

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

JULIANA HARUMI OSAKI

**O papel de RhoA e Rac1 GTPases nas respostas
celulares após danos no DNA induzidos por radiação
ionizante gama**

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr5890

São Paulo
Data do depósito na SGP
18/08/2015

JULIANA HARUMI OSAKI

**O papel de RhoA e Rac1 GTPases nas respostas
celulares após danos no DNA induzidos por radiação
ionizante gama**

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

Orientador: Prof. Dr. Fábio Luís Forti

São Paulo
Agosto/2015

Ficha Catalográfica

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

O81p Osaki, Juliana Harumi
O papel de RhoA e Rac1 GTPases nas respostas celulares após
danos no DNA induzidos por radiação ionizante gama / Juliana
Harumi Osaki. -- São Paulo, 2015.
153p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica
Orientador: Forti, Fábio Luís

1. DNA : Reparo 2. DNA : Lesão 3. Radiação gama I. T. II.
Forti, Fábio Luís, orientador.

574.873282 CDD

À minha família, acima de tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Fábio Luis Forti, pela orientação e por ter me recebido em seu laboratório.

À minha mãe Maria, pai Vitor, irmã Yumi, tia Hitomi, Batian Shigeco e toda família Chapadense e Osaki pelo apoio incondicional durante todo o decorrer do desenvolvimento desta tese e principalmente por acreditarem em mim.

Aos engenheiros Elisabeth R. S. Somessari, Carlos Gaia e ao técnico Hélio Antonio Paes pela irradiação das células no gammacell.

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. Alexander Henning Ulrich e seus alunos, por nos auxiliarem e cederem a utilização do citômetro.

Ao prof. Dr. Hugo Aguirre Armelin (CAT-Cepid-Instituto Butantan) por nos ceder a célula HeLa.

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.

Ao prof. Dr. Jeremy Stark (Department of Radiation Biology, Beckman Research Institute of the City of Hope, Duarte, California, United States of America) por ceder gentilmente os plasmídeos contendo o gene reporter para o ensaio de Recombinação Homóloga e de Recombinação não-homóloga.

À meus primos William e Valdecir pelo carinho e por me apoiarem em tudo, desde sempre aqui em São Paulo.

Aos bons amigos que fiz aqui em São Paulo e que sei que serão para vida toda Gisele, Msc Karine, Alexssandro e Liv.

À Sueli Azevedo pelo carinho, paciência, compreensão, apoio e por todos os ótimos momentos que passamos e que iremos passar.

À todos os integrantes do laboratório LSSB e também aos que passaram por ele (Msc. Thompson, Renan, Yuli, Dra. Lilian, Felipe, Gabriela) pelas ótimas discussões, pelos auxílios nos experimentos que foram extremamente importantes e descontrações também.

À profa. Dra. Daniela Sanchez Basseres e seus alunos do laboratório LBMC (Msc. Edmilson, Dra. Tatiana, Amanda, Talita, Luiza, Sandro e Dr. Mateus), pela ajuda, empréstimos de materiais e equipamentos os quais foram de imprescindível valor.

À Dra. Mariana e Dra. Micheli com quem dividi não somente o apartamento, mas também muitas risadas, conselhos e ótimos momentos.

Aos amigos prof. Dr. Raphael, Dra. Elis e Dra. Denise pelas risadas, churrascos e também pelas discussões nesse meio tempo.

À Raquel e Marina pelas conversas e bom momentos que tivemos e teremos.

Às técnicas Bere, Juliana e Vivi que contribuíram muito para o desenvolvimento da tese.

À todos os demais laboratórios que nos auxiliaram no início do desenvolvimento da tese, nos cedendo reagentes e equipamentos.

À todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para o desenvolvimento desta tese.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

“O sucesso nasce do querer, da
determinação e persistência em se
chegar a um objetivo. Mesmo não
atingindo o alvo, quem busca e vence
obstáculos, no mínimo fará coisas
admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

Osaki. J.H. **O papel de RhoA e Rac1 GTPases nas respostas celulares após danos no DNA induzidos por radiação ionizante gama.** 2015. 153p. Tese de doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O mecanismo pelo qual uma célula responde a algum dano no seu material genético é extremamente importante. Isto ocorre pela rápida ativação da maquinaria de reparo de danos no DNA, a qual é composta por uma rede intrincada de sinalização proteica, culminando no reparo do DNA; porém se o dano for irreparável ocorre ativação de mecanismos de morte celular. RhoA e Rac1 pertencem a família das pequenas proteínas sinalizadoras Rho GTPases, as quais atuam como interruptores moleculares ciclando entre estado ativo (ligada a GTP) e inativo (ligada a GDP). Os componentes desta família estão relacionados ao controle dos mais diversos processos celulares como, por exemplo, remodelamento do citoesqueleto, migração, adesão, endocitose, progressão do ciclo celular e oncogênese. No entanto, apesar das proteínas Rho GTPases estarem envolvidas em um amplo espectro de atividades biológicas, há poucas informações sobre seu papel na manutenção da integridade genômica quando células são submetidas a algum agente genotóxico. Para investigar o envolvimento das GTPases RhoA e Rac1 nas respostas de células submetidas a radiação gama, foram gerados, a partir de células de carcinoma de cervix humano - HeLa, sublinhagens clonais mutantes de RhoA e Rac1 expressando exogenamente RhoA constitutivamente ativa (HeLa-RhoA V14), RhoA dominante negativa (HeLa-RhoA N19), Rac1 constitutivamente ativa (HeLa-Rac1 V12) e Rac1 dominante negativa (HeLa-Rac1 N17). Após estas linhagens celulares serem expostas a diferentes doses de radiação gama, observamos que ambas GTPases, RhoA e Rac1, são ativadas em resposta aos efeitos da radiação. Além disso, a modulação da atividade destas enzimas, através das mutações, levou a uma alteração das respostas celulares frente aos danos no DNA, como uma redução da capacidade de reparar quebras simples e duplas nas fitas do DNA. Por outro lado, a deficiência de RhoA ou Rac1 GTPase levou a uma redução da ativação de Chk1 e Chk2 ou da fosforilação da histona H2AX, respectivamente, prejudicando os mecanismos de detecção de danos no DNA e levando as células a permanecerem mais tempo nos pontos de checagem G1/S e/ou G2/M do ciclo celular. Esses fatores contribuíram de modo expressivo para a redução da proliferação e sobrevivência celular levando as células à morte. Por fim, ensaios celulares de reparo de danos de um DNA exógeno através de mecanismos de Recombinação Homóloga (HR) e Recombinação Não-Homóloga de extremidades (NHEJ), demonstraram que a inibição da atividade de RhoA reduz significativamente a eficiência de ambas vias de reparo. Desta maneira, este trabalho demonstra e reforça a existência de mais um viés de atuação das pequenas GTPases RhoA e Rac1, agora em células HeLa, nas respostas celulares aos danos induzidos por exposição a radiação gama, modulando a sobrevivência, proliferação e indiretamente modulando resposta ao reparo do DNA através da via de Recombinação Homóloga e Não-Homóloga.

Palavras-chave: Pequenas Rho GTPases, RhoA, Rac1, radiação gama, resposta a danos e reparo no DNA, integridade e estabilidade genômica, sinalização celular.

ABSTRACT

Osaki. J.H. **The role of RhoA and Rac1 GTPases in cellular responses after DNA damage induced by ionizing gamma radiation.** 2015. 153p. PhD Thesis- Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The mechanism by which a cell responds to DNA damage is extremely important. This occurs by a quick activation of the DNA damage repair machinery, which consists of an intricate protein signaling network culminating in DNA repair. But if the damages are irreparable occurs there is activation of cell death mechanisms. RhoA and Rac1 belong to family of small Rho GTPases, signaling proteins that act as molecular switches cycling between the active state (GTP-bound) and inactive state (GDP-bound). Members of this family are implicated in the control of diverse cellular process such as cytoskeletal remodeling, migration, adhesion, endocytosis, cell cycle progression, and oncogenesis. However, despite Rho proteins are involved in a broad spectrum of biological activities, there is just a few information about their roles in the maintenance of genomic integrity, that is, when the cells are subjected to some kind of genotoxic agent. To investigate the involvement of the GTPases RhoA and Rac1 in cellular responses to gamma radiation, we generated from human cervix carcinoma cells – HeLa, clonal sublines of RhoA and Rac1 mutants, exogenous and stably expressing the constitutively active RhoA (HeLa-RhoA V14), the dominant negative RhoA (HeLa-RhoA N19), the constitutively active Rac1 (HeLa-Rac1 V12) and the dominant negative Rac1 (HeLa-Rac1 N17). After all these cell lines have been exposed to different doses of gamma radiation, we found that both GTPases, RhoA and Rac1, are activated in response to the radiation effects. Furthermore, the modulation of two enzymes activity, by using the mutant clones, led to a change in cellular responses to the DNA damage, as the reduction in the capacity of repairing DNA single and double strand breaks. On the other hand, the deficiency of RhoA or Rac1 GTPase led to a reduction of Chk1 and Chk2 activation, or on the phosphorylation of histone H2AX, respectively, hindering the mechanisms of DNA damage detection and arresting cells in the G1/S and/or G2/M checkpoints of cell cycle. These factors significantly contributed to the reduction of cell proliferation and survival, leading cells to death. Finally, cellular assays of DNA damage repair of exogenous DNA by Homologous Recombination (HR) and Non-Homologous End Joining (NHEJ), demonstrated that RhoA inhibition significantly reduced the repair efficiency of both pathways. Thus, this work demonstrates and reinforces the existence of other biological functions of small GTPases RhoA and Rac1 in HeLa cells, by regulating cellular responses to DNA damage induced by exposure to gamma radiation, modulating the survival, proliferation and indirectly modulating the response to DNA damage repair pathway through the Homologous Recombination and Non-Homologous Recombination.

Keywords: Small Rho GTPase, RhoA, Rac1, gamma radiation, DNA damage response and repair, genomic integrity and stability, cell signaling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Regulação dos pontos de checagem do ciclo celular, ao longo das diferentes fases do ciclo.....	19
Figura 2- Fatores que induzem a senescência celular.....	21
Figura 3 – Representação das mudanças morfológicas de uma célula em apoptose.....	22
Figura 4 – Vias de reparo de danos no DNA.....	24
Figura 5 - Representação esquemática das vias de reparo de quebra de fita dupla do DNA.....	28
Figura 6 - Representação esquemática da regulação da ativação da Rho GTPase.....	30
Figura 7 – Envolvimento de RhoA GTPase na contração de actomiosina e na polimerização da actina.....	33
Figura 8 – Sinalização de Rac1 GTPase.....	36
Figura 9- Caracterização dos mutantes de HeLa-RhoA pelo ensaio de atividade (Pull-down).....	60
Figura 10 -Ensaio de migração celular das células HeLa parental e dos mutantes HeLa-RhoA N19 e HeLa-RhoA V14, na presença ou ausência de 10%SBF.....	64
Figura 11 - As sublinhagens clonais mutantes RhoA V14 e RhoA N19 apresentam variação morfológica em relação a linhagem HeLa parental como maior volume, maior espalhamento e menor densidade de compactação.....	65
Figura 12 - Modulação da ativação de RhoA pelos efeito da radiação gama. ...	67
Figura 13 – Os clones HeLa-RhoA N19 migram menos em relação a HeLa e HeLa-RhoA V14 quando submetidos a diferentes doses de radiação gama.	71
Figura 14 - Os mutantes RhoA V14 e N19 apresentaram redução na proliferação celular em relação a HeLa parental.	75
Figura 15 – Os clones HeLa-RhoA N19 1G e HeLa-RhoA V14 4G são mais sensíveis aos efeitos da radiação gama em relação a linhagem HeLa parental.	79
Figura 16 – O clone mutante HeLa-RhoA N19 1G apresenta maior acúmulo de células na fase G1 do ciclo celular, quando exposto a radiação gama.	82
Figura 17 – Não há diferença entre os clones na entrada da senescência celular.....	84
Figura 18 – A mutação em RhoA em células HeLa não altera significativamente a indução de morte celular por apoptose.	86
Figura 19 – A proteína RhoA GTPase é importante para o início rápido do reparo do DNA.	89
Figura 20 - Alteração da morfologia celular e inibição da ativação de RhoA pela toxina C3.....	92
Figura 21 – A inibição da ativação de RhoA pela toxina C3 em célulaHeLa, altera a cinética de reparo do DNA.	94
Figura 22 – Representação esquemática do ensaio de Recombinação Homóloga (HR) e Recombinação não-homóloga (NHEJ).	96
Figura 23 – Visualização das células GFP+ após reparo do DNA.....	97
Figura 24 – A inibição da ativação de RhoA leva a redução do reparo do DNA exógeno, pela vida de reparo por Recombinação Homóloga e Recombinação não-homóloga.....	99

Figura 25 - A fosforilação de Chk1 e Chk2 é reduzida no mutante dominante negativo HeLa-RhoA N19.....	105
Figura 26 - Ensaio de pull-down para determinação da ativação de Rac1, o mutante Rac1 N17 apresenta menores níveis de Rac1 ativo em relação da HeLa parental e Rac1 V12.	108
Figura 27 - Ensaio clonogênico das linhagens HeLa, HeLa-Rac1 N17 3G, HeLa-Rac1 V12 4G e HeLa-Rac1 V12 2P..	109
Figura 28 – Alteração da morfologia celular dos mutantes Rac1.	110
Figura 29– Em célula HeLa Rac1 é ativada em resposta aos efeitos da exposição a radiação gama.....	112
Figura 30 - Curva de crescimento das linhagens celulares HeLa parental, HeLa-Rac1 N17 3G e HeLa-Rac1 V12 2P, demonstrando que os clones mutantes proliferam menos em relação a HeLa parental.	114
Figura 31 – Os clones mutantes HeLa-Rac1 N17 3G e HeLa-Rac1 V12 2P são mais sensíveis aos efeitos da radiação gama.	115
Figura 32 – Os clones mutantes apresentam maior porcentagem de células apoptóticas em relação a HeLa parental.	118
Figura 33- Em célula HeLa a mutação em Rac1 (Rac1 N17 e Rac1 V12), leva a redução na migração celular.....	120
Figura 34 - Ensaio de cometa alcalino das linhagens celulares HeLa parental HeLa-Rac1 N17 3G e HeLa-Rac1 V12 2P, demonstrando que Rac1 GTPase altera a cinética de reparo do DNA.	122
Figura 35 – Modulação negativa da fosforilação da histona H2AX, Chk1 e Chk2 no clone HeLa-Rac1 N17.....	125
Figura 36 - Aspecto morfológico das sublinhagens HeLa-pCM mock e HeLa-RhoA WT.	152
Figura 37 - Modulação positiva da ativação de RhoA pelos efeito da radiação gama nas sublinhagens HeLa-RhoA WT e HeLa-pCM mock.....	153
Figura 38 - AS linhagens HeLa-pCM mock e HeLa-RhoA WT apresentam menor número de colônias em relação a HeLa parental, no entanto, apresenta sensibilidade aos efeitos da radiação gama semelhante a HeLa parental.....	155

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR: Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related
CDK: Quinase dependente de ciclina (cyclin-dependent kinase)
CDT: Citoletal distending toxin
Chk1: Checkpoint kinase 1
Chk2: Checkpoint kinase 2
DDR: Resposta a danos no DNA (DNA damage response)
DMEM: Meio de cultura DME (Dulbecco modified Eagle medium)
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA-PK: DNA-dependent protein kinase
DSB: Quebra de fita dupla (Double strand break)
DTT: Ditioneitol
EDTA: Ácido etilenotriamino tetra-acético
HR: Recombinação homóloga (homologous recombination)
GAP: Proteína de ativação de GTPase (GTP activating protein)
GEF: Fator de troca de guanossina (guanosine nucleotide exchange factor)
GFP: Proteína fluorescente verde (green fluorescent protein)
GDP: Guanossina difosfato (guanosine 5'-diphosphate)
GTP: Guanossina tri-fosfato (guanosine 5'-triphosphate)
GST-RBD: Glutaciona S-Transferase fundida a RhoA Binding Domain da proteína Rhotekin
Gy: gray
mDIA: Mammalian homolog of Drosophila Diaphanous
NHEJ: Recombinação não-homóloga (Non-Homologous End-Joining)
PAK1: p21 activated kinase I
PAK-PDB-GST: p21 activated kinase I- fundida a Glutaciona S-Transferase
ROCK: RHO-associated, Coiled-coil Containing Protein Kinase ou Rho-kinase
PBS: Solução salina tamponada com fosfato (phosphate buffered saline)
ROS: espécies reativas de oxigênio (Reactive oxygen species)
SDS: Dodecil sulfato de sódio (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
SFB: Soro fetal bovino
TBS-T: Solução salina tamponada com tris e acrescida de Tween (tris buffered saline)

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Ciclo celular	16
1.1.1 Pontos de checagem do ciclo celular (“checkpoints”)	17
1.1.2 Senescência e apoptose	20
1.2 Reparo do DNA	23
1.2.1 Recombinação homóloga (HR).....	26
1.2.2 União não-homóloga de extremidades (NHEJ).....	28
1.3 Família das Pequenas Rho GTPases.....	29
1.3.1 RhoA	32
1.3.2 Rac1.....	35
1.4 Modulação de RhoA e Rac1 GTPase em resposta a danos no DNA.	37
2. OBJETIVOS	40
2.1 Objetivo geral.....	40
2.2 Objetivos específicos	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1 Linhagens celulares de mamíferos	42
3.2 Obtenção das sublinhagens mutantes de RhoA-GTP e Rac1-GTP	42
3.3 Irradiação das linhagens celulares	43
3.4 Preparação de lisados celulares totais e quantificação	43
3.5 Preparação das beads RBD-GST e Pak1-GST, para o ensaio de atividade de RhoA ou Rac1 (Ren et al, 1999).....	44
3.6 Determinação da atividade de RhoA e Rac1 GTPase por ensaio de pull-down (adaptado de (Ren et al., 1999)	45
3.7 Eletroforese desnaturante de proteínas (SDS-PAGE).....	46
3.8 Western Blot	47
3.9 Ensaio de formação de colônia ou clonogênico.....	47
3.10 Curva de crescimento celular	48
3.11 Ensaio de cometa alcalino e neutro	49
3.12 Ensaio de migração celular.....	51
3.13 Inibição da atividade de RhoA através da transfecção transiente do plasmídeo contendo a sequência de DNA da toxina C3.....	51
3.14 Geração de sublinhagens mutantes estáveis DR-GFP e EJ5-GFP em células HeLa 53	
3.15 Ensaio celulares do reparo de DNA exógeno contendo danos de quebra dupla: Reparo por Recombinação Homóloga (HR) e Não-homóloga (NHEJ)	54
3.16 Ensaio de apoptose em células marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídeo	55

3.17	Análise de senescência celular por atividade de beta-galactosidase	56
3.18	Análises estatísticas	57
4.	RESULTADOS	58
4.1	Envolvimento da proteína RhoA GTPase na resposta de células expostas a radiação gama	58
4.1.1	Caracterização das sublinhagens clonais de células HeLa mutantes para a GTPase RhoA	58
4.1.2	A atividade de RhoA é aumentada pela exposição a radiação gama	66
4.1.3	A radiação gama estimula a migração celular nas linhagens HeLa e HeLa-RhoA V14	68
4.1.4	As sublinhagens clonais mutantes RhoA N19 e RhoA V14 apresentam menor capacidade de proliferação em relação as células HeLa	72
4.1.5	O clone mutante deficiente em RhoA, HeLa-RhoA N19 1G, apresenta acúmulo de células na fase G1 do ciclo celular em resposta aos efeitos da radiação gama	79
4.1.6	Avaliação da Senescência celular por associação com atividade de B-Galactosidase.	83
4.1.7	Mutantes deficientes e proficientes de RhoA GTPase não alteram substancialmente sua morte por apoptose após radiação gama	84
4.1.8	A GTPase RhoA é importante para o início rápido do reparo de danos no DNA.	86
4.1.9	A inibição direta da ativação da RhoA GTPase endógena pela exoenzima C3 proporciona perfil semelhante ao do clone dominante negativo (HeLa-RhoA N19)	90
4.1.10	RhoA GTPase é requerida para o reparo do DNA por Recombinação Homóloga (HR: Homologous Recombination) e Não-homóloga (NHEJ: Non-homologous end joining)	94
4.1.11	RhoA é capaz de modular negativamente a fosforilação das proteínas quinases de resposta a danos no DNA, Chk1 e Chk2, após tratamento com a radiação gama.	100
4.2	Estudo do envolvimento da proteína Rac1 GTPase na resposta celular de células expostas a radiação gama	106
4.2.1	Caracterização das sublinhagens clonais de células HeLa mutantes para a GTPase Rac1	106
4.2.2	A proteína Rac1 GTPase é ativada em resposta a radiação gama	111
4.2.3	A linhagem clonal HeLa-Rac1 N17 3G apresenta menor proliferação e sobrevivência frente a radiação gama	112
4.2.4	Os clones mutantes HeLa-Rac1 V12 e HeLa-Rac1 N17 apresentam maiores níveis de apoptose	116
4.2.5	O clone defectivo em Rac1-GTP (HeLa-Rac1 N17 3G) apresenta menor capacidade de migração.	118

4.2.6 A cinética de recuperação do DNA fragmentado nas linhagens clonais HeLa-Rac1 N17 e HeLa-Rac1 V12, pelo ensaio cometa alcalino, se diferencia da observada para célula HeLa após exposição a radiação gama	121
4.2.7 Em células HeLa o mutante dominante negativo Rac1 N17 modula negativamente a fosforilação da histona H2AX e Chk1 após exposição a radiação gama	122
5. DISCUSSÃO	126
6. CONCLUSÕES	142
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	144
ANEXO 1.....	152
ANEXO 2.....	153
ANEXO 3.....	154
SÚMULA CURRICULAR.....	156

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ciclo celular

O ciclo celular é um conjunto de eventos pelos quais as células se dividem em células filhas, levam ao seu crescimento e conseqüentemente ao desenvolvimento do organismo. A regulação do ciclo é altamente conservada, pois qualquer alteração em seu funcionamento leva a instabilidade genômica, a qual é uma das principais causas da formação do câncer (Nurse, 2000).

A divisão celular é um processo cíclico composto por quatro fases distintas: fase G1, G2, S e M. Durante a fase S o material genético é replicado e então dividido entre as células filhas durante a fase M; essas duas fases são separadas pelas lacunas ou intervalos (“gaps”) chamados de G1 e G2, as quais fazem a preparação celular para a entrada em S ou M. É na fase G1 que antecede a S, que a célula cresce em volume, aumenta o número de organelas, preparando o DNA para a replicação. A fase G2 fica entre a fase S e M, nessa fase ocorre síntese de proteína e estruturas de membrana, antes da célula ser dividida em células filhas (Norbury and Nurse, 1992; Suryadinata et al., 2010).

A regulação da progressão do ciclo celular ao longo das fases é feita por complexos proteicos, formados por ciclinas e CDKs. Durante cada fase do ciclo celular há variação das ciclinas e CDKs. A família das serina/treonina quinases conhecidas como CDK (cyclin-dependent kinase), é responsável pela progressão do ciclo celular e para isso é necessário que se associem com as proteínas ciclinas. Ciclinas pertencem a um grupo de proteínas que são classificadas pela existência da região de ligação da CDK (cyclin box), a denominação ciclina veio devido sua flutuação, em termos de expressão proteica, durante o ciclo celular. No entanto, atualmente tem se descoberto novos membros da família das ciclinas que não

flutuam ao longo do ciclo celular (Lim and Kaldis, 2013; Mendenhall and Hodge, 1998; Satyanarayana and Kaldis, 2009).

As CDKs e ciclinas, por serem proteínas reguladoras universais do ciclo celular, são altamente e eficientemente reguladas para que ocorra o funcionamento do ciclo. A atividade do complexo CDK/ciclina é regulada por duas grandes famílias de inibidores de CDK, a INK4 composta por p16, p15, p18 e p19, que se ligam especificamente a CDK4/CDK6 e impedem a atividade da ciclina D, enquanto que a família das Cip/Kip composta por p21, p27 e p57 inibe a atividade de CDK2/ciclina E, CDK2/ciclina A e CDK1/ciclina B (Mendenhall and Hodge, 1998; Satyanarayana and Kaldis, 2009).

1.1.1 Pontos de checagem do ciclo celular (“checkpoints”)

As diferentes fases do ciclo celular são ordenadas em sequência, ou seja, o ciclo segue adiante somente se as células passarem pelas fases anteriores, característica esta que leva a ideia da existência de pontos de checagem ao longo do ciclo celular. Existem pontos ao longo do ciclo celular, onde as progressões das fases podem ser pausadas para que a célula se recupere de algum tipo de “defeito”, ou para que o ciclo possa ser permanentemente parado quando o “defeito” não pôde ser reparado. Estes pontos são chamados de pontos de checagem do ciclo celular ou “checkpoints” (Mendenhall and Hodge, 1998; Nurse, 2000).

As vias de sinalização envolvendo os pontos de checagem são compostas por proteínas sensoras, transdutoras e efetoras dos sinais. A regulação destas é dividida em etapas; uma proteína sensora e uma quinase reguladora de resposta detectam o estresse ou “defeito” e enviam um sinal para pausar o ciclo celular. Se o estresse for um dano no DNA, a célula primeiramente ativa a maquinaria de reparo

do DNA para reparar o dano antes de dar continuidade ao ciclo, para que não haja perda de informação genética ou para que informações alteradas (mutações) não sejam repassadas para as células filhas (Humpal et al., 2009).

Os principais componentes do ponto de checagem da resposta a danos no DNA são as proteínas que compõem a família das phosphoinositide 3-kinase related kinases (PIKKs), como a ATM, ATR e DNA-PK, as quais mantêm o ciclo celular parado na fase G1, S ou G2 e levam ao reparo do DNA ou à morte celular. Essas quinases controlam os pontos de checagem G1/S, intra-S e G2/M através da ativação de seus efetores as quinases Chk2 e Chk1 (Bartek and Lukas, 2007).

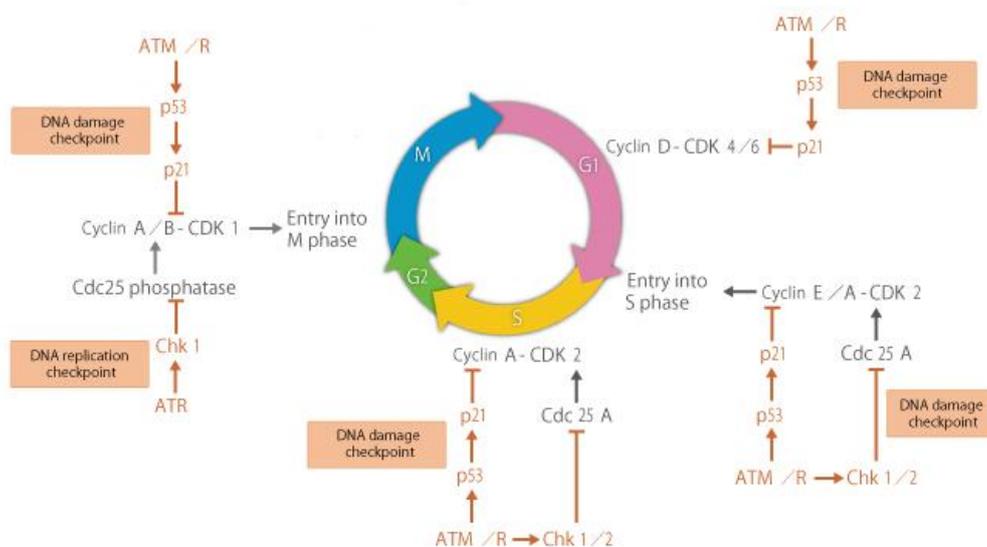
O checkpoint G1/S é importante para impedir que células com danos no DNA entrem na fase S do ciclo celular. Esse checkpoint é induzido pela ativação de ATM/ATR, Chk1/2 e p53. A proteína p53 é um regulador da transcrição de p21, o qual é essencial para inibir a entrada na fase S. Danos no DNA induzidos por radiação ionizante ou radiação ultravioleta, também levam a para do ciclo na fase G1, através da ativação de ATM/ATR-Chk2/1, respectivamente, que culminam na proteólise da fosfatase Cdc25A, de maneira independente da ativação de p53. A fosfatase Cdc25A atua na defosforilação da CDK, a qual é essencial para progressão do ciclo celular (Figura1) (Bartek and Lukas, 2001; Deckbar et al., 2011).

Outro checkpoint é o intra-S; esse ponto de checagem é regulado através da fosforilação de Chk2, a qual é dependente de ATM. Chk2 induz a degradação da fosfatase Cdc25A, impedindo que Cdk2 seja defosforilada e assim impeça a progressão normal da fase S do ciclo celular (Figura1) (Bartek and Lukas, 2001; Deckbar et al., 2011).

O 3º ponto de checagem, G2/M, impede que células danificadas entrem na fase M, que tem o complexo Cdc2-ciclina B como principal regulador da transição

desta fase. Danos no DNA ativam ATM/ATR iniciando duas cascatas de sinalização para inativar Cdc2-ciclina B, a primeira inibe a progressão para fase M através da ativação de Chk1/2 e inibição de Cdc25C. A segunda cascata é através da ativação de p53, que por sua vez regula a transcrição de proteínas efetoras que inibem este complexo Cdc2-ciclina B (Figura 1) (Bartek and Lukas, 2001; Deckbar et al., 2011).

Os componentes dos checkpoints, reguladores do ciclo celular e de parada do ciclo fazem parte da cascata de sinalização da resposta a danos no DNA (DNA damage response - DDR). Para assegurar que a replicação, a transmissão das informações genéticas sejam fiéis e que a célula prolifere normalmente, os checkpoints são responsáveis em rapidamente induzir a parada do ciclo celular, transmitir a sinalização para a maquinaria de resposta ao dano no DNA e manter o ciclo parado até o DNA ser reparado completamente (Bartek and Lukas, 2001; Lim and Kaldis, 2013; Symington and Gautier, 2011).



© CSLS/The University of Tokyo

Figura 1 – Regulação dos pontos de checagem do ciclo celular, ao longo das diferentes fases do ciclo. O ponto de checagem G1/S é regulado através das proteínas ATM/ATR os quais ativam Chk1/2 e p53, que levam a parada do ciclo. Outro ponto de checagem é na fase S, onde o ciclo é atrasado. Por fim temos o ponto de checagem na fase G2/M, que regula a entrada na fase M do ciclo celular. (Copyright © 2011 Division of Life Sciences, Komaba Organization for Educational Excellence, College of Arts and Sciences, The University of Tokyo. All Rights Reserved. http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/active/13_03.html).

1.1.2 Senescência e apoptose

Senescência e apoptose são importantes mecanismos de controle homeostático de populações normais de células e também atuam como supressores de tumor, pois impedem que a célula portadora de danos no DNA progrida através do ciclo celular podendo dar origem ao câncer (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Rodier and Campisi, 2011).

Células que entram em senescência são metabolicamente ativas, porém param de proliferar, algumas apresentam resistência aos sinais de morte celular programada, ou seja, tornam-se resistentes a apoptose e possuem expressão gênica alterada. As células podem ser induzidas à senescência por diferentes fatores como dano no DNA, encurtamento do telômero devido a replicação, induzida por oncogenes e estresse. A permanente incapacidade de se proliferar é uma característica marcante de células senescentes, já que não conseguem dar continuidade ao ciclo celular. Algumas células tumorais, apesar de serem capazes de se proliferar indefinidamente, podem entrar em senescência em resposta as diferentes terapias anti-câncer (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Gire et al., 2004; Rodier and Campisi, 2011).

Células senescentes apresentam morfologia alterada, são achatadas, grandes, algumas multinucleadas e também possuem aumento no número de lisossomos. Podem ser divididas em três grupos: senescência replicativa, induzida por estresse e induzida por oncogene (Figura 2) (Rodier and Campisi, 2011; Vavrova and Rezacova, 2011).

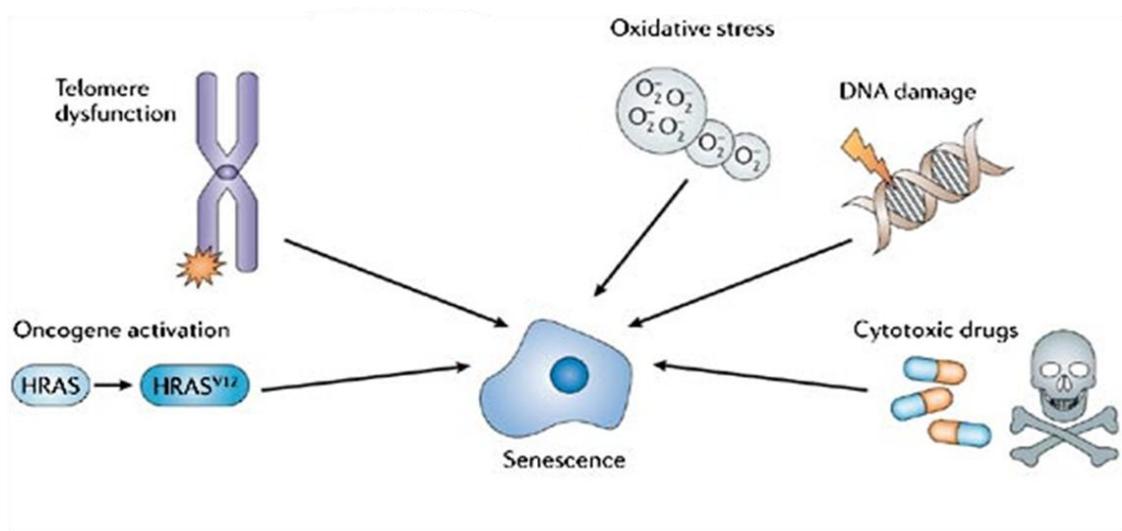


Figura 2- Fatores que induzem a senescência celular. Há vários fatores que induzem a senescência celular, fatores externos e internos a célula (Collado and Serrano, 2006).

A senescência replicativa é um processo desencadeado pelo encurtamento do tamanho do telômero, a cada etapa de replicação celular cerca de 50 pares de bases do telômero são perdidas (Gire et al., 2004; Vavrova and Rezacova, 2011).

A senescência induzida por estresse, também conhecida por senescência prematura, ocorre em resposta a danos no DNA ocasionados por vários agentes como radiação gama, radiação UV, peróxido de hidrogênio e agentes quimioterapêuticos. Essas células senescentes apresentam focos de reparo do DNA contendo histona γ H2AX fosforilada, que é indicativo de danos no DNA que não foram reparados (Mathon and Lloyd, 2001; Vavrova and Rezacova, 2011).

Outro tipo de senescência conhecida é a induzida por oncogenes como, por exemplo, Ras, Mos e Cdc6. A senescência induzida por oncogene é tida como uma barreira anti-tumor, pois cessa a proliferação celular. Acredita-se que a ativação da senescência seja um conjunto de fatores, não apenas em resposta ao dano no DNA e hipofosforilação de Rb (retinoblastoma- proteína supressora de tumor), mas também pelo aumento da secreção de citosinas pró-inflamatórias (Vavrova and Rezacova, 2011).

Apoptose, também chamada de morte celular programada, elimina as células danificadas, diferentemente da senescência na qual as células param de se proliferar. Algumas células senescentes adquirem resistência a apoptose, por um mecanismo ainda não muito claro, podendo ser via ação da proteína supressora de tumor p53 ou expressão alterada de fatores pró-apoptóticos (proteínas BCL2, BCL-XL e BAX) (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Qin et al., 2014).

A sinalização que leva a apoptose pode ser ativada por vários estímulos internos e externos, como por exemplo, medicamentos utilizados na quimioterapia e a exposição aos efeitos da radioterapia, que induzem a lesões no DNA de algumas células ou perturbações no citoesqueleto os quais levam a morte celular por apoptose. Células em processo de apoptose apresentam mudanças morfológicas, com a condensação do citoplasma e da cromatina, manutenção da integridade das organelas, formação de corpos apoptóticos e sem o extravasamento do conteúdo extracelular. Corpos apoptóticos são constituídos do citoplasma juntamente com as organelas envoltas por membrana com ou sem fragmento nuclear (Figura 3) (Elmore, 2007).

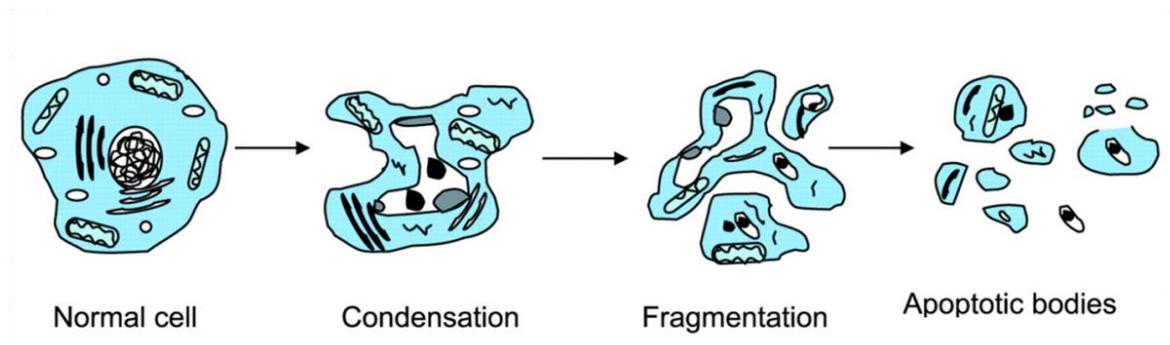


Figura 3 – Representação das mudanças morfológicas de uma célula em apoptose. Inicialmente ocorre a condensação do núcleo e em seguida a fragmentação da célula em corpos apoptóticos (Padanilam, 2003).

Células no início de apoptose ainda mantêm a integridade da membrana celular. As caspases são proteínas envolvidas no processo de inicialização da apoptose e são sintetizadas na sua forma inativa como procaspase, que para serem ativadas precisam ser clivadas (Vermes et al., 2000).

A apoptose pode ocorrer através de duas vias, a extrínseca ou a intrínseca. A via extrínseca é mediada por receptores, os quais ao serem estimulados levam a ativação da caspase-8 que por sua vez ativa a caspase-3 ou amplifica a ativação da caspase-3 pela clivagem da proteína Bid, a qual leva ao extravasamento de citocromo c. Esse extravasamento leva a formação do apoptossomo e ativação da caspase-9. A via intrínseca é mitocondrial e envolve membros da família das proteínas Bcl-2, que regulam a liberação do citocromo c da mitocôndria. O citocromo c livre interage com Apaf-1, dATP e procaspase-9 para formar o apoptossomo. A caspase-9 é clivada no apoptossomo e ativa a caspase-3. Nas duas vias, os efetores caspases são ativados, há a exposição de fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática, clivagem da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) e fragmentação do DNA (Danial and Korsmeyer, 2004; Vermes et al., 2000).

1.2 Reparo do DNA

O genoma está sob constante ataque de agentes endógenos e exógenos, os quais podem causar modificações em apenas uma base (oxidação ou alquilação), quebras duplas ou simples da ligação fosfodiéster nas fitas do DNA. Tais danos são reparados por diferentes mecanismos como reparos por excisão de base, de nucleotídeos ou de pareamentos errôneos e reparos de quebras da fita do DNA (Figura 4) (Cline and Hanawalt, 2003).

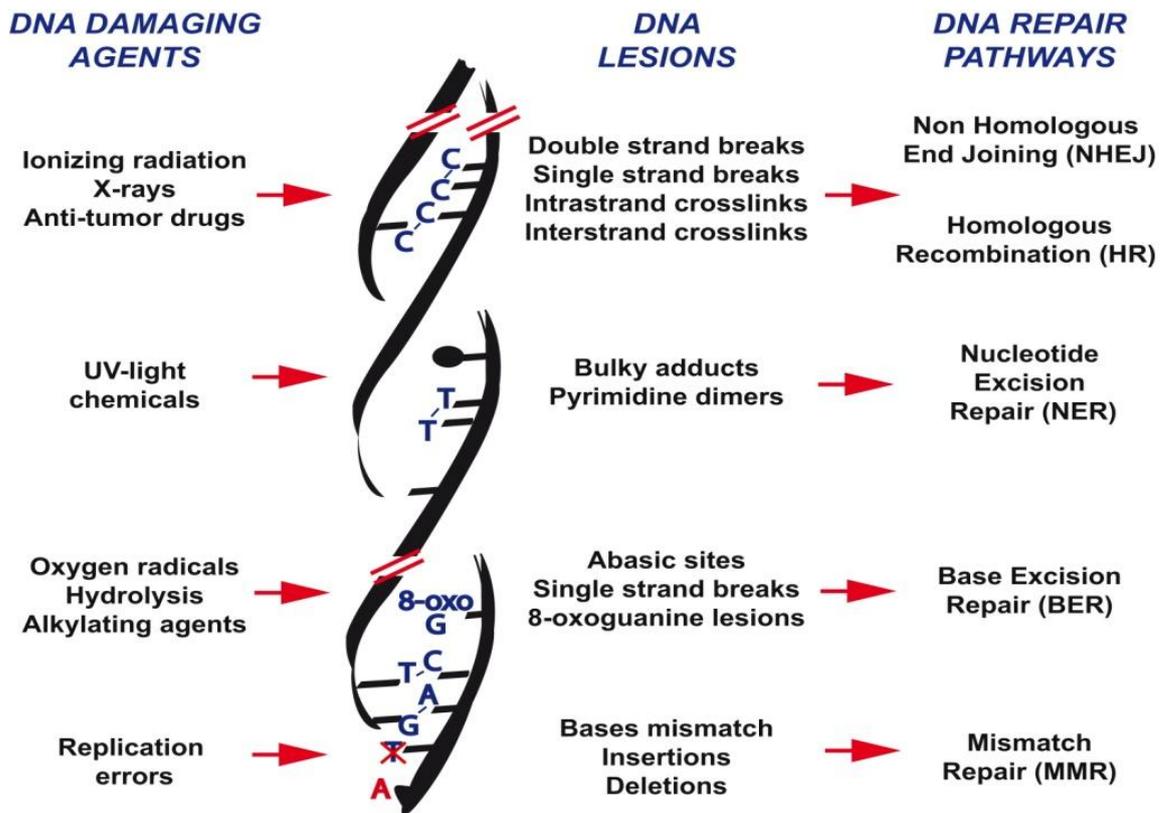


Figura 4 – Vias de reparo de danos no DNA. Existem diferentes agentes que induzem danos no DNA os quais levam a formações específicas de lesões ao DNA e essas lesões são reparados pelas vias de reparo (Blanpain et al., 2011).

Espécies reativas de oxigênio (ROS) induz a quebras de fita simples do DNA, com a extremidade 3' modificada contendo fosfato ou fosfoglicolato, a base guanina do DNA é a mais suscetível aos efeitos de ROS, levando a formação de 8-oxo-7,8-dihydroguanina (8-oxoG), esses danos são reparados pela via de reparo por excisão de base (base excision repair - BER) (David et al., 2007; Dianov and Parsons, 2007).

Outro agente indutor de danos no DNA é a luz ultravioleta (UV), os dímeros de ciclobutano pirimidina (CPDs) e 6-4 fotoprodutos, são os principais tipos de lesões induzidas pela luz UV e são reparados principalmente pela via de reparo por excisão de nucleotídeo (nucleotide excision repair – NER) (Friedberg et al., 2006).

Danos no DNA também podem ser induzidos por estresse durante a replicação (replication stress), formando quebras duplas e simples na fita do DNA.

Lesões não reparadas do DNA, lacunas (“gaps”), ou intervalos (“nicks”) e regiões de simples fita, são fontes extremamente comuns de estresse durante a replicação, os quais podem atrasar ou parar a replicação do DNA. Os “nicks” e “gaps” quando encontrados pela maquinaria de replicação, são facilmente transformados em quebras de fita dupla (Zeman and Cimprich, 2014).

A radiação ionizante (raios-X e gama) induz a danos no DNA, principalmente quebras de fita dupla, de maneira direta e indireta. Na ação direta, ocorre a interação direta da energia da radiação com o DNA, danificando o DNA. O efeito indireto é através da radiólise da água, onde ocorre formação de espécies reativas de oxigênio, principalmente do radical hidroxil, o qual ocasiona quebras de fita dupla no DNA (Breen and Murphy, 1995).

A quebra da fita dupla do DNA (DSB - double strand break) é uma lesão de extrema importância, que provoca instabilidade genômica podendo levar ao câncer. O reparo de DSBs exige uma complexa maquinaria de reparo. A quebra de fita dupla do DNA pode ser gerada por fatores endógenos (agentes de dano ao DNA, como por exemplo, as espécies reativas de oxigênio e peróxido de hidrogênio) e exógenos (radiação ionizante ou inibidores de topoisomerasas) (Karagiannis and El-Osta, 2004; O'Driscoll and Jeggo, 2006).

A transdução de sinal em resposta ao DSB ocorre basicamente da seguinte maneira: a lesão DSB é detectada por proteínas sensoras, que por sua vez ativam as cascatas de proteínas quinases as quais amplificam o sinal através de uma série de proteínas efetoras. A cascata de sinalização leva a uma alteração na transcrição, replicação ou na segregação cromossômica. A resposta pode induzir a transcrição de genes de resposta a estresse, ao aumento da concentração de desoxiribonucleotídeos, que são necessários para a síntese de DNA durante o

reparo, se o dano for muito severo e irreparável a sinalização dispara a apoptose ou induz a senescência (estado onde as células possuem uma limitada capacidade proliferativa) (Karagiannis and El-Osta, 2004).

O mecanismo de reparo de DSB é dependente de em qual fase do ciclo celular o dano foi detectado. O reparo pode ser por união não-homóloga de extremidades (NHEJ - Non-Homologous End-Joining) ou por recombinação homóloga (HR – Homologous Recombination).

1.2.1 Recombinação homóloga (HR)

O mecanismo mais comum para reparar DSB em eucariotos superiores é a recombinação homóloga (HR – Homologous Recombination), o qual utiliza como DNA molde para o reparo o cromossomo homólogo; no entanto, o reparo ocorre se as células lesadas estiverem na fase S ou G2 do ciclo celular. Se o dano for induzido por radiação ionizante durante a fase G1, há um atraso na maquinaria de reparo até que a célula chegue a fase S ou G2 para que ocorra HR, pois existe uma preferência pela HR quando há exposição a radiação ionizante. Este é um mecanismo de reparo conhecido por ser livre de erro e sem perda de informação genética (Bernstein and Rothstein, 2009).

Para que ocorra o reparo, a fita lesionada tem que estar com a extremidade 3' em simples fita. A lesão é reconhecida primariamente pelo complexo proteico MRN, o qual é composto por duas subunidades de proteínas Mre11, duas de Rad50 e uma de Nbs1 (Bernstein and Rothstein, 2009). Este complexo proteico possui atividade de ATPase, atividade exonucleásica na direção 3' → 5' e endonucleásica. A ação do complexo MRN interfere no comportamento celular e também recruta e promove a ativação da proteína ATM quinase (Ataxia Telangiectasia Mutated) (Figura 5)

(Kanaar and Wyman, 2008).

ATM é um componente central na cascata de sinalização de DBS, possuindo papel importante na regulação pós-irradiação ionizante, pois promove um prolongamento da transição G1→S para que o dano seja reparado antes da replicação. Durante a fase S, inibe a replicação do material genético e regula também a transição da fase G2→M, em células que foram lesionadas pós-irradiação ionizante durante a fase G2 do ciclo celular (O'Driscoll and Jeggo, 2006).

Outro passo da resposta ao dano envolve a fosforilação da histona H2AX (γ -H2AX), pela ATM, DNA-PKcs e ATR. As proteínas MRN, ATM e γ -H2AX promovem o recrutamento de outras proteínas para que ocorra o reparo do dano no DNA (Fernandez-Capetillo et al., 2004; Wang et al., 2005). Após a digestão de uma das fitas do DNA pelo complexo MRN, é recrutado o complexo heterotrimérico RPA (replication protein A) que possui alta afinidade pela fita simples de DNA recém formada, RPA atua estabilizando a fita simples do DNA. Em seguida a RAD51 recombinase é recrutada e juntamente com RPA invadem a fita homóloga do DNA, para que ocorra a síntese da sequência faltante utilizando como molde a sequência da fita homóloga. Por fim, ocorre a ligação do fragmento, restaurando o DNA que foi lesionado (Figura 5) (Mladenov et al., 2013).

Em resposta a quebra de fita dupla do DNA, a proteína H2AX é rapidamente fosforilada na extremidade carboxi-terminal, mais precisamente no aminoácido Ser 139. Muitos componentes de resposta a dano no DNA como, por exemplo, ATM e o complexo MRN colocalizam com γ -H2AX formando um foco de reparo e com a inibição da fosforilação da histona não há a formação de foco de reparo, indicando que a γ -H2AX é importante na formação do foco de reparo. Desta forma, a histona H2AX fosforilada é utilizada como marcador de dano no DNA, que pode ser

detectada por imunofluorescência e Western blotting (An et al., 2010; Fernandez-Capetillo et al., 2003).

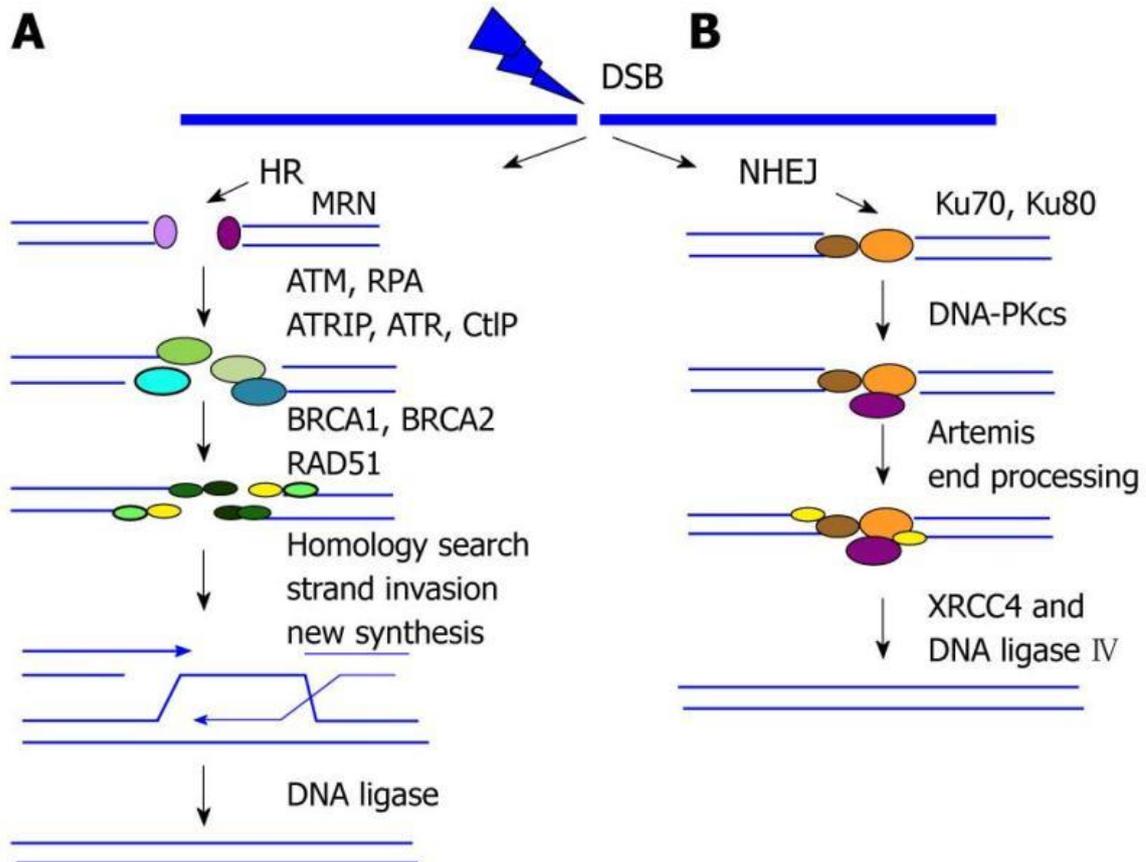


Figura 5 - Representação esquemática das vias de reparo de quebra de fita dupla do DNA. A) Recombinação Homóloga. A lesão é reconhecida pelo complexo MRN, o qual recruta outras proteínas envolvidas no reparo como ATM, RPA e RAD51. B) Recombinação não-homóloga. O heterodímero KU70/Ku80 se ligam a extremidade do DNA quebrado e recrutam DNA-Pkcs e outras proteínas para que ocorra o reparo do DNA (Peng and Lin, 2011).

1.2.2 União não-homóloga de extremidades (NHEJ)

Se a lesão estiver presente em células que estão na fase G1 do ciclo celular, o reparo será através da união não-homóloga de extremidades (NHEJ - Non-Homologous End-Joining). NHEJ é um mecanismo versátil, uma vez que pode atuar durante todo o ciclo celular, especialmente em G0 e G1, porém é propenso a erro podendo ocorrer perda de alguns nucleotídeos, já que há um processamento da extremidade lesada do DNA, para que ocorra a re-ligação dos fragmentos rompidos

(Frank-Vaillant and Marcand, 2002; Lieber et al., 2003).

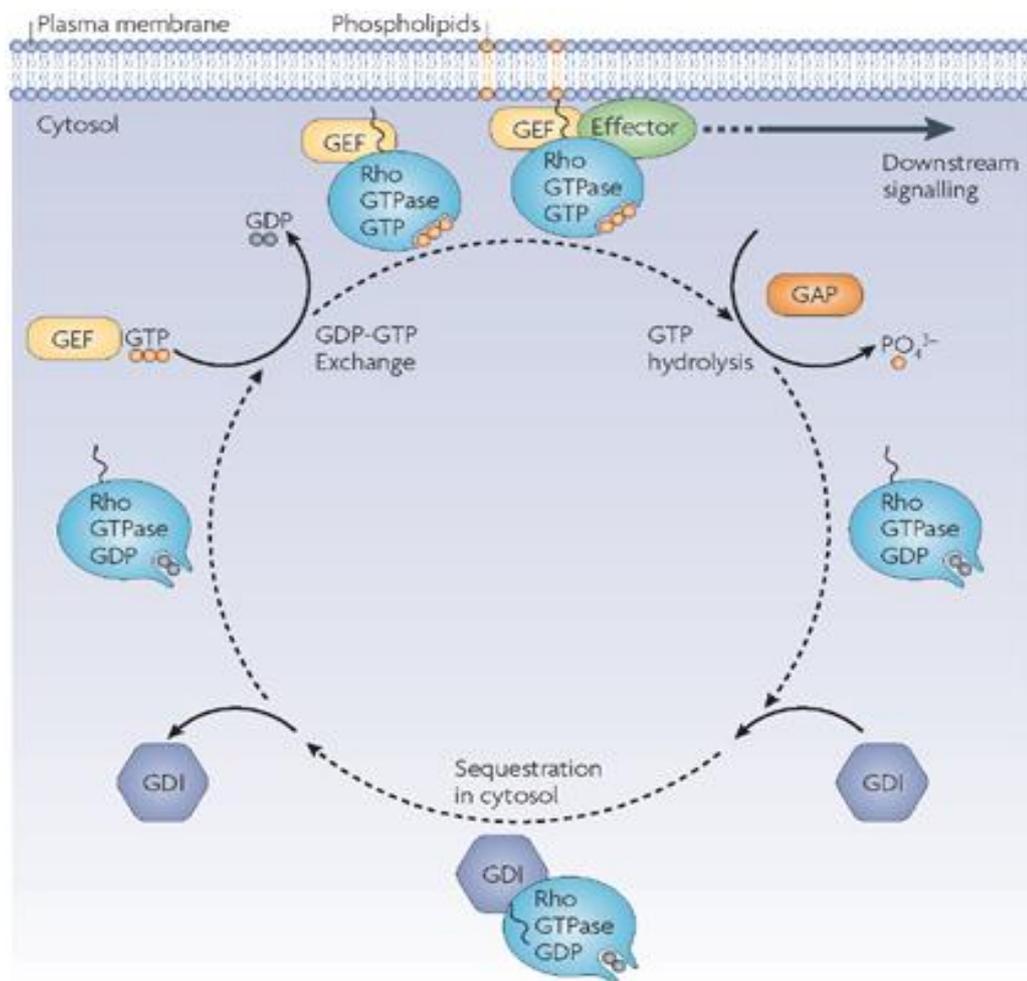
O mecanismo de reparo via NHEJ ocorre da seguinte maneira: o complexo proteico heterodimero Ku70/Ku80 se liga a extremidade quebrada do DNA; em seguida recruta as proteínas DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) e Artemis (nuclease específica); levando ao processamento do DNA pela enzima Artemis que corta as extremidades das fitas; e por fim há a ligação dessas fitas pelo complexo DNA ligase 4 e XRCC4 (Lieber et al, 2003). Artemis pertence a subfamília das metalo- β -lactamases que possui atividade de exonuclease quando complexada ou fosforilada por DNA-PKcs (Figura 5) (Moshous et al., 2001).

1.3 Família das Pequenas Rho GTPases

A família das Rho GTPases pertencem a superfamília das pequenas GTPases relacionadas a Ras, Ras homologous (Rho), que compreendem um grupo de moléculas sinalizadoras. São altamente conservadas dentre os eucariotos, pois possuem o domínio G conservado (Schmidt and Hall, 2002; Wennerberg et al., 2005). A superfamília Ras é subdividida com base na sequência e similaridade de função, é composta por cinco grupos: Ras, Rho, Ran, Rab e Arf (Wennerberg et al., 2005).

As GTPases funcionam como interruptores moleculares que possuem alta afinidade por nucleotídeos de guanina, GDP e GTP, estando na forma ativa ligada a GTP e inativa ligada a GDP. Há uma mudança na conformação da proteína entre a forma ligada a GTP e a GDP, que as várias proteínas efetoras conseguem distinguir, a mudança na conformação proteica ocorre predominantemente na região do switch I e II, os quais ficam próximos a região de ligação do GTP (Bishop and Hall, 2000; Ihara et al., 1998; Jaffe and Hall, 2005).

A atividade da Rho GTPase é regulada por várias enzimas: a ativação da GTPase é catalisada pelas enzimas GEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factors); sua inativação pode ocorrer por duas maneiras: uma auto-hidrólise da Rho GTPase ligada a GTP, porém esta função é fraca, e também pela ação das enzimas GAPs (GTPase Activating Enzymes) as quais catalisam a hidrólise do GTP; as GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors) inibem a ativação de Rho, pelo bloqueio da ligação de GTP e sequestro da proteína Rho da face interna da membrana celular para o citoplasma (Schmidt and Hall, 2002) (Figura 6).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 6 - Representação esquemática da regulação da ativação da Rho GTPase. A ativação de Rho pela proteína GEF, a qual troca GDP por GTP; A proteína GAP faz a inativação de Rho pela hidrólise de GTP; A proteína GDI faz a inibição da ativação de Rho, através do sequestro de Rho para o citosol (Iden and Collard, 2008).

Uma característica importante da grande maioria dos integrantes da superfamília Ras é a ocorrência de modificações pós-traducionais. Resíduos lipídicos são adicionados na extremidade N-terminal ou C-terminal, essas modificações são importantes para localização subcelular e auxiliam na ancoragem da GTPase na membrana celular. A maioria dos integrantes da subfamília Ras e Rho, sofre a adição de cadeias de isopreno (farnesil e geranil) ao resíduo de cisteína C-terminal que está contido no motif CAAX. E integrantes da família de Arf são modificados na região N-terminal, pela adição de ácidos graxos (miristoil) (Wennerberg et al., 2005).

Rho GTPase é uma família composta por 22 membros divididos em 8 subfamília: Rho, Rac, Cdc42, Rnd, RhoU/V, RhoD/F, RhoH e RhoBTB. Estão envolvidas na migração, adesão, endocitose, tráfego de vesículas, oncogênese, remodelamento do citoesqueleto, morfogênese, progressão do ciclo celular, polaridade e migração celular (Schmidt and Hall, 2002). Mais de 70 efetores de GTPases já foram identificados e as Rho GTPases na forma ativa, ou seja ligadas ao GTP, podem reconhecer mais de um efector; também uma GTPase pode regular a outra, como por exemplo Cdc42 pode ativar a Rac1, que por sua vez tem a capacidade de regular RhoA. Todas essas propriedades de Rho contribuem para formar uma complexa rede de sinalização celular (Iden and Collard, 2008; Smits et al., 2010).

Os membros melhor caracterizados desta família são a RhoA, Rac1 e Cdc42. Por regularem uma grande gama de processos biológicos, estas proteínas, seus reguladores e efetores estão envolvidos no controle da formação de tumores e de sua progressão maligna. Muitos tumores humanos apresentam expressão aumentada de Rho GTPase e também tumores com nível normal de expressão

podem possuir atividade da proteína Rho GTPase alterada (Karlsson et al., 2009).

1.3.1 RhoA

A proteína RhoA GTPase é capaz de modular as proteínas regulatórias do ciclo e da proliferação celular, está envolvida diretamente na migração celular, organização do citoesqueleto e adesão celular (Jaffe and Hall, 2005; Ren et al., 1999; Ridley, 2001).

Uma vez ativada (ligada a GTP) RhoA, transmite as informações via suas proteínas efetoras ROCK (RHO-associated, Coiled-coil Containing Protein Kinase ou também chamada de Rho kinase) e mDIA (Mammalian homolog of Drosophila Diaphanous). É através da proteína efetora ROCK que a sinalização para contração (dependente de Rho) da actomiosina, é mediada pela fosforilação da cadeia leve da miosina e da miosina fosfatase, induzindo a formação de fibras de stress. Outro efetor de RhoA, a proteína mDIA, atua na nucleação e polimerização de filamentos de actina, permitindo a migração celular (Figura 7) (Spiering and Hodgson, 2011; Thumkeo et al., 2013; Vega and Ridley, 2008).

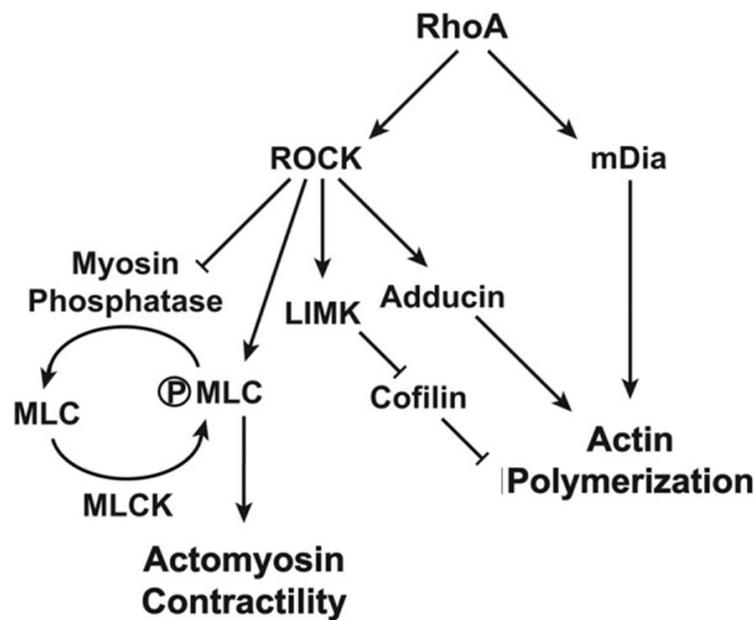


Figura 7 – Envolvimento de RhoA GTPase na contração de actomiosina e na polimerização da actina. Através dos efetores ROCK e mDia, RhoA gtpase induz a formação de fibras de stress e a migração celular através da contração da actomiosina e da polimerização da actina (O'Connor and Chen, 2013).

RhoA é encontrada superexpressa em alguns tipos de câncer e constitutivamente ativada em linhagens de câncer de mama; quando isso ocorre é considerada um prognóstico ruim. Em linhagens celulares de câncer de próstata, a inibição da atividade de RhoA leva a senescência e quando transfectadas com RhoA constitutivamente ativa, impede que as células entrem em senescência, sugerindo que a ativação de RhoA provavelmente afeta a parada do crescimento celular através da modulação da fosforilação de Erk, de p21 e p27 as quais são proteínas reguladores do ciclo celular (Park et al., 2007).

Além do mecanismo clássico de ativação utilizando GEF como agente de troca de GDP por GTP, RhoA também pode ser ativada diretamente por espécies reativas de oxigênio. RhoA possui um motivo redox sensível, que contém dois resíduos de cisteína no loop de ligação do fosforil, que ao serem oxidados induzem a liberação do nucleotídeo e troca do GDP pelo GTP que está presente em excesso

na célula, ativando a GTPase na ausência de GEF (Aghajanian et al., 2009).

Em células tumorais de córtex adrenal de camundongo (Y1), a proteína RhoA não é essencial, mas no entanto, está envolvida na proliferação celular e é necessária para iniciar a senescência quando induzida pelo hormônio AVP (arginina vasopressina) (Forti and Armelin, 2007).

Costa e colaboradores, demonstraram que RhoA também é um mediador do processo de senescência quando induzido pela fator oncogênico FGF2 (fator de crescimento de fibroblasto 2) nas linhagens celulares de camundongo Y1 (adrenal) e 3T3-B61 (fibroblasto), pois células transfectadas com dominante negativo RhoA não entraram em senescência e quando as células expressavam RhoA constitutivamente ativa, entraram em senescência em presença de FGF2. (Costa et al., 2008).

Em célula endotelial de cordão umbilical humano (HUVEC), quando exposta a radiação gama há uma maior indução de senescência celular. Os autores observaram que quando essa célula é exposta a radiação gama, ocorre redução da proteína RhoGDI, a qual atua sequestrando RhoA para o citoplasma impedindo que seja ativa pela GEF, dessa forma há aumento dos níveis de Rho ativo, promovendo a parada do ciclo celular via alta ativação de RhoA, já que RhoA também atua na regulação do ciclo celular (Yentrapalli et al., 2013).

Em células de Glioblastoma humano, foi observado aumento da migração celular em resposta radiação gama, aumentando seu potencial invasivo e metastático. Os autores observaram que o aumento da migração celular se deve a ativação de RhoA GTPase, quando as células são expostas a radiação gama. Uma vez que RhoA, está diretamente envolvida na promoção da migração celular (Zhai et al., 2006).

Em células de carcinoma cervical (SiHA), a exposição ao fator de

crescimento vascular endotelial (VEGF-C) promoveu a metástase celular, através do aumento da migração e invasão celular. A via de RhoA/ROCK foi a principal mediadora da metástase, pois a inibição de RhoA ou de ROCK reduziu drasticamente o níveis de miosina, levando a redução da migração celular (He et al., 2010).

Um passo importante para a invasão celular e metástase de diversos cânceres é a migração celular, sendo a proteína RhoA GTPase um dos principais articuladores da migração celular, se torna um dos principais alvos de estudo para tratamento do câncer (Yamaguchi et al., 2005).

1.3.2 Rac1

A GTPase Rac1 pertence ao grupo das Rac GTPases, o qual é composto por três isoformas, Rac1, Rac2 e Rac3, sendo a primeira isoforma a mais estudada dentre os outros integrantes deste grupo. Rac1 está envolvida em uma ampla gama de atividades celulares como adesão, migração, organização do citoesqueleto, estabilidade genômica e na senescência celular. A proteína Rac1 é expressa em todos os tecidos, Rac2 é encontrada em tecidos hematopoiéticos e Rac3 é encontrada no sistema nervoso central (Debidida et al., 2006; Guo et al., 2010; Wertheimer et al., 2012).

Rac1 GTPase atua nas diferentes atividades biológicas através dos efetores, como por exemplo, WAVE que através da ativação da proteína Arp2/3 atua indiretamente na polimerização da actina, levando a reorganização do citoesqueleto; outro efector é PAK que também atua na reorganização do citoesqueleto regulando atividade da proteína quinase da miosina de cadeia leve (MLCK) e da proteína LIM quinase (LIMK) e fosforila a proteína cofilina, um regulador da dinâmica dos

filamentos de actina (Figura 8) (Vadlamudi et al., 2004; Wertheimer et al., 2012).

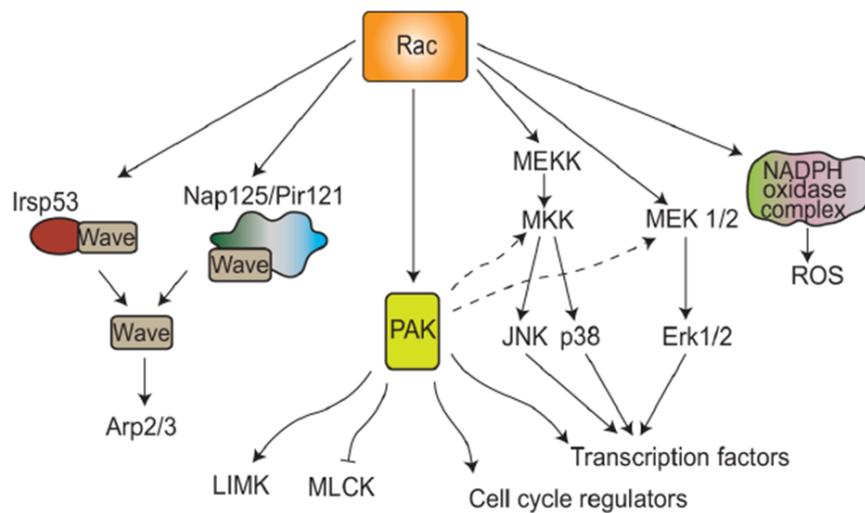


Figura 8 – Sinalização de Rac1 GTPase. Rac1 promove reorganização do citoesqueleto através da transmissão da sinalização pelas proteínas efetoras Wave e PAK; está envolvida na formação de ROS, via NADPH oxidase (Wertheimer et al., 2012).

Rac1 é superexpressa em células tumorais de pulmão, mama e cólon. A forma variante de Rac1, a Rac 1b, é resultante de “splicing” alternativo e se comporta como molécula constitutivamente ativa que possui ciclagem rápida entre GDP/GTP e não é inativada por GDI. Esta forma variante foi encontrada em câncer de mama e superexpresso em câncer de cólon, estando envolvida na progressão do câncer e atua como regulador negativo de Rac1, induzindo desligamento da interação de Rac1 com a membrana celular; uma vez no citoplasma Rac1 não pode ser ativada (Nimnual et al., 2010).

Em fibroblastos de origem embrionária de camundongo, tanto Rac1 constitutivamente ativa, como o duplo mutante negativo, levam as células a uma diminuição do crescimento celular, alteração na progressão das fases G1/S e G2/M, aumento da apoptose e senescência em resposta a danos ocasionados no material genético por espécies reativas de oxigênio (Debidda et al., 2006).

Em células endoteliais de tumor de rato adulto a proteína Rac1 não é

essencial para a angiogênese do tumor, porém é requerida quando a integrina $\beta 3$ está ausente; com aumento na atividade de Rac1 tem-se um subsequente aumento no crescimento do tumor, da angiogênese e da resposta mediada por VEGF (D'Amico et al., 2010).

Em células MCF-7 de câncer de mama Rac1 é ativada por radiação gama. Em ambas as células MCF-7 e câncer de pâncreas (CD18/HPAF), Rac1 atua regulando o checkpoint G2/M induzido por radiação gama, pois a inibição de Rac1 resultou na atenuação na parada do ciclo celular em G2/M, via inibição da fosforilação do regulador do ciclo celular Cdc2. Rac1 também importante para regulação da ativação das proteínas envolvidas no reparo de DNA Chk1, Chk2, ATM e ATR, as quais não ativadas em resposta a radiação gama levam a redução da sobrevivência celular (Yan et al., 2012; Yan et al., 2014).

1.4 Modulação de RhoA e Rac1 GTPase em resposta a danos no DNA.

Na literatura há relatos de ativação de RhoA e Rac1 GTPase de células expostas a danos no DNA (Frisan et al., 2003; Guerra et al., 2008, Yan et al., 2012; Yan et al., 2014). A proteína RhoA GTPase é ativada quando as células são expostas a uma toxina bacteriana CDT que induz quebras de fita dupla no DNA, semelhante aos efeitos da radiação gama, e essa ativação é acompanhada de formação de fibras de stress. O dano no DNA induzido pela toxina CDT ativa a maquinaria de resposta a danos no DNA, através a ativação de ATM, fosforilação da histona H2AX, parada do ciclo celular pela ativação de Chk2 e por fim ativação de vias de HR e NHEJ. Os danos induzidos por CDT, levam a ativação de RhoA de maneira dependente de ATM. Em outros trabalhos presentes na literatura, demonstraram que células expostas a CDT levam a ativação da proteína Net1, que é

uma GEF nuclear, a qual ativa RhoA promovendo a sobrevivência celular (Dubash et al., 2011; Frisan et al., 2003; Guerra et al., 2008).

Muito recentemente foi demonstrado pela primeira vez, uma relação direta entre uma via de reparo do DNA (via BER) e ativação da RhoA e Rac1 GTPase. Os autores demonstraram que o reparo de 8-oxoG, a qual que é resultante da oxidação da base guanina do DNA, formada em grande quantidade quando há exposição da célula a espécies reativas de oxigênio. A proteína 8-oxiguanina DNA glicosilase-1 (OGG1) é a responsável pela excisão da 8-oxoG do DNA, e é componente da via de reparo de BER. A proteína OGG1 se liga a 8-oxoG com grande afinidade, formando o complexo OGG1. 8-oxoG, esse complexo é capaz de agir como GEF (faz a troca de GDP por GTP) ativando a RhoA ou Rac1 GTPase, levando a formação de fibras de stress alterando e a morfologia celular (Hajas et al., 2013; Luo et al., 2014; Pandita, 2014).

Em relação a pequena GTPase Rac1, mostrou-se que ela é importante e necessária para a regulação do ciclo celular quando as células são expostas a radiação gama. A inibição de Rac1 (por inibidores farmacológicos, RNAi e mutante Rac1-N17) torna células de câncer de mama (MCF-7) e de câncer da pâncreas (CD18/HPAF), mais sensíveis aos efeitos da radiação gama, diminuindo a sobrevivência, induzindo a apoptose celular e diminuindo a ativação do checkpoint G2/M. Nas células MCF-7, os autores observaram que há aumento da ativação de Rac1, quando as células são expostas a radiação gama (Yan et al., 2012; Yan et al., 2014).

Com o passar dos anos, tem aumentado o interesse na investigação da correlação da ativação de RhoA e Rac1 GTPase, em resposta aos mais diversos danos no DNA. No entanto, apenas recentemente foi encontrada uma relação direta

de ativação de RhoA e Rac1 e mecanismo de reparo, pois até então era observado somente aspectos celulares, morfológicos envolvendo essas proteínas. Dessa forma, surge a necessidade de maiores investigações a respeito de efeitos bioquímicos, que estão por trás da ativação de RhoA e Rac1 em resposta a exposição celular a agentes genotóxicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar qual o nível de envolvimento e possíveis mecanismos de ação de duas proteínas Rho GTPases (RhoA e Rac1) na recuperação de células HeLa após danos no DNA originados por irradiação gama.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Verificar a atividade das GTPases RhoA e Rac1 na linhagem celular tumoral HeLa antes e após a exposição a radiação gama, através do ensaio de pull-down;
- ✓ Gerar sublinhagens estáveis de HeLa expressando exógenamente RhoA e Rac1 selvagem e mutadas de forma constitutivamente ativa (proficiente) ou dominante negativas (deficiente) para as 2 GTPases;
- ✓ Analisar o comportamento das sublinhagens clonais das GTPases após exposição a diferentes doses de radiação gama em ensaios de proliferação (ensaios de colônia e curvas de crescimento), migração celular (ensaios de risco), e morte celular (análise de apoptose e senescência);
- ✓ Analisar a cinética de formação de danos e de reparo do DNA nestas linhagens após os efeitos da radiação gama, através de ensaios de cometa alcalino e neutro.
- ✓ Utilizando o gene reporter de GFP numa construção plasmidial exógena, iremos analisar os níveis de reparo deste DNA pelas vias de Recombinação Homóloga e Recombinação não-homóloga, quando inibimos a ativação de RhoA GTPase através da utilização da toxina C3;
- ