para mTOR, acredita-se que após certo tempo em cultura, as células que tiveram menor expressão do shRNA e, portanto, menor nível de silenciamento de mTOR, obtiveram uma grande vantagem seletiva sobre aquelas células em que mTOR foi fortemente reprimido. Sabe-se que o crescimento celular e a proliferação celular são regulados independentemente embora possuam uma grande inter-relação, visto que o crescimento celular e a replicação do DNA precedem e são necessários para a divisão celular. A proteína mTOR regula a progressão do ciclo celular através do controle da síntese proteica (Fingar et al., 2004) e que, diretamente, possui um impacto na proliferação celular. A inibição de mTOR resulta, entre outros fatores, na geração de células filhas menores após um evento de mitose (Fingar et al., 2002). Como neste trabalho o tamanho das células não foi medido durante a execução da curva de crescimento apresentada na Figura 4.5, não podemos afirmar que esse efeito não foi observado.

Não foi realizada curva de crescimento para as linhagens *knockdown* para PGC1 α visto que as análises de expressão gênica para essas linhagens foram realizadas posteriormente em relação às daquelas de ATM, mTOR e p53. No momento em que foram obtidos os resultados de qRT-PCR (Figura 4.6) para PGC1 α o foco deste trabalho estava voltado para as análises das linhagens silenciadas para p53. Como se pode notar na Figura 4.6, as quatro sequências de shRNA testadas contra os mRNAs de PGC1 α resultaram em silenciamento de mais de 50%, atingindo 70% de silenciamento para a linhagem PGC1 α KD3. No entanto, uma comparação direta entre a eficiência de silenciamento para as quatro proteínas trabalhadas nessa etapa do projeto não poderia ser feita visto que estaríamos comparando classes diferentes de moléculas utilizando, consequentemente, técnicas diferentes – western blotting e qRT-PCR.

Finalizando a primeira etapa do projeto, foi então analisado o nível proteico de p53 em linhagens expressando constitutivamente shRNA específicos contra esse alvo. Como está mostrado na figura 4.7, podemos observar que somente a linhagem p53 KD1 obteve silenciamento satisfatório para os objetivos do presente estudo.

Após a identificação das linhagens celulares transfectadas com o plasmídeo codificador do shRNA capaz de gerar o maior grau de silenciamento gênico, tais linhagens foram submetidas a seleção clonal. A geração de clones derivados de um conjunto de células transfectadas com plasmídeo de silenciamento é um procedimento recomendado quando desejamos trabalhar com uma população de células geneticamente homogênea, como já discutido anteriormente no item 4.1.5 da seção Resultados. Os clones obtidos que demonstraram silenciamento da expressão de p53 maior do que 70% foram armazenados em nitrogênio líquido para serem utilizados em projetos futuros e em possíveis colaborações.

A segunda etapa deste projeto compreendeu o estudo do papel da proteína p53 na resposta celular ao tratamento com o corante azul de metileno fotoativado. Para essa etapa, foram utilizados clones derivados da linhagem celular p53 KD1, selecionados através de *western blotting*, como mostra a Figura 4.8. Dentre diversos clones testados, a maioria desses resultados não foi

apresentado aqui, dois clones foram selecionados, consistindo de um silenciamento moderado e outro mais forte da expressão de p53, são eles os clones KD1 clone 1 e KD1 clone 3.

Um procedimento comumente utilizado para estimular a respiração mitocondrial consiste em cultivar as células em meio de cultura contendo galactose (Aguer et al., 2011). Células HEK293 crescendo em meio contendo galactose a 10 mM não apresentam diferença significativa na velocidade de crescimento em relação àquelas cultivadas em meio contendo glicose (Figura 4.9), embora tenham apresentado uma pequena redução nesses parâmetros. Entretanto, quando utilizamos clones *knockdown* para p53 mostramos que há uma diferença significativa na velocidade de crescimento, tanto para meio contendo glicose quanto galactose, quando comparados com o controle. Esses dados reforçam o impacto de p53 no controle da proliferação celular, mesmo em condições fisiológicas normais, na ausência de fontes exógenas de estresse. Entre os clones p53 KD, houve também uma grande diferença no crescimento celular quando comparamos os dois substratos energéticos, em que células p53 KD crescendo em meio contendo galactose apresentaram um aumento de proliferação em relação ao controle significativamente menor do que as mesmas células crescendo em meio contendo glicose. Estes resultados sugerem que, na presença de níveis reduzidos de p53, é possível modular a proliferação celular dependendo do substrato energético disponível. Essa é uma estratégia bastante recente e interessante, pois pode contribuir para a melhor compreensão e tratamento de doenças, tais como o câncer. Em um estudo recente, foi demonstrado como a disponibilidade de substratos metabólicos pode modular a resposta respiratória frente ao desacoplamento mitocondrial em células transformadas (Zhdanov et al., 2014).

