

GISELE ESPINHA TEIXEIRA DA SILVA

SINALIZAÇÃO DA GTPASE RHOA NAS
RESPOSTAS CELULARES APÓS ESTRESSE
GENOTÓXICO PROMOVIDO POR RADIAÇÃO
ULTRAVIOLETA

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT,
para obtenção de Título de Mestre em
Biotecnologia.

São Paulo
2015

GISELE ESPINHA TEIXEIRA DA SILVA

Sinalização da GTPase RhoA nas respostas
celulares após estresse genotóxico promovido por
radiação ultravioleta

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT,
para obtenção de Título de Mestre em
Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Fábio Luís Forti

Versão corrigida. A versão original
eletrônica encontra-se disponível tanto na
Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca
Digital de Teses e Dissertações da USP
(BDTD)

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Silva, Gisele Espinha Teixeira da.

Sinalização da GTPase RhoA nas respostas celulares após estresse genotóxico promovido por radiação ultravioleta / Gisele Espinha Teixeira da Silva. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Luís Forti.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Sinalização em sistemas biomoleculares.

Versão do título para o inglês: RhoA GTPase signaling in cellular responses after genotoxic stress caused by ultraviolet radiation.

1. Rho GTPases 2. RhoA 3. Radiação ultravioleta 4. Dano no DNA
5. Reparo no DNA 6. Sinalização celular I. Forti, Prof. Dr. Fábio Luís
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0197/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Gisele Espinha Teixeira da Silva.

Título da Dissertação: Sinalização da GTPase RhoA nas respostas celulares após estresse genotóxico promovido por radiação ultravioleta.

Orientador(a): Prof. Dr. Fábio Luís Forti.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Aos meus pais,
José Carlos e Maria de Lourdes.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Fábio Luis Forti, pelo projeto e pela orientação.

Ao prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck por nos ceder as linhagens deficientes em NER e todo seu grupo, principalmente à aluna de doutorado Clarissa Rocha e à especialista Veridiana Munford, pela ajuda nos ensaios de HCR e imunofluorescência anti-CPD.

À profa. Dra. Marisa H. G. de Medeiros e seus alunos, por nos auxiliarem e cederem a utilização do microscópio para a realização do ensaio cometa.

Ao prof. Dr. Hugo Aguirre Armelin (CAT-Cepid-Instituto Butantan) por nos ceder as linhagens HeLa e MeWo.

Ao prof. Dr. Gary Bokoch (The Scripps Research Institute, La Jolla-CA-USA), por ceder gentilmente os plasmídeos RBD-GST e PDB-GST.

À profa. Dra. Bianca Silvana Zingales, ao técnico Marcelo Nunes e à Pós Doutoranda Dra. Solange Lessa Nunes, por nos cederem a utilização do sonicador e diversos reagentes.

Aos técnicos da central analítica do Instituto de Química, Adriana Yamaguti Matsukuma e Wilton Rocha Lima pela ajuda com o microscópio confocal e com o citômetro, além das conversas que tivemos.

Aos meus pais José Carlos e Maria de Lourdes por sempre terem me incentivado a perseguir meus sonhos e me apoiado em cada decisão ao longo da minha trajetória, meu amor por vocês é incondicional.

Ao meu irmão Rodrigo e à minha cunhada Cláudia, por todo o carinho e por serem exemplos em minha vida, além de terem me dado os sobrinhos mais lindos: Biel e Leleca, obrigada por fazerem a vida da “TiGi” mais feliz e por me inspirarem.

À minha irmã Anelisa, por ser meu porto seguro e por sonhar comigo meu sonho de ser cientista e ao meu cunhado Danilo por cuidar tão bem da minha flor e por ter se tornado um amigo.

Ao meu padrinho Waldir e à minha madrinha Cleonice, Tide você é o amor da minha vida, tenho muito orgulho da mulher guerreira que você é! Aos meus primos Vinicius e Junior, que além de serem irmãos do coração me deram sobrinhos do coração: a Gabi e o Gu, além de suas esposas Bete e Andréia, que é uma amiga incrível. Obrigada por sempre acreditarem em mim!

Aos melhores amigos que eu poderia ter feito no mestrado: Juliana, Karine, Aleksandro, Liv e aos agregados Jonas e Bruno... Vocês terão minha amizade e meu carinho por toda a vida.

À todos os integrantes do LSSB, que fizeram parte da minha trajetória: Thompson, Renan, Yuli, Lilian, Felipe, Gabriela, pelo apoio teórico e por todos os cafés compartilhados.

Aos queridos amigos Mariana Duarte, Raphael Queiroz e Florêncio Freitas, por todo o carinho e momentos de alegria que foram muito além do mundo acadêmico.

À profa. Dra. Daniela Sanchez Basséres e seus alunos: Edmilson, Amanda, Talita, Sandro e Mateus), pelos empréstimos de materiais e equipamentos além da convivência diária. Um agradecimento especial às amigas queridas Tatiana Lobo e Luiza Sacalabrini, que se tornaram muito especiais

Às amigas Tatiana (Jay), Désirée (Tata), Dani e Van que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e me dando apoio emocional, vocês são irmãs para mim.

À Ariane (Dragão) por todos esses anos de parceria e denço e ao Alexandre por ter se tornado um amigo tão essencial. Bem como a toda sua família: tia Marcia, João e Edinho que sempre me acolheram tão bem.

Ao Flávio e à tia Pri que sempre torce por mim, obrigada por não querer mais me afogar, sem o Bartô essa reta final não teria sido tão feliz.

Ao Tete e à tia Carol, que chegou de mansinho e conquistou um carinho enorme, você é muito especial.

Às técnicas Berê, Juliana e Vivi que deram suporte ao desenvolvimento dessa dissertação.

À todos os alunos e professores do IQ que contribuíram com materiais e equipamentos durante o desenvolvimento do meu projeto.

À todos os amigos e familiares, que me apoiaram ao longo do mestrado.

Às agências CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

“Que os vossos esforços desafiem
as impossibilidades, lembrai-vos
de que as grandes coisas do
homem foram conquistadas do
que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

Silva GET. Sinalização da GTPase RhoA nas respostas celulares após estresse genotóxico promovido por radiação ultravioleta. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

A GTPase RhoA é uma enzima que atua bioquimicamente como um interruptor molecular, ciclando entre um estado ativo (ligado a GTP) e outro inativo (ligado a GDP), sendo que no estado ativo é capaz de se ligar a diversas proteínas efetoras desencadeando os sinais e respostas celulares. O reparo de danos no DNA tem importância fundamental na manutenção da estabilidade genômica, visto que a falta ou erros nesse processo causam mutações que, quando acumuladas, levam à morte celular ou causam diversas doenças, como câncer. A via de sinalização da GTPase RhoA atua em diversos processos celulares, como organização do citoesqueleto, migração, progressão no ciclo celular e tumorigênese. Na última década alguns poucos trabalhos vêm demonstrando essa proteína em vias de sinalização de dano e reparo de DNA, após diversos agentes estressores, mas muito ainda precisa ser investigado. No intuito de avaliar o comportamento de RhoA, após estresse causado por radiação ultravioleta dos tipos A, B e C, foram gerados clones mutantes que expressam RhoA em seu estado constitutivamente ativo (RhoA-V14) e dominante negativo (RhoA-N19) nas linhagens de adenocarcinoma de cérvix (HeLa) e melanoma (MeWo), além de ter sido utilizada nas linhagens parentais a transfecção de plasmídeo codificando para a exoenzima C3, um inibidor de Rho GTPases. Após exposição das linhagens à radiação ultravioleta, a fragmentação do material genético foi acompanhada por ensaios de cometa alcalino e observou-se uma maior sensibilidade e um maior tempo de recuperação das duas linhagens quando a atividade de RhoA é reduzida. Os mesmos foram corroborados com ensaios de *host cell reactivation*, imunofluorescência para dímeros de pirimidina (CPD) e immunoblottings das fosfoproteínas de resposta a danos Chk1 e H2AX, que mostraram um atraso em sua ativação nos mutantes HeLa/MeWo RhoA-N19. Estes prejuízos no reparo prejudicaram a progressão no ciclo celular e nos ensaios de proliferação e sobrevivência celular quando da deficiência na atividade de RhoA, como confirmado pela deficiência de ativação das MAP quinase JNK1/2 e ERK1/2, proteínas envolvidas em sinalização para morte e proliferação celular após diversos agentes estressores (incluindo UV). Ensaios de apoptose, autofagia e senescência, demonstraram que as linhagens investigadas com atividade reduzida RhoA possuem maior porcentagem de senescência celular, o que se correlaciona com sua redução de capacidade proliferativa. Quando avaliamos o envolvimento da via de RhoA em linhagens deficientes nas proteínas XPA, XPC e XPV da via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER), que é a principal via ativada após tratamento com radiação ultravioleta, percebemos que estas linhagens de fibroblastos, que normalmente já possuem maior fragmentação em ensaios cometa, possuem uma capacidade ainda mais reduzida de reparo quando a atividade de RhoA é inibida pela exoenzima C3. Isto leva a uma redução na capacidade proliferativa dessas linhagens observada através de curvas de crescimento celular. Desta maneira, esse trabalho demonstrou que a atividade da GTPase RhoA, e sua via de sinalização, é requerida e importante nas respostas celulares após radiação ultravioleta em linhagens de adenocarcinoma de cérvix, melanoma metastático e fibroblastos humanos.

Palavras-chave: Rho GTPases. RhoA. Radiação ultravioleta. Dano no DNA. Reparo no DNA. Estabilidade genômica. Sinalização celular.

ABSTRACT

Silva GET. RhoA GTPase signaling in cellular responses after genotoxic stress caused by ultraviolet radiation. [Master's Thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

RhoA is an enzyme that acts biochemically as a molecular switch that switches between an active state (bound to GTP) to another inactive (on GDP), while in the active state is able to bind to different effector proteins to trigger signals and cellular responses. The DNA damage repair has fundamental importance in the maintenance of genomic stability, since the lack or errors in this process can cause mutations that, when accumulated, lead to cell death or cause various diseases such as cancer. The RhoA GTPase signaling pathway acts on many cellular processes such as cytoskeletal organization, migration, cell cycle progression and tumorigenesis. In the last decade a few studies have demonstrated that this protein may influence DNA damage and repair signaling pathways after different stressors, but much remains to be investigated. In order to further evaluate this possible RhoA function after stress caused by ultraviolet radiation of types A, B and C, mutant clones expressing RhoA in its constitutively active (RhoA-V14) or dominant negative (RhoA-N19) forms were generated in the cervix adenocarcinoma (HeLa) and melanoma (MeWo) cell lines, and also in the parental cells transfected with a plasmid encoding for the exoenzyme C3, an inhibitor of Rho GTPases. After exposure of the cells to ultraviolet radiation, the DNA fragmentation was accompanied by alkaline comet assays, both cell lines showed a higher sensitivity and a delayed recovery capacity when the RhoA activity is reduced. These results were corroborated with host cell reactivation assays, immunofluorescence for pyrimidine dimers (CPD) and immunoblottings for the DNA damage response phosphoproteins Chk1 and H2AX, which showed a delayed activation in HeLa / MeWo RhoA-N19 mutants. The impaired repair reduced the cell's progression on the cell cycle, as well as in cell proliferation and survival assays under RhoA deficiency, which was confirmed by impaired activation of MAP kinase JNK1/2 and ERK1/2 proteins, involved in signaling for cell death and proliferation after several stressors (including UV). Apoptosis, autophagy and senescence assays demonstrated that the investigated cell lines with reduced RhoA activity have higher percentage of cellular senescence, which correlates with a reduced proliferative capacity. When we evaluated the involvement of RhoA pathway in cell lines deficient for the XPA, XPC and XPV proteins belonging to the nucleotide excision repair (NER) pathway, which is the major route activated after treatment with ultraviolet radiation, we notice that these fibroblast cell lines, usually already with high basal DNA fragmentation in comet assays, have a further reduced ability to repair damaged DNA under RhoA inhibition by the C3 exoenzyme. This leads to a reduction in the proliferative capacity of these cell lines in growth curves. Thus, this study demonstrated that the RhoA GTPase activity, and its downstream signaling pathway, is required and important in cellular responses after ultraviolet radiation treatments of cervix adenocarcinoma, metastatic melanoma and fibroblasts human cell lines.

Keywords: Rho GTPase. RhoA. Ultraviolet radiation. DNA damage. DNA repair. Genomic stability. Cell signaling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore filogenética da família das Rho GTPases.....	18
Figura 2. Domínio G conservado da superfamília Ras.....	19
Figura 3. Esquema representativo da regulação das Rho GTPases.....	20
Figura 4. Via de sinalização das Rho GTPases durante a migração celular.....	21
Figura 5. Rho GTPases e a progressão do ciclo celular.....	23
Figura 6. Principais lesões causadas no DNA pela radiação ultravioleta.....	25
Figura 7. Principal via de sinalização para reconhecimento de dano no DNA após radiação ultravioleta.....	26
Figura 8. Via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER).....	29
Figura 9. A sublinhagem HeLa-RhoA-N19 apresenta redução na capacidade migratória.....	50
Figura 10. A sublinhagem MeWo-RhoA-N19 apresenta redução na capacidade migratória.....	52
Figura 11. Formação de fibras de estresse nas linhagens HeLa e MeWo em comparação aos seus respectivos mutantes RhoA-N19 e RhoA-V14.....	53
Figura 12. Inibição da atividade da GTPase RhoA endógena pela toxina C3 nas linhagens HeLa e MeWo.....	54
Figura 13. A sublinhagem HeLa-RhoA-N19 apresenta maior sensibilidade e um atraso no reparo do DNA após tratamentos com UVA, UVB e UVC.....	56
Figura 14. A sublinhagem HeLa-RhoA-N19 apresenta maior fragmentação nuclear após 6h de tratamento com UVA, UVB e UVC.....	57
Figura 15. A diminuição da atividade da proteína RhoA sensibiliza a sublinhagem MeWo-RhoA-N19 após tratamentos com UVA, UVB e UVC.....	59
Figura 16. A sublinhagem MeWo-RhoA-N19 apresenta maior fragmentação nuclear após 3h de tratamento com UVA, UVB e UVC.....	60
Figura 17. A maior sensibilidade ao dano e o atraso do reparo após inibição da proteína RhoA endógena persiste na linhagem parental HeLa.....	61
Figura 18. A maior sensibilidade ao dano e o atraso do reparo após inibição da proteína RhoA endógena persiste na linhagem parental MeWo.....	63
Figura 19. A capacidade de reparar DNA exógeno é menor na sublinhagem HeLa-RhoA-N19 após exposição à radiação ultravioleta.....	65
Figura 20. O reparo de dímeros de pirimidina é deficiente na sublinhagem HeLa-RhoA-N19 após exposição à UVA, UVB ou UVC.....	67
Figura 21. O reparo de dímeros de pirimidina é deficiente na sublinhagem MeWo-RhoA-N19 após exposição à UVA, UVB ou UVC.....	68
Figura 22. Fosforilação da MAPK JNK 1/2 após UVC nas linhagens HeLa, MeWo e nos mutantes de RhoA.....	69
Figura 23. Fosforilação da MAPK ERK 1/2 após UVC nas linhagens HeLa, MeWo e nos mutantes de RhoA.....	70
Figura 24. A fosforilação de Chk1 é atrasada nos mutantes HeLa-RhoA-N19 e MeWo-RhoA-N19.....	71
Figura 25. A sinalização de dano no DNA por γ H2AX é diminuída nos mutantes dominante negativo (RhoA-N19).....	72

Figura 26. Curva de crescimento da linhagem HeLa e dos mutantes RhoA-V14 e RhoA-N19.....	74
Figura 27. Curva de crescimento da linhagem parental MeWo e dos mutantes MeWo-RhoA-V14 e MeWo-RhoA-N19.....	75
Figura 28. Fração de sobrevivência das linhagens HeLa, HeLa-RhoA-N19 e HeLa-RhoA-V14	77
Figura 29. Fração de sobrevivência das linhagens MeWo, MeWo-RhoA-N19 e MeWo-RhoA-V14	78
Figura 30. Ensaio clonogênico das linhagens HeLa e MeWo transfectadas com o plasmídeo contendo a sequência da exoenzima C3.....	81
Figura 31. Distribuição das linhagens HeLa, HeLa-RhoA-N19 e HeLa-RhoA-V14 no ciclo celular após exposição à radiação ultravioleta	83
Figura 32. Distribuição das linhagens MeWo, MeWo-RhoA-N19 e MeWo-RhoA-V14 no ciclo celular após exposição à radiação ultravioleta	84
Figura 33. Avaliação da senescência celular nas linhagens HeLa, HeLa-RhoA-N19 e HeLa-RhoA-V14 por SA- β -gal.....	86
Figura 34. Ensaio de autofagia das linhagens HeLa, HeLa-RhoA-N19, HeLa-RhoA-V14.....	88
Figura 35. Análise de apoptose e necrose na linhagem HeLa e mutantes de RhoA....	90
Figura 36. Inibição da atividade da GTPase RhoA endógena pela toxina C3 nas linhagens MRC5, XPA, XPC e XPV.....	91
Figura 37. Curvas de crescimento das linhagens MRC5, XPA, XPC e XPV transfectadas com o plasmídeo contendo a sequência da exoenzima C3	93
Figura 38. Ensaio de cometa alcalino das linhagens MRC5, XPA, XPC e XPV após inibição da proteína RhoA endógena e exposição à UVC	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-4 PP: 6-4 pirimidina-pirimidona

8oxoG: 8-oxoguanosina ATM: Ataxia telangiectasia mutada

ATR: Ataxia telangiectasia relacionada a Rad3

BER: *base excision repair*

Cdc42: *cell division control protein 42 homolog*

CDK: *cyclin-dependent kinase*

CDT: *cytolethal distending toxin*

Chk1: *checkpoint kinase 1*

Chk2: *checkpoint kinase 2*

CKI: *cyclin kinase inhibitor*

CPD: dímero de pirimidina

DDR: resposta a danos no DNA

DMEM: *Dulbecco's modified eagle's medium*

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucléico

DSB: *double strand break*

EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético ERK: *extracellular signal regulated kinase*

GAP: GTP activating protein

GDI: guanine nucleotide dissociation inhibitor

GDP: guanosina difosfato

GEF: guanosine nucleotide exchange factor

GGR: *global genome repair*

GST-RBD: Glutathione S-Transferase fusionada a RhoA Binding Domain da proteína Rhotekin

GTP: guanosina trifosfato HCR: *host cell reactivation*

JNK: *c-Jun NH₂ terminal kinase*

MAPK: *mitogen-activated protein kinase*

mDIA: Mammalian homolog of Drosophila Diaphanous

MMR: *mismatch repair*

NER: *nucleotide excision repair* PI: iodeto de propídeo

Rac1: *Ras-related C3 toxin substrate 1*

RhoA: *Ras homolog gene Family, member A*

RNA: ácido ribonucléico

ROCK: Rho kinase

PBS: solução salina tamponada com fosfato

ROS: espécies reativas de oxigênio SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio

SFB: soro fetal bovino

SV40: *simian vírus 40*

TBS-T: solução salina tamponada com tris acrescida de Tween

TCR: *transcription coupled repair*

UV: luz ultravioleta

UVA: luz ultravioleta no comprimento de onda de 315 a 400 nm

UVB: luz ultravioleta no comprimento de onda de 280 a 315 nm

UVC: luz ultravioleta no comprimento de onda de 200 a 280 nm

XP: Xeroderma Pigmentosum

XPA: paciente XP, deficiente na proteína XPA

XPC: paciente XP, deficiente na proteína XPC

XPV: paciente XP, deficiente na proteína XPV

SUMÁRIO

1 <u>INTRODUÇÃO</u>	17
1.1 Família das Rho GTPases.....	17
1.2 RhoA e tumorigênese	20
1.3 Ciclo celular e checkpoints	22
1.4 Danos ao DNA	24
1.5 Mecanismos de Reparo do DNA	28
1.6 Vias de morte celular	30
1.7 RhoA e dano/reparo de DNA.....	31
2 <u>OBJETIVOS</u>	33
2.1 Objetivo geral	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3 <u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	34
3.1 Linhagens celulares	34
3.2 Obtenção das sublinhagens mutantes de RhoA	35
3.3 Irradiação das linhagens celulares	36
3.4 Obtenção de lisados celulares totais e quantificação	37
3.5 Preparo de beads RBD-GST para ensaio de atividade de RhoA.....	37
3.6 Ensaio de pull-down.....	38
3.7 Eletroforese desnaturante de proteínas (SDS-PAGE).....	39
3.8 Western Blot	39
3.9 Ensaio de migração celular por risco (“scratch wound healing assay”).....	40
3.10 Detecção de fibras de estresse por imunofluorescência	40
3.11 Ensaios clonogênicos de sobrevivência.....	41
3.12 Curvas de crescimento celular	41
3.13 Distribuição das células nas fases do ciclo celular	42
3.14 Ensaio de senescência associado à β -galactosidase.....	42
3.15 Autofagia celular	43
3.16 Citometria de fluxo – Apoptose e necrose celular	43
3.17 Ensaio de cometa alcalino.....	44
3.18 Ensaio de reativação da célula hospedeira (HCR)	45
3.19 Imunofluorescência para análise de dímeros de pirimidina.....	45
3.20 Inibição da GTPase RhoA pela toxina C3.....	46
3.21 Análises estatísticas	47
4 <u>RESULTADOS</u>	48
4.1 Caracterização da modulação da atividade da GTPase RhoA nas linhagens celulares HeLa e MeWo.....	48
4.1.1 <i>Caracterização das sublinhagens de células HeLa e MeWo mutantes para a GTPase RhoA</i>	48
4.1.2 <i>Inibição da atividade endógena da GTPase RhoA pela exoenzima C3 nas linhagens HeLa e MeWo</i>	54

4.2 Efeitos da modulação da atividade GTPásica de RhoA na formação de danos e no posterior reparo de DNA após exposição das linhagens HeLa e MeWo à radiação ultravioleta	55
4.2.1 <i>A diminuição da atividade RhoA leva à uma maior sensibilidade ao dano e a um atraso ou ineficiência do reparo do DNA após radiação ultravioleta.....</i>	55
4.2.2 <i>Efeitos da modulação da atividade de RhoA na sinalização celular em vias de proliferação, estresse e resposta a dano de DNA após radiação ultravioleta... ..</i>	68
4.3 Envolvimento da proteína RhoA GTPase em respostas biológicas de sobrevivência e proliferação celular após exposição à radiação ultravioleta dos tipos A, B e C.....	73
4.4 Avaliação de morte celular da linhagem HeLa e das sublinhagens HeLa-RhoA-V14 e HeLa-RhoA-N19 após estresse por radiação ultravioleta.....	85
4.4.1 <i>Senescência celular associada à β-Galactosidase</i>	85
4.4.2 <i>Autofagia celular associada ao marcador LC3B I/II</i>	87
4.4.3 <i>Apoptose e Necrose por PI e Anexina V em citometria de fluxo</i>	89
4.5 Efeitos da inibição da atividade de RhoA na sinalização de reparo de DNA em células deficientes da via de NER após radiação ultravioleta	91
5 <u>DISCUSSÃO</u>.....	96
6 <u>CONCLUSÕES</u>.....	103
<u>REFERÊNCIAS</u>.....	105
<u>ANEXO</u> - Súmula Curricular	115

1 INTRODUÇÃO

1.1 Família das Rho GTPases

As Rho GTPases constituem uma de cinco famílias inseridas na superfamília de proteínas relacionadas a Ras: Arf, Ras, Rab, Ran e Rho. O gene *Rho* foi identificado em 1985 em uma espécie do gênero *Aplysia* e logo depois foram encontrados 18 genes que as codificavam no genoma humano (Madaule, Axel, 1985; Rojas et al., 2012). A família Rho atualmente é composta por 22 proteínas que são altamente conservadas entre os eucariotos. Na figura 1, podemos perceber que de acordo com a sequência primária de aminoácidos, motivos estruturais e funções biológicas a família Rho pode ser subdividida em 6 subfamílias, que exibem propriedades semelhantes: subfamília relacionada a RhoA (RhoA, RhoB e RhoC); subfamília relacionada a Rac1 (Rac1b, Rac2, Rac3 e RhoG); subfamília relacionada a Cdc42 (Cdc42, TC10, TCL, Chp/Wrch-2 e Wrch-1); subfamília Rnd (Rnd1, Rnd2 e RhoE/Rnd3); subfamília RhoBTB (RhoBTB-1, RhoBTB-2 e RhoBTB-3) e subfamília Miro (Miro-1 e Miro-2). As proteínas RhoD, Rif e RhoH não se encaixam em nenhuma das subfamílias (Wennerberg, Der, 2004).

Em 1992 as GTPases RhoA e Rac foram demonstradas com papel na indução de fibras de estresse e lamelipódios quando em seu estado constitutivamente ativo (ligado a GTP) em fibroblastos, e pouco tempo depois a Rho GTPase Cdc42 foi demonstrada com função na formação de extensões de membrana (filopódios). Desde então, vem crescendo o interesse em desvendar as funções das GTPases da família Rho, embora RhoA, Rac1 e Cdc42 continuem sendo as GTPases melhor caracterizadas e estudadas da família (Aspenstrom et al., 2004; Etienne-Manneville, Hall, 2002; Jaffe, Hall, 2005).

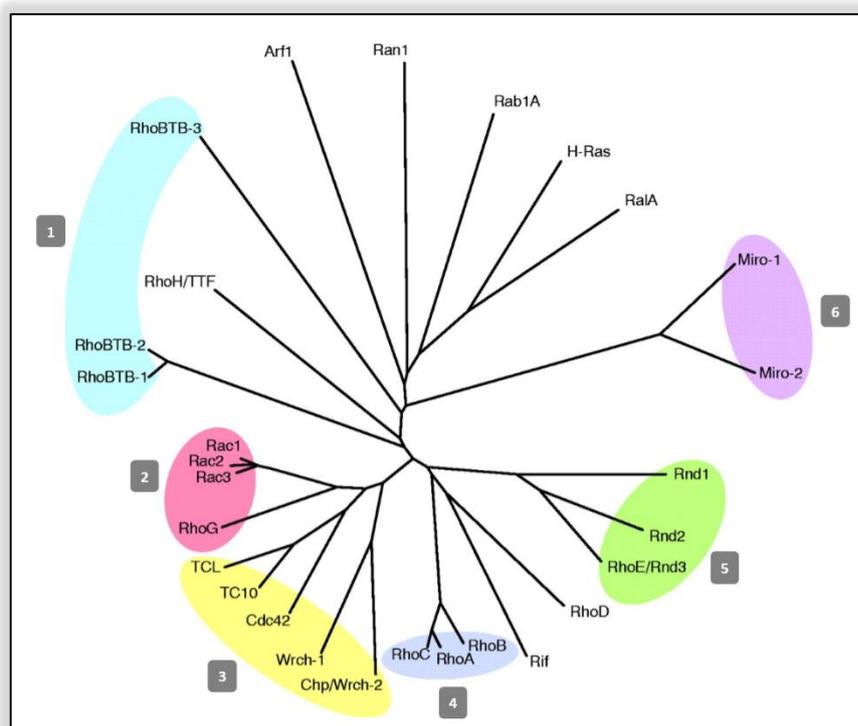


Figura 1. Árvore filogenética da família das Rho GTPases. Essa família de proteínas pode ser subdividida em 6 grupos: (1) proteínas RhoBTB; (2) proteínas relacionadas a Rac; (3) proteínas relacionadas a Cdc42; (4) proteínas relacionadas a Rho; (5) proteínas Rnd; (6) proteínas Miro (adaptado de Wennerberg, Der, 2004).

As proteínas da superfamília Ras possuem o domínio G (Figura 2) conservado, esse está envolvido na ligação de GTP e hidrólise. O switch I e o switch II são regiões que sofrem mudanças conformacionais durante o ciclo GDP-GTP e contribuem para a ligação da proteína efetora. As proteínas Rho são caracterizadas por uma inserção de 13 aminoácidos no domínio G, estes estão envolvidos na regulação do domínio de ligação à proteína efetora (Vigil et al., 2010).

Os integrantes da superfamília Ras, em sua maioria, sofrem mudanças pós-traducionais diversas e resíduos lipídicos são adicionados na extremidade C-terminal; essas modificações são importantes para localização subcelular e auxiliam na ancoragem das GTPases na membrana. A maioria dos integrantes da subfamília Rho sofrem a adição de cadeias isoprenóides de farnesil ou geranil ao resíduo de cisteína que está contido no motivo CAAX localizado na porção C-terminal da proteína (Wennerberg et al., 2005).

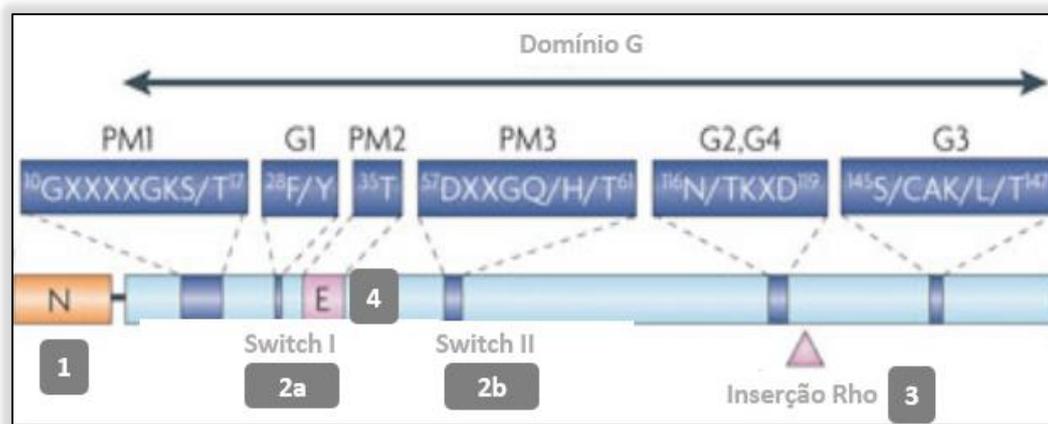


Figura 2. Domínio G conservado da superfamília Ras. Em azul escuro podemos observar regiões de ligação à GTP, o domínio G se encontra próximo à porção N-terminal da proteína, algumas outras regiões do domínio G são: (2a) e (2b) switch I e switch II, que mudam a conformação durante a ciclagem GDP-GTP; (3) inserção de 13 aminoácidos característicos das proteínas Rho; (4) região de ligação à proteína efetora (adaptado de Vigil et al., 2010).

Enzimas GTPases, assim denominadas pela afinidade e ligação de nucleotídeos de guanina, ciclam de um estado inativo, ligado a GDP, à outro ativo, ligado a GTP. Quando em sua conformação ativa diferentes moléculas efetoras são capazes de se ligar a essas proteínas e desencadear as mais diversas respostas celulares (Bishop, Hall, 2000).

Em geral, a regulação da atividade das enzimas GTPases é controlada por outras enzimas, tais como as: GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors), que catalisam a troca de GDP por GTP ativando-as; GAPs (GTPase Activating Proteins) que estimulam sua inativação acelerando a hidrólise de GTP a GDP; e GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors), que se ligam a essas proteínas em seu estado inativo e as sequestram no citosol impedindo sua ligação com moléculas efetoras, como ilustrado na Figura 3 (Aspenstrom et al., 2004; Schmidt, Hall, 2002).

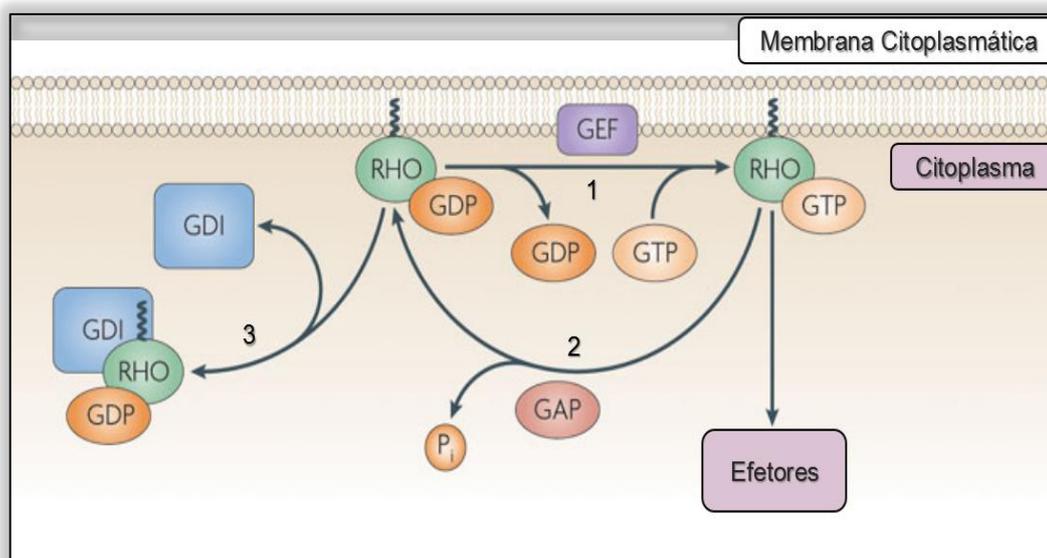


Figura 3. Esquema representativo da regulação das Rho GTPases. (1) Ativação da GTPase através da troca de GDP por GTP; (2) Inativação da GTPase pela hidrólise de GTP a GDP; (3) Inativação da GTPase através do sequestro da proteína para o citoplasma (adaptado de Tybulewicz, Henderson, 2009).

1.2 RhoA e tumorigênese

Dentre as diversas respostas biológicas reguladas por Rho GTPases encontram-se: organização de citoesqueleto e adesão (Figura 4), onde Rac1 e Cdc42 possuem papel indispensável na regulação do complexo Arp2/3, que estimula a polimerização de actina em focos de adesão, enquanto RhoA e seus efetores, principalmente ROCK e mDia1, são responsáveis pela organização desses filamentos de actina em fibras de estresse e junto aos focos de adesão (Parsons et al., 2010; Spiering, Hodgson, 2011).

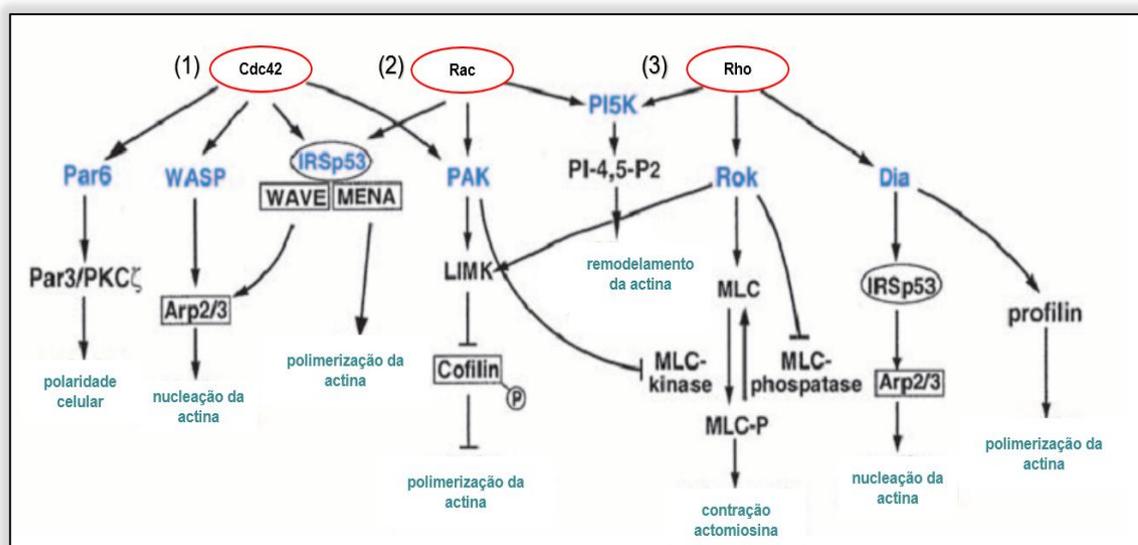


Figura 4. Via de sinalização das Rho GTPases durante a migração celular. (1) Cdc42 atua com diversas proteínas efetoras (azul) durante a remodelação celular para o movimento migratório, promovendo nucleação e polimerização da actina além de polaridade celular; (2) Rac, além de ativar a polimerização de actina através de seus efetores IRSp53 e PAK, promove o remodelamento dos filamentos de actina através de PI5K; (3) Rho, além de PI5K como efetor, interage com Rok e Dia, suas principais proteínas efetoras, o que desencadeia nucleação e polimerização de actina, além de remodelação e contração de filamentos de actina e miosina (adaptado de Aelst, Symons, 2002).

Por ter papel determinante na organização do citoesqueleto e na adesão celular, mecanismos diretamente relacionados com migração celular, as Rho GTPases e seus efetores são correlacionadas com o desenvolvimento de tumores e, de maneira coordenada, os integrantes da família Rho vêm sendo associados com alguns aspectos específicos da tumorigênese como: desdiferenciação e proliferação, angiogênese, invasão e metástase (Gomez del Pulgar et al., 2005).

Além de estar envolvida em vias de sinalização necessárias para a tumorigênese, a expressão e atividade de RhoA foi correlacionada com alguns tipos de tumores. A superexpressão de RhoA é associada à progressão de câncer de mama e testicular, essa GTPase é encontrada superexpressa em tumores de colo, pulmão, cabeça e pescoço e sua atividade foi descrita aumentada em tumores de fígado (Orgaz et al., 2014).

A cascata de sinalização mediada por ROCK, um dos principais efetores de RhoA, mostrou ser necessária em alterações morfológicas que ocorrem durante o processo de morte celular programada (Karlsson et al., 2009; Ridley, 2004).

Constatadas suas participações no estabelecimento e no desenvolvimento de tumores, as Rho GTPases poderiam ser utilizadas como alvos terapêuticos em drogas

farmacológicas ou até mesmo em terapia gênica, no intuito de que a inativação das mesmas, em pontos específicos de cascatas de sinalização que mantêm tais neoplasias, pudesse diminuir ou até mesmo impedir o desenvolvimento dessas doenças (Sahai, Marshall, 2002).

1.3 Ciclo celular e checkpoints

O ciclo celular é um processo pelo qual uma célula passa para se dividir em células filhas. É constituído de quatro fases distintas: G1, fase na qual a célula respondendo à estímulos positivos ou negativos prepara-se para se dividir, diferenciar ou entrar em processo de morte celular; fase S, na qual ocorre síntese de DNA; G2, onde ocorre síntese de proteínas e RNAs necessários para que ocorra a próxima fase e, finalmente Mitose (M), onde uma célula se divide em duas células filhas (Norbury, Nurse, 1992).

A progressão na ordem correta das fases do ciclo celular, bem como o controle de qualidade da divisão celular ocorre através de checkpoints, que são pontos onde a progressão do ciclo pode ser pausada para que a célula se recupere de algum tipo de estresse. Esses pontos de parada são necessários para a manutenção da estabilidade genômica, já que quando detectados erros de replicação de DNA, bem como danos no DNA causados por agentes externos, por exemplo, por radiação ultravioleta, o ciclo celular é interrompido nesses pontos até que tais erros sejam reparados (Williams, Stoeber, 2012).

As principais proteínas que regulam o ciclo celular são as ciclinas, que se complexam com quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e formam complexos capazes de fosforilar substratos e modular a progressão no ciclo; outras proteínas também atuam no ciclo, mas como inibidores do mesmo, como as CKIs (proteínas inibidoras de CDKs) que, bloqueando a atividade dos complexos de CDKs, impedem que as mesmas atuem seu substrato e conseqüentemente causem parada no ciclo, além de complexos de ubiquitina, que degradam proteínas necessárias para progressão do ciclo e de algumas fosfatases (Satyanarayana, Kaldis, 2009; Uhlmann et al., 2011).

Os primeiros indícios da participação de Rho GTPases no ciclo celular (Figura 5) surgiram quando a partir do estímulo com RhoA, Rac1 e Cdc42 ativas em células quiescentes, foi notada a recuperação de progressão da fase G1 para a S. RhoA atua

como repressora da transcrição da proteína p21 (necessária na passagem da fase G1 para S), através do sequestro das formas ativas de MAPK (ERK) no citosol pela sua principal proteína efetora ROCK, sendo que a repressão da proteína 21 levava à degradação da proteína p27 e consequente descontrole do ciclo (Coleman et al., 2004; Liberto et al., 2002).

A ciclina D1, conhecida como reguladora principal da fase G1, também é influenciada por RhoA e em alguns tipos celulares foi mostrado que a ativação de RhoA é acompanhada com a ativação do promotor de ciclina D1, e por Rac1, que através da ativação de NF- κ B induz a transcrição da mesma (Boyer et al., 2004; Villalonga, Ridley, 2006).

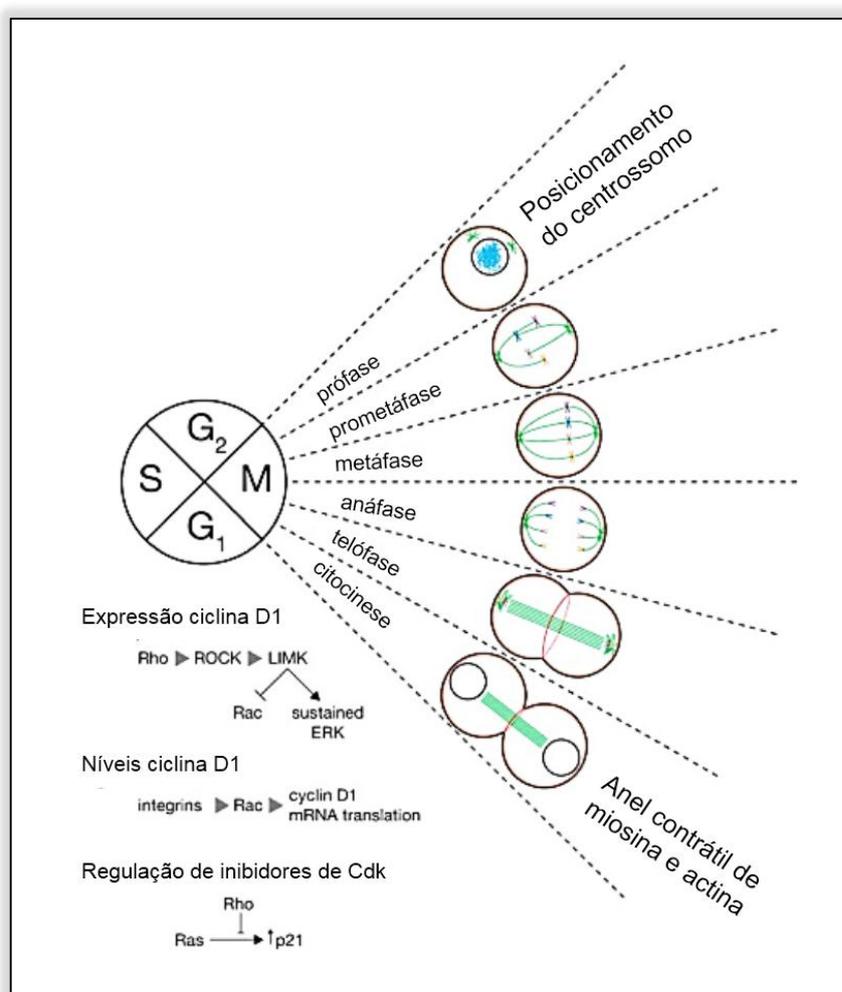


Figura 5. Rho GTPases e a progressão do ciclo celular. As GTPases da família Rho (Rho, Rac e Cdc42) regulam a atividade de proteínas quinases dependentes de ciclina, que influenciam a progressão na fase G1 do ciclo celular; além disso, são responsáveis pela organização e posicionamento dos microtúbulos durante a mitose, e da formação e função do anel de contração de actina e miosina necessário no final da citocinese (adaptado de Jaffe, Hall, 2005).

1.4 Danos ao DNA

A molécula de DNA é responsável por armazenar as informações genéticas de cada célula viva, portanto sua integridade e estabilidade são essenciais para a manutenção de um ser vivo. Existem diversos fatores endógenos, como subprodutos do metabolismo, e exógenos, como a radiação ultravioleta, que causam danos no DNA que quando não reparados podem causar mutações e doenças como câncer (Lord, Ashworth, 2012).

A radiação ultravioleta é uma parte do espectro eletromagnético classificada de acordo com o comprimento de onda emitido em três classes, UVA (315-400nm), UVB (270-315nm) e UVC (100-280nm). A principal fonte a qual somos expostos é a radiação solar composta de 90-95% de UVA, 5-10% UVB e UVC. Esta última é totalmente absorvida pela camada de ozônio, embora esta venha sendo destruída ao longo dos anos e passando a não absorver totalmente comprimentos de onda abaixo de 310nm. Visto que as moléculas de DNA conseguem absorver radiação máxima de 260nm, a UVC passa a ser também um alvo de grande preocupação em relação aos aspectos carcinogênicos e mutagênicos da radiação ultravioleta (Kanavy, Gerstenblith, 2011; Schuch, Menck, 2010).

As radiações UVB e UVC normalmente formam ligações do tipo dímeros de pirimidina no DNA (CPDs), caracterizados por ligações covalentes formadas entre duas bases pirimídicas próximas, e 6-4 fotoprodutos (6-4 PPs), formados a partir da ligação do carbono 6 com o carbono 4 de bases pirimídicas adjacentes, as quais podem ser observadas na Figura 6 (Pfeifer et al., 2005).

A radiação UVA induz principalmente a oxidação de bases púricas e pirimídicas, levando por fotosensibilização do DNA, principalmente oxidações do tipo 8-oxoguanosina (8oxoG), que consiste na adição de radical hidroxila a uma base guanosina proveniente de interações com espécies reativas de oxigênio (EROs, principalmente $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 e O_2^-), que também agridem proteínas do citosol e até mesmo lipídeos de membrana celular. Além disso, os três tipos de radiação UV podem levar, de maneira direta ou indireta, a quebras na dupla fita do DNA (Sage et al., 2012).

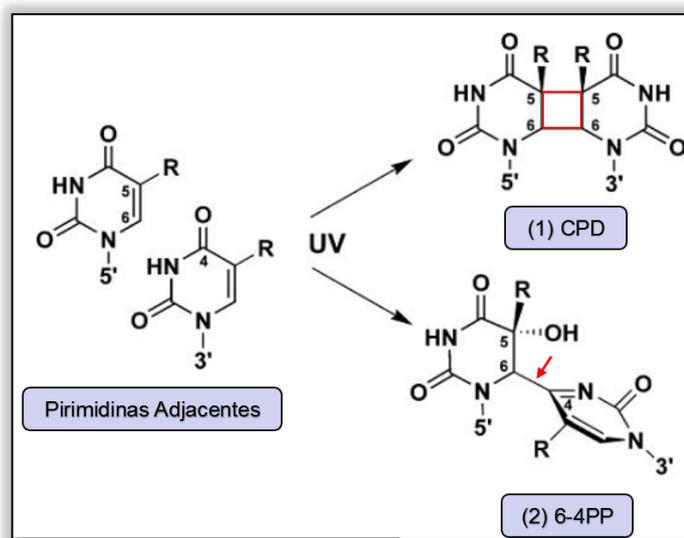


Figura 6. Principais lesões causadas no DNA pela radiação ultravioleta. (1) Dímero de pirimidina ciclobutano (CPD); (2) Fotoproduto 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PP) (adaptado de Li et al., 2006).

Quando os danos gerados por radiação ultravioleta se instalam no DNA, vias de sinalização são desencadeadas para que ocorra o reparo dos mesmos, pois caso essas lesões não sejam corrigidas, podem ocorrer mutações e até mesmo morte celular (Norbury, Hickson, 2001; Palomera-Sanchez, Zurita, 2011).

Para que essa sinalização ocorra de maneira rápida e eficaz algumas proteínas de resposta aos danos de DNA são ativadas (geralmente por fosforilação). Podemos visualizar na figura 7, uma das principais vias de reconhecimento de dano ativada após danocausado por radiação ultravioleta. Quando os complexos sensores de dano reconhecem a lesão as principais proteínas ativadas são ATM e ATR, quinases responsáveis por fosforilar e ativar algumas proteínas conhecidas como mediadores de dano (ex: H₂AX, Chk1 e Chk2) que serão capazes de ativar proteínas efetoras, que finalmente desencadearão respostas apropriadas, como morte celular, reparo do DNA, proliferação ou senescência (Sulli et al.,2012).

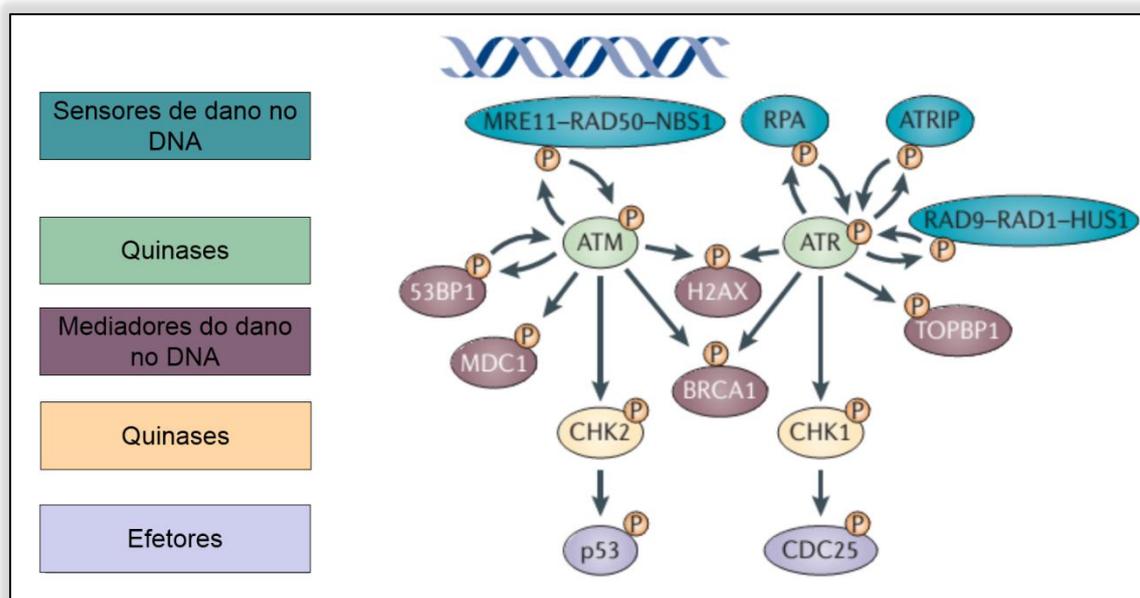


Figura 7. Principal via de sinalização para reconhecimento de dano no DNA após radiação ultravioleta. Quando danos são reconhecidos por proteínas e complexos específicos, as quinases ATM e ATR são acionadas e desencadeiam uma cascata de fosforilação de proteínas chamadas mediadores do dano, com o intuito de desencadear respostas como reparo no DNA ou morte celular (adaptado de Sulli et al., 2012).

Uma das vias de sinalização ativada por radiação ultravioleta é a via de MAPK (mitogen-activated protein kinase), uma cascata de sinais que se dá a partir de proteínas que fosforilam outras em resíduos de treonina e/ou tirosina, levando a fosforilação de diversas outras proteínas quinases, proteínas nucleares e fatores de transcrição, gerando respostas celulares para diferenciação, proliferação e morte celular. Os grupos de MAPK mais conhecidos em eucariotos são: JNK (c-Jun NH₂ terminal kinase), ERK (extracellular signal regulated kinase) e p38, além de várias de suas isoformas. Vários estudos mostraram que a cascata de sinalização de ERK é preferencialmente ativada por UVA, enquanto que as de JNK e p38 são preferencialmente ativadas por UVB e UVC, respectivamente (Dent et al., 2003; Kabuyama et al., 2001).

As proteínas ATR e ATM já foram descritas serem ativadas em resposta a danos que causam quebras duplas ou simples nas fitas de DNA; quando ativadas, elas desencadeiam a fosforilação de proteínas como Chk1 e Chk2, respectivamente, que causam uma sinalização de parada no ciclo celular e início de pontos de checagem nas transições G1/S e G2/M. A ativação dessas proteínas vem sendo altamente estudadas e correlacionadas com a terapia do câncer, já que normalmente

células tumorais possuem deficiência em pontos de checagem (Bartek, Lukas, 2007; Hurley, Bunz, 2007).

A proteína p53 é um fator de transcrição que atua como supressor tumoral já que induz a expressão tanto de inibidores da progressão do ciclo celular, como p21, bem como indutores de apoptose e senescência celular; mutações em p53 normalmente são correlacionadas com o desenvolvimento de tumores por levarem à proliferação descontrolada das células e, além disso, p53 é alvo de regulação por proteínas essenciais na resposta aos danos no DNA, como Chk1, Chk2, ATM, ATR e p38 (Reinhardt, Schumacher, 2012).

A proteína γ -H2AX era até algum tempo atrás vista apenas como um bom marcador de dano de DNA do tipo quebra dupla e associada exclusivamente com radiação gama; entretanto, ao longo dos anos diversos estudos realizados vêm mostrando que certos tipos e doses de radiação ultravioleta também causam quebras duplas nas fitas de DNA. Foi demonstrado a co-localização de γ H2AX inclusive com outras proteínas sinalizadoras de dano de DNA, como ATM e Rad51 em focos de dano de DNA após exposição à radiação ultravioleta (Oh et al., 2011; Toyooka et al., 2011).

Outra resposta celular aos danos no DNA que também vem sendo investigada é a senescência celular, que ocorre quando as células perdem a capacidade proliferativa, mas permanecem metabolicamente ativas e são então chamadas de senescentes. As células senescentes normalmente param de ciclar na fase G1, mas também pode ocorrer parada em G2; outra característica de células senescentes é a superatividade da enzima β -galactosidase, processo este cuja via de sinalização ainda não foi bem esclarecida. Assim, o interesse nessa resposta à danos no DNA aumenta pelo fato de que se desvendados e induzidos mecanismos de interrupção da proliferação em processos tumorigênicos, novos tratamentos terapêuticos podem surgir (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007; Reinhardt, Schumacher, 2012).

Pouco ainda se sabe sobre o papel de GTPases na instabilidade genômica, danos ou reparo de DNA causado por radiações em geral e em especial por ultravioleta e, embora tenha sido mostrado RhoB mediando proteção contra apoptose em queratinócitos humanos lesionados por UVB, ainda existe muito a ser esclarecido no papel direto ou indireto dessas GTPases em respostas a danos gerados por radiação ultravioleta e na participação dessas enzimas em cascatas de sinalização específicas (Boswell et al., 2007; Canguilhem et al., 2005).

1.5 Mecanismos de Reparo do DNA

Existem diversos mecanismos de sinalização celular responsáveis pelo reparo da molécula de DNA, dentre eles o reparo por excisão de bases (Base Excision Repair), reparo por excisão de nucleotídeos (Nucleotide Excision Repair) e o reparo de pareamento errôneo (Mismatch Repair, MMR).

Quando essas lesões são detectadas as células se engajam na tentativa de corrigir as mesmas, pois quando isso não ocorre elas acabam sofrendo algum tipo de morte celular. Em relação as terapias anti-câncer, diversas proteínas que participam desses mecanismos de reparo são estudadas como alvos de drogas na intenção de desvendar e diminuir a radioresistência exibida por alguns tipos de tumores (Lord, Ashworth, 2012).

O reparo por excisão de bases (BER) ocorre quando a base defeituosa é detectada e removida por proteínas especializadas denominadas DNA glicosilases, que são capazes de hidrolisar as ligações entre base nitrogenada e desoxirribose, gerando um sítio chamado de AP (apurínico/apurimidínico); em seguida enzimas APE (AP endonuclease) são encarregadas de quebrar ligações fosfodiéster e gerar um corte na fita. Outras enzimas indispensáveis para que ocorra o reparo são as PARP 1/2, responsáveis por recrutar enzimas de reparo como XRCC1 e ligase III; a DNA polimerase β é a enzima capaz de sintetizar a base antes errônea e reparar o erro (Wilson. Bohr, 2007).

Mutações na via de BER vêm sendo estudadas em tumores na intenção de desenvolver novas drogas que levem à diminuição de radioresistência de células tumorais em tratamentos de câncer (Vens, Begg, 2010).

A via de NER (Figura 8) é a mais atuante em reparo de DNA lesionado por radiação ultravioleta, pois é bem específica, por exemplo, no reparo de CPDs e 6-4PPS; as principais lesões que se instalam no DNA após este dano. Esta via de reparo é composta por duas sub-vias: o reparo acoplado à transcrição (ou do inglês TCR) e o reparo global do genoma (ou do inglês GGR), as quais, por sua vez, se diferenciam no reconhecimento da lesão.

Na via TCR a RNA polimerase 2 é bloqueada pela lesão e duas outras proteínas CSA e CSB são necessárias para que a RNA polimerase seja dissociada da dupla-fita e as outras proteínas de NER sejam recrutadas; as primeiras proteínas que

reconhecem as lesões são XPE e XPC, depois outras proteínas da cascata de NER são recrutadas, como XPA, RPA, TFIIH e XPG, para estabilizar o complexo e realizar a abertura da dupla-fita de DNA. Logo após, o complexo ERCC é necessário para que ocorra a incisão da fita e o reparo possa ocorrer a partir da síntese de DNA tendo como molde a fita não lesionada (Hanawalt, 2002; Rastogi et al., 2010).

A via de reparo global do genoma se diferencia da via de TCR apenas na etapa inicial de reconhecimento da lesão, sendo que nesse caso o reconhecimento da lesão é feito pelo complexo XPC-HHR23B e por XPE, essa via é responsável pelo reconhecimento de lesões em regiões não transcritas do genoma (Noussipiel, 2009).

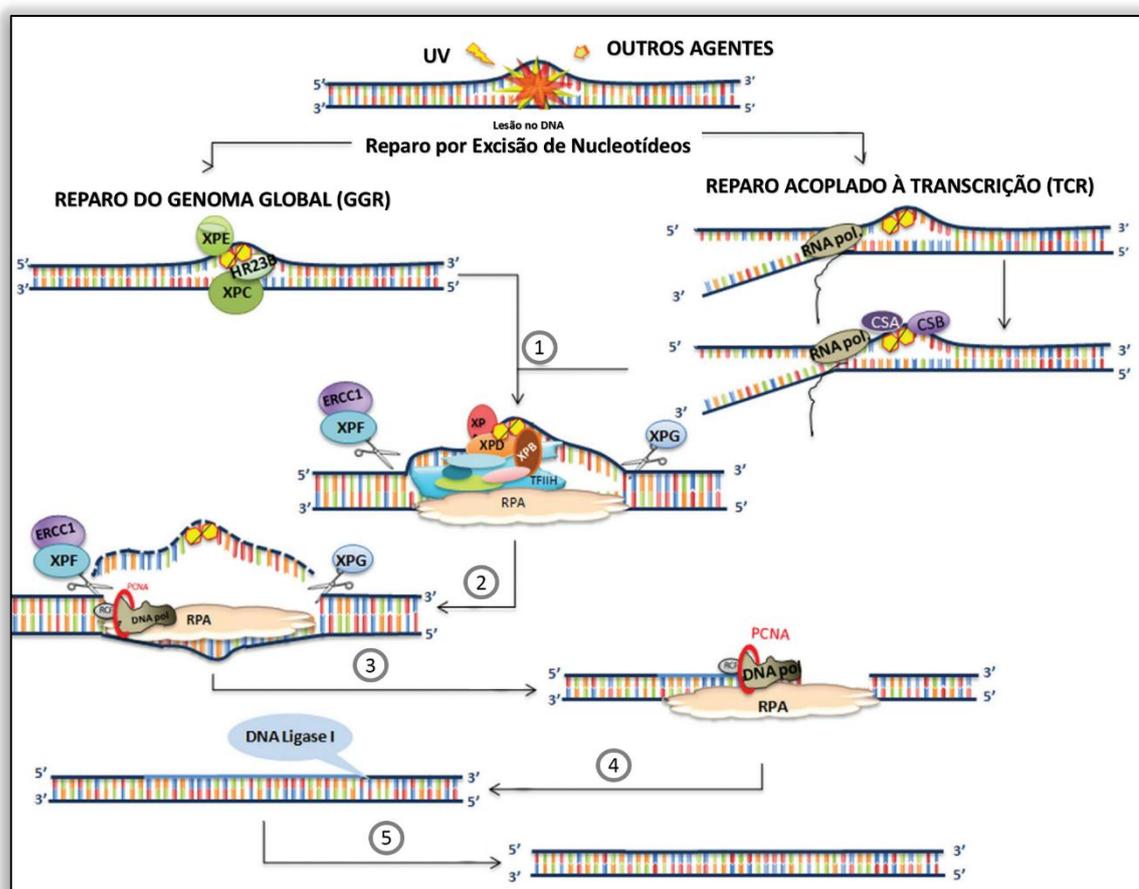


Figura 8. Via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER). A principal via de reparo de DNA ativada após radiação ultravioleta é a via de reparo por excisão de nucleotídeos, onde ocorre o reconhecimento do dano: etapa que divide NER em 2 subvias: GGR: Reparo do genoma global, que remove lesões em regiões não transcritas do genoma e TCR: Reparo acoplado à transcrição, que remove lesões em fitas ativamente transcritas pelo bloqueio da RNA polimerase II; após o reconhecimento seguem-se as etapas (1) Abertura da dupla hélice; (2) Excisão das extremidades 5' e 3'; (3) Síntese de novo DNA; (4) Ligação do DNA recém-sintetizado para enfim, chegarmos em (5) onde o DNA está reparado (adaptado de Menck, Munford, 2014).

O reparo de pareamento errôneo (MMR) é o principal mecanismo geral de manutenção da estabilidade genômica, pois através dele são corrigidos inserções erradas, deleções e incorporações de bases errôneas durante a replicação do DNA. Basicamente o processo ocorre através do reconhecimento de erros na síntese de DNA pelos heterodímeros MSH2/MSH6 e MSH2/MSH3, sendo o recrutamento de um terceiro heterodímero (MLH1/PMS2) o responsável pelo reparo por ter a capacidade de remover em definitivo os nucleotídeos (Hong et al., 2008; Kadyrov et al., 2006).

Ainda em relação MMR vale ressaltar que esse tipo de reparo é atuante na correção de danos dos tipos CPD e 6-4PPS por se tratarem exatamente de ligações erradas entre bases; estudos demonstraram que a expressão da proteína MSH2 é aumentada em melanomas e o silenciamento da proteína MSH2 levou à redução de apoptose induzida por radiação UVB em melanomas (Seifert et al., 2008).

1.6 Vias de morte celular

Estímulos ou estressores, endógenos ou exógenos, desencadeiam respostas celulares das mais diversas, desde vias de sinalização que levam à sobrevivência até diversos tipos de morte celular. Os cinco tipos de morte celular mais comuns e abrangentes são: necrose, apoptose, autofagia, senescência e pirofagia (Fulda et al., 2010).

Células necróticas são morfológicamente caracterizadas pelo aumento no volume da célula e de suas organelas acarretando em ruptura de membrana plasmática e exposição de material intracelular. Esse mecanismo geralmente é disparado por receptores de morte celular como os Toll-like (TLRs) principalmente em situação de inibição de caspases, grupo de proteases conhecidas por disparar cascata de apoptose celular (Fulda et al., 2010).

Morte celular programada, ou apoptose é um mecanismo complexo que basicamente se dá a partir de um estímulo de dano, sinalizando o desligamento das proteínas Bcl-2 e Apaf-1; essa última, juntamente com a proteína Bax, vão ativar o citocromo c que levará à ativação da caspase-9 desencadeando uma cascata de clivagens de outras caspases, ativando as mesmas, e gerando diversas clivagens de proteínas citossólicas e material genético, o que por fim causará fagocitose das células (Elmore, 2007; Papaliagkas et al., 2007).

Em condições fisiológicas, o processo de autofagia ocorre para a manutenção da homeostasia tecidual e este processo de autodigestão celular se dá a partir da formação de um fagossomo na molécula, estrutura ou proteína a ser degradada. Após a formação do fagossomo, acontece a fusão do mesmo com um lisossomo, formando um complexo capaz de digerir essas estruturas e liberar seu conteúdo no meio externo e, se possível reciclado. Existem algumas proteínas envolvidas na sinalização para formação do fagolisossomo utilizadas como marcadores desse segundo tipo de morte celular programada, como LC3 e ATG5 (Chen et al., 2012; Kimmelman, 2011).

Senescência é caracterizada por uma parada continua no ciclo celular, mesmo em condições fisiológicas para que a célula se divida acompanhada por modificações morfológicas como achatamento do citoplasma, aumento no volume e em geral, pelo aumento na expressão de inibidores de ciclo celular, como, por exemplo, p16 e p27. Embora a sinalização que leve à esse tipo de parada no ciclo celular ainda não tenha sido completamente desvendada, sabe-se que estímulos como radiação levam células à senescer (Ben-Porath, Weinberg, 2004).

1.7 RhoA e dano/reparo de DNA

Alguns trabalhos foram surgindo ao longo dos últimos 10 anos e a GTPase RhoA vem sendo observada impactando vias de sinalização para dano/reparo de DNA. Frisan e colaboradores, mostraram que o bloqueio da atividade da quinase ATM, após a indução de quebras duplas no material genético pela toxina CDT, impede a ativação da GTPase RhoA e a formação de fibras de estresse, sendo a via de RhoA um novo alvo da via de ATM após geração de danos no DNA (Frisan et al., 2003).

O aumento da atividade da GTPase RhoA após geração de danos do tipo quebra dupla foi demonstrado em tratamentos com diferentes doses de radiação gama, demonstrando também que com redução da atividade dessa enzima vias de reparo de DNA por recombinação homóloga e não-homóloga perdem a eficiência em linhagem de adenocarcinoma de cérvix (Osaki et al., 2016).

Recentemente (2014), a atividade da proteína RhoA foi relacionada diretamente com a enzima 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1), proteína responsável pelo início da via de reparo por excisão de bases após dano oxidativo no DNA do tipo 8-oxoguanina (8-oxoG). Luo e seus colaboradores demonstraram que OGG1 e 8-oxoG interagem fisicamente e catalisam a troca de RhoA-GDP por RhoA-

GTP, atuando como uma GEF da RhoA induzindo a polimerização de actina e formação de fibras de estresse (Luo et al., 2014).

A GEF específica de RhoA Net1 foi demonstrada ativa em núcleos de diversos tipos celulares regulando positivamente uma pequena fração da GTPase RhoA presente no núcleo; além disso foi demonstrado que essa co-localização é aumentada por radiação ionizante (Dubash et al., 2011).

Sendo assim, com o crescente aumento na investigação de possíveis relações entre a atividade da GTPase RhoA e vias de sinalização para dano e reparo de DNA, amplia-se a necessidade de outros dados literários que corroborem e complementem os efeitos biológicos e bioquímicos relatados até o presente momento.

2 OBJETIVOS

2.1 **Objetivo geral**

Determinar um possível papel da GTPase RhoA em vias de sinalização envolvidas na detecção, geração e reparo de danos aos DNA nas linhagens de adenocarcinoma de cérvix (HeLa) e melanoma (MeWo) após estresse genotóxico promovido por radiação ultravioleta.

2.2 **Objetivos Específicos**

- Analisar formação de danos no DNA e a eficiência de reparo, através do ensaio de cometa alcalino, expresso pela redução da cauda do cometa nas linhagens HeLa e MeWo, modulando ou não a atividade da proteína RhoA, após irradiação ultravioleta.
- Analisar a influência de RhoA na capacidade de reparo de DNA exógeno lesado por UV através do ensaio de *Host Cell Reactivation*. Verificar os níveis de formação e a recuperação de dímeros de pirimidina formados no DNA, através da técnica de imunofluorescência, nas linhagens parental e mutantes de RhoA, após exposição à radiação ultravioleta.
- Analisar a influência da GTPase RhoA em ensaios de proliferação (curvas de crescimento e ensaios clonogênicos), progressão no ciclo celular e ensaios de migração celular frente a exposição à radiação ultravioleta dos tipos A, B e C. Verificar a ativação de vias de senescência, apoptose, necrose e autofagia nas linhagens parentais e clonais para a GTPase RhoA após tratamentos com radiação UVA, UVB e UVC.
- Verificar a influência da inibição da atividade da GTPase RhoA em linhagens deficientes da via de NER (XPA, XPC e XPV) em comparação com a linhagem de fibroblasto proficiente em NER (MRC5) em ensaios de proliferação e de cometa alcalino, após tratamento com radiação ultravioleta.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares

A linhagem tumoral de adenocarcinoma de cérvix (HeLa, CCL-2) e a linhagem de melanoma humano (MeWo, HTB-65) foram cultivadas a partir de amostras adquiridas da ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) e, gentilmente cedidas pelo laboratório do Prof. Hugo Aguirre Armelin (CAT, Cepid, Instituto Butantan).

As linhagens de fibroblastos humanos transformadas por SV40 utilizadas foram gentilmente cedidas pelo laboratório do Prof. Carlos Frederico Martins Menck, ICB-USP:

- MRC-5V1: linhagem de fibroblasto de tecido de pulmão de embrião humano, proficiente em reparo por excisão de nucleotídeos (Huschtscha, Holliday, 1983);
- XP12RO: fibroblasto de pele de paciente XP-A, deficiente nas subvias de reparo do genoma global (GGR) de reparo acoplado à transcrição (TCR) de NER (Satokata et al., 1992);
- XP4PA: fibroblasto de paciente XP-C, deficiente na subvia global de NER (Soufir et al., 2010);
- XP30RO: fibroblasto de paciente XP-V, deficiente na síntese translesão mediada pela DNA polimerase eta (Masutani et al., 1999).

As linhagens utilizadas foram cultivadas em meio DMEM Dulbecco Modified Eagle Medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), com exceção da linhagem de melanoma, cultivada em meio RPMI-1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), os meios de cultura eram suplementados com 10% de soro fetal bovino inativado (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e as células mantidas em atmosfera úmida com 5% CO₂ e a 37 °C em incubadora Sanyo (Sanyo, Osaka, Japão) modelo MCO-19AIC(UV).

Para o congelamento, as células eram ressuspensas após tripsinização em meio apropriado (DMEM ou RPMI) com 30% de soro fetal bovino acrescido de 10% de DMSO e distribuídas em ampolas de congelamento devidamente identificadas. Quando então eram armazenadas em freezer -80 °C ou em galão com nitrogênio líquido.

Para o descongelamento, as ampolas contendo as células eram incubadas a 37 °C e imediatamente diluídas em 10 mL de meio apropriado em um tudo de 15 mL. Em seguida a suspensão de células era centrifugada por 3 min a 1500 rpm e o meio contendo DMSO era aspirado. O *pellet* celular era então ressuspendido em meio de cultura contendo 20% de soro fetal bovino a transferido para garrafas de cultura celular mantidas em estufa à 37 °C e 5% CO₂. Após 24 h do descongelamento, os meios de cultura eram trocados novamente por meio contendo 10% de soro fetal bovino.

As linhagens HeLa e MeWo eram mantidas em cultura com meio apropriado e eram repicadas em 1:5 a cada 48 h ou 72 h, quando então eram replaqueadas de acordo com a densidade celular necessária para cada experimento, as células eram mantidas em cultura até a 12^a passagem, quando então eram substituídas por alíquotas em passagens menores.

Os fibroblastos imortalizados por SV40 eram repicados a cada 48 h e as células eram cultivadas até a 10^a passagem, quando então eram descartadas e substituídas por alíquotas em menor passagem mantidas no estoque de nitrogênio ou no freezer - 80 °C do laboratório.

3.2 Obtenção das sublinhagens mutantes de RhoA

Sublinhagens de células HeLa e MeWo mutantes para a enzima RhoA foram, gerados previamente pelo Prof. Dr. Fábio Luís Forti através de transduções com vetores retrovirais. Tais sublinhagens expressam cDNAs que codificam para a proteína RhoA em seu estado constitutivamente ativado (RhoA-V14), através de substituição do aminoácido glicina pelo aminoácido valina na posição 14, e do dominante negativo (RhoA-N19), com substituição do aminoácido treonina por asparagina na posição 19. Estes mutantes foram utilizados em toda nossa experimentação e foram comparados com a linhagem parental em relação à diferente expressão/atividade da proteína RhoA e as respostas celulares frente ao estresse genotóxico promovido por radiação ultravioleta.

Células empacotadoras da linhagem Φ NX-Ampho (Phoenix) foram transfectadas com Lipofectamina 2000 (Invitrogen) com plasmídeo contendo cDNA que codifica RhoA mutada em N19 ou V14, clonados originalmente no vetor retroviral pCM (pCLNCX “backbone”). Os plasmídeos foram empacotados em partículas retrovirais (títulos superiores a 10⁶) que foram usadas (moi = 1) na transdução de

células HeLa ou MeWo parentais. Para isso 2×10^5 células foram plaqueadas em placas de 60 mm de diâmetro (Corning) e mantidas em meio apropriado suplementado com 10% de soro fetal bovino por 24 h. Após esse tempo, necessário para a devida adesão celular, o meio de cultura foi substituído por meio fresco contendo sobrenadante viral na proporção de 1:1 v/v, além de polibreno (Sigma) na concentração final de 4 µg/mL, por mais 24 h.

Decorrido o tempo necessário para a transdução retroviral, as células permaneceram em meio fresco por mais 24 h, antes de serem subcultivadas para placas (Corning) de 100 mm de diâmetro, onde após 24 h, iniciou-se o processo de seleção clonal, utilizando-se de meio DMEM suplementado com 10% SFB e 500 µg/mL do antibiótico de seleção Neomicina/G418 (Sigma). Após a seleção durante cerca de 30 dias, colônias individuais foram coletadas, utilizando-se de anéis de clonagem e graxa de silicone (Synth), transferidas para placas multiwell de 24 poços com meio de seleção. A eficiência de transdução foi de aproximadamente 90% para todas as construções utilizadas, bem como para o vetor retroviral pCM vazio. Após os poços apresentarem confluência de 90% a 100% de células, os clones foram transferidos para garrafas de cultura de 5 cm² (Corning), as quais após confluência total, tiveram as células tripsinizadas e os clones foram congelados em DMEM suplementado com 20% SFB e 10% de DMSO em vials de congelamento (Corning), subsequentemente armazenados em tanques de nitrogênio líquido para posterior análise (adaptado de Forti, Armelin, 2007).

3.3 Irradiação das linhagens celulares

As células foram plaqueadas em densidades específicas em placas de cultura (Corning) de tamanho variável para cada experimento. O procedimento de irradiação ocorria geralmente após 24 h na presença de tampão fosfato PBS (80 mmol/L Na₂HPO₄, 20 mmol/L NaH₂PO₄.2H₂O, 100 mmol/L NaCl, pH 7,2), utilizando um transiluminador (Alpha Innotech) para UVA e UVB, enquanto para a radiação UVC foi utilizada a lâmpada da própria cabine de segurança biológica (Esco Class II BSC). As placas foram destampadas e expostas à radiação nos três comprimentos de onda pelo tempo necessário para que as doses desejadas fossem atingidas; esses tempos foram determinados por recorrentes calibrações das lâmpadas utilizando-se de

dosímetro VLX 3W (marca Vilbert Lourmat) com sondas específicas para cada um dos comprimentos de onda.

3.4 Obtenção de lisados celulares totais e quantificação

Para a obtenção dos lisados protéicos, as células foram plaqueadas em placas p100 e mantidas em ambiente úmido à 37 °C e 5% CO₂ para atingirem densidade celular de aproximadamente 70% de confluência. As células foram lavadas duas vezes com PBS (80 mmol/L Na₂HPO₄, 20 mmol/L NaH₂PO₄.2H₂O, 100 mmol/L NaCl) e rompidas com tampão de lise celular RIPA (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.2, 1% Triton X-100, 0,5% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS, 500 mmol/L NaCl, 10 mmol/L MgCl₂), acrescido de inibidores de proteases (2 µg/mL leupeptina, 2 µg/mL pepstatina A, 2 µg/mL aprotinina e 1 mmol/L PMSF) e fosfatases (1 mmol/L ortovanadato de sódio e 1 mmol/L fluoreto de sódio). As células foram mantidas em gelo por 10 min e a lise mecânica celular foi feita com auxílio de raspador; em seguida o lisado passava por centrifugação (10 min/ 14.000 rpm/ 4 °C) em centrífuga Eppendorf modelo 5424, e o sobrenadante obtido era aliqotado e armazenado em freezer -80 °C (adaptado de Ren et al., 1999).

As proteínas totais contidas nos lisados foram quantificadas segundo método colorimétrico de Bradford, em microplacas utilizando Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BioRad, CA, EUA), utilizando albumina de soro bovino (Sigma) em diferentes concentrações para estabelecimento de curva padrão (Bradford, 1976).

3.5 Preparo de beads RBD-GST para ensaio de atividade de RhoA

O plasmídeo Rhotekin-RBD, o qual contém a sequência que codifica para a proteína de fusão RBD-GST (RBD para Rho Binding Domain), usado para o ensaio de atividade de RhoA, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Gary Bokoch (The Scripps Research Institute, La Jolla-CA-USA), foi utilizado para transformação por choque térmico na bactéria *E. coli* estirpe BL21(DE3). Em seguida, as bactérias transformadas foram recuperadas em 1 mL de meio LB por 1 h a 37 °C sob agitação constante (200 rpm), em incubadora 311 DS Shaking (Labnet) e plaqueadas em meio de cultura Luria-Bertani sólido (LB-ágar) contendo 100 µg/mL de ampicilina e incubadas a 37 °C por 18 h.

Uma colônia de bactéria transformada com plasmídeo Rhotekin-RBD foi inoculada em 200 mL de meio LB por 12 h a 37 °C sob agitação constante (200 rpm). Essa cultura de 200 mL foi reinoculada em 2 L de meio LB e mantida a 37 °C sob agitação constante de 250 rpm até atingir aproximadamente $DO_{600} = 0,6$. À essa cultura, foi adicionado IPTG (isopropil β -D tiogalactosídeo) 0,5 mmol/L como indutor de expressão, e foi incubada a 37 °C sob constante agitação. Após 2 h de indução as células foram recuperadas por 10 min de centrifugação a 8.000 rpm a 4 °C. O precipitado bacteriano foi ressuscitado em 20 mL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7.5, NaCl 150 mmol/L, 1% Triton X-100, 5 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 10 μ g/mL Leupeptina e Aprotinina). As bactérias foram lisadas em gelo através de sonicação em 8 ciclos de 2 min, com intervalos de 1 min, com sonicador Vibra-Cell VC 505 (SONICS). Após a lise, o material foi centrifugado por 30 min a 14.000 rpm a 4 °C e a fração solúvel contendo a proteína de fusão foi coletada.

Aproximadamente 12 mL dessa fração solúvel foi incubada com 0,5 mL de resina Glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare) por 1 h a 4 °C sob agitação orbital constante. Em seguida, a proteína de fusão ligada a resina foi lavada 6 vezes com tampão de lavagem (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 0,5% Triton X-100, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L DTT, 1 μ g/mL Leupetina e Aprotinina, 0,1 mmol/L PMSF), as beads foram ressuscitadas em 5 mL do tampão de lavagem contendo 10% de glicerol, aliqüotadas (0,25 mL) e armazenadas em freezer -80 °C (modelo MDF-U33V-PE - Sanyo) (adaptado de Ren et al, 1999).

3.6 Ensaio de pull-down

O ensaio de pull-down foi realizado para determinar a atividade da GTPase RhoA. Neste experimento foi utilizada a proteína de fusão RBD-GST (Rhotekin Binding Domain - Glutathione S-Transferase). O domínio RBD, pertence à proteína Rhotekin, que é uma proteína efetora de RhoA com capacidade de reconhecer e se ligar especificamente a RhoA no estado ativo (ligado a GTP). A proteína de fusão ligada a resina Glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare), na concentração de 50 μ g para beads-RBD, foi incubada por 90 min, com 500 μ g de lisado celular das células irradiadas ou não. Decorrido esse tempo, as beads foram lavadas por 3 vezes com tampão B (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.2, 1% Triton X-100, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L $MgCl_2$, 10 μ g/mL leupetina e aprotinina e 0,1 mmol/L PMSF). As proteínas precipitadas

foram analisadas por immunoblotting com anticorpo primário específico anti-RhoA (Santa Cruz) (adaptado de Ren et al, 1999) de acordo com o protocolo descrito a seguir.

3.7 Eletroforese desnaturante de proteínas (SDS-PAGE)

A análise eletroforética das proteínas foi realizada sob condições desnaturantes segundo LAEMMLI, 1970. O gel de poliacrilamida utilizado possui concentração de acrilamida no gel de empilhamento (Tris-HCl 0,155 M pH 6,8; SDS 0,1%; APS 0,1% e Temed 0,5 µL/mL) de 5% e no gel separador (Tris-HCl 0,375 M pH 8,8; SDS 1%; APS 1% e Temed 0,5 µL/mL) de 10 a 13%, de acordo com o peso molecular da proteína alvo, espessura do gel de 1,5 mm e relação acrilamida:bis-acrilamida de 29:1. As corridas eletroforéticas foram realizadas em voltagem constante de 120 V e amperagem variável, em tampão de corrida (192 mM Glicina; 0,1% SDS; 25 mM Tris) à temperatura ambiente. As proteínas foram coradas com Coomassie Brilliant Blue R-250 para quantificação da beads (RBD) ou os géis foram utilizados para transferência por western blot.

3.8 Western Blot

Os géis de SDS-PAGE destinados para transferência das proteínas, foram mergulhados por 10 minutos em tampão de transferência (192 mM Glicina, 20% metanol, 25 mM Tris pH 8.3) e as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose-Millipore utilizando o sistema úmido (Mini Trans-Blot, BioRad) 350 mA, por 1 h a temperatura ambiente. As membranas foram bloqueadas com 5% de leite em pó (LaSerenissima desnatado) em TBS-T (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.6; 137 mmol/L NaCl; 0,1% Tween 20) por 1 h sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida, foram incubadas com anticorpos primários descritos a seguir: anti-γH2AX Ser 139 (R&D Systems Inc.) 1:1.500 em TBS-T por 3 h à temperatura ambiente; anti-RhoA (26C4, Santa Cruz) 1:500, anti-phospho-Chk1 Ser280 (2347, Cell Signaling) 1:1.000, anti-p-JNK (6254, Santa Cruz) 1:1.000, anti-JNK (612540, Cell Signaling) 1:1.000, anti-p-ERK 1/2 (4370, Cell Signaling) 1:1.000, anti-ERK (4695, Cell Signaling) 1:1.000, overnight à 4 °C; anti-α-Tubulina (5286, Santa Cruz) 1:2.000, anti-Actina (1615, Santa Cruz) 1:1.000, durante 1 h à temperatura ambiente.

Por fim, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a fluoróforos Alexa 680 ou 800 (IRDye 800CW ou 680RD, LI-COR Biosciences), anti-mouse, na diluição de 1:15.000 por 1 h a temperatura ambiente. As membranas foram reveladas utilizando Scanner Odyssey Infrared Image System (LI-COR Biosciences) e as bandas foram quantificadas com auxílio do software Odyssey V 3.0 (LI-COR Biosciences).

3.9 Ensaio de migração celular por risco (“scratch wound healing assay”)

A migração celular em resposta à variação na expressão da GTPase RhoA nas células parentais HeLa ou MeWo, bem como nas sublinhagens clonais, e também em resposta aos tratamentos com radiação UV, foi analisada através do método de “risco”, 1×10^6 células foram plaqueadas em placas de 35 mm de diâmetro e mantidas em cultura até que a placa estivesse com 100% de confluência (aproximadamente 48 h), quando então as células eram irradiadas na presença de tampão PBS e com o auxílio de ponteiros de micropipetas p200 as placas eram riscadas radialmente em forma de cruz com a ponteira na posição vertical.

As placas tinham então o tampão PBS substituído por meio de cultura e campos específicos eram demarcados nas placas para que fossem tiradas fotos, em aumento de 200x, das fendas iniciais; após 24 h os mesmos campos eram fotografados para se obter as fendas finais, utilizando câmera (XC30 Olympus) acoplada ao microscópio Olympus (IX51). Através do software cell-F, as áreas das fendas iniciais (0 h) e finais (24 h) eram quantificadas. Os resultados foram expressos de acordo com a diferença de áreas entre as fendas finais e iniciais, em porcentagem, onde 100% de migração representa fechamento total da fenda inicial (adaptado de Liang et al., 2007).

3.10 Detecção de fibras de estresse por imunofluorescência

Para a visualização de fibras de estresse, 3×10^4 células foram plaqueadas em lamínulas de vidro redondas de 13 mm e mantidas em cultura por 24 h, quando então foram lavadas 2x com tampão fosfato (PBS), fixadas com 3% formaldeído / 2% sacarose / PBS por 10 min à temperatura ambiente, lavadas 2x com PBS e permeabilizadas com 0.5% Triton X-100 / 6,84% sacarose / 3 mM MgCl / PBS durante 5 min em gelo. Em seguida, as células foram bloqueadas por 30 min à temperatura

ambiente (3% BSA / 10% SFB / PBS) para então serem incubadas com anticorpo anti-Faloidina conjugado com Alexa-Fluor 488 (Invitrogen), diluído 1:500 em solução de bloqueio, durante 2 h à temperatura ambiente, em ambiente úmido e protegido de luz. A montagem das lâminas com lamínulas foram feitas utilizando Vectashield com DAPI (1 µg/mL). As imagens foram obtidas por microscopia confocal (Carl Zeiss LSM-510) em objetiva de 100x (adaptado de Yamaguchi et al., 2001).

3.11 Ensaios clonogênicos de sobrevivência

O ensaio de colônia em monocamada foi utilizado para determinar a resposta das linhagens em relação à sobrevivência ou proliferação das células isoladas após estresse genotóxico promovido por radiação ultravioleta. Colônias isoladas, foram obtidas a partir do plaqueamento em duplicata de células em baixa densidade (1×10^3 ou 2×10^3 células) em placas de 60 mm de diâmetro, 24 h antes da exposição das células à radiação ultravioleta. Após estresse as placas foram mantidas em incubadora à 37 °C e 5% de CO₂ por 10 dias, com trocas de meio a cada 48 h, para visualização, as células foram fixadas com formaldeído 10% (10 min) e coradas com cristal violeta (0.5%), para que cada colônia pudesse ser contada à olho nu (adaptado de Fanken et al., 2006).

3.12 Curvas de crescimento celular

As células foram plaqueadas em números de $3,5 \times 10^4$ ou 5×10^4 por tratamento, em placas de 35 mm de diâmetro e, após 24 h, foram irradiadas com UVA, UVB ou UVC na presença de tampão PBS. As células eram mantidas em cultura e a cada 24 h eram coletadas em duplicata por 5 dias subsequentes; para isso as células tinham o meio de cultura removido e eram lavadas 3x com PBS, em seguida eram tripsinizadas e fixadas em solução de formaldeído e PBS para em seguida serem contadas em câmara de Fuchs-Rosenthal. Os dados obtidos foram plotados como uma curva para que se pudesse avaliar as respectivas diferenças proliferativas entre linhagens e clones em relação ao tempo de dobramento, após os respectivos tratamentos.

3.13 Distribuição das células nas fases do ciclo celular

Para esse ensaio, foram plaqueadas 2×10^5 células 24 h antes dos tratamentos com radiação ultravioleta. A partir do tratamento, uma cinética de 0 h, 6 h e 24 h foi utilizada para que pudessem ser notadas variações na distribuição das células nas fases do ciclo celular. As placas foram lavadas 3x com tampão PBS, antes de serem tripsinizadas, fixadas em etanol 80% e a cada coleta a suspensão de células era centrifugada a 1.500 rpm por 5 min. No dia da análise no citômetro, as células eram lavadas 3x com tampão PBS, para que o excesso de etanol fosse removido e, coradas com solução de iodeto de propídio (2 ug/mL iodeto de propídio, 0,1% triton x-100, 0,1% citrato de sódio e 10 ug/mL RNase em água milli-Q) durante 30 min à temperatura ambiente, antes de serem lidos 30.000 eventos para cada condição em um citômetro de fluxo (BD, FACS Verse).

3.14 Ensaio de senescência associado à β -galactosidase

Para o ensaio de senescência celular, 3×10^4 células foram plaqueadas em duplicata em placas de 35 mm de diâmetro 24 h antes da exposição à radiação ultravioleta. Após a irradiação as células retornaram para incubadora por 96 h. Passado esse tempo de incubação, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas 3x com PBS, fixadas com solução de fixação (2% formaldeído, 0,2% Glutaraldeído em PBS) por 3 min, lavadas 3x com PBS e adicionou-se 2 mL de solução de coloração pH 6 (5 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$, 2 mmol/L $MgCl_2$, 150 mmol/L NaCl, 30 mmol/L tampão fosfato/ Ácido cítrico, 5 mmol/L $K_4Fe(CN)_6$, 1 mg/mL X-Gal) e as placas foram mantidas incubadas por 18 h a 37 °C. Após esta incubação as células foram lavadas 2x com PBS e a análise foi feita contando células senescentes marcadas (azuis) com auxílio de um microscópio invertido (Olympus), utilizando contraste de fase. Foram contadas pelo menos 1000 células por placa. Os dados foram expressos em porcentagem de células marcadas em relação ao total de células contadas (adaptado de Forti, Armelin, 2007).

3.15 Autofagia celular

A análise da autofagia foi realizada por imunofluorescência, 48 h após tratamentos com UVA, UVB e UVC, onde a montagem das lâminas e lamínulas foi feita como descrito no item 3.10, após as células terem sido incubadas com anticorpo policlonal anti-LC3B (Invitrogen L10382), 1:500, por 1 h em temperatura ambiente, com anti-rabbit Alexa 488 e com anti-Faloidina conjugado com rodamina, 1:500, por 1 h à temperatura ambiente em ambiente úmido e escuro. As imagens foram obtidas por microscopia confocal (Carl Zeiss LSM-510) em objetiva de 100x.

Além de imunofluorescência, um ensaio de western blot foi realizado 48 h após exposição à UVA, UVB e UVC como descrito no item 3.8; o anticorpo primário anti-LC3B, diluído 1:1.000 em TBS-T, foi incubado overnight à 4 °C e em seguida o anticorpo secundário utilizado foi o anti-rabbit IRDye 680RD (LI-COR Biosciences) na diluição de 1:15.000, por 1 h a temperatura ambiente. As membranas foram reveladas utilizando Scanner Odyssey Infrared Image System (LI-COR Biosciences).

Em ambos experimentos foi utilizado cloroquina como controle positivo e, para isso, as células foram tratadas com 50 µM de cloroquina por 16 h à 37 °C.

3.16 Citometria de fluxo – Apoptose e necrose celular

A avaliação de morte celular por apoptose ou necrose em nossas células foi feita utilizando marcação celular dupla com anexina-V (anticorpo que reconhece a fosfatidilserina externalizada por células em apoptose) e iodeto de propídeo (marcador nuclear que se intercala ao DNA, quando a membrana está desestabilizada, permitindo sua entrada na célula) (Vermes et al., 2000).

Para o ensaio, 15×10^4 células foram plaqueadas em placas p35 mm, 24 h antes do tratamento com radiação ultravioleta (UVA, UVB e UVC). Utilizamos como controle positivo 60 J/m² de UVC. Após 48 h e 72 h dos tratamentos as células aderidas foram tripsinizadas em suspensão, coletadas e transferidas para tubos eppendorf, sendo centrifugadas a 1.500 rpm por 5 min a temperatura ambiente (centrífuga Eppendorf 5424). Em seguida as placas foram lavadas duas vezes com PBS, sendo que as células que se soltaram contidas no tampão PBS resultantes da lavagem, também foram coletadas por centrifugação e reunidas com as anteriores. As células ainda aderidas às placas foram tripsinizadas e também recuperadas por

centrifugação, foi feita uma lavagem subsequente das células com PBS e centrifugadas novamente.

Em seguida, todas as células coletadas e agrupadas foram ressuspensas cuidadosamente em tampão de ligação da Anexina-V (50 mM HEPES pH 7.4; 700 mM NaCl; 12.5 mM CaCl₂), para ficar com concentração de 1×10^6 células/mL. Foi coletado 100 μ L da suspensão celular (1×10^5 células) e adicionado 5 μ L de Anexina-V conjugada com FITC (BD Biosciences) e 1,5 μ L de iodeto de propídeo (1 mg/mL). As amostras foram incubadas por 15 min a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação foi adicionado 400 μ L de tampão de ligação da Anexina-V e as células (20.000 eventos/ condição) foram analisadas por citometria de fluxo (citômetro FACS-Verse BD Biosciences) usando como excitação 488 nm e emissão 560 nm para iodeto de propídeo e excitação 496 nm e emissão 520 nm para Anexina-V-FITC. Os dados obtidos foram analisados com o software Kaluza 1.3 Flow Analysis (Beckman Coulter).

As células foram classificadas em: células viáveis (Anexina V- / PI-), células em apoptose inicial (Anexina V+ / PI-), células em apoptose tardia (Anexina V+ / PI+), células em necrose (Anexina V- / PI+).

3.17 Ensaio de cometa alcalino

Para o ensaio de cometa alcalino, foram plaqueadas 2×10^5 células, 24 h antes dos tratamentos com radiação. Após a irradiação com lâmpadas específicas para UVA, UVB ou UVC as células foram coletadas por tripsinização, misturadas em um gel de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (LMP) a 37 °C e a mistura foi aplicada em uma lâmina, contendo uma fina camada de 1,5% de agarose de normal ponto de fusão previamente preparada, e incubada a 4 °C por 15 min até solidificar. As células foram lisadas em solução de lise (10 mmol/L Tris pH 10, 2,5 mmol/L NaCl, 100 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100 e 10% DMSO) por 18 h em geladeira, para que se obtivessem nas lâminas apenas o núcleo aderido à matriz extracelular.

Após a lise, as lâminas foram colocadas numa cuba de eletroforese horizontal, onde foi adicionado tampão de eletroforese (300 mmol/L NaOH, 1 mmol/L EDTA) gelado até cobrir as lâminas, e o sistema foi mantido em repouso em câmara fria à 4 °C, por 30 min para que o DNA desnaturasse. Em seguida as lâminas foram submetidas à eletroforese sob corrente de 1 V/cm e 300 mA por 30 min, à 4 °C em

seguida as lâminas foram incubadas em tampão de neutralização (0,4 mmol/L Tris-HCl pH 7,5) durante 15 min e armazenadas a 4 °C. Para análise, o DNA foi corado com brometo de etídeo e visualizado em microscópio de fluorescência. A análise dos danos no DNA foi expressa como momento de cauda (olive tail moment, ou OTM), que é dado pela multiplicação da porcentagem de DNA na cauda pelo tamanho da cauda; esses parâmetros foram obtidos através do software Komet 6.0 (Andor) e foram analisadas 50 células em duplicata por amostra em cada experimento adaptado de Singh et al., 1988).

3.18 HCR

O ensaio de reativação pela célula hospedeira foi utilizado para medir a capacidade da célula hospedeira em reparar DNA exógeno lesado através do uso do gene repórter da luciferase.

A linhagem HeLa bem como os clones mutantes da GTPase RhoA foram plaqueadas em placas multi-well de 96 poços, em uma densidade de 2×10^4 células/poço e após 24 h, foram transfectadas com lipofectamina e os plasmídeos pShuttle MCS (luciferase) e pRL SV40 (renilla), que carregam os genes repórter da luciferase e renilla, respectivamente, clonados nos sítios Nhe I e Xba I. Os plasmídeos pShuttle MCS (luciferase) foram previamente tratados com diferentes doses de UVA (100 KJ/m², 200 KJ/m² e 300 KJ/m²), UVB (1 KJ/m², 2 KJ/m² e 4 KJ/m²) e UVC (200 J/m², 400 J/m² e 800 J/m²) para a geração das lesões no DNA. Após 48 h, adicionou-se substratos para o produto dos genes reporter luciferase (luciferina) e para o gene controle renilla, conforme recomendações do kit Dual-Glo Luciferase Assay Systems (Promega), e a luminescência dos poços foi quantificada em triplicatas de amostras e duplicatas de réplicas biológicas em um luminômetro (GloMax®, Promega).

3.19 Imunofluorescência para análise de dímeros de pirimidina

Para acompanhar o estabelecimento e reparo de dímeros de pirimidina formados no DNA após exposição às radiações UVA, UVB e UVC a metodologia de imunofluorescência foi utilizada nas linhagens parentais HeLa e MeWo, bem como nas sublinhagens RhoA-V14 e RhoA-N19, em tempos de 0 h, 6 h, 24 h e 48 h pós irradiação. As células foram plaqueadas em uma densidade de 1×10^5 células em

placas de 35 mm de diâmetro (Corning) contendo lamínulas de vidro redondas de 13 mm e mantidas em incubadora com atmosfera de 5% CO₂ e 37 °C por 24 h até o tratamento com radiação ultravioleta dos tipos A, B e C.

Nos tempos desejados, as células foram fixadas em solução de 4% paraformaldeído por 5 min, permeabilizadas com solução 0.5% Triton X-100 e seguia-se com desnaturação do DNA com 2 M HCl (por 30 min à 90 °C), para posterior bloqueio de 30 min (3% BSA/ 10% SFB/ PBS), incubação de anticorpo primário anti-CPD (Cosmo Bio Co, LTD-Japão) diluído 1:200 por 2 h à 4 °C e, por fim anticorpo secundário Alexa-Fluor 568 por 1 h à temperatura ambiente. Para montagem das lamínulas nas lâminas foi utilizado vectashield contendo DAPI (1 µg/mL). A aquisição das imagens foi realizada em microscópio de fluorescência confocal (Zeiss LSM-510) com objetivas de aumento de 100x e aproximadamente 100 núcleos foram analisados por condição em cada experimento realizados em triplicata, onde mediu-se a fluorescência de cada núcleo emitida pelas lesões de CDPs, delimitados e normalizados pelo número de núcleos corados por DAPI.

3.20 Inibição da GTPase RhoA pela toxina C3

A inibição da atividade da proteína RhoA endógena foi realizada nas linhagens após transfecção transiente (lipofectamine 2000 Invitrogen) com um plasmídeo pEF-myc (Invitrogen) carregando sequência codificante para a exoenzima C3 transferase de *Clostridium botulinum*, que seletivamente inibe a atividade das proteínas RhoA, RhoB e RhoC. Esse plasmídeo foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Gary Bokoch (The Scripps Research Institute, La Jolla-CA-USA).

As células foram plaqueadas em placas p100 e mantidas em cultura até confluência de 80% quando então era realizada a transfecção, de acordo com o protocolo do fabricante e descrito brevemente aqui: inicialmente 2 complexos eram formados, complexo A (14 µg de DNA plasmidial em 500 µL de meio DMEM sem SBF e sem antibiótico) e complexo B (14 µL de lipofectamina em 500 µL de meio DMEM sem SBF e sem antibiótico), que foram incubados a temperatura ambiente por 5 min; em seguida as soluções contidas nos complexos A e B foram misturadas e incubadas a temperatura ambiente por outros 20 min. As células aderidas às placas foram lavadas duas vezes com meio DMEM sem SBF e sem antibióticos, e a mistura dos

tubos A+B foi adicionada as células, mantidas incubadas por 6 h e após esse tempo o meio foi trocado por DMEM+10% SBF e as células retornadas a incubadora.

Após 12 h, 24 h e 48 h de transfecção, pode-se observar uma redução na atividade da proteína RhoA através de ensaios de Pull-Down, sendo o melhor tempo de inibição o de 24 h, quando então as células eram tratadas com 4 J/m² de UVC e redistribuídas em novas placas de tamanhos e em densidades variáveis de acordo com o experimento a ser realizado.

3.21 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados utilizando teste *t* de Student, onde a significância foi considerada com $P < 0.05$, ou two-way ANOVA, e expressos em média \pm desvio padrão de réplicas experimentais. Foi utilizado o software GraphPad Prism 6 (San Diego, CA) para a representação gráfica de todos os resultados.

4 **RESULTADOS**

4.1 **Caracterização da modulação da atividade da GTPase RhoA nas linhagens celulares HeLa e MeWo**

4.1.1 ***Caracterização das sublinhagens de células HeLa e MeWo mutantes para a GTPase RhoA***

Inicialmente, a abordagem escolhida para investigar a modulação da atividade da proteína RhoA foi a utilização de sublinhagens estáveis que expressam cDNA exógeno para mutações da proteína em estado constitutivamente ativo (RhoA-V14), através da substituição de Ala por Val na posição 14, ou dominante negativo (RhoA-N19) com substituição de Thr por Asn na posição 19), mutações previamente utilizadas em fibroblastos (Qiu et al., 1995).

As sublinhagens mutantes RhoA-V14 e RhoA-N19 para a linhagem de adenocarcinoma de cérvix HeLa foram estabelecidas pelo Prof. Dr. Fábio Luís Forti enquanto os mutantes da linhagem de melanoma MeWo foram estabelecidas por mim, com protocolo descrito na seção 3.2. Como caracterização inicial da atividade de RhoA nessas sublinhagens, a aluna de doutorado Juliana Harumi Osaki analisou tais mutantes através do ensaio de pull-down, que se baseia na capacidade de ligação da proteína RhoA em seu estado ativo (RhoA-GTP) à proteína Rhotekin, específica para a GTPase RhoA, método descrito na seção 3.6 (Osaki et al., 2016).

Adicionalmente, por RhoA se apresentar com papel fundamental na migração celular, principalmente em adesão e motilidade do citoesqueleto (Ridley et al., 2003), foram realizados ensaios de biológicos de risco (“wound healing assay”) com as linhagens parentais HeLa e MeWo e seus respectivos mutantes RhoA-V14 ou RhoA-N19, em condições controle ou após exposição à radiação ultravioleta. Paralelamente, as linhagens parentais e as sublinhagens foram submetidas ao ensaio de risco após tratamento com Mitomicina C, que atua bloqueando a replicação de DNA através de crosslinks formados na dupla fita, para garantir a análise da migração após o risco, com ou sem tratamento posterior, e não a proliferação das células nas bordas dos riscos (Tomasz et al., 1988).

Os dados obtidos após ensaios de risco na linhagem parental HeLa e nas sublinhagens quando exposta à radiação mostram uma superioridade na migração da linhagem parental bem como do mutante RhoA-V14, que apresentaram redução da

fenda inicial de 90 e 80% após 24 h na condição controle, em relação à HeLa-RhoA-N19 com redução de aproximadamente 65% (Figura 9A).

A diferença notada entre as linhagens sem prévia exposição à radiação é acentuada após estresse, quando o mutante RhoA-N19 se mostra inferior às outras linhagens após tratamentos com UVA, UVB e UVC (Figura 9A), o que fica explícito também quando analisados campos representativos das fotos quantificadas nos experimentos (Figura 9B).

Como comentado previamente, as linhagens foram submetidas à tratamento com mitomicina C (Figura 9C), para demonstrar que a dificuldade de migração encontrada na HeLa-RhoA-N19 não se trata de uma resposta causada por uma menor proliferação celular e sim, por uma migração afetada pela menor atividade endógena da proteína RhoA. Podemos observar que o mutante RhoA-N19 apresenta redução na fenda de aproximadamente 60% nas condições controle e após mitomicina, a linhagem parental e o mutante RhoA-V14 também mantém as reduções de 90 e 80% respectivamente.

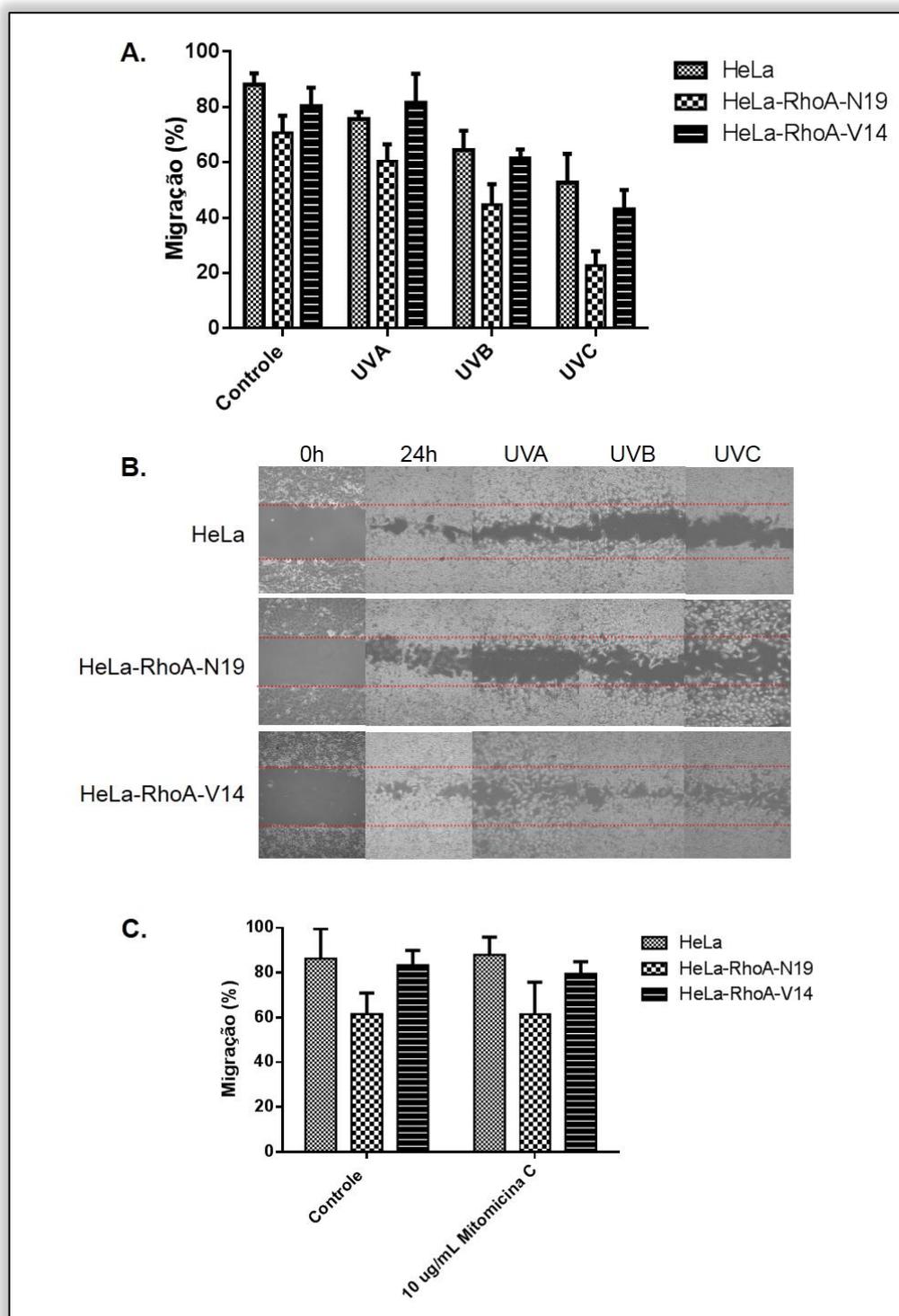


Figura 9. A sublinhagem HeLa-RhoA-N19 apresenta redução na sua motilidade. Ensaio de migração em risco das linhagens HeLa, HeLa-RhoA-N19 e HeLa-RhoA-V14. A. Porcentagem de migração encontrada após tratamentos com 597 J/m² de UVA, 90 J/m² de UVB e 6 J/m² de UVC; B. Painéis representativos das fendas analisadas e quantificadas nos tempos 0h e após 24h de tratamento; C. Migração das linhagens após 24h de tratamento com Mitomicina C, sem exposição à radiação.

Para averiguar se a diminuição da atividade enzimática de RhoA possuía efeito semelhante na linhagem MeWo e seus mutantes, ensaios de migração celular semelhantes foram realizados (Figura 10). As doses de radiação ultravioleta utilizadas na linhagem parental MeWo, bem como em seus respectivos mutantes RhoA-N19 ou RhoA-V14 foram definidas após ensaio de equivalência genotóxica entre as linhagens parentais HeLa e MeWo, onde diferentes doses de UVA, UVB e UVC testadas refletiam uma equivalência na sobrevivência celular em ensaios clonogênicos (dados não mostrados).

Quando avaliamos a diferença na capacidade migratória da linhagem mutante MeWo-RhoA-N19 em relação à MeWo e MeWo-RhoA-V14, a deficiência na redução da fenda fica ainda mais evidente do que no caso da linhagem HeLa e suas sublinhagens. Enquanto o mutante RhoA-N19 apresenta uma redução na fenda de 30% após 24h, as linhagens parental e RhoA-V14 apresentam uma redução de 70 e 60%, respectivamente.

A porcentagem de migração se encontra reduzida para RhoA-N19 após tratamentos com UVA, UVB e UVC em relação às outras linhagens (Figura 10A). O painel de fotos dos campos representativos dos ensaios de migração com ou sem tratamento com radiação ultravioleta A, B ou C confirmam a importância da atividade de RhoA durante movimento migratório na linhagem de melanoma, assim como observado anteriormente com a linhagem de adenocarcinoma (Figura 10B).

Novamente, para comprovar que a sublinhagem MeWo-RhoA-N19 possui uma capacidade migratória reduzida relacionada à menor atividade de RhoA e não a um possível atraso na divisão celular, as linhagens foram submetidas à Mitomicina C sem prévia exposição à radiação ultravioleta (Figura 10C). Estes resultados mostraram efetivamente diferenças na motilidade das diferentes sublinhagens, enquanto a linhagem RhoA-N19 apresentou 50% na redução da fenda inicial, as linhagens MeWo e MeWo-RhoA-V14 apresentaram uma redução de aproximadamente 80%.

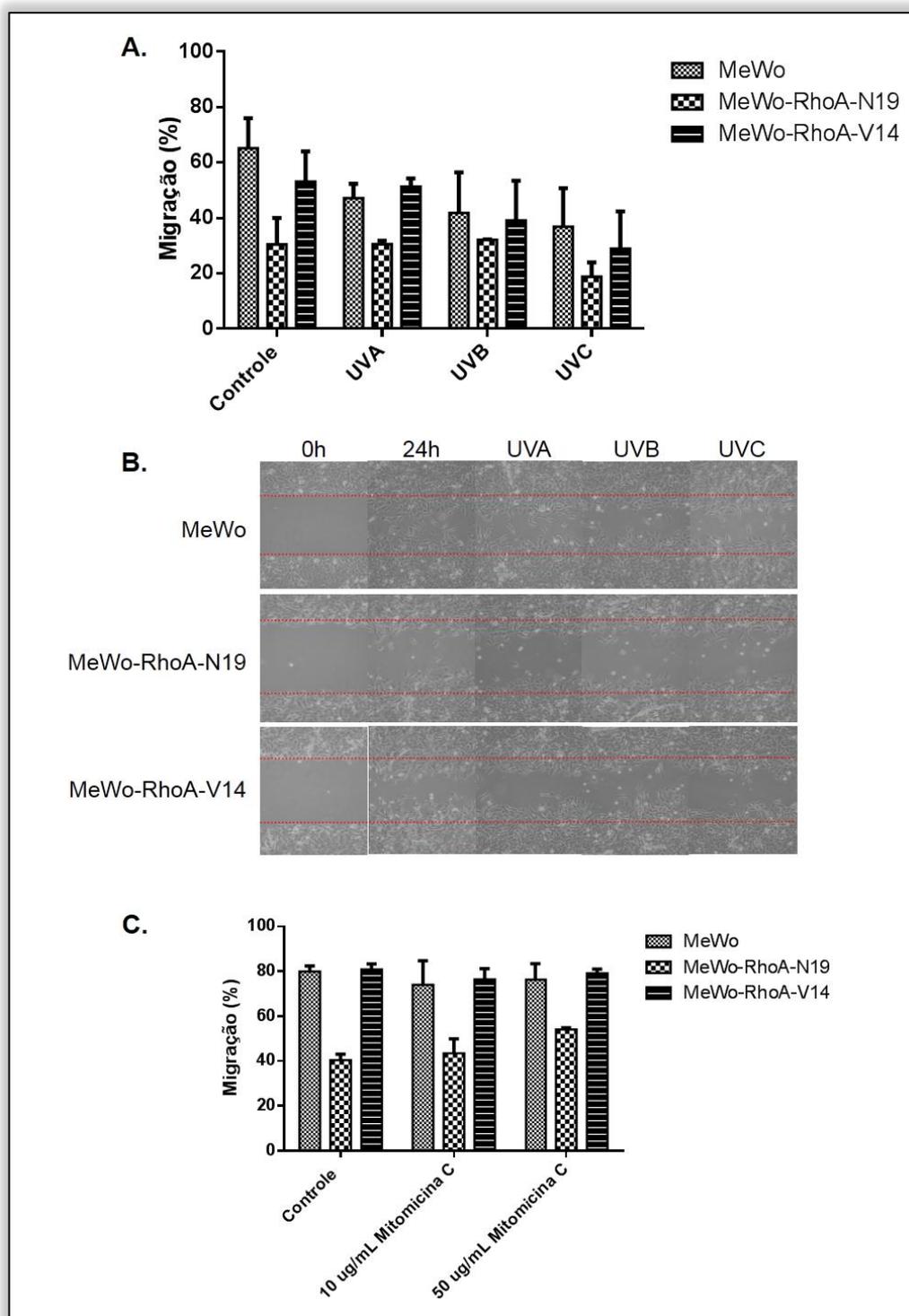


Figura 10. A sublinhagem MeWo-RhoA-N19 apresenta redução em sua motilidade. Ensaio de migração em risco das linhagens MeWo, MeWo-RhoA-N19 e MeWo-RhoA-V14. A. Porcentagem de migração encontrada após tratamentos com 50 KJ/m² de UVA, 80 J/m² de UVB e 4 J/m² de UVC; B. Painéis representativos das fendas analisadas e quantificadas nos tempos 0h e após 24h de tratamento; C. Migração das linhagens após 24h de tratamento com Mitomicina C, sem exposição à radiação.

Finalmente, para constatar a modulação da atividade da GTPase RhoA nos mutantes RhoA-N19 e RhoA-V14 das linhagens HeLa e Mewo, uma investigação do panorama geral de fibras de estresse foi feita por ensaios de imunofluorescência com marcação para Faloidina, já que a GTPase RhoA tem papel fundamental na formação e ativação desses filamentos de actina através de suas principais proteínas efetoras ROCK e mDIA (Ridley, Hall, 1992).

Através de microscopia confocal o que pode ser observado na Figura 11 foi que os mutantes RhoA-N19 das linhagens HeLa e MeWo apresentam menor quantidade de fibras e, além disso as fibras formadas possuem estrutura menos espessa, mais descontínua e fragmentada, quando comparadas às linhagens parentais e aos mutantes com a GTPase RhoA em seu estado constitutivamente ativo (RhoA-V14).

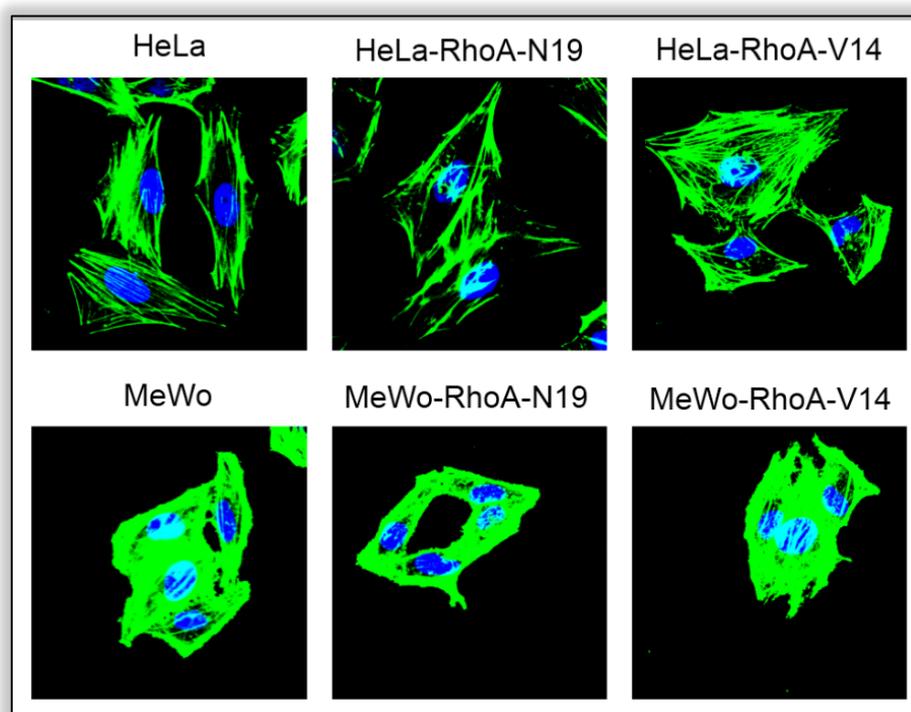


Figura 11. Formação de fibras de estresse nas linhagens HeLa e MeWo em comparação aos seus respectivos mutantes RhoA-N19 e RhoA-V14. A formação dos filamentos de actina foi observada após imunofluorescência das linhagens com anticorpo anti-Faloidina (Invitrogen) conjugado com Alexa-Fluor 488 (verde), diluído 1:500 em 3% BSA / 10% SFB / PBS e incubado por 2 h à temperatura ambiente. O núcleo das células foi marcado com DAPI (azul), as imagens foram obtidas por microscopia confocal (Carl Zeiss LSM-510) em objetiva de 100x..

4.1.2 Inibição da atividade endógena da GTPase RhoA pela exoenzima C3 nas linhagens HeLa e MeWo

A exoenzima C3, secretada pela bactéria *Clostridium Botulinum*, catalisa a ADP ribosilação das proteínas RhoA, RhoB e RhoC no resíduo de asparagina localizado na posição 41. Tal aminoácido está localizado próximo à região de ligação aos efetores de Rho e assim a GTPase é inibida perdendo sua capacidade de enviar sinais celulares a jusante através das proteínas efetoras (Lerm et al., 2000).

Na Figura 12 podemos observar os resultados de immunoblotting seguidos aos ensaios de pull-down realizados nas linhagens HeLa e MeWo 24 h após a transfecção com plasmídeo codifica para a exoenzima C3, o que confirma a inibição da GTPase RhoA, esses resultados foram obtidos em colaboração com a Dra. Juliana Harumi Osaki.

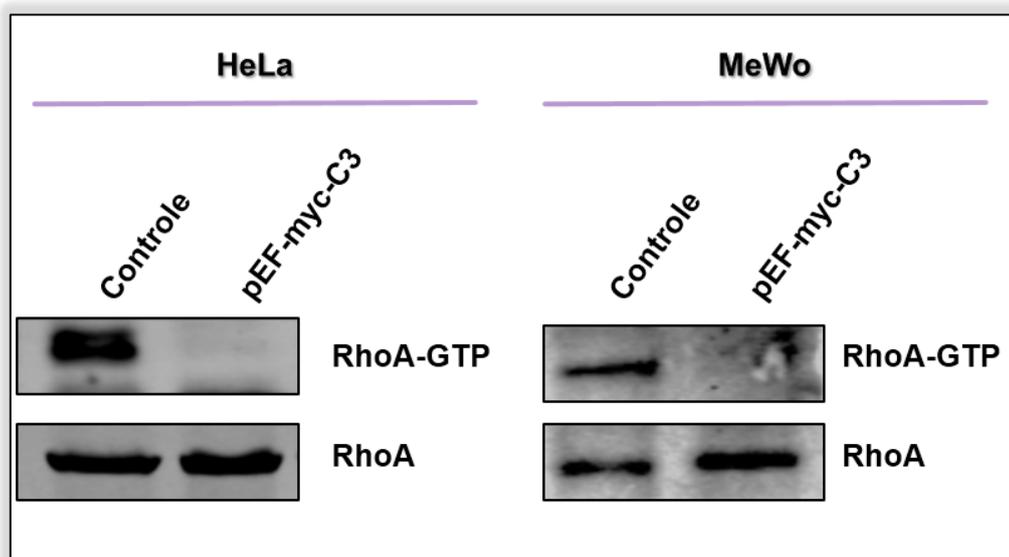


Figura 12. Inibição da atividade da GTPase RhoA endógena pela toxina C3 nas linhagens HeLa e MeWo. As linhagens HeLa e MeWo foram transfectadas em placas de 100mm com 14µg de plasmídeo pEF-myc-C3, 24h após a transfecção o ensaio de pull-down foi realizado e os níveis de RhoA total e ativo (ligado a GTP) foram avaliados por western blot utilizando anticorpo anti-RhoA. Como controle foram utilizados lisados celulares das células não transfectadas com pEF-myc-C3 no ensaio de pull-down.

4.2 Efeitos da modulação da atividade GTPásica de RhoA na formação de danos e no posterior reparo de DNA após exposição das linhagens HeLa e MeWo à radiação ultravioleta

4.2.1 A diminuição da atividade RhoA leva à uma maior sensibilidade ao dano e a um atraso ou ineficiência do reparo do DNA após radiação ultravioleta

Como parâmetro inicial e mais geral de avaliação de dano e reparo de DNA foi utilizado o ensaio de cometa alcalino, uma metodologia que consiste na detecção e quantificação dos danos causados no DNA em células únicas após corrida eletroforética. O cometa alcalino foi utilizado por possuir uma maior capacidade de desnaturação do DNA e é capaz de detectar não só quebras duplas, como no caso do cometa neutro, mas também quebras simples e lesões de sítios alcalinos lábeis, danos conhecidamente induzidos por radiação ultravioleta (Singh et al., 1988).

Tal experimento é capaz de indicar diversos padrões quantificáveis úteis, como comprimento da cauda formada após eletroforese e migração de conteúdo genômico fragmentado, relação entre DNA na cauda/DNA na cabeça do cometa etc. O critério escolhido para análise dos nossos dados foi o Olive Tail Moment, que avalia o comprimento da cauda formada em relação à porcentagem de DNA contida na mesma em relação à quantidade de DNA total de cada núcleo (Calini et al., 2002).

Ao avaliar a linhagem parental HeLa e as sublinhagens HeLa-RhoA-N19 e HeLa-RhoA-V14 em tempos de 0,5 h, 3 h e 6 h após exposição por radiação ultravioleta do tipo A (Figura 13A), pudemos observar tanto uma maior sensibilidade do mutante dominante negativo em relação às outras duas linhagens (3h), devido ao maior valor de OTM, quanto um atraso no reparo, visto que em 6h as linhagens parental e o mutante RhoA-V14 já possuem OTM semelhante ao controle e o RhoA-N19 ainda apresenta danos significativos.

Quando expostas à UVB (Figura 13B), a maior sensibilidade à radiação ultravioleta persiste na sublinhagem HeLa-RhoA-N19 em relação à linhagem parental de adenocarcinoma de cérvix e ao mutante constitutivamente ativo, após 3 h de tratamento, o que se repete quando tratamos as células com 6 J/m² de UVC (Figura 13C). Quanto ao tempo necessário de reparo após radiação ultravioleta do tipo B, pudemos observar o mesmo padrão avaliado após UVA; após 6 h a linhagem parental bem como o clone RhoA-V14 tiveram seu DNA reparado mais efetivamente que o mutante RhoA-N19, que continua com níveis de danos elevados (Figura 13B). A

diferença entre o mutante dominante negativo RhoA-N19 em relação à linhagem HeLa, encontrada após 6 h de estresse induzido por UVC, também foi significativamente estatística (Figura 13C).

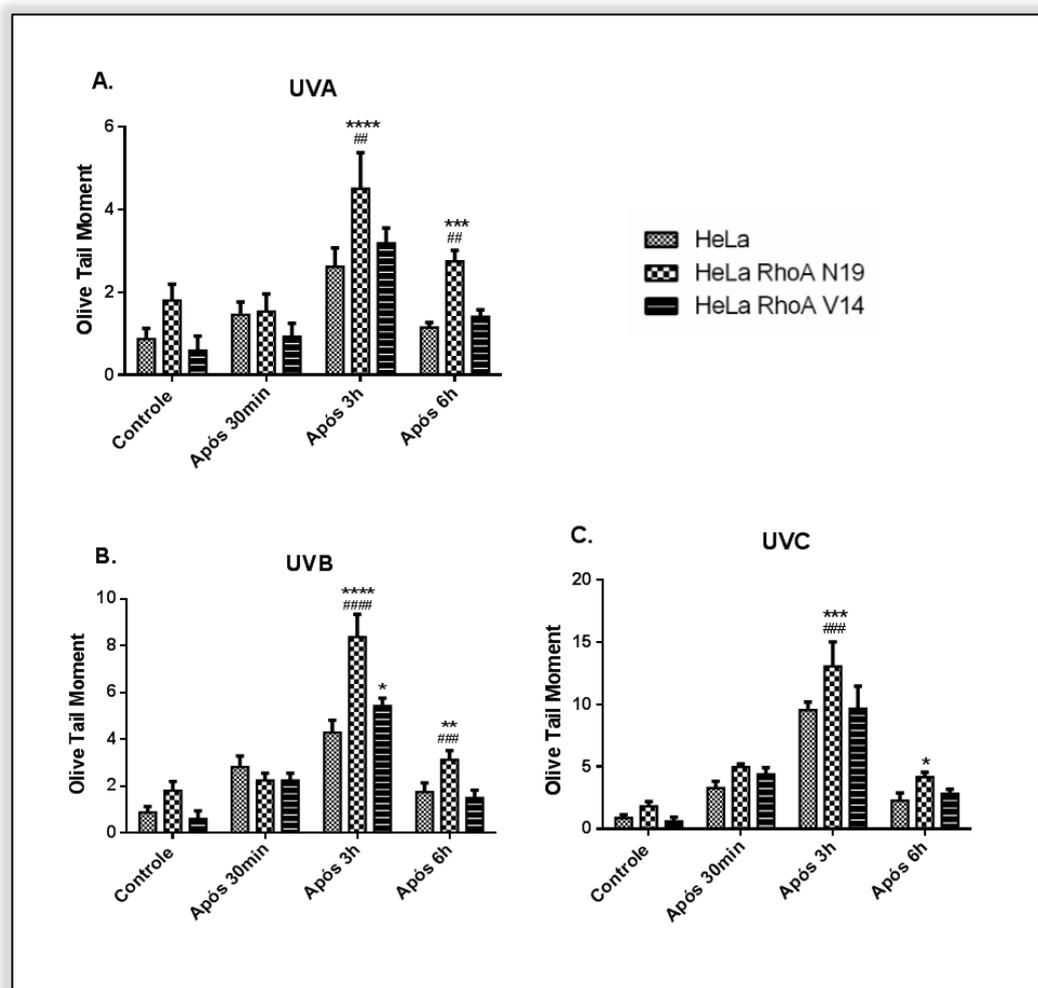


Figura 13. A sublinhagem HeLa-RhoA-N19 apresenta maior sensibilidade e um atraso no reparo do DNA após tratamentos com UVA, UVB e UVC. A. Ensaio de cometa alcalino linhagens celulares HeLa, HeLa-RhoA-N19 e HeLa-RhoA-V14 após tratamento com 597 J/m² de UVA; B. Olive Tail Moment após exposição à 90 J/m² UVB; C. Quantificações após 6 J/m² de UVC. As células foram expostas à UVA, UVB ou UVC. Após a radiação as células foram coletadas em diferentes tempos (0; 0,5; 3 e 6h). Os cometas foram analisados utilizando o software Komet 6.0 (Andor). Os gráficos são a representação de triplicata experimental independente. Teste estatístico two-way ANOVA *P<0.1; ** ##P<0.01*** ###P<0.001; **** #####P<0.0001. * representa análise entre a linhagem parental versus as sublinhagens; # representa análise entre os mutantes HeLa-RhoA-N19 e HeLa-RhoA-V14.

Na figura 14, podemos analisar um painel de fotos representativas utilizadas para acompanhar a redução das caudas dos cometas formados nas linhagens HeLa, HeLa-RhoA-N19 e HeLa-RhoA-V14. Podemos visualizar que nos tempos de 6h após exposição à UVA, UVB ou UVC os núcleos das linhagens HeLa e HeLa-RhoA-V14 possuem fragmentação próxima aos controles, demonstrando uma recuperação total

dos danos causados pela radiação. No caso da linhagem MeWo-RhoA-N19, percebemos que em 6 h, embora haja diminuição das caudas detectadas nos tempos de 3 h, a fragmentação dos núcleos persiste, indicando que o reparo do DNA está com um atraso.

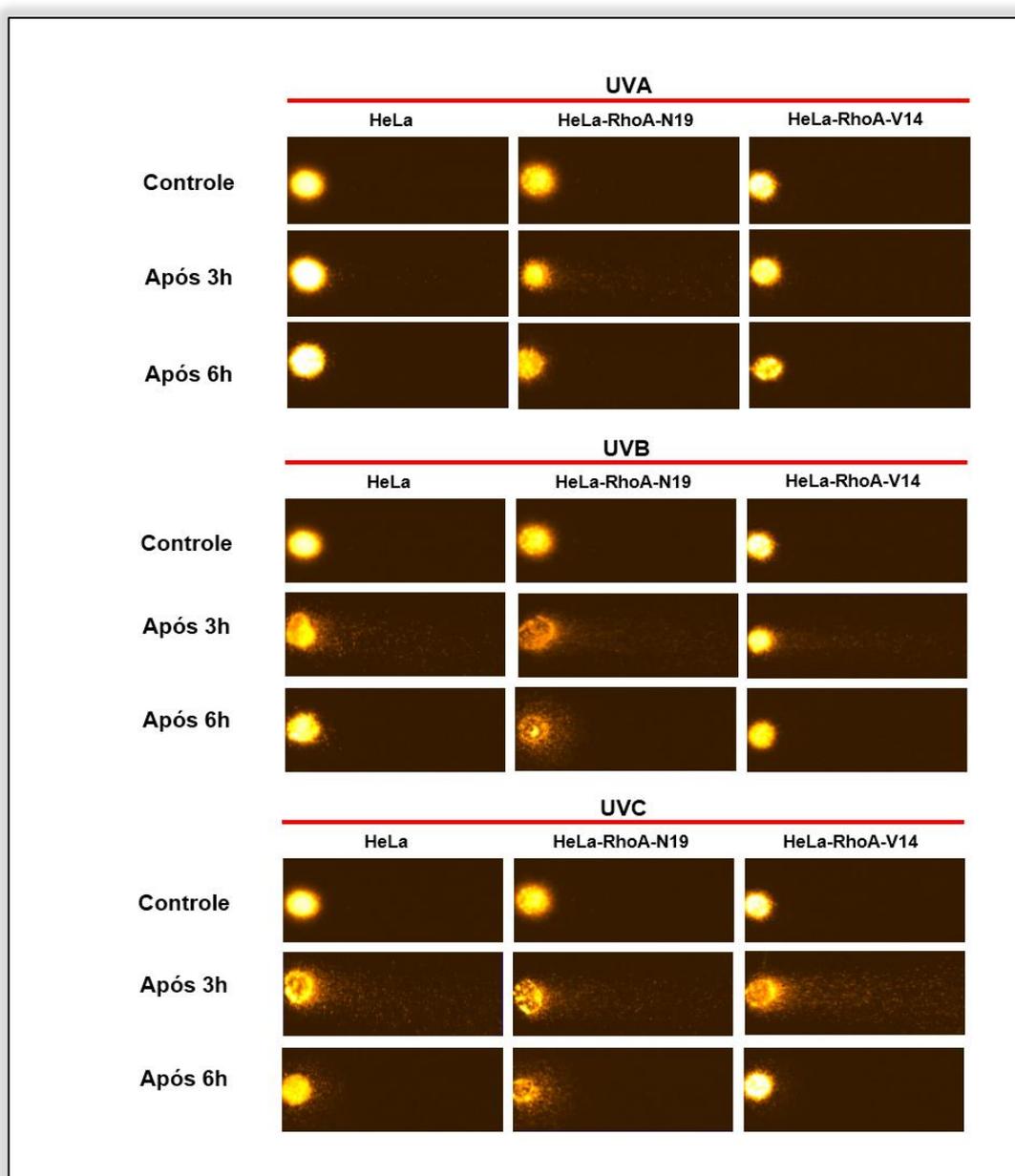


Figura 14. A sublinhagem HeLa-RhoA-N19 apresenta maior fragmentação nuclear após 6h de tratamento com UVA, UVB e UVC. Fotos representativas do ensaio de cometa alcalino das linhagens HeLa, HeLa-RhoA-N19 e HeLa-RhoA-V14 após tratamento com 597 J/m² de UVA; 90 J/m² UVB e 6 J/m² de UVC. Os cometas foram analisados utilizando o software Komet 6.0 (Andor). Aproximadamente 100 núcleos foram capturados em cada condição por experimento. O painel representa os núcleos analisados após triplicata experimental.

Ao realizar o ensaio de cometa alcalino na linhagem de melanoma MeWo e em suas respectivas sublinhagens, podemos perceber uma maior capacidade de reparo delas em relação às células de adenocarcinoma de cérvix, visto que após 6 h não existem diferenças estatísticas entre a parental e os mutantes, embora o mutante RhoA-N19 ainda apresente um padrão mais elevado de danos quanto ao Olive Tail Moment (Figura 15). Ainda assim, a modulação da atividade da proteína RhoA se mostra importante nas células de melanoma, visto que após radiação ultravioleta do tipo A, o mutante dominante negativo apresenta dano significativamente superior em relação ao mutante RhoA-V14 após 0,5 h de tratamento (Figura 15A).

A maior sensibilidade à radiação ultravioleta do mutante RhoA-N19 é percebida quando o tratamento é feito com UVB (0,5 h); a linhagem parental e a sublinhagem HeLa-RhoA-V14 apresentam dano inferior ao mutante RhoA-N19, mostrando assim um possível papel da proteína RhoA na proteção das células após indução de estresse genotóxico (Figura 15B). Em relação à UVC, pudemos perceber uma maior suscetibilidade do mutante RhoA-N19 em relação a linhagem parental MeWo no que se refere à fragmentação do DNA após 0,5 h, embora não tenhamos notado diferenças estatisticamente significativas entre os mutantes RhoA-N19 e RhoA-V14 (Figura 15C).

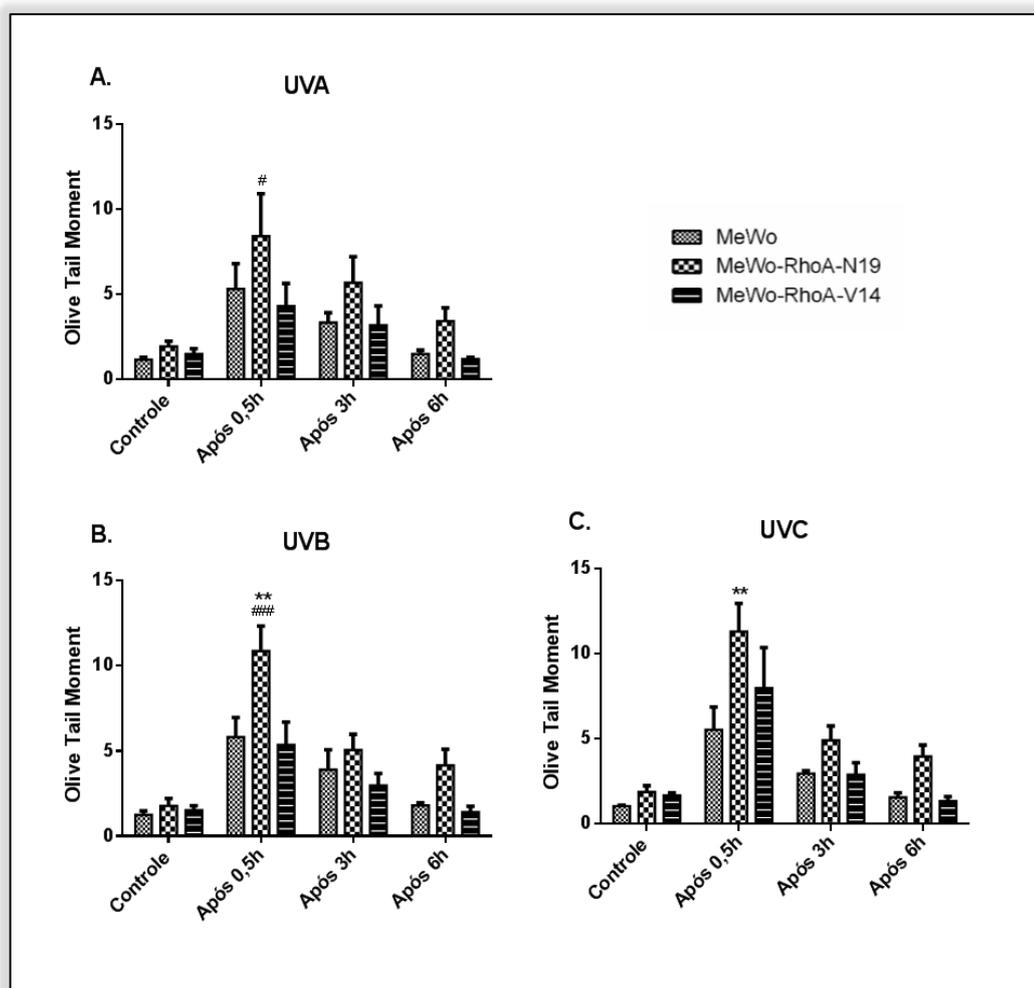


Figura 15. A diminuição da atividade da proteína RhoA sensibiliza a sublinhagem MeWo-RhoA-N19 após tratamentos com UVA, UVB e UVC. A. Ensaio de cometa alcalino das linhagens celulares MeWo, MeWo-RhoA-N19 e MeWo-RhoA-V14 após tratamento com 50 KJ/m² de UVA; B. após exposição à 80 J/m² UVB; C. após exposição à 4 J/m² de UVC. As células foram expostas à UVA, UVB ou UVC. Após a radiação as células foram coletadas em diferentes tempos (0; 0,5; 3 e 6h). Os cometas foram analisados utilizando o software Komet 6.0 (Andor). Os gráficos são a representação de triplicata experimental independente. Teste estatístico two-way ANOVA #P=0.0145; **P=0.0023; ###P=0.0005. * representa análise entre a linhagem parental versus as sublinhagens; # representa análise entre os mutantes HeLa-RhoA-N19 e HeLa-RhoA-V14.

Na figura 16, podemos analisar um painel de fotos representativas utilizadas para acompanhar a redução das caudas dos cometas formados nas linhagens MeWo, MeWo-RhoA-N19 e MeWo-RhoA-V14. Podemos visualizar que nos tempos de 6h após exposição à UVA, UVB ou UVC os núcleos das linhagens MeWo, MeWo-RhoA-N19 e MeWo-RhoA-V14 possuem fragmentação próxima aos controles, demonstrando uma recuperação total dos danos causados pela radiação. Já nos tempos de 3h, podemos detectar uma maior fragmentação dos núcleos do mutante

RhoA-N19 em relação à linhagem MeWo e ao mutante RhoA-V14, demonstrando uma maior sensibilidade da linhagem de melanoma aos danos causados por radiação ultravioleta quando a atividade de RhoA é reduzida.

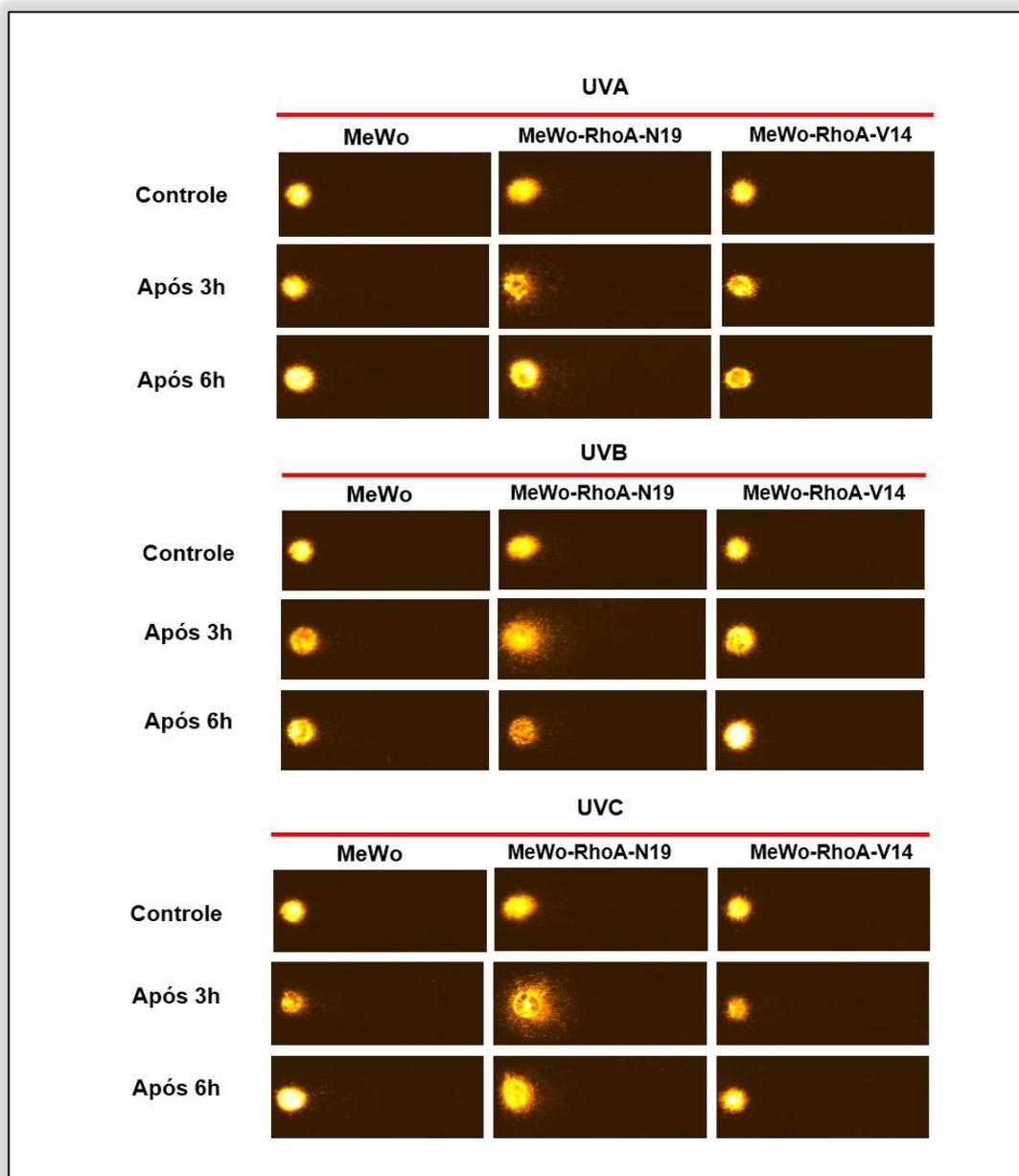


Figura 16 A sublinhagem MeWo-RhoA-N19 apresenta maior fragmentação nuclear após 3h de tratamento com UVA, UVB e UVC. Fotos representativas do ensaio de cometa alcalino das linhagens MeWo, MeWo-RhoA-N19 e MeWo-RhoA-V14 após tratamento com 50 KJ/m² de UVA; 80 J/m² UVB e 4 J/m² de UVC. Os cometas foram analisados utilizando o software Komet 6.0 (Andor). Aproximadamente 100 núcleos foram capturados em cada condição por experimento. O painel representa os núcleos analisados após triplicata experimental.

Em paralelo, a GTPase RhoA endógena foi inibida nas linhagens parentais HeLa e MeWo através da transfecção das células com a exoenzima C3, para

averiguar a possibilidade de confirmação dos dados obtidos nos ensaios de cometa com os mutantes RhoA-N19. Como podemos observar no ensaio de cometa alcalino da linhagem HeLa após transfecção com C3 e tratamentos com UVA, UVB e UVC (Figura 17) o atraso no reparo é persistente após 6 h, repetindo o dado observado na sublinhagem mutante HeLa-RhoA-N19. Esses resultados reafirmam um potencial papel da proteína Rho na sinalização celular para vias de reparo de DNA.

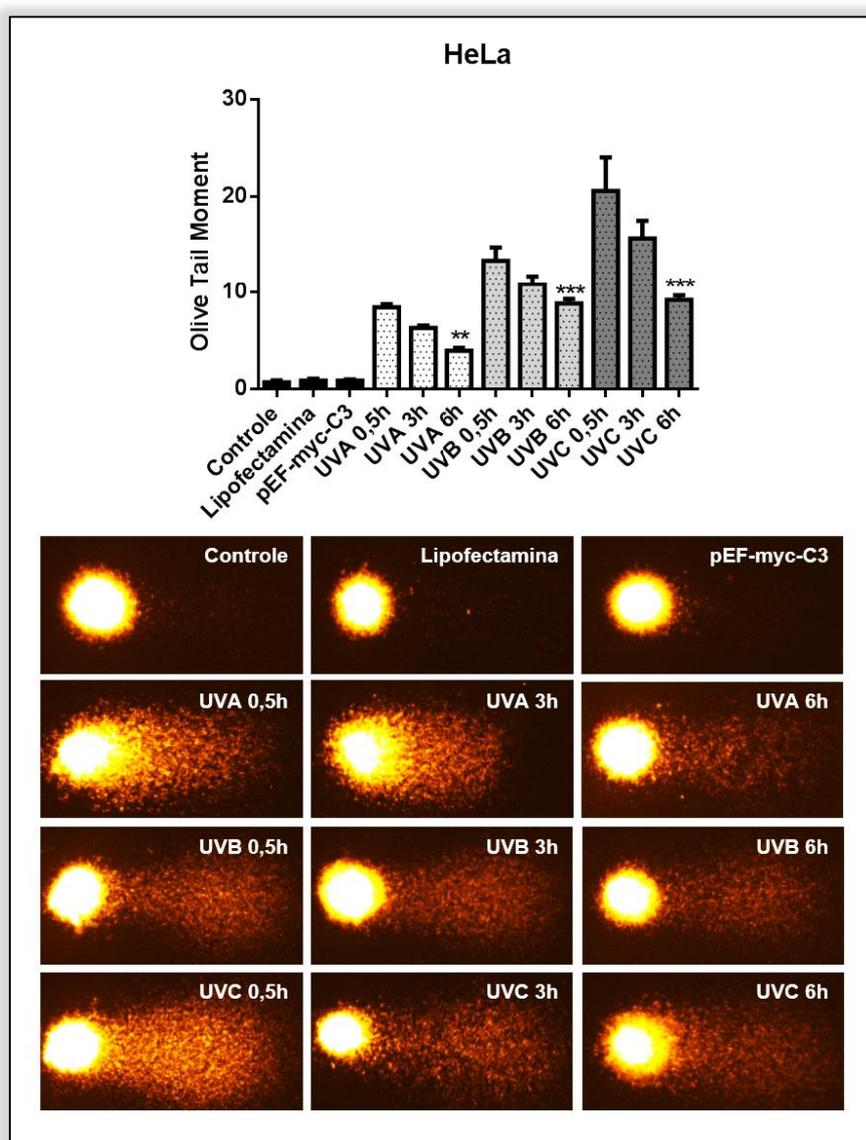


Figura 17. A maior sensibilidade ao dano e o atraso do reparo persiste na linhagem parental HeLa após inibição da proteína RhoA endógena. Ensaio de cometa alcalino da linhagem HeLa após transfecção com pEF-myc-C3 e painel representativo dos cometas analisados e quantificados. As células foram transfectadas com 14 μ g de plasmídeo em placas de 100mm, 24h após a transfecção elas foram distribuídas em placas de 35mm em densidade de 2×10^5 células, após tempo de adesão as células foram submetidas a tratamentos com 50 KJ/m^2 de UVA, 80 J/m^2 de UVB e 4 J/m^2 de UVC, para então serem submetidas à corrida eletroforética em condições alcalinas. Os resultados são a média de triplicata experimental. Foi utilizado para análise estatística teste t, onde $*P < 0.05$ entre tratamentos versus controle.

No caso da linhagem de melanoma, após 6 h de tratamento com radiação ultravioleta do tipo A, B ou C, a sublinhagem MeWo-RhoA-N19 embora apresentasse um padrão elevado de dano no DNA não mostrava diferença estatística em relação às outras linhagens, como demonstrado anteriormente. Todavia, quando a linhagem de melanoma MeWo têm a proteína Rho endógena inibida por C3 é possível observar que após 6h de exposição à UVA, UVB ou UVC, as lesões formadas no DNA persistem, indicando um atraso na recuperação das lesões formadas no material genético (Figura 18).

Após os ensaios de cometa alcalino, pudemos observar que quando as linhagens possuem a proteína RhoA endógena inibida por C3 (Figuras 17 e 18), elas se tornam mais suscetíveis à fragmentação do DNA do que quando as linhagens expressam RhoA exógena mutada em sua forma dominante negativa RhoA-N19 (Figuras 13 e 15).

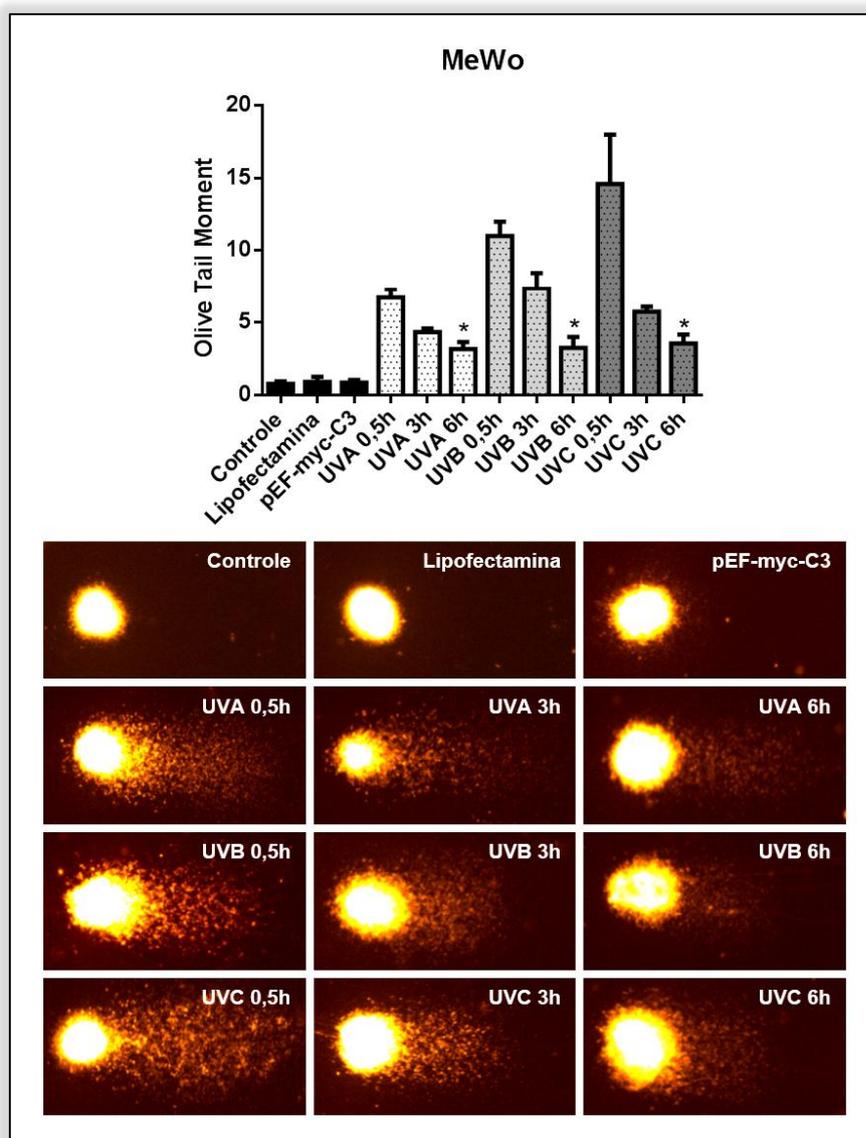


Figura 18. A maior sensibilidade ao dano e o atraso do reparo persiste nas linhagens parentais MeWo após inibição da proteína RhoA endógena. Ensaio de cometa alcalino da linhagem MeWo após transfecção com pEF-myc-C3 e painel representativo dos cometas analisados e quantificados. As células foram transfectadas com 14 μ g de plasmídeo em placas de 100mm, 24h após a transfecção elas foram distribuídas em placas de 35mm em densidade de 2×10^5 células, após tempo de adesão as células foram submetidas a tratamentos com 50 KJ/m^2 de UVA, 80 J/m^2 de UVB e 4 J/m^2 de UVC, para então serem submetidas à corrida eletroforética em condições alcalinas. Os resultados são a média de triplicata experimental. Foi utilizado para análise estatística teste t, onde $*P < 0.05$ entre tratamentos versus controle.

Para também averiguar a capacidade de reparo da linhagem de adenocarcinoma de cérvix HeLa e de seus respectivos mutantes RhoA-N19 e RhoA-V14, foram realizados ensaios de Host Cell Reactivation (HCR). Com esse método é possível avaliar a capacidade das células de reparar um DNA plasmidial exógeno, contendo danos provocados por radiação ultravioleta do tipo A, B ou C, através da expressão de um gene repórter de luciferase. Os resultados obtidos com os HCRs

indicaram que a expressão da proteína RhoA exógena mutada em sua forma dominante negativa RhoA-N19 na linhagem de adenocarcinoma de cérvix HeLa afeta expressivamente a capacidade de reparo dessas células após tratamento com UV, seja por menor eficiência das maquinarias de reparo ou por menor sinalização de acionamento das mesmas (Figura 19).

Ainda, pudemos observar com esses dados que a capacidade de reparo das linhagens decresce de maneira proporcional às doses utilizadas de UVA (Figura 19A), UVB (Figura 19B) ou UVC (Figura 19C), provavelmente devido aos tipos e quantidades de danos gerados em cada caso.

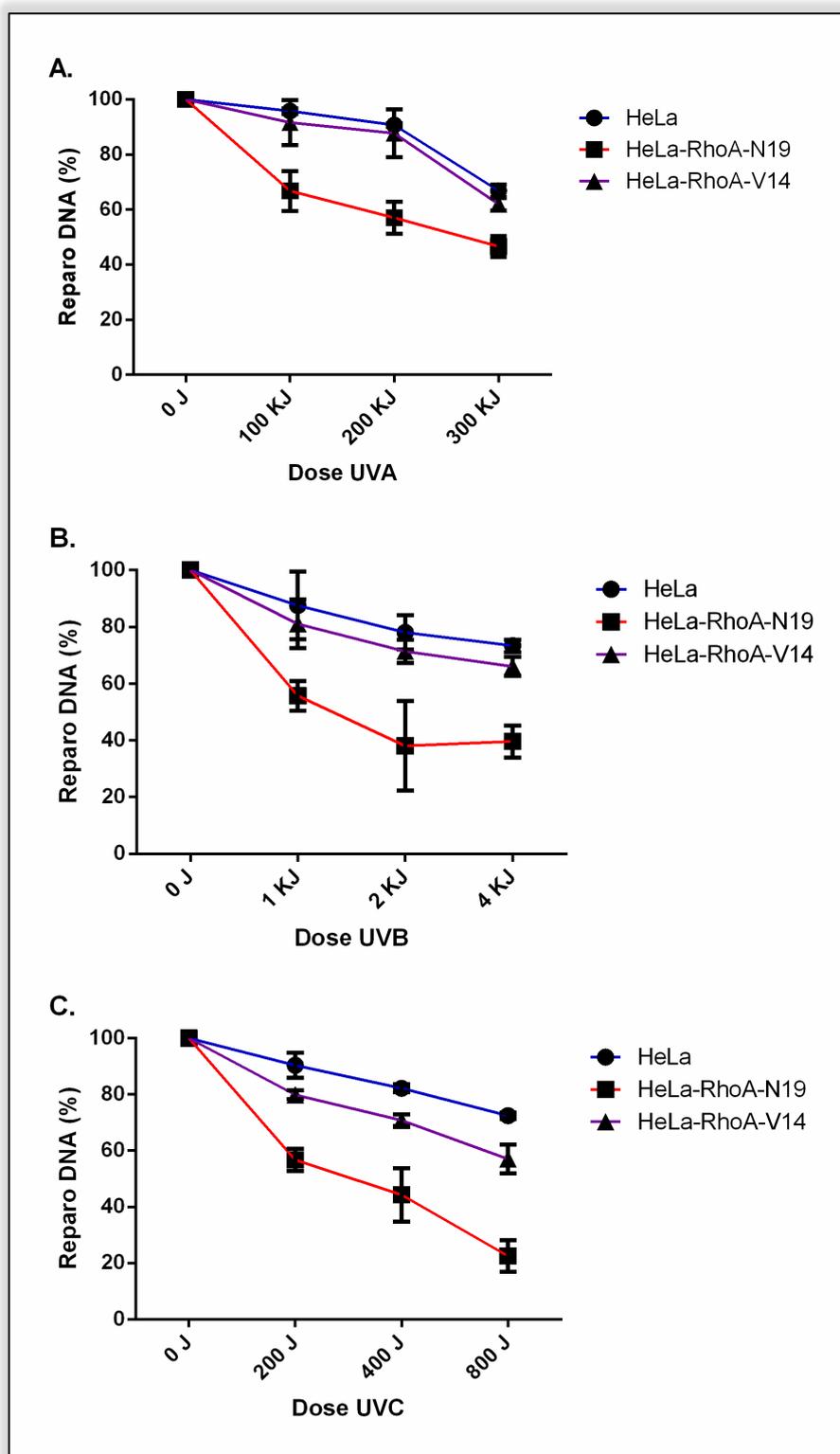


Figura 19. A capacidade de reparar DNA exógeno é menor na sublinhagem HeLa-RhoA-N19 após exposição à radiação ultravioleta. Ensaio de HCR realizado nas linhagens HeLa, HeLa-RhoA-N19 e HeLa-RhoA-V14 48h após transfecção com DNA plasmidial previamente exposto à A. 100, 200 e 300 KJ de UVA; B. 1, 2 e 4 KJ de UVB e C. 200, 400 e 800 J de UVC. O gráfico mostra a média com erro padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicatas.

Um dos principais fotoprodutos formados pela absorção de luz UV pela molécula de DNA é o dímero de ciclobutano pirimidina (CPD) e tal lesão é reparada normalmente pela via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER). Visto o atraso detectado nos ensaios de cometa alcalino e HCRs nas sublinhagens que possuem RhoA superexpressa em sua forma dominante negativa ou com atividade inibida, ensaios de imunofluorescência foram utilizados para acompanhar a formação e o reparo de CPDs nas linhagens parentais de adenocarcinoma de cérvix bem como em seus mutantes RhoA-N19 ou RhoA-V14.

Como previsto, a linhagem HeLa e HeLa-RhoA-V14 apresentam maior recuperação das lesões formadas pela exposição à UVA, B e C (em 48 h) em relação ao mutante RhoA-N19 (setas amarelas), visto que esse mutante apresenta persistência de dímeros no DNA, quando nas outras duas linhagens tal marcação não é mais detectada (Figura 20).

O mutante estabelecido na linhagem de melanoma MeWo-RhoA-N19 (setas amarelas) também mostrou-se defectivo quanto à recuperação de dímeros após 48 h em relação à MeWo parental e à MeWo-RhoA-V14 (Figura 21), o que nos levou a presumir que a via de reparo por excisão de nucleotídeos pudesse estar sofrendo alguma interferência negativa direta provocada pela menor atividade da GTPase RhoA em ambas as linhagens investigadas neste estudo.

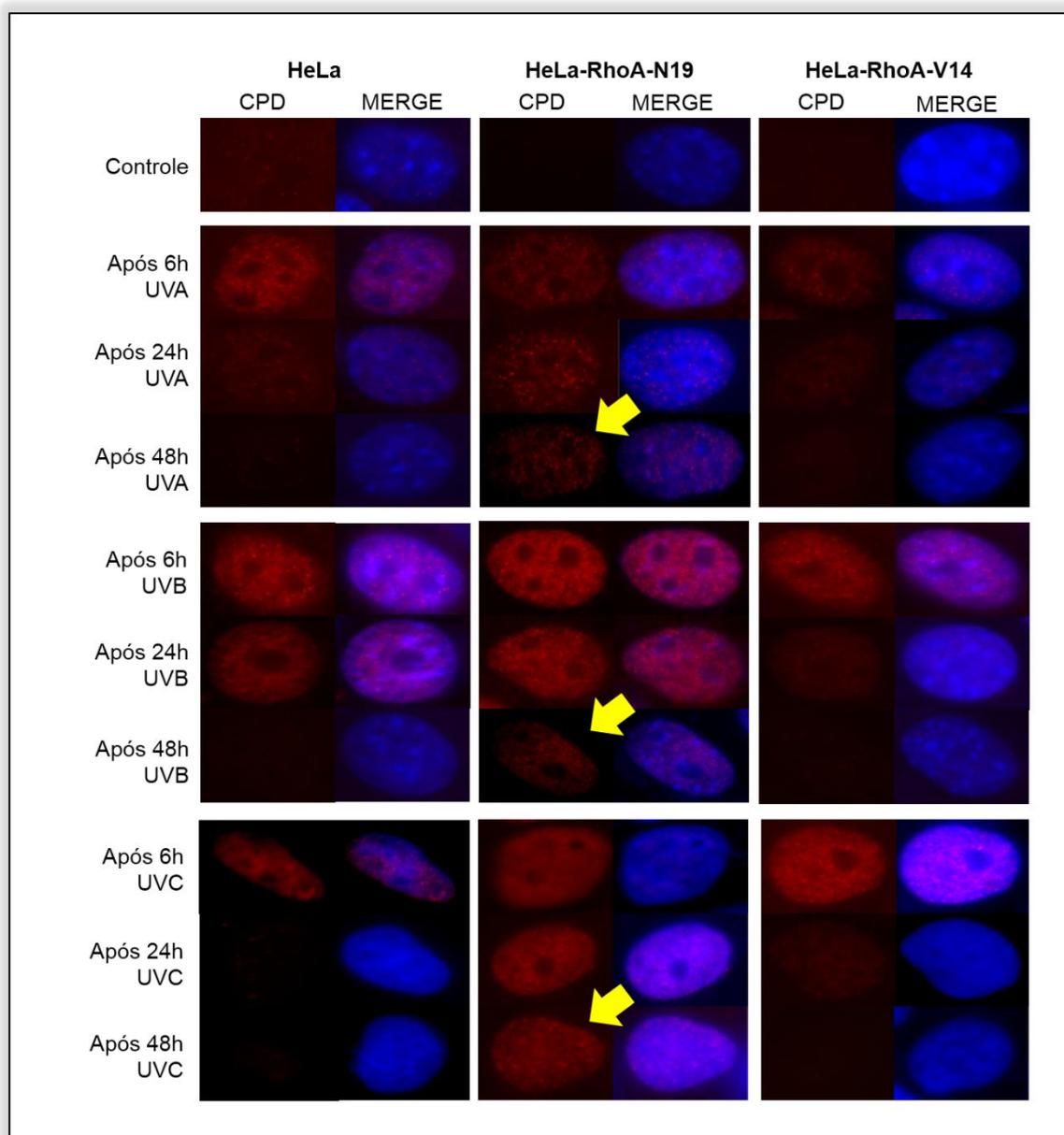


Figura 20. O reparo de dímeros de pirimidina é deficiente na sublinhagem HeLa-RhoA-N19 após exposição à UVA, UVB ou UVC. A detecção de dímeros foi realizada por imunofluorescência utilizando anti-CPD e anti-mouse Alexa 488 nas linhagens HeLa, HeLa-RhoA-N19 e HeLa-RhoA-V14 em tempos de 0, 6, 24 e 48h após exposição à 50 KJ/m² de UVA, 80 J/m² de UVB e 4 J/m² de UVC. As imagens foram capturadas em objetivas de 100x, os núcleos são representativos de dois experimentos independentes onde aproximadamente 10 campos foram analisados por condição.

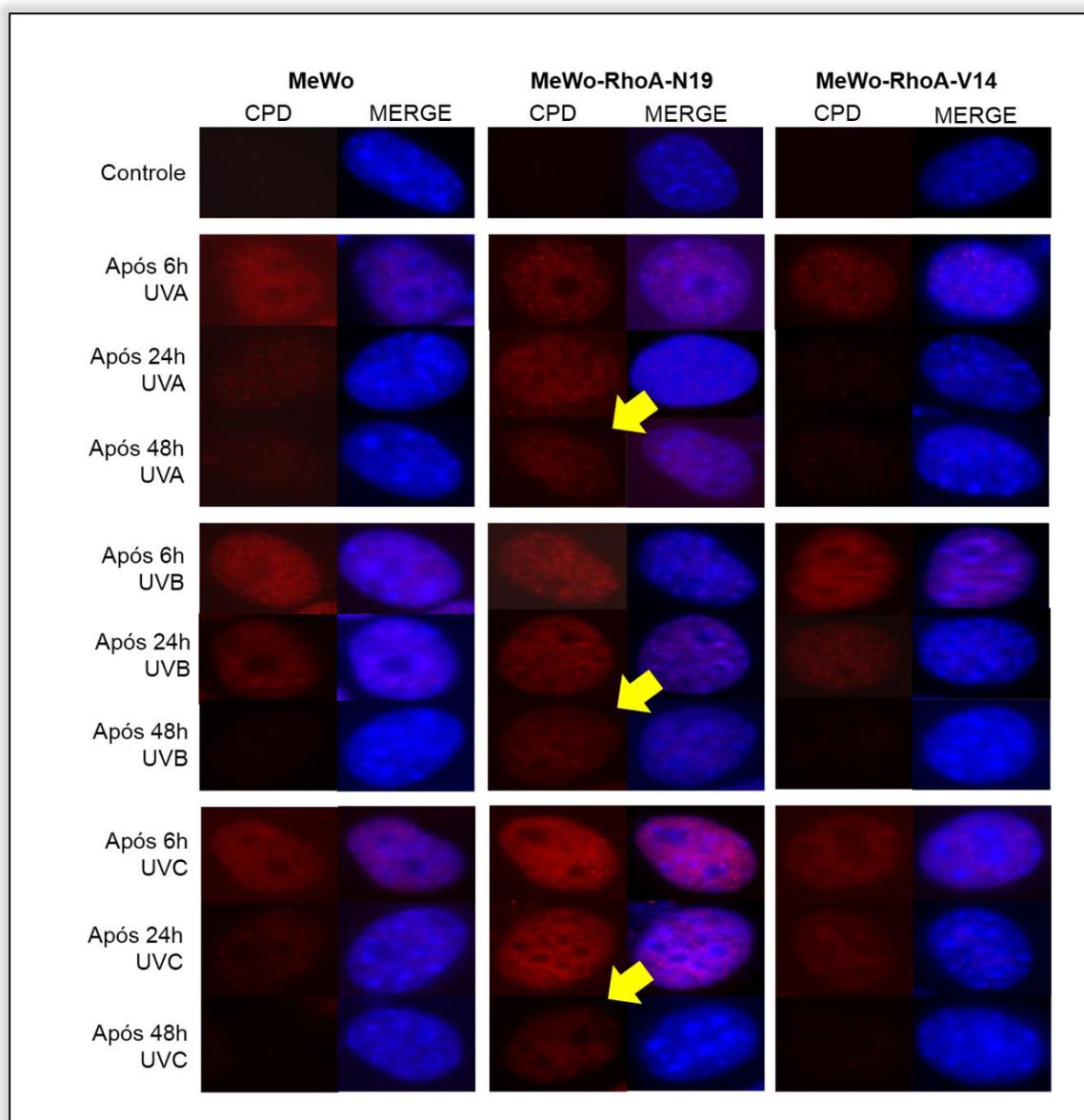


Figura 21. O reparo de dímeros de pirimidina é deficiente na sublinhagem MeWo-RhoA-N19 após exposição à UVA, UVB ou UVC. A detecção de dímeros foi realizada por imunofluorescência utilizando anti-CPD e anti-mouse Alexa 488 nas linhagens MeWo, MeWo-RhoA-N19 e MeWo-RhoA-V14 em tempos de 0, 6, 24 e 48h após exposição à 50 KJ/m² de UVA, 80 J/m² de UVB e 4 J/m² de UVC. As imagens foram capturadas em objetivas de 100x, os núcleos são representativos de dois experimentos independentes onde aproximadamente 10 campos foram analisados por condição.

4.2.2 Efeitos da modulação da atividade de RhoA na sinalização celular em vias de proliferação, estresse e resposta a dano de DNA após radiação ultravioleta

Existem três principais cascatas de MAPK: quinase regulada por sinal extracelular (ERK 1/2); quinase c-Jun amino-terminal (JNK) e a quinase p38, essas MAPK estão envolvidas na transdução do sinal da superfície celular para o núcleo.

JNK e p38 são principalmente ativadas por estressores ambientais, citocinas inflamatórias, choque térmico e agentes causadores de dano no DNA, como radiação ultravioleta (Chang, Karin, 2001).

Avaliando a ativação da SAPK (stress-activated protein kinase) JNK após exposição à 4 J/m² UVC por western blot, percebemos na figura 22 que a linhagem parental de adenocarcinoma de cérvix HeLa, bem como no mutante RhoA-V14 a fosforilação das isoformas JNK 1 / 2 ocorre em 15min, enquanto o mutante dominante negativo HeLa-RhoA-N19 apresenta um atraso de 15 min na fosforilação dessa MAPK.

Quando verificamos a fosforilação de JNK 1/2 na linhagem de melanoma, não verificamos diferenças no padrão de ativação da isoforma JNK 1 (46 kDa) entre a linhagem parental e os mutantes, já para a isoforma JNK 2 (54 kDa) percebemos que sua fosforilação decai após 3h nas linhagens MeWo e MeWo-RhoA-V14, enquanto a linhagem MeWo-RhoA-N19 tem a fosforilação mantida até pelo menos 6h (Figura 22).

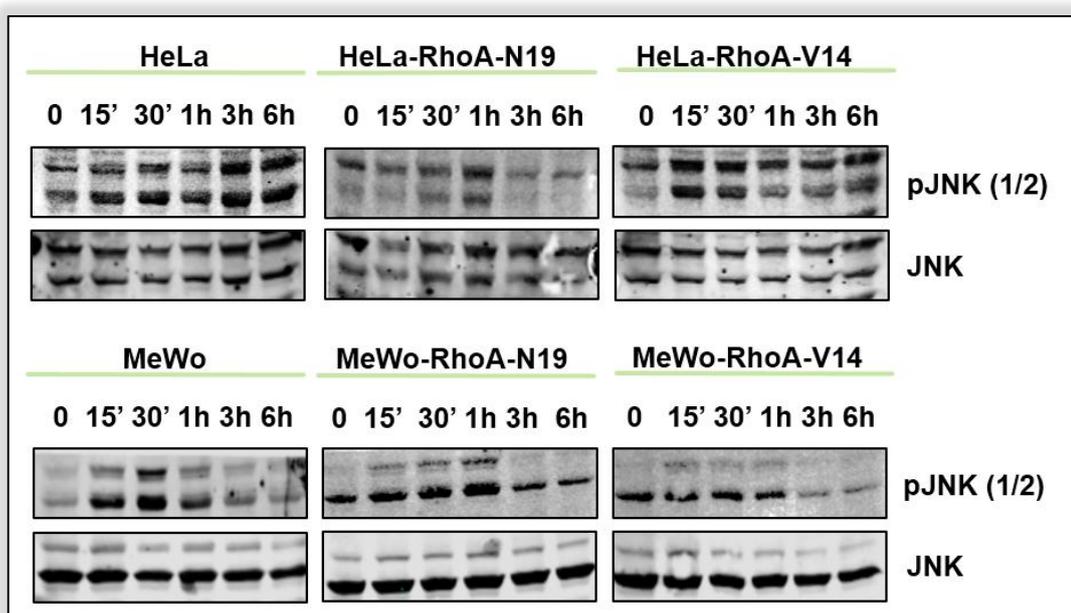


Figura 22. Fosforilação da MAPK JNK 1/2 após UVC nas linhagens HeLa, MeWo e nos mutantes de RhoA. Figura representativa de western blot das linhagens HeLa e MeWo, bem como das sublinhagens mutantes para RhoA após tratamento com 4 J/m² UVC. As fotos são representativas de duplicatas experimentais.

A fosforilação das isoformas 1 e 2 de ERK também foram acompanhadas na linhagem parental HeLa bem como nas sublinhagens HeLa-RhoA-N19 e HeLa-RhoA-V14 (Figura 23), assim como notado para a MAPK JNK, a ativação de ERK possui um

atraso no mutante RhoA-N19, e enquanto as linhagens HeLa e HeLa-RhoA-V14 possuem ativação transiente da mesma, a sublinhagem HeLa-RhoA-N19 possui ativação mantida.

Embora o mutante RhoA-N19 da linhagem de melanoma não apresente atraso na fosforilação de ERK em relação às outras duas linhagens, podemos observar que a ativação da MAPK é mantida após 3 h, enquanto na linhagem parental MeWo sua ativação decai em 1h e na sublinhagem Mewo-RhoA-V14 decai a partir de 3 h (Figura 23).

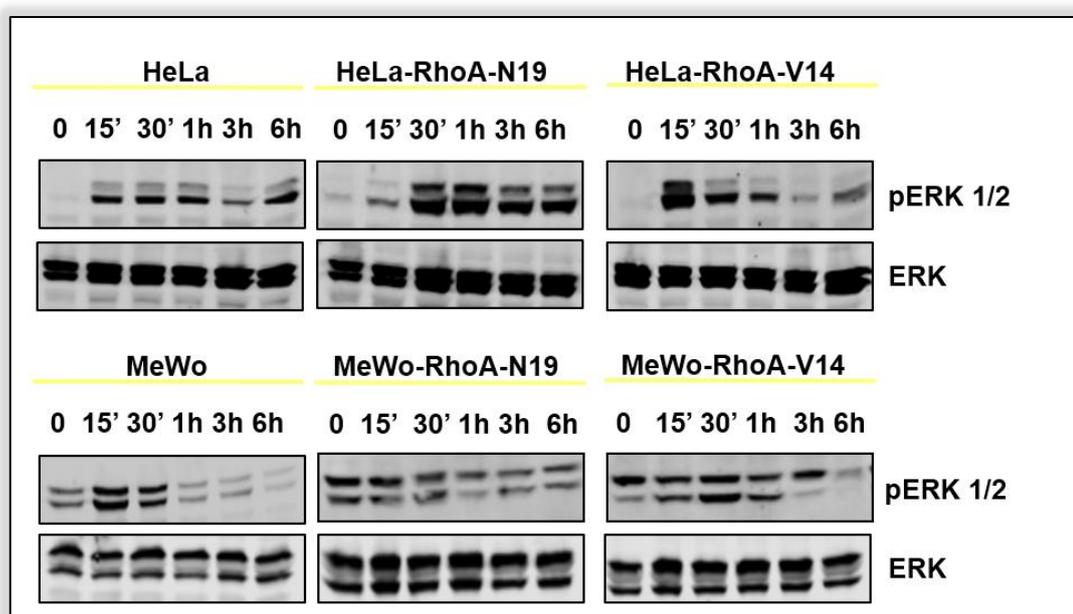


Figura 23. Fosforilação da MAPK ERK 1/2 após UVC nas linhagens HeLa, MeWo e nos mutantes de RhoA. Figura representativa de western blot das linhagens HeLa e MeWo, bem como das sublinhagens mutantes para RhoA após tratamento com 4 J/m^2 UVC. As fotos são representativas de duplicatas experimentais.

Quando ocorrem lesões no material genético, diversas proteínas são responsáveis pelo reconhecimento do dano no DNA e outras são imediatamente recrutadas nestes sítios, dentre essas proteínas centrais na sinalização de dano no DNA se encontram as quinases ATR e ATM, sendo que ATR é preferencialmente ativada por quebras simples no DNA, como as promovidas por radiação ultravioleta, enquanto que ATM é ativada preferencialmente após a formação de quebras duplas no DNA. Essas quinases possuem diversos substratos atuando também desde o reconhecimento do dano até o reparo dos mesmos (Matsuoka et al., 2007).

Dentre os principais substratos de ATR, encontra-se a proteína Chk1, que atua na sinalização da parada do ciclo celular nos checkpoints S e G2/M (Xiao et al., 2003). Para avaliar a fosforilação da proteína Chk1 após a indução de estresse por UVC, submetemos às linhagens parentais MeWo e HeLa, bem como seus respectivos mutantes RhoA-V14 e RhoA-N19 a irradiação e acompanhamos em uma cinética de até 6h através de immunoblottings. O que pudemos observar para pChk1 (Figura 24) é que a sublinhagem HeLa-RhoA-N19 apresenta uma ativação transiente, adiantada em 15 min e finalizada em 6 h, enquanto que a sublinhagem MeWo-RhoA-N19 apresenta uma ativação transiente e atrasada, de ao menos 15min, dessa proteína comparada com a célula parental e o clone constitutivamente ativo. Estes resultados podem sugerir alterações de parada nos checkpoints do ciclo celular que podem estar afetando o reparo do DNA lesionado após radiação ultravioleta.

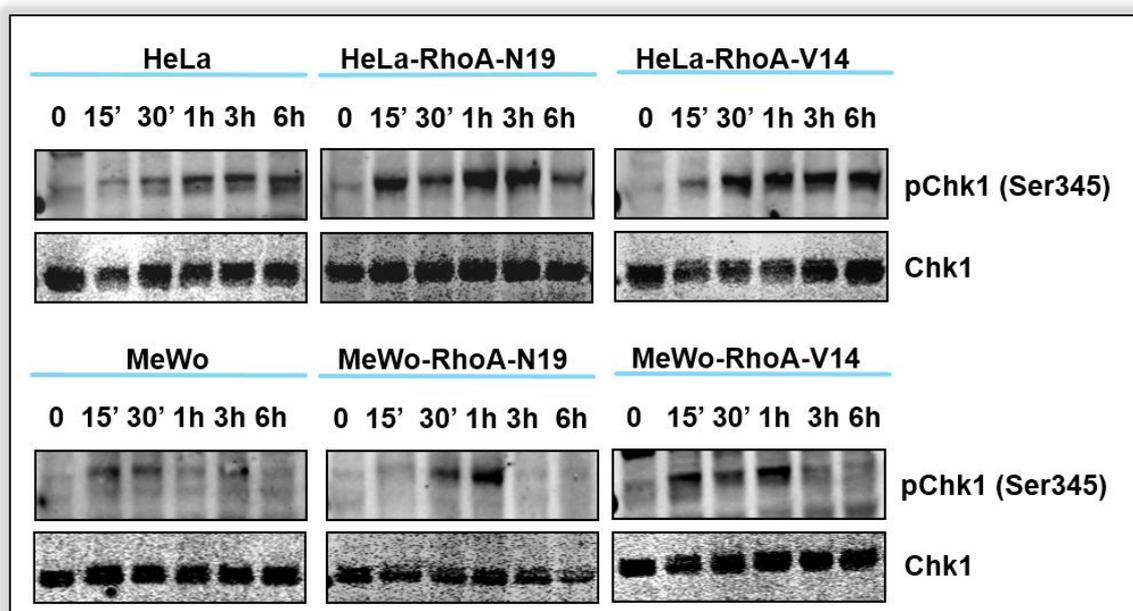


Figura 24. A fosforilação de Chk1 é atrasada nos mutantes HeLa-RhoA-N19 e MeWo-RhoA-N19. As linhagens mutantes e as linhagens HeLa e MeWo parentais foram plaqueadas em placas de 100mm, 24h antes da exposição a 4 J/m² UVC. As células foram lisadas nos diferentes tempos após a radiação e as proteínas foram analisadas por immunoblot para fosfo-Chk1(Ser 345) Cell Signaling, Os immunoblots são os representativos de três experimentos independentes.

Os níveis de fosforilação da histona H2AX (Ser 139) também foram analisados por ensaios de immunoblotting em experimentos de cinéticas curtas de até 1h após tratamento com 4 J/m² de UVC das linhagens parentais HeLa e MeWo, bem como de suas respectivas sublinhagens mutantes para RhoA. A fosforilação da histona H2AX

por muito tempo foi vista como marcador exclusivo de quebras duplas no DNA, entretanto já se sabe que H2AX é alvo por exemplo de ATR, quinase ativada em via de sinalização após radiação ultravioleta, e esta fosforilação da H2AX parece ser necessária para o recrutamento de proteínas que iniciam o reparo no DNA (Katsube et al., 2014).

Quando analisamos os dados obtidos de fosforilação temporal de H2AX (Figura 25), o que podemos observar é uma menor ativação da H2AX nos mutantes dominante negativo HeLa-RhoA-N19 e MeWo-RhoA-N19 em relação às linhagens parentais e aos mutantes constitutivamente ativos RhoA-V14. Essa deficiência na sinalização de reparo em sítios de dano de DNA vai de acordo com uma provável menor capacidade de reparar lesões no material genético após exposição à radiação ultravioleta dos tipos A, B e C, conforme identificado nos ensaios biológicos anteriores, e de alguma maneira dependente da atividade de RhoA.

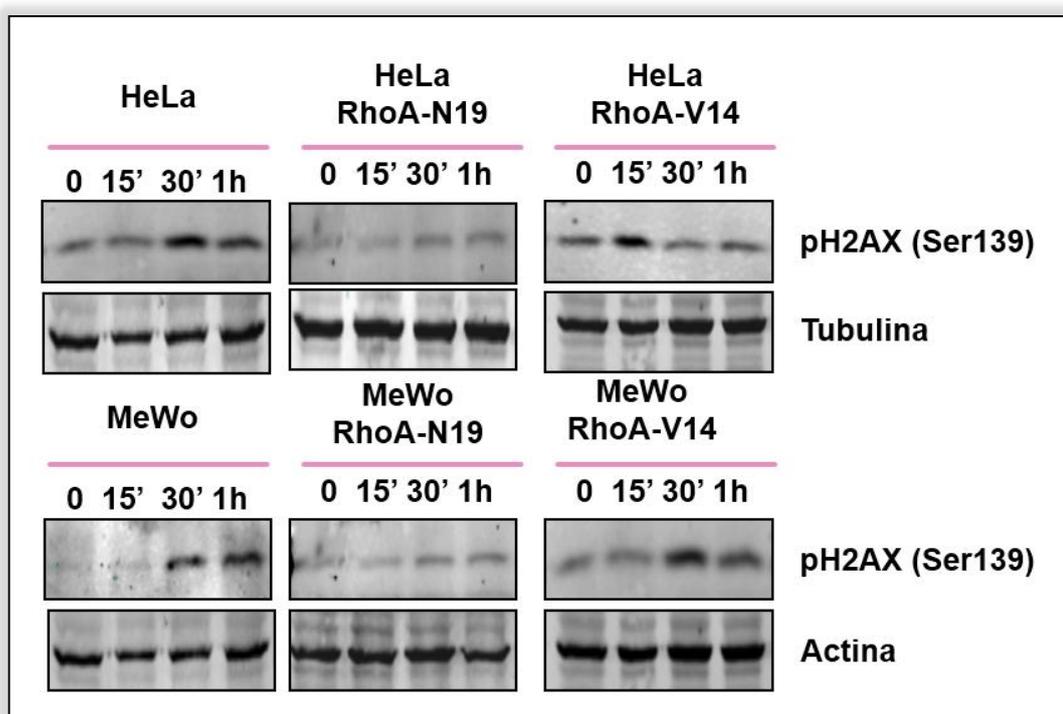


Figura 25. A sinalização de dano no DNA por γ H2AX é diminuída nos mutantes dominante negativo (RhoA-N19). As linhagens mutantes e as linhagens HeLa e MeWo parentais foram plaqueadas em placas de 100mm, 24h antes da exposição a 4 J/m² UVC. As células foram lisadas nos tempos 0, 15 min, 30 min e 1h após a radiação e as proteínas foram analisadas por imunoblot para fosfo-H2AX (Ser 139) R&D systems Os imunoblots são os representativos de três experimentos independentes.

4.3 Envolvimento da proteína RhoA GTPase em respostas biológicas de sobrevivência e proliferação celular após exposição à radiação ultravioleta dos tipos A, B e C

Ensaio de curva de crescimento foram realizados nas linhagens parentais HeLa e MeWo, bem como nas sublinhagens com mutações para a GTPase RhoA em seu estado constitutivamente ativado (RhoA-V14) e dominante negativo (RhoA-N19) para a análise de sua capacidade proliferativa, e após serem submetidas às radiações ultravioleta dos tipos A, B e C.

A linhagem mutante HeLa-RhoA-V14 apresenta proliferação semelhante à HeLa na condição controle, entretanto a linhagem HeLa-RhoA-N19 apresenta proliferação estatisticamente reduzida em relação às outras duas, o que é possível visualizar após 120 h em crescimento exponencial, sem exposição à radiação (Figura 26A).

Quando submetidas à radiação ultravioleta do tipo A (597 J/m^2) a linhagem parental continua com tempo de dobramento celular semelhante à HeLa-RhoA-V14 (24 h), entretanto o mutante HeLa-RhoA-N19 apresentou menor proliferação em relação à sublinhagem constitutivamente ativa de RhoA em 96 e 120 h, bem como em relação à HeLa em 120 h (Figura 26B). O tratamento com UVB aumentou o tempo de dobramento das linhagens HeLa e HeLa-RhoA-V14 de 24 h para 72 h quando comparadas ao tratamento com UVA (Figura 26B), enquanto que o dominante negativo HeLa-RhoA-N19 apresentou menor proliferação após estresse, o que fica evidenciado após 120 h em relação à HeLa (Figura 26C). A sublinhagem HeLa-RhoA-V14 ainda possui proliferação semelhante à linhagem parental quando tratada com radiação UVC, e embora demonstre um perfil superior em alguns casos, não foram obtidas diferenças estatísticas; entretanto o mutante HeLa-RhoA-N19 possui uma redução em sua capacidade proliferativa após exposição a tal estresse quando comparada com as outras duas linhagens (Figura 26D).

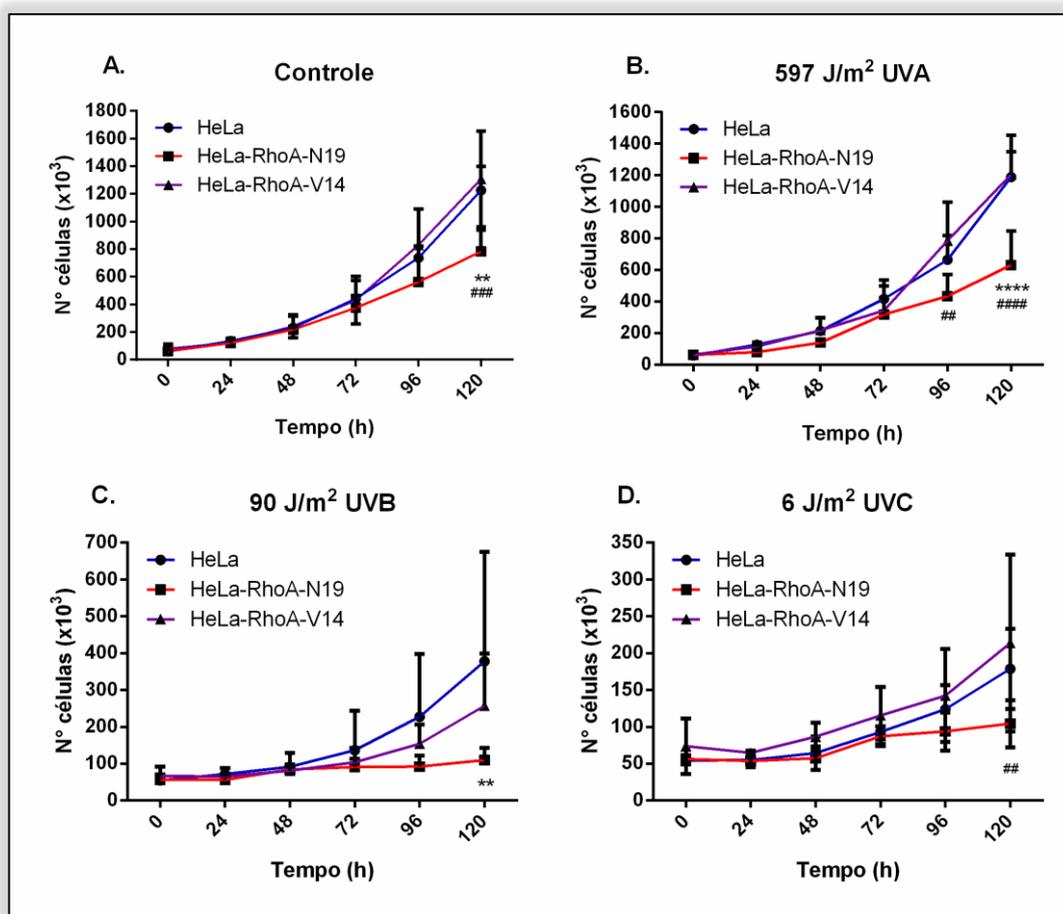


Figura 26. Curvas de crescimento da linhagem HeLa e dos mutantes RhoA-V14 e RhoA-N19. A. Curva de crescimento de HeLa, HeLa-RhoA-N19 e HeLa-RhoA-V14 em crescimento exponencial; B. Após tratamento com 597 J/m² de UVA; C. Após exposição à 90 J/m² de UVB; D. Após exposição à 6 J/m² de UVC. Os gráficos são a representação de triplicata experimental independente. ** ##P=0.007 e **** #####P<0.0001 pelo teste two-way ANOVA. * representa análise entre HeLa versus mutantes RhoA-N19 e RhoA-V14; # representa análise entre mutantes HeLa-RhoA-N19 e HeLa-RhoA-V14.

Os dados obtidos em curvas de crescimento para a linhagem MeWo e para as sublinhagens MeWo-RhoA-V14 e MeWo-RhoA-N19 mostram que o clone constitutivamente ativado para RhoA apresenta superioridade proliferativa quando comparada à linhagem parental e ao clone dominante negativo quando as células estão em crescimento exponencial, a diferença em relação ao mutante RhoA-N19 pode ser observada já em 96 h, enquanto em relação à linhagem parental o mesmo pode ser visto após 120 h. Há uma redução na proliferação da sublinhagem MeWo-RhoA-N19 quando comparada também à linhagem MeWo, o que fica evidenciado após 120 h (Figura 27A).

Quando expostas à radiação ultravioleta do tipo A, a modulação da atividade enzimática de RhoA leva à redução da capacidade proliferativa do mutante dominante

negativo em relação às outras duas linhagens, já o mutante RhoA-V14 demonstra proliferação semelhante à linhagem parental MeWo após 50 KJ/m² de UVA (Figura 27B). A exposição à UVB (Figura 27C) e UVC (Figura 27D) volta a mostrar um aumento na proliferação quando a atividade da GTPase RhoA é modulada positivamente (RhoA-V14) em relação à MeWo, o que foi observado após 5 dias de experimento e nesses dois casos, a sublinhagem dominante negativa demonstra um atraso no crescimento celular em relação às outras linhagens já em 72 h, comportamento que persiste até 120 h.

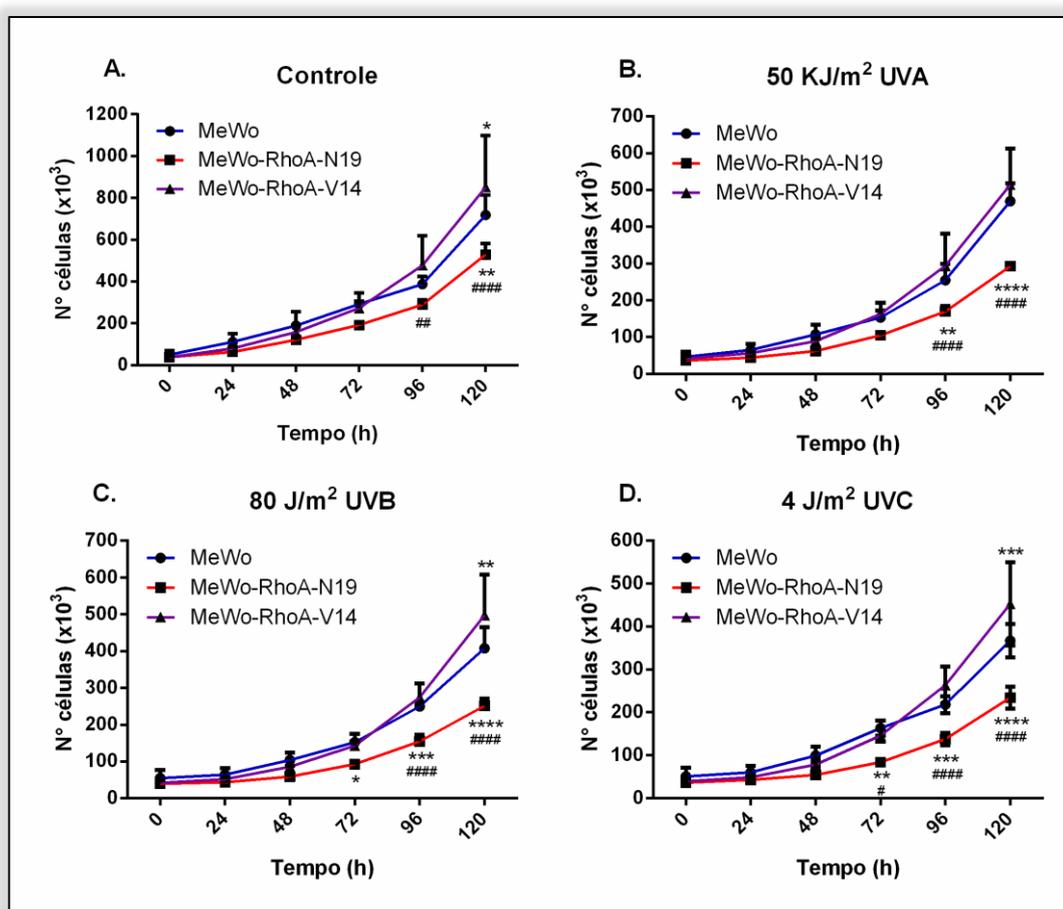


Figura 27. Curvas de crescimento da linhagem parental MeWo e dos mutantes MeWo-RhoA-V14 e MeWo-RhoA-N19. A. Curva de crescimento de MeWo, MeWo-RhoA-N19 e MeWo-RhoA-V14 em crescimento exponencial; B. Após tratamento com 50 KJ/m² de UVA; C. Após exposição à 80 J/m² de UVB; D. Após exposição à 4 J/m² de UVC. Os gráficos são a representação de quadruplicata experimental independente. * #P<0.1; ** ##P<0.01; *** ###P<0.001 e **** ####P<0.0001 pelo teste two-way ANOVA. * representa análise entre MeWo versus mutantes RhoA-N19 e RhoA-V14; # representa análise entre mutantes MeWo-RhoA-N19 e MeWo-RhoA-V14.

As linhagens HeLa e MeWo bem como seus respectivos mutantes, constitutivamente ativo (RhoA-V14) e dominante negativo (RhoA-N19) também foram submetidas a ensaios clonogênicos para análise da sobrevivência celular em baixa densidade quando expostas ou não à radiação ultravioleta.

Os dados obtidos foram plotados como fração de sobrevivência, o que pode ser observado é que a linhagem parental HeLa possui menor sensibilidade aos efeitos da radiação ultravioleta quando comparada às outras duas sublinhagens, o que acarreta em uma maior taxa de sobrevivência após estresse por UVA, UVB e UVC (Figura 28A). Os mutantes RhoA-N19 e RhoA-V14 além de apresentarem uma menor fração de sobrevivência em relação à linhagem parental HeLa, não apresentaram diferenças significativas entre si nos tratamentos com UV (Figura 28A); nesse caso o que pudemos observar foi uma superioridade (ou maior resistência) do mutante RhoA-V14 em relação ao RhoA-N19 em relação ao tamanho das colônias formadas bem como uma maior definição de seus contornos (Figura 28B).

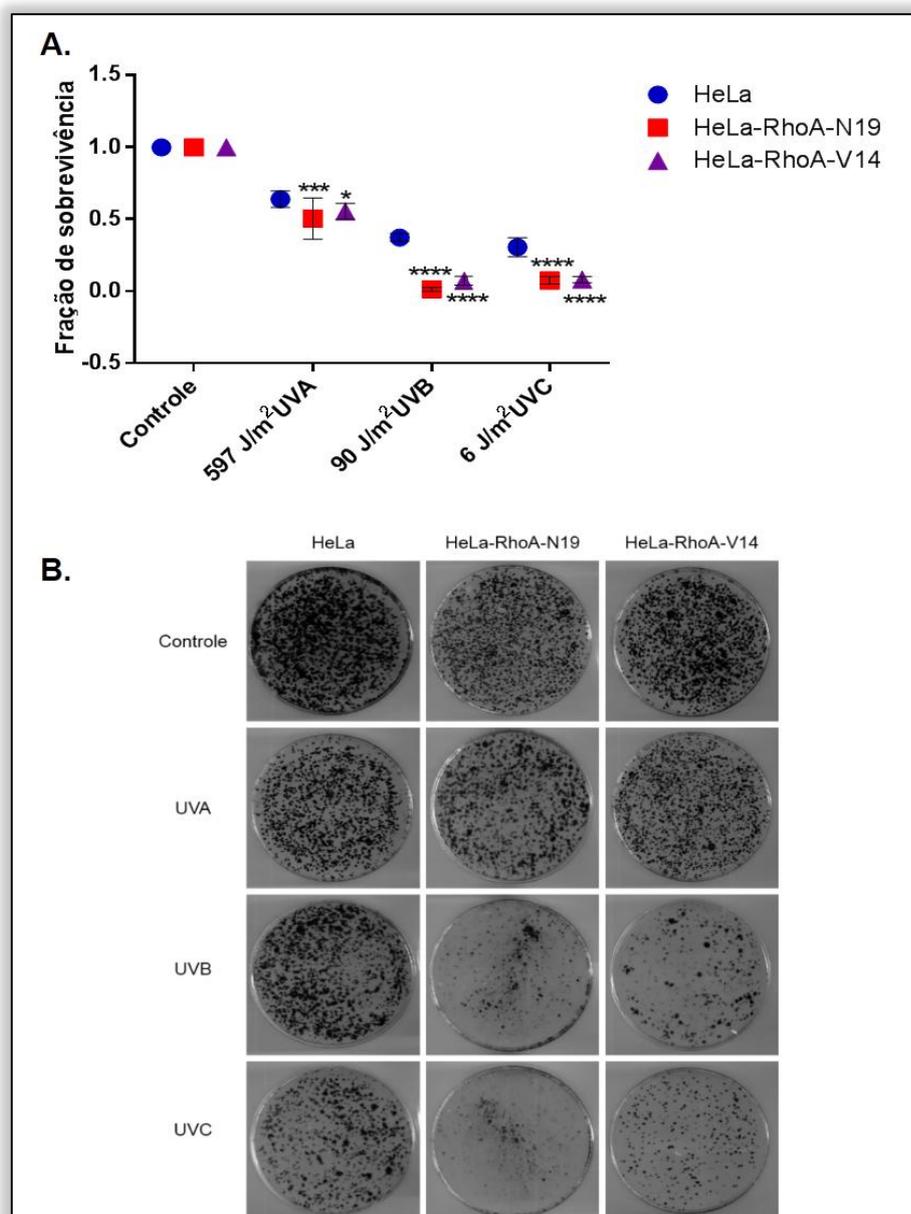


Figura 28. Fração de sobrevivência das linhagens HeLa, HeLa-RhoA-N19 e HeLa-RhoA-V14. A. Fração de sobrevivência das linhagens obtidas após ensaio de colônias das linhagens tratadas com UVA, UVB e UVC; B. Foto representativa das colônias coradas e contadas. Os resultados são a média de seis experimentos independentes. Foi utilizado para análise estatística two-way ANOVA * $P < 0.1$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.000,1$ entre os clones versus HeLa parental.

No caso da linhagem de melanoma MeWo, e de seus mutantes, quando comparados com os dados obtidos a partir das linhagens de adenocarcinoma de cérvix (HeLa), o primeiro ponto observado foi o tamanho das colônias que são maiores no caso do melanoma, decorrido o mesmo tempo dos experimentos de formação das colônias (Figuras 28B e 29B).

Diferentemente de HeLa, a linhagem parental MeWo apresentou uma fração de sobrevivência maior após tratamentos com UVA (50 KJ/m²), UVB (80 J/m²) e UVC (4 J/m²) em relação ao mutante dominante negativo RhoA-N19 e equivalente à sublinhagem MeWo-RhoA-V14. Ainda, foi possível observar uma resistência significativa do mutante RhoA-V14 em relação ao mutante RhoA-N19 após tratamento com radiação ultravioleta do tipo B (Figura 29A).

Analisando a morfologia das colônias formadas nas linhagens MeWo, MeWo-RhoA-N19 e MeWo-RhoA-V14 com ou sem tratamento, aparentemente não foram encontradas diferenças morfológicas visíveis e a desigualdade foi dada apenas a partir do número de colônias formada em cada situação (Figura 29B).

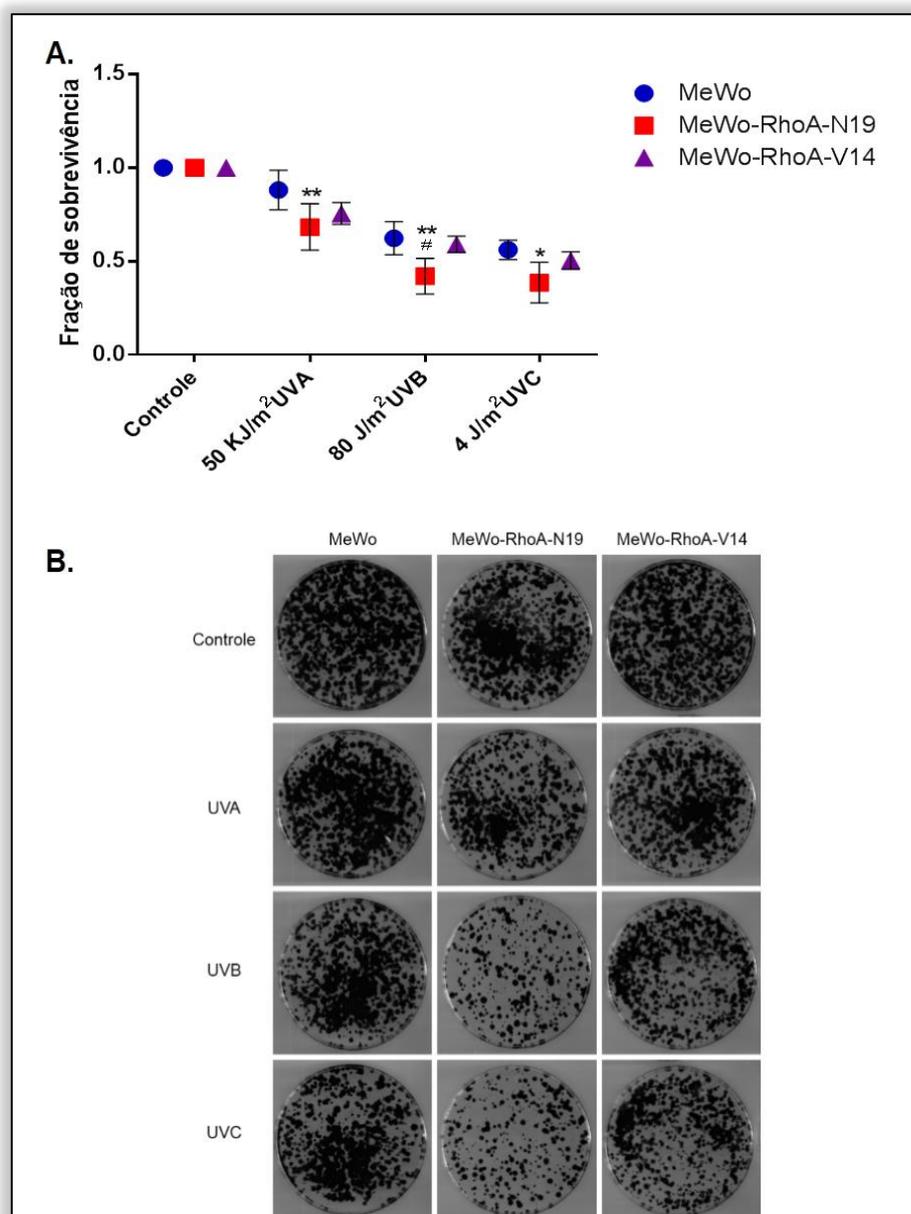


Figura 29. Fração de sobrevivência das linhagens MeWo, MeWo-RhoA-N19 e MeWo-RhoA-V14. A. Fração de sobrevivência das linhagens obtidas após ensaio de colônias das linhagens tratadas com UVA, UVB e UVC; B. Foto representativa das colônias coradas e contadas. Os resultados são a média de triplicata experimental. Foi utilizado para análise estatística two-way ANOVA * #P<0.05; **P<0.01; * representa análise entre MeWo versus mutantes RhoA-N19 e RhoA-V14; # representa análise entre mutantes MeWo-RhoA-N19 e MeWo-RhoA-V14.

Os resultados obtidos após contagem de colônias das linhagens HeLa e MeWo após inibição das funções biológicas de RhoA por C3 demonstram uma diminuição da sobrevivência celular significativa dos controles já em relação a transfecção com pEF-myc-C3, mesmo sem exposição à radiação, o que já seria esperado devido ao papel

conhecido dessa proteína na estruturação do citoesqueleto na citocinese junto a finalização da mitose (Figura 28A).

Entretanto, a fração de sobrevivência celular é ainda mais reduzida nas duas linhagens quando somadas a inibição da proteína por C3 com a exposição às radiações ultravioleta dos tipos A, B ou C (Figura 28B). Tais resultados, corroboram os dados obtidos anteriormente nos dois casos, que demonstraram uma inferioridade na sobrevivência das sublinhagens HeLa-RhoA-N19 e MeWo-RhoA-N19 após exposição à radiação quando comparadas às linhagens parentais ou aos mutantes constitutivamente ativos RhoA-V14.

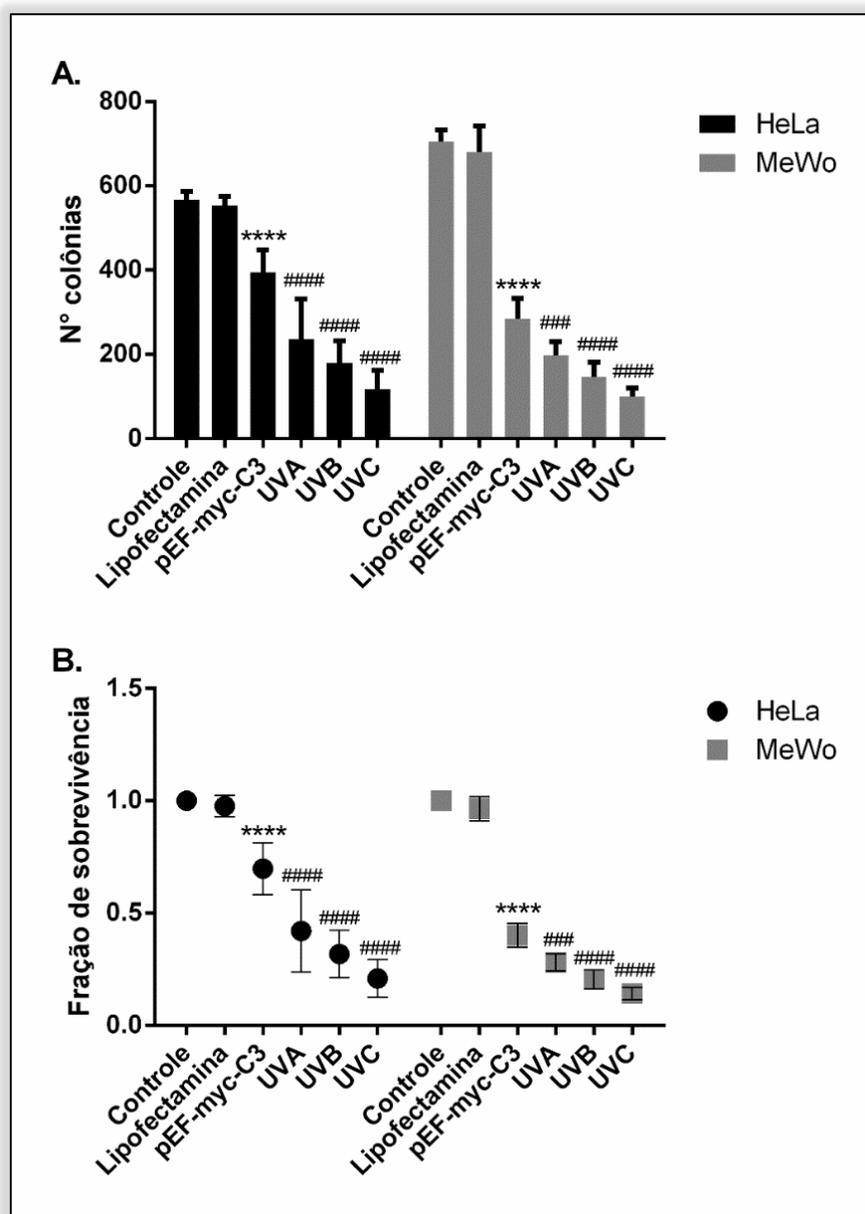


Figura 30. Ensaio clonogênico das linhagens HeLa e MeWo transfetadas com o plasmídeo contendo a sequência da exoenzima C3. As células foram transfetadas com 14 μ g de plasmídeo em placas de 100mm, 24h após a transfecção elas foram distribuídas em placas de 60mm em densidade de 2×10^3 células, após tempo de adesão as células foram submetidas a tratamento com 50 KJ/m^2 de UVA, 80 J/m^2 de UVB e 4 J/m^2 de UVC. Após 10 dias as células foram fixadas com formaldeído 10% em PBS, coradas com cristal violeta 0,5% e contadas manualmente. A. Número de colônias obtido nas linhagens HeLa e MeWo; B. Fração de sobrevivência. Os resultados são a média de triplicata experimental. Foi utilizado para análise estatística two-way ANOVA ### $P < 0.05$; **** $P < 0.0001$; * representa análise entre os controles versus pEF-myc-C3; # representa análise entre pEF-myc-C3 versus tratamento com UVA, UVB e UVC.

A GTPase RhoA desempenha papel importante na progressão da fase G1 do ciclo celular através de sua principal proteína efetora ROCK, atuando na degradação

de p27, um inibidor de CDK, o que regula a expressão da ciclina D1 (Villalonga, Ridley, 2006).

Investigando a distribuição das linhagens HeLa, MeWo e de seus mutantes para RhoA em seu estado constitutivamente ativo (RhoA-V14) e dominante negativo (RhoA-N19), pudemos observar que existe um acúmulo de células na fase G1 da sublinhagem HeLa-RhoA-N19 após tratamentos com UVA, UVB e UVC. A linhagem parental HeLa e HeLa-RhoA-V14 possuem um acúmulo em G1 após 6h, mas voltam a ciclar normalmente em 24 h, o mesmo não é notado no mutante dominante negativo (Figura 31).

Esse dado corrobora os resultados obtidos após as curvas de crescimento na linhagem de adenocarcinoma de cérvix (Figura 26), visto que um acúmulo da linhagem HeLa-RhoA-N19, pode justificar a deficiência da linhagem em relação à capacidade proliferativa verificado em relação às linhagens HeLa e HeLa-RhoA-V14.

Nas linhagens MeWo, MeWo-RhoA-N19 e MeWo-RhoA-V14 esse acúmulo em G1 não é tão evidente como nas linhagens de adenocarcinoma de cérvix, após exposição à UVA, UVB e UVC. O que pudemos observar é que a linhagem MeWo-RhoA-V14 apresenta maior acúmulo nas fases S e G2/M quando comparada à MeWo e MeWo-RhoA-N19 no tempo de 6h, podendo indicar uma parada adiantada em checkpoint para recuperação das lesões induzidas pela radiação ultravioleta (Figura 32).

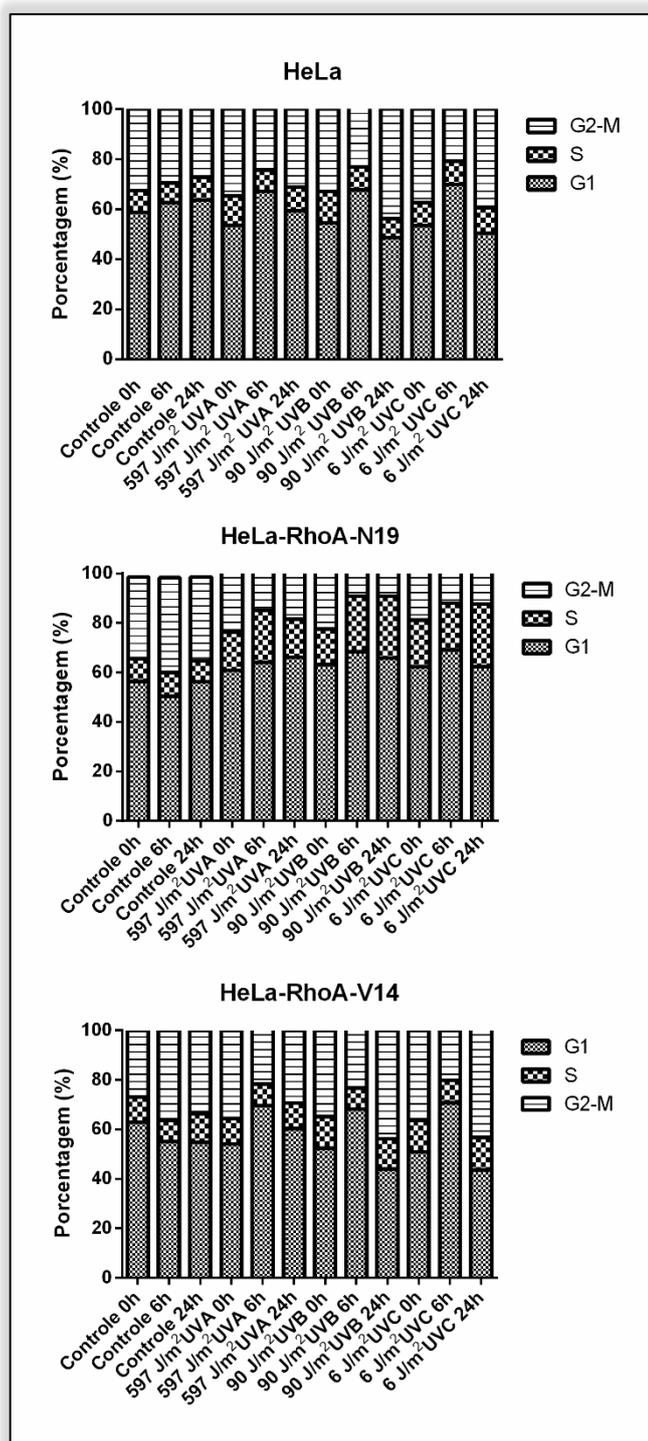


Figura 31. Distribuição das linhagens HeLa, HeLa-RhoA-N19 e HeLa-RhoA-V14 no ciclo celular após exposição à radiação ultravioleta. Para esse experimento, as células foram coletadas e fixadas em etanol 80% nos tempos de 0 h, 6 h e 24h após tratamentos com UVA, UVB ou UVC. No dia da análise as células foram incubadas em solução de iodeto de propídio, antes de serem analisados 3 x 10⁴ eventos em duplicata experimental para cada condição em um citômetro de fluxo (BD, FACS Verse).

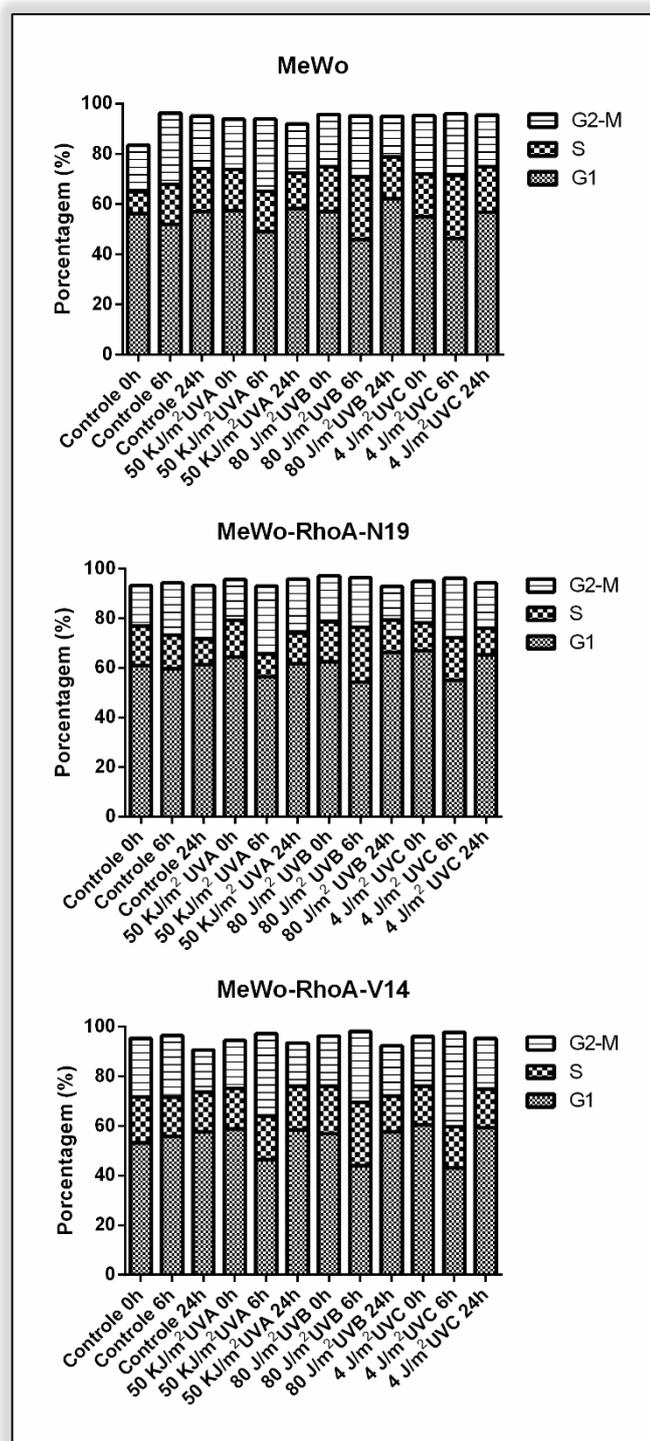


Figura 32. Distribuição das linhagens MeWo, MeWo-RhoA-N19 e MeWo-RhoA-V14 no ciclo celular após exposição à radiação ultravioleta. Para esse experimento, as células foram coletadas e fixadas em etanol 80% nos tempos de 0 h, 6 h e 24h após tratamentos com UVA, UVB ou UVC. No dia da análise as células foram incubadas em solução de iodeto de propídio, antes de serem analisados 3×10^4 eventos em duplicata experimental para cada condição em um citômetro de fluxo (BD, FACS Verse).

4.4 Avaliação de morte celular da linhagem HeLa e das sublinhagens HeLa-RhoA-V14 e HeLa-RhoA-N19 após estresse por radiação ultravioleta

4.4.1 Senescência celular associada à Beta-Galactosidase

Células senescentes são células que perdem o potencial de divisão de forma irreversível. Essas células têm como característica uma parada no ciclo na fase G1 e uma proporção reduzida na razão núcleo/citoplasma em relação às células que permanecem em divisão celular. Tanto estímulos extrínsecos como intrínsecos podem levar a célula a senescer (Stein et al., 1999).

A β -Galactosidase é uma enzima expressa no lisossomo celular, que possui atividade ótima em pH 4, no entanto foi demonstrado que em células senescentes a β -Gal possui atividade aumentada em pH 6, o que levou tal enzima a se tornar um marcador bem aceito de senescência celular (Dimri et al., 1995).

Para verificar se a radiação ultravioleta estava induzindo a senescência celular na linhagem parental HeLa ou nas sublinhagens HeLa-RhoA-N19 e HeLa-RhoA-V14, realizamos o ensaio de atividade de β -Galactosidase onde pudemos observar que o mutante RhoA-N19 se mostra mais suscetível à senescência quando comparado às outras linhagem após 96h de exposição à radiação ultravioleta dos tipos A, B ou C (Figura 33).

No painel representativo das fotos analisadas da figura 33, podemos concluir ao analisar as marcações indicadas pelas setas amarelas, que o mutante RhoA-N19 possui maior quantidade e maior intensidade de marcação azul, indicando maior número de células em senescência.

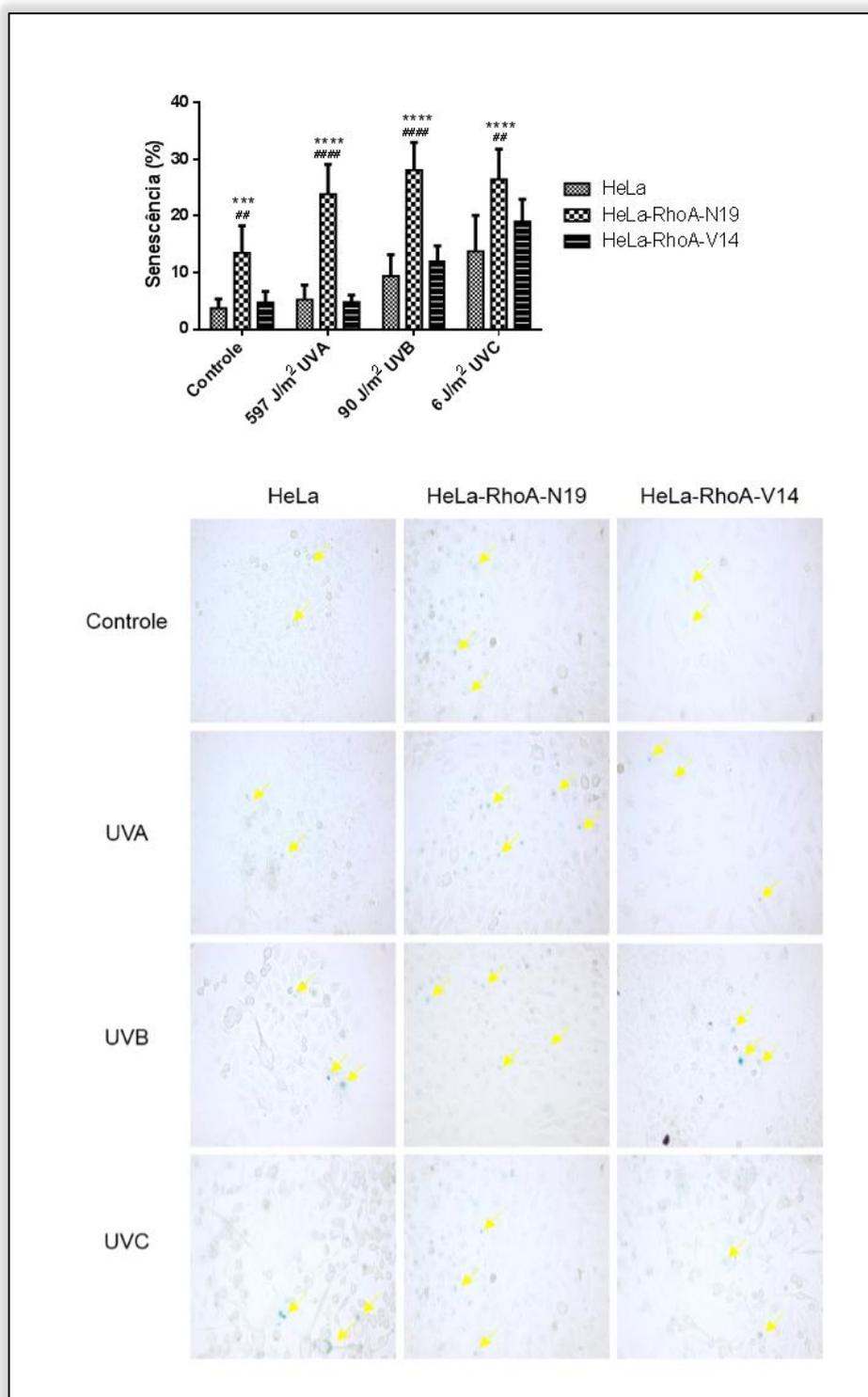


Figura 33. Avaliação da senescência celular nas linhagens HeLa, HeLa-RhoA-N19 e HeLa-RhoA-V14 por SA-β-gal. Após 96h do tratamento com 597 J/m² UVA, 90 J/m² UVB ou 6 J/m² de UVC as linhagens foram coradas com solução contendo X-gal, por 18h à 37°C. Análises feitas em microscópio invertido contando células senescentes (azul) em um total de pelo menos 1000 células por placa analisada. As setas amarelas no painel demonstrativo de fotos indicam as marcações consideradas. Os resultados mostram a média de sextuplicata experimental, a análise estatística foi feita com o método two-way ANOVA ##P=0.0045; ***P<0.001; **** ###P<0.0001; * representa análise entre a linhagem parental versus as sublinhagens; # representa análise entre os mutantes HeLa-RhoA-N19 e HeLa-RhoA-V14.

4.4.2 Autofagia celular associada ao marcador LC3B I/II

A autofagia celular é uma via de reciclagem das células que ocorre através da degradação de componentes celulares não funcionais no lisossomo, sendo necessária para a sobrevivência, desenvolvimento e homeostase celular (Klionsky, Saltiel, 2012). Dentre os marcadores de autofagia, destaca-se a proteína LC3, necessária durante o processo de expansão da membrana autofágica; essa proteína é encontrada em duas formas, no citosol como LC3-I e sua derivada proteolizada LC3-II na membrana do autofagossomo, sendo degradada após a formação do autofagolisossomo (Glick et al., 2010).

Para verificar o comportamento das linhagens investigadas em relação à autofagia celular quando expostas à radiação ultravioleta, foram realizados imunoblottings para LC3B isoformas I e II, após 48 h de tratamento com radiação ultravioleta. Os resultados mostram que não foi possível verificar diferenças nos níveis de LC3-I entre a linhagem parental HeLa e os mutantes RhoA-V14 e RhoA-N19, enquanto que a LC3-II só foi visualizada de maneira considerável no controle positivo de cloroquina nas três linhagens (Figura 34A).

Ensaio de imunofluorescência foram realizados em complemento para verificar o desencadeamento da autofagia celular ou não nas três linhagens, utilizando anti-LC3B e Alexa 488. Pudemos confirmar o resultado obtido anteriormente dos imunoblottings, constatando então que no tempo de 48 h com as doses de UVA, UVB ou UVC utilizadas, as linhagens HeLa, HeLa-RhoA-N19 ou HeLa-RhoA-V14 não apresentam ativação significativa da via de autofagia (Figura 34B).

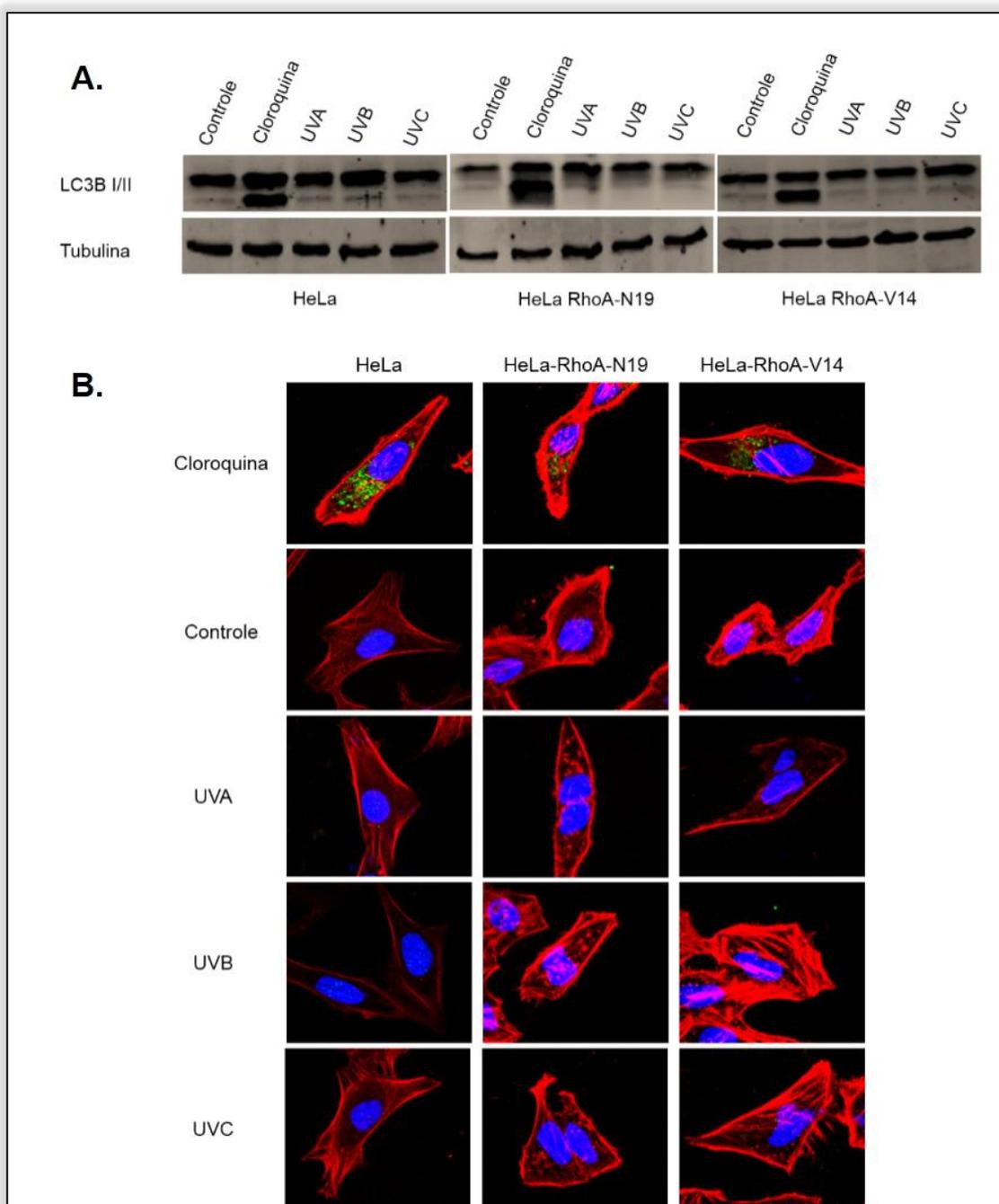


Figura 34. Ensaio de autofagia das linhagens HeLa, HeLa-RhoA-N19, HeLa-RhoA-V14. As linhagens foram expostas à 50 KJ/m^2 de UVA, 80 J/m^2 de UVB e 4 J/m^2 de UVC e mantidas em cultura por 48h antes das análises. A. Immunoblot para LC3B (Invitrogen), das três linhagens nas condições sem tratamento, controle positivo com $50 \mu\text{m}$ de cloroquina e tratadas com radiações ultravioleta dos tipos A, B e C; B. Imunofluorescência utilizando anti-LC3B e anti-rabbit Alexa 488 (verde), Faloidina-Rodamina (Invitrogen) em vermelho e DAPI (azul) paramarcação dos núcleos para as três linhagens após 48h dos tratamentos citados acima. As imagens são representativas de dois experimentos independentes.

4.4.3 Apoptose e Necrose por PI e Anexina V em citometria de fluxo

A morte celular programada, ou apoptose, tem papel fundamental na homeostase tecidual, bem como em diversas patologias, dentre elas o câncer. Essa via de morte celular pode ser desencadeada por diversos estímulos intrínsecos e extrínsecos, incluindo danos no DNA e radiação (Hengartner, 2000). E para avaliar uma possível diferença na ativação das vias de morte celular por apoptose ou necrose, a linhagem parental HeLa, bem como os mutantes RhoA-V14 e RhoA-N19, foram submetidos à ensaios de citometria de fluxo após marcação com Anexina V e iodeto de propídio em tempos de 48 h e 72 h após estresse promovido por 50 KJ/m² UVA, 80 J/m² UVB e 4 J/m² UVC.

As células analisadas foram classificadas em apoptose inicial, quando apresentavam marcação positiva apenas para Anexina V (Figura 35A); apoptose tardia, quando apresentavam marcação positiva tanto para Anexina V quanto para iodeto de propídio (Figura 35B) e necrose, quando apresentavam marcação positiva apenas para Iodeto de Propídio (Figura 35C). Após analisar os dados gerados por citometria de fluxo para avaliar a morte celular por apoptose ou necrose na linhagem de adenocarcinoma de cérvix HeLa bem como nas sublinhagens mutadas para RhoA, não foi possível observar diferenças significativas entre as linhagens com as doses utilizadas de radiação ultravioleta dos tipos A, B e C (Figura 35).

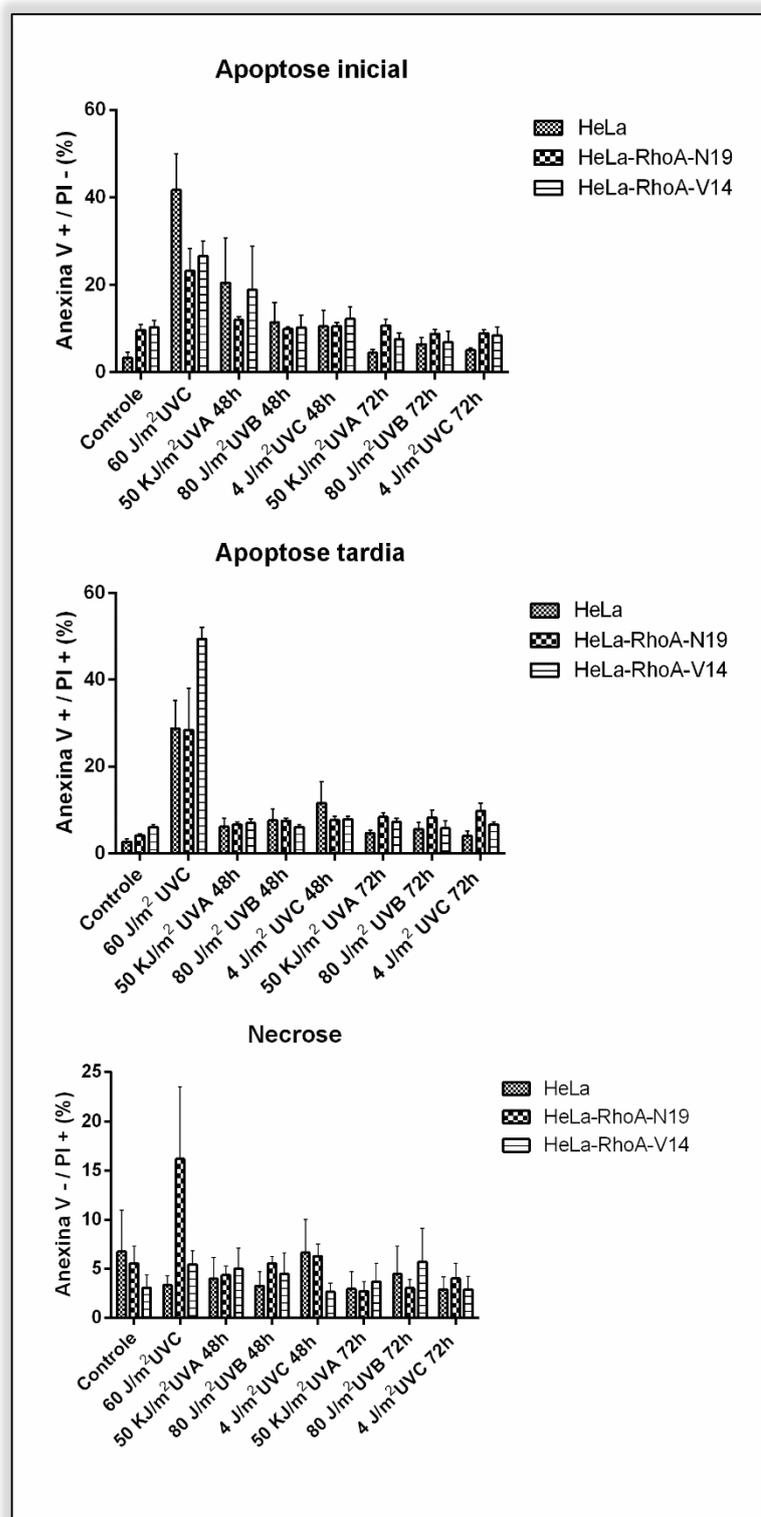


Figura 35. Análise de apoptose e necrose na linhagem HeLa e mutantes de RhoA. As células foram marcadas com anexina V e iodeto de propídio 48h e 72h após tratamentos com UVA, UVB e UVC, como controle positivo foi utilizado 60 J/m² UVC, processadas e analisadas por citometria de fluxo em citômetro BD FACS Verse (BD Biosciences). Os dados foram analisados no Software Kaluza 1.3 (Beckman Coulter) e classificados em A. Apoptose inicial; B. Apoptose tardia e C. Necrose. Os gráficos representam média de duplicata experimental.

4.5 Efeitos da inibição da atividade de RhoA na sinalização de reparo de DNA em células deficientes da via de NER após radiação ultravioleta

Para avaliar a possível participação da GTPase RhoA Na via de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos, inibimos a atividade endógena de RhoA com a exoenzima C3 em linhagens deficientes em proteínas da via de NER. Todas as abordagens descritas nesta seção de resultados foram realizadas em linhagens XPA, XPC e XPV, respectivamente deficientes em proteínas envolvidas na via de reparo por excisão de nucleotídeos e a linhagem MRC-5, um fibroblasto normal humano usado como controle negativo por ser proficiente da via de NER. Para verificar a resposta das células frente ao inibidor de RhoA, utilizamos o ensaio de pull-down (Figura 36), que nos mostrou que 24 h após a transfecção com pEF-myc-C3 as quatro linhagens celulares possuem atividade de RhoA significativamente reduzida.

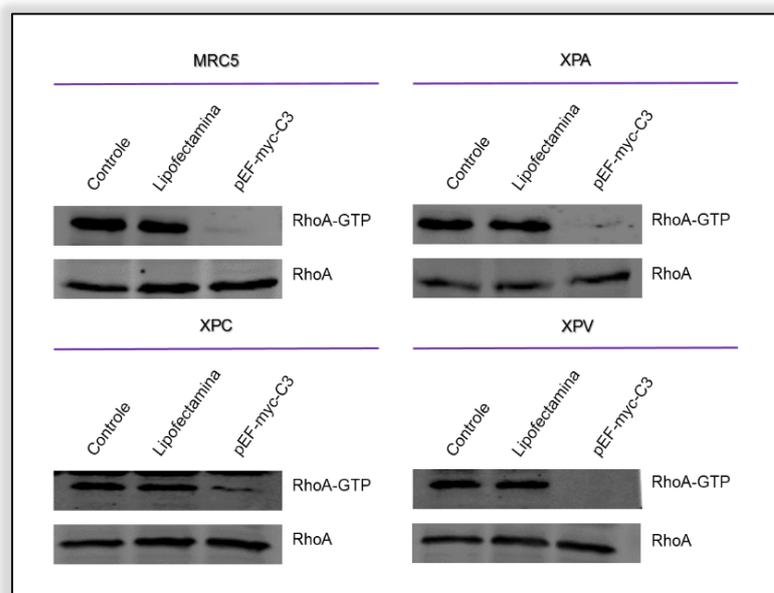


Figura 36. Inibição da atividade da GTPase RhoA endógena pela toxina C3 nas linhagens MRC5, XPA, XPC e XPV. As linhagens foram transfectadas em placas de 100 mm com 14 µg de plasmídeo pEF-myc-C3, 24 h após a transfecção o ensaio de pull-down foi realizado e os níveis de RhoA total e ativo (ligado a GTP) foram avaliados por western blot utilizando anticorpo anti-RhoA (Santa Cruz).

Utilizando este protocolo de inibição da proteína RhoA nas linhagens pela toxina C3, as células foram submetidas inicialmente a ensaios de proliferação celular por curvas de crescimento. Como podemos observar na figura 37A, a linhagem de fibroblasto MRC5, possui capacidade proliferativa reduzida quando na presença da toxina C3 (linha verde), bem como quando exposta à 4 J/m² UVC (linha rosa) em

relação aos controles; todavia, quando o tratamento com radiação é somado à inibição da GTPase (linha vermelha) o efeito na redução da proliferação celular se torna mais expressivo, e as células passam a proliferar significativamente nestas condições somente após 120 h de exposição à UVC.

Analisando as linhagens deficientes em proteínas da via de NER, observamos comportamento similar à linhagem MRC5 em relação aos tratamentos com UVC (linha rosa) e quando a proteína RhoA é inibida (linha verde) em relação aos controles (linhas azuis), a capacidade proliferativa das linhagens é muito mais reduzida (Figura 37).

Quando a exposição à UVC é somada à inibição da atividade endógena na GTPase, a linhagem deficiente em XPA (Figura 37B) e a linhagem deficiente em XPC (Figura 37C) não conseguem recuperar a capacidade proliferativa mesmo após 144 h da inibição transiente de RhoA, enquanto a linhagem XPV começa a recuperar a capacidade proliferativa apenas após 120 h (Figura 37D).

Estes resultados mostram claramente que células deficientes da via de NER, e por isso já muito mais sensíveis aos efeitos da radiação UVC, são ainda mais sensibilizadas quando da inibição de RhoA, o que reforça a hipótese que esta GTPase tem papel importante na recuperação e proliferação destas células provável e possivelmente contribuindo da alguma forma com mecanismos de reparo de DNA envolvidos.

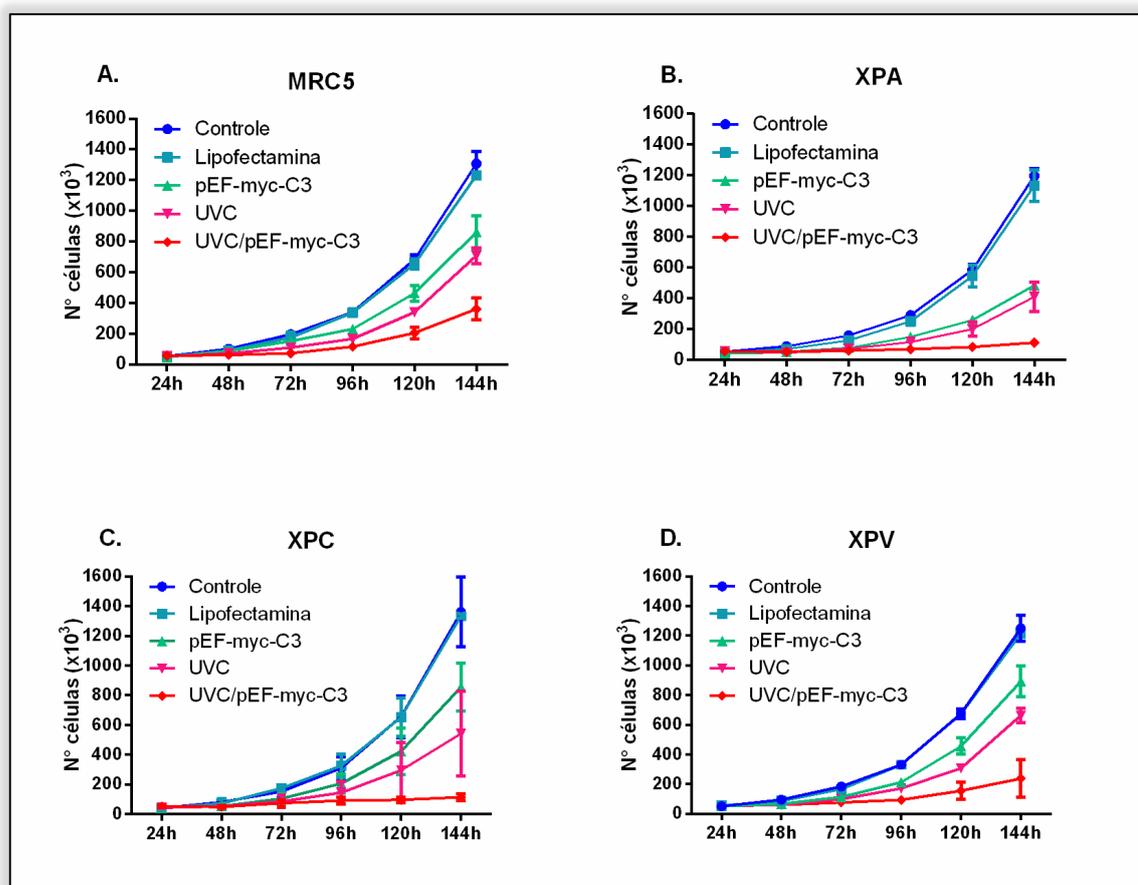


Figura 37. Curvas de crescimento das linhagens MRC5, XPA, XPC e XPV transfetadas com o plasmídeo contendo a sequência da exoenzima C3. As células foram transfetadas com 14 μ g de plasmídeo em placas de 100mm, 24h após a transfecção elas foram distribuídas em placas de 60mm em densidade de 5×10^4 células, como controle foram utilizadas células sem tratamento e tratadas apenas com lipofectamina. A. linhagem de fibroblasto MRC5; B. linhagem deficiente em XPA; C. linhagem deficiente em XPC e D. linhagem deficiente em XPV. Os resultados representam média de triplicatas experimentais.

Quando analisamos as linhagem MRC5 em relação aos níveis de danos causados por UVC e à recuperação dos mesmos, seguidos em experimentos de cinética até 6h após tratamento por ensaio cometa alcalino, com e sem inibição da proteína RhoA (Figura 38A), podemos observar que após 6 h, as células tratadas com inibidor possuem danos persistentes, enquanto as células que sofreram danos mas que possuem a GTPase ativa já se recuperaram.

Um ponto importante a ser observado na figura 38, é que nas condições controle das quatro linhagens analisadas, com ou sem exposição à UVC, independente das linhagens serem transfetadas com pEF-myc-C3 os valores de OTM permanecem próximos a 1, demonstrando que a inibição de RhoA sem exposição à radiação ultravioleta não gera danos no DNA.

Quando analisamos a inibição de RhoA na linhagem defectiva em XPA (Figura 38B), proteína recrutada na via de NER logo após a etapa de reconhecimento da lesão e que possui grande afinidade por lesões induzidas por UV, podemos visualizar por cometa alcalino um atraso significativo na recuperação do dano muito maior nesta linhagem quando a proteína RhoA é inibida, colocando assim a atividade da proteína RhoA em papel importante no recrutamento de proteínas da via de NER.

As linhagens deficientes em XPC (Figura 38C), proteína importante no reconhecimento de lesão na sub-via global de NER, e XPV (Figura 38D), não apresentam diferenças estatisticamente significativas no tempo analisado para comparação de ineficiência de reparo ou acúmulo de danos (6 h), após exposição à UVC quando comparadas as células tratadas ou não com a toxina C3.

Embora não exista diferença estatística, é possível observar um acúmulo de danos após 6h nas linhagens XPC e XPV (Figura 38C e 38D), que sem inibição de RhoA atingem respectivamente um OTM máximo de 5 e 4, enquanto após a inibição da GTPase por C3 esses valores chegam respectivamente a 10 e 5.

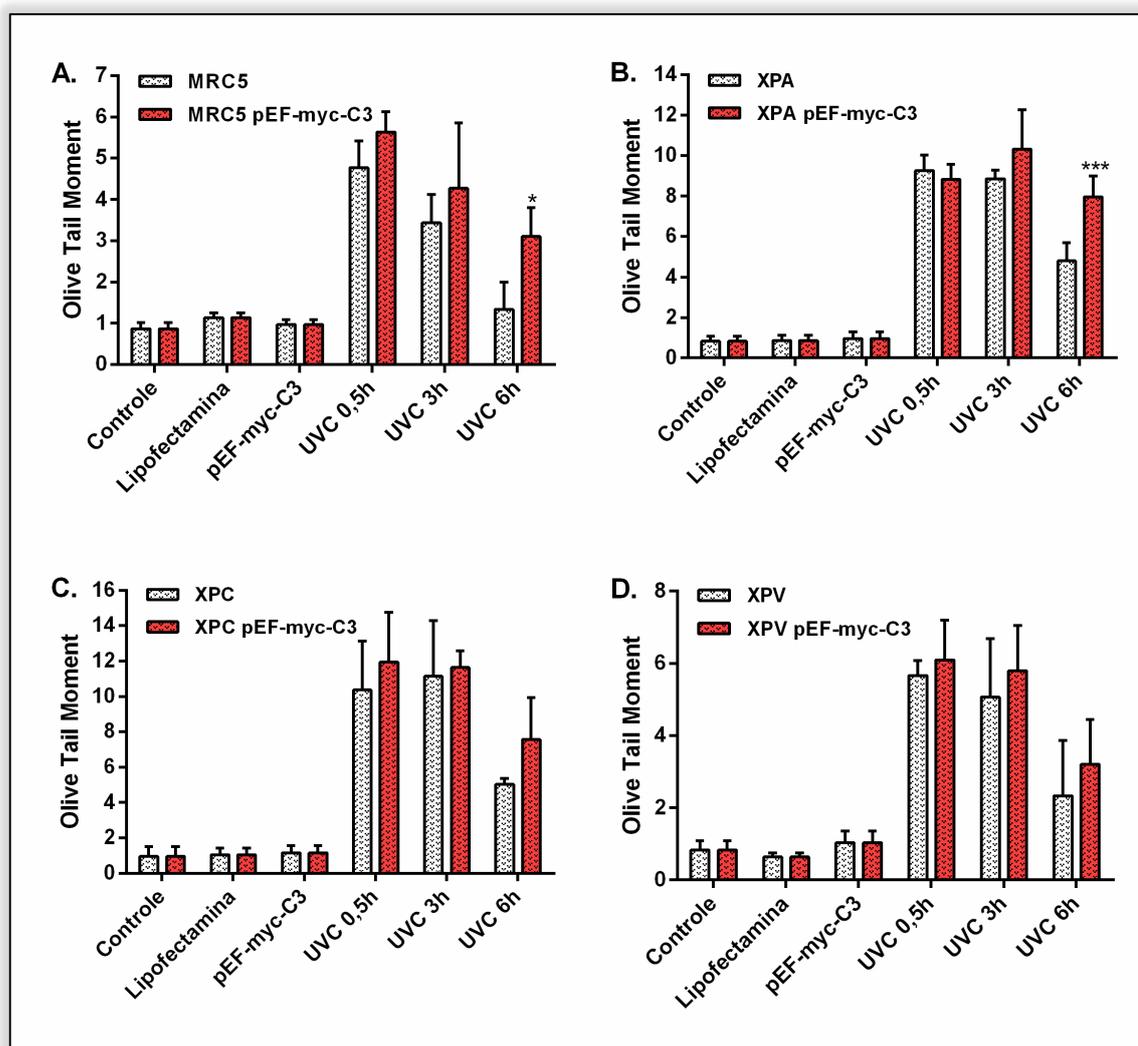


Figura 38. Ensaio de cometa alcalino das linhagens MRC5, XPA, XPC e XPV após inibição da proteína RhoA endógena e exposição à UVC. As células foram transfectadas com 14 ug de plasmídeo em placas de 100mm, 24h após a transfecção elas foram distribuídas em placas de 35mm em densidade de 2×10^5 células, após tempo de adesão as células foram submetidas a tratamentos com 4 J/m^2 de UVC, para então serem submetidas à corrida eletroforética em condições alcalinas. A. Ensaio de cometa alcalino da linhagem MRC5 após transfecção com pEF-myc-C3; B. Ensaio de cometa alcalino da linhagem XPA após transfecção com pEF-myc-C3; C. Ensaio de cometa alcalino da linhagem XPC após transfecção com pEF-myc-C3; D. Ensaio de cometa alcalino da linhagem XPV após transfecção com pEF-myc-C3. Os resultados são a média de triplicata experimental. Foi utilizado para análise estatística two-way ANOVA das linhagens tratadas com a toxina C3 versus as não tratadas, onde * $P < 0.1$ e *** $P < 0.001$.

5 DISCUSSÃO

As funções biológicas da GTPase RhoA vem sendo estudadas ao longo das últimas décadas e essa enzima tem papel essencial em diversas vias de sinalização celular, como no controle da dinâmica dos filamentos de actina, controle e progressão do ciclo celular além de migração celular (Jaffe, Hall, 2005).

Em relação à organização do citoesqueleto, sabe-se que RhoA desempenha papéis fundamentais a partir de duas principais proteínas efetoras: a serina/treonina quinase ROCK, responsável pela organização de filamentos de actina em fibras de estresse, que atua em colaboração com a mDia, que induz a formação dos filamentos de actina (Watanabe et al., 1999).

Nas últimas quatro décadas, actina monomérica e filamentosa vêm sendo observadas em núcleos de tipos celulares diferentes, a concentração nuclear de actina é regulada por proteínas capazes de transportar esses filamentos entre núcleo e citoplasma, o fator de exportação nuclear (XPO6) é o responsável pelo transporte de complexos de profilina-actina para o citoplasma, enquanto IPO9 importa complexos de cofilina-actina do citoplasma para o núcleo (Dopie et al., 2012; Stuken et al., 2003).

Belin e colaboradores demonstraram em agosto de 2015, que danos gerados no DNA por diversos agentes genotóxicos, inclusive radiação ultravioleta, induzem filamentos de actina nuclear através das proteínas *Formin-2* e *Spire 1/2*, o que pode facilitar o movimento da cromatina e o recrutamento de fatores necessários para o devido reparo do DNA (Belin et al., 2015).

Além de RhoA, outras proteínas da família Rho estão envolvidas na regulação do citoesqueleto de actina. Rac1 por exemplo têm função de induzir a polimerização de actina para formar lamelipódios (projeções do citoesqueleto), enquanto Cdc42 estimula a polimerização da actina para a formação de filopódios, extensões longas e finas (Nobes, Hall, 1995).

Em paralelo aos estudos da importância da GTPase RhoA em dano e reparo de DNA, nosso grupo demonstrou que a diminuição da atividade de Rac1, através do mutante HeLa-Rac1-N17 leva à um atraso na fosforilação de H2AX e Chk1, após tratamentos com radiação ultravioleta e gama (Espinha et al., 2015).

Na mesma linha investigativa, demonstramos que a super expressão da GTPase Cdc42 em seu estado constitutivamente ativo (Cdc42-V12) na linhagem de adenocarcinoma de cérvix HeLa, leva à uma maior sensibilidade à radiação UVC e

uma menor sobrevivência quando comparadas à linhagem que expressa níveis normais de Cdc42 (Ascer et al., 2015).

Em outro trabalho desenvolvido em nosso grupo de pesquisa, conseguimos demonstrar que quando os danos são causados por radiação gama, a linhagem de adenocarcinoma de cérvix HeLa, apresenta deficiência em vias de reparo ativadas por quadra dupla na fita de DNA, como via de reparo por recombinação homóloga e recombinação não-homóloga, após inibição da atividade de RhoA pela exoenzima C3 (Osaki et al., 2016).

Acreditamos que deva existir um balanço entre os filamentos de actina formados no citoesqueleto para que ocorra a indução de filamentos de actina nuclear e o devido recrutamento de fatores de reparo de DNA; dessa forma ao diminuir (através dos mutantes RhoA-N19) ou inibir (através da exoenzima C3) a atividade da GTPase RhoA, o recrutamento desses fatores poderiam estar sendo afetados.

Assim, sabendo-se do amplo papel da família das Rho GTPases em tumorigênese (Orgaz et al., 2014) e somando-se o potencial de sinalização dessas proteínas após indução de estresse genotóxico, o presente trabalho teve a intenção de avaliar a modulação da GTPase RhoA após danos promovidos por UVA, UVB ou UVC em linhagens tumorais de adenocarcinoma de cérvix (HeLa) e melanoma metastático (MeWo).

O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo envolvido em diversas doenças, incluindo câncer, onde se sabe que ele estimula a adesão de células tumorais de mama (MDA-MB-435) pela via de RhoA. Garcia e colaboradores demonstraram que a via de RhoA/ROCK promove a fosforilação e translocação núcleo-citoplasma de nucleolina, uma proteína de localização principalmente nucleolar, que estimula a adesão quando localizada na superfície celular ou no citoplasma, onde co-localiza com RhoA (Garcia et al., 2011).

Da mesma forma, acreditamos que a via de RhoA/ROCK possa estar envolvida na sinalização núcleocitoplasmática requerida após estresse por radiação ultravioleta, emitindo sinais não apenas para a síntese e polimerização de actina, mas também para o recrutamento de proteínas envolvidas em reconhecimento do dano instalado por radiação ultravioleta e, como consequência, início ou disparo de mecanismos de reparo.

A GTPase RhoA há anos vem sendo encontrada super expressa e/ou super ativada em diversos tipos de câncer, além de estar envolvida em progressão tumoral.

Por isso usamos como modelo celular para avaliar sua sensibilidade frente à radiação ultravioleta a linhagem de adenocarcinoma de cérvix – HeLa, que possui um alto basal de RhoA-GTP (Figura 9) além de tal linhagem ser deficiente em p53; Xia e Land demonstraram que a deficiência em p53 pode ser favorável à ativação de RhoA (Xia, Land, 2007).

Para verificar se as respostas encontradas na linhagem HeLa eram linhagem dependente, optamos por utilizar uma linhagem de melanoma (MeWo), que possui um basal menor de RhoA-GTP (Figura 9) em relação à HeLa, o que tornaria mais visível as respostas biológicas causadas por uma diminuição da atividade GTPásica de RhoA. Além, é claro, desta linhagem possuir níveis normais de p53.

Os danos de fragmentação no DNA das linhagens HeLa e MeWo, além dos mutantes RhoA-N19 e RhoA-V14, foram analisados pelo método do cometa alcalino, capaz de detectar fragmentos causados diretamente pela radiação ultravioleta, além de mutações no DNA sensíveis a quebrar em condições alcalinas, os sítios alcalino-lábeis (Piette et al., 1986).

Quando submetidas à UVA, UVB ou UVC, os mutantes gerados para a proteína RhoA em seu estado dominante negativo (HeLa-RhoA-N19 e MeWo-RhoA-N19) demonstram uma maior fragmentação do DNA, visualizado no ensaio cometa, em relação às linhagens parentais e em relação aos mutantes RhoA-V14. Essa diferença foi observada também, quando a atividade da proteína Rho é inibida utilizando transfecção transiente com plasmídeo que codifica para a exoenzima C3, capaz de inibir RhoA, RhoB e RhoC em ambas linhagens HeLa e MeWo, o que nos deu indícios de que a atividade da proteína Rho poderia ser necessária após dano causado por radiação não-ionizante UV.

Kobayashi e colaboradores mostraram em fibroblastos, através de anticorpos específicos, que lesões do tipo dímeros de pirimidina (CPD) permanecem no material genético até 24 h após exposição à doses crescentes de UVB e UVC (Kobayashi et al., 2001). Assim, nos ensaios de imunofluorescência realizados nas linhagens HeLa e MeWo, bem como em seus mutantes para a GTPase RhoA em seu estado constitutivamente ativo (RhoA-V14) e dominante negativo (RhoA-N19), pudemos constatar a presença de CPDs após 24 h de exposição à radiação ultravioleta, como esperado, embora seja visível o início da recuperação principalmente nas linhagens parentais e nos mutantes HeLa-RhoA-V14 e MeWo-RhoA-V14. Contudo, 48 h após exposição à UVA, UVB e UVC dímeros de pirimidina são detectados apenas nos

mutantes HeLa-RhoA-N19 e MeWo-RhoA-N19, demonstrando, que células deficientes na atividade de RhoA apresentam um aparente atraso no reparo de material genético após exposição à radiação ultravioleta utilizada.

A GEF LARG, que catalisa a troca de RhoA-GDP para RhoA-GTP ativando à via RhoA/ROCK para reorganização do citoesqueleto, interage com proteínas importantes para replicação após estresse genotóxico, como TELO2 e PCNT. Os autores do trabalho em questão demonstraram que linhagens deficientes na GEF LARG possuem focos de γ H2AX reduzidos, além de menor ativação de Chk1; além disso, células ATR e TELO2 deficientes apresentaram deficiência na via de fosforilação de miosina, via ativada pela GTPase RhoA (Beveridge et al., 2014). Estes resultados publicados recentemente, também reforçam nossa hipótese de envolvimento da via de RhoA/ROCK em mecanismos de reparo de DNA.

Uma das primeiras proteínas sinalizadoras em dano do DNA é a histona H2AX fosforilada, que é demonstrada estar presente em danos após radiação ionizante, ultravioleta entre outros agentes alquilantes. Foi demonstrado que após exposição à UVC, sua fosforilação tem um primeiro pico em 1h após estresse em células CHO-9, e em outra linhagem derivada da mesma hipersensível à UV, e um segundo pico de ativação é observado após 12h, demonstrando assim que a fosforilação de histona estava ocorrendo apenas na fase S do ciclo celular após radiação ultravioleta (Staszewski et al., 2008). Em um outro trabalho foi demonstrado que o pico de fosforilação de histona H2AX após exposição à diferentes doses de UVB se dá após 30min ou 1h, de acordo com o carenciamento ou estímulo com 20% de soro fetal bovino em linfócitos (Scarpato et al., 2013).

Em nossos dados, pudemos observar por western blotting que as linhagens parentais HeLa e MeWo possuem um pico de ativação em 1h, como esperado, os mutantes que expressam a GTPase RhoA em seu estado constitutivamente ativo possuem fosforilação adiantada em relação às parentais, sendo que a sublinhagem HeLa-RhoA-V14 após 15 minutos e MeWo-RhoA-V14 após 30 minutos. Em oposição, os mutantes dominante negativos HeLa-RhoA-N19 e MeWo-RhoA-N19 não apresentam fosforilação de histona H2AX nos primeiros 60 minutos após exposição à UVC. Dessa forma, os dados obtidos por Beveridge e colaboradores corroboram os resultados que obtivemos na análise de ativação de H2AX após radiação ultravioleta do tipo C, demonstrando que a atividade GTPásica de RhoA é necessária para reconhecimento do dano de DNA a ser reparado.

Além de γ H2AX, outras proteínas sinalizadoras são essenciais após estresse gerado por radiação ultravioleta, como a quinase ATR, capaz de fosforilar a proteína Chk1 nos resíduos Ser 345 e Ser 317, culminando em paradas do ciclo celular nas fases S e G2/M para que ocorra o reparo do DNA após estresse genotóxico (Chen, Sanchez, 2004).

Beveridge e colaboradores demonstraram que a linhagem HeLa quando transfectada com siRNA para a GEF LARG, específica da GTPase RhoA, possuem deficiência na ativação de Chk1 com ou sem estresse gerado por hidróxiuréia, em nosso trabalho verificamos que a fosforilação de Chk1 é atrasada nas linhagens HeLa/MeWo-RhoA-N19 após radiação ultravioleta do tipo C, o que nos induziu a concluir comparativamente que os pontos de checagem nessas células estavam sendo afetados e muito provavelmente o reparo do DNA lesionado (Beveridge et al., 2014).

As MAP quinases constituem vias de sinalização sequencial, onde uma quinase fosforila a outra levando à sua ativação e assim consecutivamente, essas vias são ativadas tanto em resposta à radiação quanto à outros estressores celulares, e levam à morte ou proliferação celular (Munshi, Ramesh, 2013). JNK 1/2 foi demonstrada ser ativada após radiação ultravioleta, desempenhando um papel pró apoptótico quando possui ativação prolongada, por ser capaz de ativar proteínas caspases além de regular proteínas envolvidas na regulação da via de apoptose, como p53 e Bax (Dent et al., 2003). Já a ERK 1/2 está mais envolvida em vias de proliferação celular, sendo que após tratamento com radiação foi demonstrada que ela é rapidamente ativada em linhagens tumorais pelas GTPases Ras/Raf em contrapartida, quando essa quinase é silenciada após radiação ionizante, foi demonstrado que a célula pode ser inviabilizada (Munshi, Ramesh, 2013).

Em nossos ensaios para averiguar a ativação de JNK 1/2 ou ERK 1/2 nas linhagens HeLa e MeWo bem como em seus respectivos mutantes RhoA-N19 ou RhoA-V14 percebemos que a ativação dessas proteínas são deficientes após radiação UVC nos mutantes HeLa/MeWo-RhoA-N19, o que corrobora a menor capacidade proliferativa e menor sobrevivência dessas linhagens após tratamento com radiação ultravioleta.

O controle negativo da progressão no ciclo celular é requerido durante a diferenciação, o desenvolvimento, a senescência e a morte das células, apresentando importante função no bloqueio da proliferação quando as células apresentam

integridade genômica comprometida, o que pode impedir a tumorigênese (Hartwell, Kastan, 1994). Por RhoA apresentar papel importante na progressão da fase G1 do ciclo celular, bem como seu papel fundamental nas etapas finais da mitose celular, vias de morte celular foram analisadas na linhagem de adenocarcinoma de cérvix HeLa, em comparação às sublinhagens mutantes para RhoA HeLa-RhoA-V14 e HeLa-RhoA-N19.

Sabe-se que a via de sinalização para contração de filamentos de actina/miosina desencadeada por RhoA/ROCK-I é necessária nas modificações citoplasmáticas que ocorrem durante o processo de morte por apoptose (Julian, Olson, 2014), entretanto as doses de radiação ultravioleta utilizadas no presente estudo em cinéticas de 48 h e 72 h, não desencadearam diferenças na linhagem HeLa após modulação da atividade GTPásica de RhoA.

A degradação de proteínas é feita em homeostase pelo processo de autofagia e foi demonstrado que RhoA é degradada por esse processo para garantir estabilidade genômica (Belaid et al., 2013). Utilizando as técnicas de imunofluorescência e western blot não detectamos diferente expressão de marcadores de autofagia celular nas linhagens HeLa, HeLa-RhoA-N19 e HeLa-RhoA-V14 após exposição à 50 KJ/m² UVA, 80 J/m² UVB ou 4 J/m² UVC.

Como já mencionado e está bem estabelecido na literatura, o reparo de danos induzidos por radiação ultravioleta é realizado principalmente pela via de NER, e a maioria dos pacientes que possuem deficiência em proteínas envolvidas na via de NER apresentam deficiência no reparo de lesões causadas por radiação ultravioleta e por isso desenvolvem câncer com maior facilidade. Assim, decidimos também avaliar o papel de RhoA e sua via de sinalização em linhagens celulares imortalizadas e provenientes de pacientes XPA, XPC e XPV. Esta última por se saber que pacientes com XPV são sensíveis à radiação UV, mesmo não desenvolvendo falhas na via de NER. E como controle foi utilizada a linhagem estabelecida de fibroblasto humano MRC5 (Stary, Sarasin, 2002).

Mirzayans e colaboradores mostraram que em baixas doses de UVC, fibroblastos deficientes em proteínas da via de NER possuem uma alta redução em sua capacidade proliferativa, pois tais linhagens entram em senescência celular decorrente de acúmulo de p21 (Mirzayans et al., 2008). Em nossos experimentos de proliferação celular, pudemos observar essa redução na capacidade proliferativa das linhagens de fibroblastos MRC5, XPA, XPC e XPV após exposição à 4 J/m² de UVC.

Muito interessante após inibição da atividade da GTPase RhoA pela exoenzima C3 esta redução de proliferação foi muito acentuada. Ao somar a inibição da GTPase RhoA, com o tratamento com radiação UVC as linhagens XPA e XPC não conseguem se recuperar mesmo após 120 h de tratamento enquanto as linhagens MRC5 e XPV, vão apresentar sinal de proliferação apenas após 120 h de UVC.

Ao analisarmos as linhagens deficientes em NER em relação à capacidade de reparo de DNA fragmentado pelo ensaio de cometa alcalino, notamos que a linhagem controle MRC5 e a linhagem deficiente em XPA, possuem danos significativamente maiores que as outras duas linhagens, quando além de expostas à UVC tem a GTPase RhoA inibida, mesmo após 6h de tratamento. Como foi demonstrado em 2007, uma das proteínas alvo de ATM e ATR, após estresse gerado por radiação ultravioleta, é a proteína XPA. Assim, se a inibição de RhoA estiver impactando a sinalização de dano no DNA após UV, isso pode estar afetando a via de NER através do atraso nos sinais necessários para o reparo do material genético através da regulação negativa da proteína XPA por RhoA (Stokes et al., 2007).

6 CONCLUSÕES

Os dados apresentados e discutidos nesse trabalho nos permitem concluir, nas linhagens de adenocarcinoma de cérvix (HeLa) e de melanoma (MeWo), que:

- ✓ Ao se modular negativamente a atividade da GTPase RhoA, através do mutante RhoA-N19 ou da utilização do inibidor C3, a resposta celular ao estresse genotóxico causado pela radiação UVA, UVB ou UVC fica deficiente, seja por um atraso no reparo de DNA endógeno fragmentado, ou seja pela menor capacidade da maquinaria endógena de reparar DNA exógeno previamente lesado.
- ✓ A deficiência na fosforilação da histona H2AX e o atraso ativação da proteína Chk1 nos mutantes dominante negativo HeLa/MeWo-RhoA-N19 constata uma falha no reconhecimento de danos, que acarretariam na deficiência ao recrutar proteínas capazes de identificar e iniciar o reparo de lesões causadas por radiação ultravioleta.
- ✓ O reparo de fotoprodutos do tipo dímeros de pirimidina é eficiente nas linhagens que possuem atividade basal normal de RhoA ou expressando a GTPase em seu estado constitutivamente ativo HeLa/MeWo-RhoA-V14, mesmo após 48h de exposição à UVA, UVB ou UVC, em comparação as linhagens deficientes pra RhoA.
- ✓ A proliferação e sobrevivência celular são reduzidas quando a atividade da proteína RhoA é regulada negativamente, com ou sem exposição às radiações UVA, UVB e UVC, sendo ainda mais afetadas em combinação com estes agentes genotóxicos.
- ✓ A linhagem HeLa tende à entrar em senescência celular quando a atividade da enzima RhoA é reduzida em condições de exposição a UVA, UVB e UVC.

Além disso, os dados apresentados e discutidos nesse trabalho, nas linhagens deficientes de via de NER, nos permitem concluir que:

- ✓ As linhagens deficientes nas proteínas XPA, XPC e XPV têm proliferação reduzida quando a RhoA GTPase é inibida, e diante da adição do tratamento

com radiação ultravioleta, a capacidade proliferativa dessas células é ainda mais drasticamente afetada.

- ✓ A atividade de RhoA afeta, direta ou indiretamente, a via de reparo por excisão de nucleotídeos na fase de reconhecimento de lesões geradas no material genético por radiação ultravioleta, visto que a linhagem XPA possui um retardo ainda maior na capacidade de se recuperar quando à inibição de RhoA é acrescentada ao tratamento com radiação ultravioleta UV, quando comparada às linhagens XPC ou XPV.

REFERÊNCIAS*

Aelst LV, Symons M. Role of Rho family GTPases in epithelial morphogenesis. *Genes & Development*. 2002;16:1032-54.

Ascer LG, Magalhaes YT, Epinha G, Osaki JH, Souza RC, Forti FL. CDC42 Gtpase activation affects hela cell DNA repair and proliferation following uv radiation-induced genotoxic stress. *J Cell Biochem*. 2015;116:2086-97.

Aspenstrom P, Fransson A, Saras J. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J*. 2004;377:327-37.

Aznar S, Lacal JC. Rho signals to cell growth and apoptosis. *Cancer Lett* 2001;165:1-10.

Bartek J, Lukas J. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Cell Biology*. 2007;19:238-45.

Belaid A, Cerezo M, Chargui A, Corcelle-Termeau E, Pedeutour F, Giuliano S, Ilie M, Rubera I, Tauc M, Barale S, Bertolotto C, Brest P, Vouret-Craviari V, Klionsky DJ, Carle GF, Hofman P, Mograbi B. Autophagy plays a critical role in the degradation of active RhoA, the control of cytokinesis, and genomic stability. *Cancer Res*. 2013;15:4311-22.

Belin BJ, Lee T, Mullins RD. DNA damage induces nuclear actin filament assembly by Formin-2 and Spire-1/2 that promotes efficient DNA repair. *Elife*. 2015 doi: 10.7554/eLife.07735.

Ben-Porath I, Weinberg RA. When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J Clin Invest*. 2004;113:8-13.

Beveridge RD, Staples CJ, Patil AA, Myers KN, Maslen S, Skehel JM, Boulton SJ, Collins SJ. The leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor LARG is required for efficient replication stress signaling. *Cell Cycle*. 2014;13:3450-9.

Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*. 2000;348:241-55.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Boswell SA, Ongusaha PP, Nghiem P, Lee SW. The protective role of a small GTPase RhoE against UVB-induced DNA damage in keratinocytes. *J Biol Chem.* 2007;282:4850-8.

Boyer L, Travaglione S, Falzano L, Gauthier NC, Popoff MR, Lemichez E, Fiorentini C, Fabbri A. Rac GTPase instructs nuclear factor-kappaB activation by conveying the SCF complex and I κ B α to the ruffling membranes. *Mol Biol Cell.* 2004;15:1124-33.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

Calini V, Urani C, Camatini M. Comet assay evaluation of DNA single- and double-strand breaks induction and repair in C3H10T1/2 cells. *Cell Biol Toxicol.* 2002;18:369-79.

Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:729-40.

Canguilhem B, Pradines A, Baudouin C, Boby C, Lajoie-Mazenc I, Charveron M, Favre G. RhoB protects human keratinocytes from UVB-induced apoptosis through epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem.* 2005;280:43257-63.

Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 2001;410:37-40.

Chen LH, Chu PM, Lee YJ, Tu PH, Chi CW, Lee HC, Chiou SH. Targeting protective autophagy exacerbates UV-triggered apoptotic cell death. *Int J Mol Sci.* 2012;13:1209-24.

Chen Y, Sanchez Y. Chk1 in the DNA damage response: conserved roles from yeasts to mammals. *DNA Repair.* 2004;3:1025-32.

Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF. Ras and Rho GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5:355-66.

Dent P, Yacoub A, Fisher PB, Hagan MP, Grant S. MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene.* 2003;22:5885-96.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:9363-67.

Dopie J, Skarp KP, Rajakylä EK, Tanhuanpää K, Vartiainen MK. Active maintenance of nuclear actin by importin 9 supports transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;9:544-52.

Dubash AD, Guilluy C, Srougi MC, Boulter E, Burridge K, García-Mata R. The small GTPase RhoA localizes to the nucleus and is activated by Net1 and DNA damage signals. *Plos One*. 2011;doi:10.1371/journal.pone.0017380.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35:495-516.

Espinha G, Osaki JH, Magalhaes YT, Forti FL. Rac1 GTPase-deficient HeLa cells present reduced DNA repair, proliferation, and survival under UV or gamma irradiation. *Mol Cell Biochem*. 2015;404:281-97.

Forti FL, Armelin HA. Vasopressin triggers senescence in K-ras transformed cells via RhoA-dependent downregulation of cyclin D1. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14:1117-25.

Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 2006;5:2315-9.

Frisan T, Cortes-Bratti X, Chaves-Olarte E, Stenerlöw B, Thelestam M. The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin induces DNA double-strand breaks and promotes ATM-dependent activation of RhoA. *Cell Microbiol*. 2003;5:695-707.

Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol*. 2010;2010:214074.

Garcia MC, Williams J, Johnson K, Olden K, Roberts JD. (2011). Arachidonic acid stimulates formation of a novel complex containing nucleolin and RhoA. *FEBS Lett*. 2011;585:618-22.

Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*. 2010;221:3-12.

Gomez del Pulgar T, Benitah SA, Valeron PF, Espina C, Lacal JC. Rho GTPase expression in tumourigenesis: evidence for a significant link. *Bioessays*. 2005;27:602-13.

Hanawalt PC. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene*. 2002;21:8949-56.

Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science*. 1994;266: 1821-28.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407:770-6.

Hong Z, Jiang J, Hashiguchi K, Hoshi M, Lan L, Yasui A. Recruitment of mismatch repair proteins to the site of DNA damage in human cells. *J Cell Sci*. 2008;121:3146-54.

Hurley PJ, Bunz F. ATM and ATR: components of an integrated circuit. *Cell Cycle*. 2007;6:414-7.

Huschtscha LI, Holliday R. Limited and unlimited growth of SV40-transformed cells from human diploid MRC-5 fibroblasts. *Journal of Cell Science*. 1983;63:77-99.

Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:247-69.

Julian L, Olson MF. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions. *Small GTPases*. 2014;5:e29846.

Kabuyama Y, Homma MK, Sekimata M, Homma Y. Wavelength-specific activation of MAP kinase family proteins by monochromatic UV irradiation. *Photochem Photobiol*. 2001;73:147-52.

Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P. Endonucleolytic function of MutL α in human mismatch repair. *Cell*. 2006;126:297-308.

Kanavy HE, Gerstenblith MR. Ultraviolet radiation and melanoma. *Semin Cutan Med Surg*. 2011;30:222-8.

Karlsson R, Pedersen ED, Wang Z, Brakebusch C. Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1796:91-8.

Katsube T, Mori M, Tsuji H, Shiomi T, Wang B, Liu Q, Neno M, Onoda M. Most hydrogen peroxide-induced histone H2AX phosphorylation is mediated by ATR and is not dependent on DNA double-strand breaks. *J Biochem*. 2014;156:85-95.

Kimmelman AC. The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev*. 2011;25:1999-2010.

Klionsky DJ, Saltiel AR. Autophagy works out. *Cell Metabolism*. 2012;15: 273-4.

Kobayashi N, Katsumi S, Imoto K, Nakagawa A, Miyagawa S, Furumura M, Mori T. Quantitation and visualization of ultraviolet-induced DNA damage using specific antibodies: application to pigment cell biology. *Pigment Cell Res*. 2001;14:94-102.

Lerm M, Schmidt G, Aktories K. Bacterial protein toxins targeting Rho GTPases. *FEMS Microbiology Letters*. 2000;188:1-6.

Li J, Uchida T, Todo T, Kitagawa T. Similarities and differences between cyclobutane pyrimidine dimer photolyase and (6-4) photolyase as revealed by resonance raman spectroscopy. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006;281:25551-9.

Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007;2:329-33.

Liberto M, Cobrinik D, Minden A. Rho regulates p21(CIP1), cyclin D1, and checkpoint control in mammary epithelial cells. *Oncogene.* 2002;21:1590-9.

Liu CA, Wang MJ, Chi CW, Wu CW, Chen JY. Rho/Rhotekin-mediated NF-kappaB activation confers resistance to apoptosis. *Oncogene.* 2004;23:8731-42.

Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature.* 2012;481:287-94.

Luo J, Hosoki K, Bacsi A, Radak Z, Hegde ML, Sur S, Hazra TK, Brasier AR, Ba X, Boldogh I. 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1-mediated DNA repair is associated with Rho GTPase activation and α -smooth muscle actin polymerization. *Free Radic Biol Med.* 2014;73:430-8.

Madaule P, Axel R. A novel ras-related gene family. *Cell.* 1985;41:31-40.

Madaules P, Narumiya S. Rhotekin, a new putative target for Rho Bearing homology to a Serine/Threonine kinase, PKN, and Rhophilin in the Rho-binding domain. *The Journal of Biological Chemistry.* 1996;271:13556-60.

Masutani C, Kusumoto R, Yamada A, Dohmae N, Yokoi M, Yuasa M, Araki M, Iwai S, Takio K, Hanaoka F. The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. *Nature.* 1999;399:700-4.

Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science.* 2007;316:1160-6.

Menck CF, Munford V. DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging?. *Genet Mol Biol.* 2014;37:220-33.

Mirzayans R, Scott A, Andrais B, Pollock S, Murray D. Ultraviolet light exposure triggers nuclear accumulation of p21 (WAF1) and accelerated senescence in human normal and nucleotide excision repair-deficient fibroblasts strains. *J Cell Physiol.* 2008;215:55-67.

Munshi A, Ramesh R. Mitogen-activated protein kinases and their role in radiation response. *Genes Cancer.* 2013;4:401-8.

Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 1995;81:53-62.

Norbury C, Nurse P. Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem.* 1992;61:441-70.

Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:367-401.

Nouspikel T. DNA repair in mammalian cells: nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66:994-1009.

Oh KS, Bustin M, Mazur SJ, Appella E, Kraemer KH. UV-induced histone H2AX phosphorylation and DNA damage related proteins accumulate and persist in nucleotide excision repair-deficient XP-B cells. *DNA Repair (Amst).* 2011;10:5-15.

Orgaz JL, Herraiz C, Sanz-Moreno V. Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells. *Small GTPases.* 2014;5:e29019.

Osaki JH, Espinha G, Magalhaes YT, Forti FL. Modulation of RhoA GTPase activity sensitizes human cervix carcinoma cells to γ -radiation by attenuating DNA repair pathways. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:6012642.

Palomera-Sanchez Z, Zurita M. Open, repair and close again: chromatin dynamics and the response to UV-induced DNA damage. *DNA Repair (Amst).* 2011;10:119-25.

Papaliagkas V, Anogianaki A, Anogianakis G, and Ilonidis G. The proteins and the mechanisms of apoptosis: a mini-review of the fundamentals. *Hippokratia.* 2007;11:108-13.

Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:633-43.

Pfeifer GP, You YH, Besaratinia A. Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res.* 2005;571:19-31.

Piette J, Merville-Louis MP, Decuyper J. Damages induced in nucleic acids by photosensitization. *Photochem Photobiol.* 1986;44:793-802.

Qiu RG, Chen J, McCormick F, Symons M. A role for Rho in Ras transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:11781-5.

Rastogi, RP, Richa Kumar A, Tyagi MB, Sinha RP. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J Nucleic Acids.* 2010;2010: 592980.

Rathinam R, Berrier A, Alahari SK. Role of Rho GTPases and their regulators in cancer progression. *Front Biosci.* 2012;17:2561-71.

Reid T, Furuyashiki T, Ishizaki T, Watanabe G, Watanabe N, Fujisawa K, Morii N, Madaule P, Narumiya S. Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the rho-binding domain. *J Biol Chem.* 1996;271:13556-60.

Reinhardt HC, Schumacher B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet.* 2012;28:128-36.

Ren XD, Kiosses WB, Schwartz MA. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* 1999;18:578-85.

Ridley AJ. RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration. *J Microsc.* 2003;251:242-9.

Ridley AJ. Rho proteins and cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2004;84:13-19.

Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell.* 1992;70:389-99.

Rojas AM, Fuentes G, Rausell A, Valencia A. The Ras superfamily: Evolutionary tree and role of conserved amino acids. *J Cell Biol.* 2012;196:189–201.

Sage E, Girard PM, Francesconi S. Unravelling UVA-induced mutagenesis. *Photochem Photobiol Sci.* 2012;11:74-80.

Sahai E, Marshall CJ. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:133-42.

Satokata I, Tanaka K, Miura N, Narita M, Mimaki T, Satoh Y, Kondo S, Okada Y. Three nonsense mutations responsible for group A xeroderma pigmentosum. *Mutat Res.* 1992;273:193-202.

Satyanarayana A, Kaldis P. A dual role of Cdk2 in DNA damage response. *Cell Div.* 2009;4:9.

Scarpato R, Castagna S, Aliotta R, Azzarà A, Ghetti F, Filomeni E, Giovannini C, Pirillo C, Testi S, Lombardi S, Tomei A. Kinetics of nuclear phosphorylation (γ -H2AX) in human lymphocytes treated in vitro with UVB, bleomycin and mitomycin C. *Mutagenesis.* 2013;28:465-73.

Schmidt A, Hall A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev.* 2002;16:1587-609.

Schuch AP, Menck CF. The genotoxic effects of DNA lesions induced by artificial UV-radiation and sunlight. *J Photochem Photobiol B.* 2010;99:111-6.

Seifert M, Scherer SJ, Edelmann W, Bohm M, Meineke V, Lobrich M, Tilgen W, Reichrath J. The DNA-mismatch repair enzyme hMSH2 modulates UV-B-induced cell cycle arrest and apoptosis in melanoma cells. *J Invest Dermatol.* 2008;128:203-13.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, and Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;175:184-91.

Soufir N, Ged C, Bourillon A, Austerlitz F, Chemin C, Sary A, Armier J, Pham D, Khadir K, Roume J, Hadj-Rabia S, Bouadjar B, Taieb A, de Verneuil H, Benchiki H, Grandchamp B, Sarasin A. A prevalent mutation with founder effect in xeroderma pigmentosum group C from north Africa. *J Invest Dermatol.* 2010;130:1537-42.

Spiering D, Hodgson L. Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adh Migr.* 2011;5:170-80.

Sary A, Sarasin A. The genetics of the hereditary xeroderma pigmentosum syndrome. *Biochimie.* 2002;84:46-60.

Staszewski O, Nikolova T, Kaina B. Kinetics of gamma-H2AX focus formation upon treatment of cells with UV light and alkylating agents. *Environ Mol Mutagen.* 2008;49:734-40.

Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulic V. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology* 1999;19:2109-17.

Stokes MP, Rush J, MacNeill J, Ren JM, Spratt K, Nardone J, Yang V, Beausoleil SA, Gygi SP, Livingstone M, Zhang H, Polakiewicz RD, Comb MJ. Profiling of UV-induced ATM/ATR signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:19855-60.

Stüven T, Hartmann E, Görlich D. Exportin 6: a novel nuclearexport receptor that is specific for profilin.actin complexes. *EMBO J.* 2003;21:5928-40.

Sulli G, Di Micco R, d'Adda di Fagagna F. Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2012;12:709-20.

Tomasz M, Chawla AK, Lipman R. Mechanism of monofunctional and bifunctional alkylation of DNA by mitomycin C. *Biochemistry.* 1988;27:3182-7.

Toyooka T, Ishihama M, Ibuki Y. Phosphorylation of histone H2AX is a powerful tool for detecting chemical photogenotoxicity. *J Invest Dermatol.* 2011;131:1313-21.

Tybulewicz VL, Henderson RB. Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:630-44.

Uhlmann F, Bouchoux C, Lopez-Aviles S. A quantitative model for cyclin-dependent kinase control of the cell cycle: revisited. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011;366:3572-83.

Vens C, Begg AC. Targeting base excision repair as a sensitization strategy in radiotherapy. *Semin Radiat Oncol.* 2010;20:241-9.

Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods.* 2000;243:167-90.

Vigil D, Cherfils J, Rossman KL, Der CJ. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy?. *Nat Rev Cancer.* 2010;10:842-57.

Villalonga P, Ridley AJ. Rho GTPases and cell cycle control. *Growth Factors.* 2006;24:159-64.

Watanabe N, Kato T, Fujita A, Ishizaki T, Narumiya S. Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol.* 1999;3:136-43.

Watnick RS, Cheng YN, Rangarajan A, Ince TA, and Weinberg RA. Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis. *Cancer Cell.* 2003;3:219-31.

Wennerberg K, Der CJ. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *Journal of Cell Science.* 2004;117:1301-12.

Wenneberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science.* 2005;118:843-6.

Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer. *J Pathol.* 2012;226:352-64.

Wilson DM, Bohr VA. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair (Amst).* 2007;6:544-59.

Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011;30:87.

Xia M, Land H. Tumor suppressor p53 restricts Ras stimulation of RhoA and cancer cell motility. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14:215-23.

Xiao Z, Chen Z, Gunasekera AH, Sowin TJ, Rosenberg SH, Fesik S, Zhang H. Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem.* 2003;278:21767-73.

Yamaguchi Y, Kato H, Yasui H, Mori K, Negishi M. RhoA inhibits the nerve growth factor-induced Rac1 activation through Rho-associated kinase-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2001;276:18977-83.

ANEXO - Súmula Curricular

Dados pessoais

Nome: Gisele Espinha Teixeira da Silva

Data de Nascimento: 02 de Fevereiro de 1987

Naturalidade: São Paulo, SP

Formação acadêmica

2012 Mestrado em Biotecnologia.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo/SP - Brasil
Título: Sinalização da GTPase RhoA nas respostas celulares após estresse genotóxico promovido por radiação ultravioleta.

Orientador: Fábio Luís Forti

Bolsista do(a): CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2011 - 2012 Treinamento Técnico nível 3
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo/SP - Brasil
Título: Investigação dos efeitos da radiação UV na expressão, atividade e funções biológicas das GTPases da família Rho em linhagens tumorais de carcinoma de cérvix e melanoma humano.

Orientador: Fábio Luís Forti

Bolsista do(a): FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

2007 - 2010 Graduação em Biomedicina.
Faculdades Metropolitanas Unidas - FMU, São Paulo/SP - Brasil

Formação complementar

2012 - 2012 Curso de curta duração em "Cell Migration"
Sociedade Brasileira de Biologia Celular, SBBC, São Paulo/SP - Brasil

Resumos publicados em anais de eventos

1. MAGALHAES, Y. T.; ESPINHA, GISELE; FORTI, FL.

RhoA GTPase signals to DNA repair mechanisms in the response of human tumor cells to UV radiation.

23rd International Congress of the IUMBM and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2015, Foz do Iguaçu-PR.

2. OSAKI, J. H ; SILVA, G. E. T. ; FORTI, FL.

The Small GTPase RhoA mediates DNA damage repair signaling promoted by gamma and ultraviolet radiation.

60o Congresso Brasileiro de Genética, 2014, Guarujá-SP.

3. OSAKI, J. H.; SILVA, G. E. T.; FORTI, F. L.

THE SMALL GTPASES RHOA AND RAC1 ARE INVOLVED IN DNA DAMAGE REPAIR INDUCED BY LOW DOSES OF GAMMA RADIATION.

40th Annual Meeting of the European Radiation Research Society 2013, Dublin.

4. SILVA, G. E. T.; ROCHA, C. R. R.; MENCK, C. F. M.; FORTI, F. L.

RhoA GTPase mediates important cellular signaling after genotoxic stress promoted by ultraviolet radiation.

Fundamental Aspects of DNA Repair and Mutagenesis (V FARM-DNA), 2013, São Paulo-SP.

5. SILVA, G. E. T.; OSAKI, J. H.; ROCHA, C. R. R.; MENCK, C. F. M.; FORTI, F. L.

RhoA GTPase mediates important cellular signaling after genotoxic stress promoted by ultraviolet radiation.

11th International Conference on Environmental Mutagens/ XI Congress of SBMCTA and IX Congress of ALAMCTA, 2013, Foz do Iguaçu-PR.

6. SILVA, G. E. T.; FORTI, F. L.

RHOA GTPASE MEDIATES RECOVERY OF MELANOMA CELLS DAMAGED BY ULTRAVIOLET RADIATION.

10th International Congress in Cell Biology & 16th Meeting of the Brazilian Society for cell Biology, 2012, Rio de Janeiro-RJ.

7. SILVA, G. E. T.; ROCHA, C. R. R.; MENCK, C. F. M.; FORTI, F. L.

RhoA GTPase-Deficient Human Tumor Cells Have Increased Apoptosis and an Inefficient Repair of Lesions Induced by Ultraviolet Radiation.

58o Congresso Brasileiro de Genética, 2012, Foz do Iguaçu-PR.

8. OSAKI, J. H.; SILVA, G. E. T.; FORTI, F. L.

Comparative Responses to Stress Caused by Ionizing Radiation (Gamma and Ultraviolet) in HeLa Cells: Studying New Roles for Rac1 GTPases.

Annual Meeting of The American Society for Cell Biology (ASCB), 2012, San Francisco-USA.

9. SILVA, G. E. T.; FORTI, F. L.

INVESTIGATION OF THE ULTRAVIOLET RADIATION EFFECTS ON MIGRATION AND PROLIFERATION OF HELA CELLS: A ROLE FOR RHOA.

X Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA), 2011, São Pedro-SP.

10. OSAKI, J. H.; SILVA, G. E. T.; FORTI, F. L.

IMPLICATIONS OF RHOA REGULATION IN HELA CELLS EXPOSED TO STRESS RADIATION.

American Society for Cell Biology - ASCB 2011, 2011, Denver- USA.

Artigos publicados

1. OSAKI, JULIANA H.; ESPINHA, GISELE; MAGALHAES, YULI T.; FORTI, FABIO L.
Modulation of RhoA GTPase Activity Sensitizes Human Cervix Carcinoma Cells to γ -Radiation by Attenuating DNA Repair Pathways.

Oxidative Medicine and Cellular Longevity (Online), v. 2016, p. 1-11, 2016.

2. ESPINHA, GISELE; OSAKI, JULIANA H.; MAGALHAES, YULI T.; FORTI, FABIO L.
Rac1 GTPase-deficient HeLa cells present reduced DNA repair, proliferation, and survival under UV or gamma irradiation.

Molecular and Cellular Biochemistry, v. 404, p. 281-297, 2015.

3. ASCER, LIV G.; MAGALHAES, YULI T.; ESPINHA, GISELE; OSAKI, JULIANA H.; SOUZA, RENAN C.; FORTI, FABIO L.

CDC42 Gtpase Activation Affects Hela Cell DNA Repair and Proliferation Following UV Radiation-Induced Genotoxic Stress.

Journal of Cellular Biochemistry, v. 116, p. 2086-2097, 2015.

4. PEREIRA, TATIANA ARAUJO; SILVA, GISELE ESPINHA TEIXEIRA; HERNÁNDEZ, RAÚL BONNE; FORTI, FABIO L.; ESPÓSITO, BRENO PANNIA.

Antitumor activity of Mn(III) complexes in combination with phototherapy and antioxidant therapy.

BioMetals (Oxford), v. 26, p. 439-446, 2013.