Dessa maneira, decidimos analisar os parâmetros bioenergéticos consumo de oxigênio e acidificação do meio extracelular utilizando Seahorse XF24 (discutido em Materiais e Métodos e em Resultados), uma abordagem atual que permite a análise em tempo real do status metabólico em células intactas em cultura. As análises feitas nesse trabalho falharam em mostrar diferenças na respiração mitocondrial das linhagens p53 KD quando comparadas com o controle (Figura 4.12). Diferentemente dos nossos resultados, Bergeaud e colaboradores (Bergeaud et al., 2013) demonstraram que p53 estimula o consumo de oxigênio através da respiração mitocondrial, além de reduzir os níveis de EROs. Outros experimentos similares serão realizados em breve, para verificar o efeito de concentrações menores dos inibidores da cadeia transportadora de elétrons.

Por outro lado, Elkalaf e colaboradores (2013) demonstraram que baixa concentração de glicose no meio de cultura é capaz de estimular a respiração mitocondrial mais eficientemente do que a galactose. Portanto, ao usar 10 mM de glicose nesses experimentos, o consumo de oxigênio pode estar ligeiramente estimulado nas linhagens celulares utilizadas, fazendo os traçados das curvas de respiração na presença de glicose e galactose se aproximar. Embora não tenha sido observada uma diferença em OCR entre células controle e p53 KD nem entre os substratos energéticos glicose e galactose (Figuras 4.11 e 4.12), foi notado uma diferença significativa na dinâmica da acidificação do meio extracelular quando utilizados diferentes substratos energéticos (Figura 4.13). Quando a respiração mitocondrial é estimulada pelo uso de galactose como substrato energético, as células não foram capazes de fazer a transição para o metabolismo glicolítico quando a respiração mitocondrial foi inibida na presença de oligomicina (Figura 4.11 e 4.13). Esse resultado demonstra a dependência da fosforilação oxidativa como principal suprimento de energia para as células quando da presença de galactose. Após a adição de desacoplador da respiração mitocondrial (CCCP) as taxas

de acidificação do meio extracelular se igualaram para ambos os substratos utilizados. No entanto, a acidificação produzida durante a respiração máxima pode ser devida ao aumento na produção de CO₂ pelas reações do ciclo de Krebs ou pela via das pentoses fosfato, ao invés do lactato proveniente da atividade de lactato desidrogenase como proposto por Helmlinger (Helmlinger et al., 2002). Um reforço para essa ideia é o fato de que após a completa inibição da cadeia respiratória ocorre uma pronunciada queda na acidificação, demonstrando a reduzida ou ausente atividade glicolítica e do ciclo de Krebs.

Uma vez que p53 é translocado para a mitocôndria como parte das respostas a diferentes tipos de estresses, incluindo o estresse oxidativo, e tendo em vista as alterações na proliferação celular e no metabolismo energético, decidimos estudar o papel desta proteína na resposta ao estresse oxidativo induzido por azul de metileno. A observação de que os clones 1 e 3, com níveis reduzidos de p53, apresentaram maior resistência ao tratamento com azul de metileno + luz (Figura 4.14) sugerem fortemente que p53 possui um papel no controle da resposta ao estresse oxidativo mitocondrial. O inibidor da atividade transcricional de p53, pifitrina- α (Komarov et al., 1999), também induziu um efeito protetor similar sobre células HEK293 submetidas ao AM fotoativado (Figura 4.15). Vale resaltar que, entretanto, em ambos os experimentos as diferenças entre as linhagens não foram estatisticamente significativas. Dessa forma, um próximo passo seria estender o tempo de coleta dos dados para 48 h após o tratamento com o AM para detectar eventos tardios de inibição de proliferação e morte celular.

Segundo dados obtidos em nosso grupo de pesquisa por Romagna (2012), células Hela depletadas de DNAm_t apresentam menor sensibilidade ao tratamento com o corante azul de metileno. Do mesmo modo, os clones p53 KD, que foram menos sensíveis ao tratamento com AM fotoativado, também apresentaram uma redução de cerca de 50 % no número de cópias de DNAm_t (Figura 4.16). A diminuição do número de cópias de DNAm_t nas células com níveis reduzidos de p53 apenas confirmam a importância dessa proteína na manutenção do DNAm_t, como já discutido no tópico 1.8.1 da Introdução. O resultado apresentado aqui, somado com os dados da literatura (Lebedeva et al., 2009; Park et al., 2009), nos permitem afirmar que o número de cópias de DNAm_t possui uma relação direta com os níveis endógenos de p53. Adicionalmente, esses dados reforçam o envolvimento de p53 e de DNAm_t na resposta ao estresse oxidativo induzido por AM fotoativado.

Na tentativa de caracterizar o tipo de morte celular provocada pelo AM fotoativado, foi demonstrado o acúmulo de população sub-G1 em HEK293, 24 h após o tratamento, de maneira dependente de dose (Figura 4.17). Por outro lado, somente a linhagem p53 KD clone 1 apresentou um pequeno acúmulo de população sub-G1, enquanto o clone 3, que possui maior nível de silenciamento de p53, não apresentou aumento significativo de população sub-G1 após o tratamento. Como o acúmulo de células em sub-G1 é considerado um bom indicador de morte celular apoptótica (Kroemer et al., 2009), podemos afirmar que p53 é essencial para indução de apoptose após o tratamento de células HEK293 com azul de metileno fotoativado. Adicionalmente, o efeito protetor de pifitrina- α , embora pequeno, durante o tratamento de HEK293 com AM (Figura 4.15) também pode ser explicado pelo seu papel em inibir a progressão dos eventos apoptóticos (Sohn et al., 2009). Romagna (2012) demonstrou que o AM gera oxigênio singlete proporcionalmente à concentração do corante e a dose de fotoativação, gerando estresse oxidativo. Como se sabe, o estresse oxidativo induz a permeabilização da membrana externa mitocondrial, seguido pela

liberação no citoplasma de fatores indutores de apoptose (como o citocromo c), ativação de caspase 9 e 3, com conseguinte fragmentação e condensação do DNA nuclear (Kroemer et al., 2007).

A caracterização do possível modo de ação do azul de metileno em células em cultura é também um esforço na tentativa de desenvolver um protocolo válido para o estudo de danos mitocondriais, uma vez que o interesse do nosso grupo de pesquisa é estudar a ativação e a regulação das vias de reparo de danos no DNAm. A indução de dano específico no DNAm, mantendo o DNA intacto, ainda é um grande desafio para o estudo das vias de reparo mitocondriais. Uma das poucas metodologias empregadas é o uso de enzimas de restrição endereçadas para a mitocôndria (Bacman et al., 2013; Srivastava e Moraes, 2001), entretanto, essa metodologia tem limitações no que diz respeito quanto às vias de reparo que podem ser estudadas com esse procedimento, uma vez que as lesões induzidas se limitam a quebras de fitas duplas.

6. Conclusão

6.1. Linhagens com a expressão das proteínas ATM, mTOR, PGC1 α e p53 constitutivamente diminuídas foram geradas com sucesso, e podem ser utilizadas para investigar o papel dessas proteínas na resposta celular a danos no DNAm.

6.2. O crescimento celular foi significativamente aumentado após a depleção da proteína p53.

6.3. Os clones p53 KD são ligeiramente menos sensíveis ao tratamento com azul de metileno fotoativado quando comparados com o controle contendo a sequência embaralhada do shRNA. Esse mesmo efeito foi observado em células HEK293 selvagens tratadas com pifitrina- α , um potente inibidor específico de atividade transcricional de p53.

6.4. O silenciamento de p53 induziu uma diminuição significativa do número relativo de cópias do DNA mitocondrial.

6.5. Nosso modelo experimental falhou em mostrar alguma alteração na capacidade respiratória após a diminuição da expressão de p53.

6.6. A avaliação da morte celular após tratamento com azul de metileno indicou uma indução significativa nos níveis de morte celular apoptótica (acúmulo de população sub-G1). Entretanto, o mesmo efeito não foi observado nos clones p53 KD, sugerindo uma dependência de p53 na indução da morte celular após o tratamento com o azul de metileno.

6.7. Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que o azul de metileno induz morte celular, provavelmente via apoptose, como indicado pelo aumento de população sub-G1 no clone controle. Pifitrina- α também inibe apoptose, e mostrou um efeito protetor em células HEK293 tratadas com AM, reforçando a ideia de que a apoptose é o principal modo pelo qual o AM induz morte celular.

6.8. Finalmente, a morte celular induzida por AM pode ser mediada diretamente por p53 ou através do seu papel na manutenção do número de cópias do DNAm e também da sua integridade.

7. Referências Bibliográficas

- Achanta, G., R. Sasaki, L. Feng, J.S. Carew, W. Lu, H. Pelicano, M.J. Keating, e P. Huang. 2005. Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gamma. *EMBO J.* 24:3482-3492.
- Aguer, C., D. Gambarotta, R.J. Mailloux, C. Moffat, R. Dent, R. McPherson, e M.E. Harper. 2011. Galactose enhances oxidative metabolism and reveals mitochondrial dysfunction in human primary muscle cells. *PLoS One.* 6:e28536.
- Alexander, A., S.L. Cai, J. Kim, A. Nanez, M. Sahin, K.H. MacLean, K. Inoki, K.L. Guan, J. Shen, M.D. Person, D. Kusewitt, G.B. Mills, M.B. Kastan, e C.L. Walker. 2010. ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:4153-4158.
- Alexeyev, M., I. Shokolenko, G. Wilson, e S. LeDoux. 2013. The maintenance of mitochondrial DNA integrity--critical analysis and update. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5:a012641.
- Ambrose, M., e R.A. Gatti. 2013. Pathogenesis of ataxia-telangiectasia: the next generation of ATM functions. *Blood.* 121:4036-4045.
- Ambrose, M., J.V. Goldstine, e R.A. Gatti. 2007. Intrinsic mitochondrial dysfunction in ATM-deficient lymphoblastoid cells. *Hum Mol Genet.* 16:2154-2164.
- Ames, B.N., M.K. Shigenaga, e T.M. Hagen. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:7915-7922.
- Anderson, S., A.T. Bankier, B.G. Barrell, M.H. de Bruijn, A.R. Coulson, J. Drouin, I.C. Eperon, D.P. Nierlich, B.A. Roe, F. Sanger, P.H. Schreier, A.J. Smith, R. Staden, e I.G. Young. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 290:457-465.
- Andrews, R.M., I. Kubacka, P.F. Chinnery, R.N. Lightowlers, D.M. Turnbull, e N. Howell. 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet.* 23:147.
- Anson, R.M., E. Hudson, e V.A. Bohr. 2000. Mitochondrial endogenous oxidative damage has been overestimated. *FASEB J.* 14:355-360.
- Augusto, O. 2006. Radicais livres: bons, maus e naturais. Oficina de Textos. 120 pp.
- Bacman, S.R., S.L. Williams, M. Pinto, S. Peralta, e C.T. Moraes. 2013. Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs. *Nat Med.* 19:1111-1113.
- Bakhanashvili, M., S. Grinberg, E. Bonda, A.J. Simon, S. Moshitch-Moshkovitz, e G. Rahav. 2008. p53 in mitochondria enhances the accuracy of DNA synthesis. *Cell Death Differ.* 15:1865-1874.
- Banin, S., L. Moyal, S. Shieh, Y. Taya, C.W. Anderson, L. Chessa, N.I. Smorodinsky, C. Prives, Y. Reiss, Y. Shiloh, e Y. Ziv. 1998. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science.* 281:1674-1677.

- Bergeaud, M., L. Mathieu, A. Guillaume, U.M. Moll, B. Mignotte, N. Le Floch, J.L. Vayssiere, e V. Rincheval. 2013. Mitochondrial p53 mediates a transcription-independent regulation of cell respiration and interacts with the mitochondrial F(1)F(0)-ATP synthase. *Cell Cycle*. 12:2781-2793.
- Bonawitz, N.D., D.A. Clayton, e G.S. Shadel. 2006. Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. *Mol Cell*. 24:813-825.
- Brummelkamp, T.R., R. Bernards, e R. Agami. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*. 296:550-553.
- Calzavara-Pinton, P., M.T. Rossi, R. Sala, e M. Venturini. 2012. Photodynamic antifungal chemotherapy. *Photochem Photobiol*. 88:512-522.
- Canman, C.E., D.S. Lim, K.A. Cimprich, Y. Taya, K. Tamai, K. Sakaguchi, E. Appella, M.B. Kastan, e J.D. Siliciano. 1998. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*. 281:1677-1679.
- Canugovi, C., S. Maynard, A.C. Bayne, P. Sykora, J. Tian, N.C. de Souza-Pinto, D.L. Croteau, e V.A. Bohr. 2010. The mitochondrial transcription factor A functions in mitochondrial base excision repair. *DNA Repair (Amst)*. 9:1080-1089.
- Chen, D., Z. Yu, Z. Zhu, e C.D. Lopez. 2006. The p53 pathway promotes efficient mitochondrial DNA base excision repair in colorectal cancer cells. *Cancer Res*. 66:3485-3494.
- Chen, Y., W. Zheng, Y. Li, J. Zhong, J. Ji, e P. Shen. 2008. Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics. *Cancer Sci*. 99:2019-2027.
- Cooke, M.S., M.D. Evans, M. Dizdaroglu, e J. Lunec. 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*. 17:1195-1214.
- Cunningham, J.T., J.T. Rodgers, D.H. Arlow, F. Vazquez, V.K. Mootha, e P. Puigserver. 2007. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature*. 450:736-740.
- Dai, Y., K. Zheng, J. Clark, R.H. Swerdlow, S.M. Pulst, J.P. Sutton, L.A. Shinobu, e D.K. Simon. 2013. Rapamycin drives selection against a pathogenic heteroplasmic mitochondrial DNA mutation. *Hum Mol Genet*.
- de Boer, J., e J.H.J. Hoeijmakers. 2000. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*. 21:453-460.
- De, S., J. Kumari, R. Mudgal, P. Modi, S. Gupta, K. Futami, H. Goto, N.M. Lindor, Y. Furuichi, D. Mohanty, e S. Sengupta. 2012. RECQL4 is essential for the transport of p53 to mitochondria in normal human cells in the absence of exogenous stress. *Journal of Cell Science*. 125:2509-2522.
- de Souza-Pinto, N.C., C.C. Harris, e V.A. Bohr. 2004. p53 functions in the incorporation step in DNA base excision repair in mouse liver mitochondria. *Oncogene*. 23:6559-6568.

- DeLeo, A.B., G. Jay, E. Appella, G.C. Dubois, L.W. Law, e L.J. Old. 1979. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76:2420-2424.
- Eaton, J.S., Z.P. Lin, A.C. Sartorelli, N.D. Bonawitz, e G.S. Shadel. 2007. Ataxia-telangiectasia mutated kinase regulates ribonucleotide reductase and mitochondrial homeostasis. *J Clin Invest*. 117:2723-2734.
- Elkalaf, M., M. Andel, e J. Trnka. 2013. Low glucose but not galactose enhances oxidative mitochondrial metabolism in C2C12 myoblasts and myotubes. *PLoS One*. 8:e70772.
- Essick, E.E., e F. Sam. 2010. Oxidative stress and autophagy in cardiac disease, neurological disorders, aging and cancer. *Oxid Med Cell Longev*. 3:168-177.
- Feng, Z., e A.J. Levine. 2010. The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein. *Trends Cell Biol*. 20:427-434.
- Fingar, D.C., C.J. Richardson, A.R. Tee, L. Cheatham, C. Tsou, e J. Blenis. 2004. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Mol Cell Biol*. 24:200-216.
- Fingar, D.C., S. Salama, C. Tsou, E. Harlow, e J. Blenis. 2002. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev*. 16:1472-1487.
- Gabrielli, D., E. Belisle, D. Severino, A.J. Kowaltowski, e M.S. Baptista. 2004. Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. *Photochem Photobiol*. 79:227-232.
- Garritano, S., A. Inga, F. Gemignani, e S. Landi. 2013. More targets, more pathways and more clues for mutant p53. *Oncogenesis*. 2:e54.
- Gredilla, R., V.A. Bohr, e T. Stevnsner. 2010. Mitochondrial DNA repair and association with aging--an update. *Exp Gerontol*. 45:478-488.
- Greenblatt, M.S., W.P. Bennett, M. Hollstein, e C.C. Harris. 1994. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis. *Cancer Research*. 54:4855-4878.
- Halliwell, B., e J.M.C. Gutteridge. 2007. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford ; New York. xxxvi, 851 p., 858 p. of plates pp.
- Haq, R., J. Shoag, P. Andreu-Perez, S. Yokoyama, H. Edelman, G.C. Rowe, D.T. Frederick, A.D. Hurley, A. Nellore, A.L. Kung, J.A. Wargo, J.S. Song, D.E. Fisher, Z. Arany, e H.R. Widlund. 2013. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1alpha and MITF. *Cancer Cell*. 23:302-315.
- Harper, J.W., e S.J. Elledge. 2007. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell*. 28:739-745.
- Harris, S.L., e A.J. Levine. 2005. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*. 24:2899-2908.

- Helmlinger, G., A. Sckell, M. Dellian, N.S. Forbes, e R.K. Jain. 2002. Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. *Clin Cancer Res.* 8:1284-1291.
- Herrero, A., e G. Barja. 1999. 8-oxo-deoxyguanosine levels in heart and brain mitochondrial and nuclear DNA of two mammals and three birds in relation to their different rates of aging. *Aging (Milano).* 11:294-300.
- Holley, A.K., S.K. Dhar, e D.K. St Clair. 2010. Manganese superoxide dismutase versus p53: the mitochondrial center. *Ann N Y Acad Sci.* 1201:72-78.
- Holley, A.K., e D.K. St Clair. 2009. Watching the watcher: regulation of p53 by mitochondria. *Future Oncol.* 5:117-130.
- Ikehata, H., R. Okuyama, E. Ogawa, S. Nakamura, A. Usami, T. Mori, K. Tanaka, S. Aiba, e T. Ono. 2010. Influences of p53 deficiency on the apoptotic response, DNA damage removal and mutagenesis in UVB-exposed mouse skin. *Mutagenesis.* 25:397-405.
- Ito, K., A. Hirao, F. Arai, S. Matsuoka, K. Takubo, I. Hamaguchi, K. Nomiyama, K. Hosokawa, K. Sakurada, N. Nakagata, Y. Ikeda, T.W. Mak, e T. Suda. 2004. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature.* 431:997-1002.
- Johnson, S.C., M.E. Yanos, E.B. Kayser, A. Quintana, M. Sangesland, A. Castanza, L. Uhde, J. Hui, V.Z. Wall, A. Gagnidze, K. Oh, B.M. Wasko, F.J. Ramos, R.D. Palmiter, P.S. Rabinovitch, P.G. Morgan, M.M. Sedensky, e M. Kaeberlein. 2013. mTOR Inhibition Alleviates Mitochondrial Disease in a Mouse Model of Leigh Syndrome. *Science.*
- Kazak, L., A. Reyes, e I.J. Holt. 2012. Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13:659-671.
- Kim, J., e P.K. Wong. 2009. Oxidative stress is linked to ERK1/2-p16 signaling-mediated growth defect in ATM-deficient astrocytes. *J Biol Chem.* 284:14396-14404.
- Komarov, P.G., E.A. Komarova, R.V. Kondratov, K. Christov-Tselkov, J.S. Coon, M.V. Chernov, e A.V. Gudkov. 1999. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science.* 285:1733-1737.
- Kowaltowski, A.J., N.C. de Souza-Pinto, R.F. Castilho, e A.E. Vercesi. 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine.* 47:333-343.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, e C. Brenner. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 87:99-163.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, M.V. Blagosklonny, W.S. El-Deiry, P. Golstein, D.R. Green, M. Hengartner, R.A. Knight, S. Kumar, S.A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M.E. Peter, J. Tschoop, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, e G. Melino. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16:3-11.
- Kruse, J.-P., e W. Gu. 2009. Modes of p53 Regulation. *Cell.* 137:609-622.
- Lane, D.P. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 358:15-16.

- Lane, D.P., e L.V. Crawford. 1979. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. 278:261-263.
- Lavin, M.F., e Y. Shiloh. 1997. The genetic defect in ataxia-telangiectasia. *Annu Rev Immunol*. 15:177-202.
- Lebedeva, M.A., J.S. Eaton, e G.S. Shadel. 2009. Loss of p53 causes mitochondrial DNA depletion and altered mitochondrial reactive oxygen species homeostasis. *Biochim Biophys Acta*. 1787:328-334.
- Lim, E.J., C.H. Oak, J. Heo, e Y.H. Kim. 2013. Methylene blue-mediated photodynamic therapy enhances apoptosis in lung cancer cells. *Oncol Rep*. 30:856-862.
- Lim, K.S., K. Jeyaseelan, M. Whiteman, A. Jenner, e B. Halliwell. 2005. Oxidative damage in mitochondrial DNA is not extensive. *Ann N Y Acad Sci*. 1042:210-220.
- Linzer, D.I.H., e A.J. Levine. 1979. Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*. 17:43-52.
- Marchenko, N.D., A. Zaika, e U.M. Moll. 2000. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem*. 275:16202-16212.
- Mecocci, P., U. MacGarvey, A.E. Kaufman, D. Koontz, J.M. Shoffner, D.C. Wallace, e M.F. Beal. 1993. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann Neurol*. 34:609-616.
- Mellish, K.J., R.D. Cox, D.I. Vernon, J. Griffiths, e S.B. Brown. 2002. In vitro photodynamic activity of a series of methylene blue analogues. *Photochem Photobiol*. 75:392-397.
- Morita, M., S.P. Gravel, V. Chenard, K. Sikstrom, L. Zheng, T. Alain, V. Gandin, D. Avizonis, M. Arguello, C. Zakaria, S. McLaughlan, Y. Nouet, A. Pause, M. Pollak, E. Gottlieb, O. Larsson, J. St-Pierre, I. Topisirovic, e N. Sonenberg. 2013. mTORC1 Controls Mitochondrial Activity and Biogenesis through 4E-BP-Dependent Translational Regulation. *Cell Metab*. 18:698-711.
- Nicholls, D.G., e S.J. Ferguson. 2002. Bioenergetics 3. Academic Press, San Diego, Calif. xviii, 297 p. pp.
- Offer, H., M. Milyavsky, N. Erez, D. Matas, I. Zurer, C.C. Harris, e V. Rotter. 2001a. Structural and functional involvement of p53 in BER in vitro and in vivo. *Oncogene*. 20:581-589.
- Offer, H., R. Wolkowicz, D. Matas, S. Blumenstein, Z. Livneh, e V. Rotter. 1999. Direct involvement of p53 in the base excision repair pathway of the DNA repair machinery. *FEBS Lett*. 450:197-204.
- Offer, H., I. Zurer, G. Banfalvi, M. Reha'k, A. Falcovitz, M. Milyavsky, N. Goldfinger, e V. Rotter. 2001b. p53 modulates base excision repair activity in a cell cycle-specific manner after genotoxic stress. *Cancer Res*. 61:88-96.
- Oleinick, N.L., R.L. Morris, e I. Belichenko. 2002. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci*. 1:1-21.

- Olmos, Y., I. Valle, S. Borniquel, A. Tierrez, E. Soria, S. Lamas, e M. Monsalve. 2009. Mutual dependence of Foxo3a e PGC-1alpha in the induction of oxidative stress genes. *J Biol Chem.* 284:14476-14484.
- Paban, V., C. Manrique, M. Filali, S. Maunoir-Regimbal, F. Fauvelle, e B. Alescio-Lautier. 2014. Therapeutic and preventive effects of methylene blue on Alzheimer's disease pathology in a transgenic mouse model. *Neuropharmacology.* 76 Pt A:68-79.
- Park, J.Y., P.Y. Wang, T. Matsumoto, H.J. Sung, W. Ma, J.W. Choi, S.A. Anderson, S.C. Leary, R.S. Balaban, J.G. Kang, e P.M. Hwang. 2009. p53 improves aerobic exercise capacity and augments skeletal muscle mitochondrial DNA content. *Circ Res.* 105:705-712, 711 p following 712.
- Patel, A.Y., T.M. McDonald, L.D. Spears, J.K. Ching, e J.S. Fisher. 2011. Ataxia telangiectasia mutated influences cytochrome c oxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 405:599-603.
- Paz-Cristobal, M.P., D. Royo, A. Rezusta, E. Andres-Ciriano, M.C. Alejandre, J.F. Meis, M.J. Revillo, C. Aspiroz, S. Nonell, e Y. Gilaberte. 2013. Photodynamic fungicidal efficacy of hypericin and dimethyl methylene blue against azole-resistant *Candida albicans* strains. *Mycoses.*
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45.
- Radi, R., J.F. Turrens, L.Y. Chang, K.M. Bush, J.D. Crapo, e B.A. Freeman. 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem.* 266:22028-22034.
- Ramanathan, A., e S.L. Schreiber. 2009. Direct control of mitochondrial function by mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:22229-22232.
- Romagna, C.D. 2012. Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular induzida por geradores de oxigênio singlete. In Departamento de Bioquímica. Vol. Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica). Universidade de São Paulo. 100.
- Salvi, M., V. Battaglia, A.M. Brunati, N. La Rocca, E. Tibaldi, P. Pietrangeli, L. Marcocci, B. Mondovi, C.A. Rossi, e A. Toninello. 2007. Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense. *J Biol Chem.* 282:24407-24415.
- Scheffler, I.E. 2008. Mitochondria. Wiley-Liss, Hoboken, N.J. xviii, 462 p., 412 p. of plates pp.
- Schieke, S.M., D. Phillips, J.P. McCoy, Jr., A.M. Aponte, R.F. Shen, R.S. Balaban, e T. Finkel. 2006. The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J Biol Chem.* 281:27643-27652.
- Seo, Y.R., M.L. Fishel, S. Amundson, M.R. Kelley, e M.L. Smith. 2002. Implication of p53 in base excision DNA repair: in vivo evidence. *Oncogene.* 21:731-737.
- Shokolenko, I.N., G.L. Wilson, e M.F. Alexeyev. 2013. Persistent damage induces mitochondrial DNA degradation. *DNA Repair (Amst).* 12:488-499.

- Sohn, D., V. Graupner, D. Neise, F. Essmann, K. Schulze-Osthoff, e R.U. Janicke. 2009. Pifithrin-alpha protects against DNA damage-induced apoptosis downstream of mitochondria independent of p53. *Cell Death Differ.* 16:869-878.
- Souza, R.C., J.C. Junqueira, R.D. Rossoni, C.A. Pereira, E. Munin, e A.O. Jorge. 2010. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers Med Sci.* 25:385-389.
- Srivastava, S., e C.T. Moraes. 2001. Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. *Hum Mol Genet.* 10:3093-3099.
- St-Pierre, J., S. Drori, M. Uldry, J.M. Silvaggi, J. Rhee, S. Jager, C. Handschin, K. Zheng, J. Lin, W. Yang, D.K. Simon, R. Bachoo, e B.M. Spiegelman. 2006. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell.* 127:397-408.
- Sykora, P., D.M. Wilson, 3rd, e V.A. Bohr. 2012. Repair of persistent strand breaks in the mitochondrial genome. *Mech Ageing Dev.* 133:169-175.
- Uldry, M., W. Yang, J. St-Pierre, J. Lin, P. Seale, e B.M. Spiegelman. 2006. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab.* 3:333-341.
- Valentin-Vega, Y.A., K.H. Maclean, J. Tait-Mulder, S. Milasta, M. Steeves, F.C. Dorsey, J.L. Cleveland, D.R. Green, e M.B. Kastan. 2012. Mitochondrial dysfunction in ataxia-telangiectasia. *Blood.* 119:1490-1500.
- Vaseva, A.V., N.D. Marchenko, K. Ji, S.E. Tsirka, S. Holzmam, e U.M. Moll. 2012. p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell.* 149:1536-1548.
- Vazquez, F., J.H. Lim, H. Chim, K. Bhalla, G. Girnun, K. Pierce, C.B. Clish, S.R. Granter, H.R. Widlund, B.M. Spiegelman, e P. Puigserver. 2013. PGC1alpha expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. *Cancer Cell.* 23:287-301.
- Wainwright, M., e M.S. Baptista. 2011. The application of photosensitisers to tropical pathogens in the blood supply. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 8:240-248.
- Wainwright, M., e K.B. Crossley. 2002. Methylene Blue--a therapeutic dye for all seasons? *J Chemother.* 14:431-443.
- Walker, I., S.A. Gorman, R.D. Cox, D.I. Vernon, J. Griffiths, e S.B. Brown. 2004. A comparative analysis of phenothiazinium salts for the photosensitisation of murine fibrosarcoma (RIF-1) cells in vitro. *Photochem Photobiol Sci.* 3:653-659.
- Wang, Q.E., Q. Zhu, M.A. Wani, G. Wani, J. Chen, e A.A. Wani. 2003. Tumor suppressor p53 dependent recruitment of nucleotide excision repair factors XPC and TFIIH to DNA damage. *DNA Repair (Amst).* 2:483-499.
- Wong, T.S., S. Rajagopalan, F.M. Townsley, S.M. Freund, M. Petrovich, D. Loakes, e A.R. Fersht. 2009. Physical e functional interactions between human mitochondrial single-stranded DNA-binding protein and tumour suppressor p53. *Nucleic Acids Res.* 37:568-581.

- Wu, Z., P. Puigserver, U. Andersson, C. Zhang, G. Adelmant, V. Mootha, A. Troy, S. Cinti, B. Lowell, R.C. Scarpulla, e B.M. Spiegelman. 1999. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*. 98:115-124.
- Yakes, F.M., e B. Van Houten. 1997. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:514-519.
- Zhao, Y., L. Chaiswing, J.M. Velez, I. Batinic-Haberle, N.H. Colburn, T.D. Oberley, e D.K. St Clair. 2005. p53 translocation to mitochondria precedes its nuclear translocation and targets mitochondrial oxidative defense protein-manganese superoxide dismutase. *Cancer Res*. 65:3745-3750.
- Zhdanov, A.V., A.H. Waters, A.V. Golubeva, R.I. Dmitriev, e D.B. Papkovsky. 2014. Availability of the key metabolic substrates dictates the respiratory response of cancer cells to the mitochondrial uncoupling. *Biochim Biophys Acta*. 1837:51-62.
- Zhou, J., J. Ahn, S.H. Wilson, e C. Prives. 2001. A role for p53 in base excision repair. *EMBO J*. 20:914-923.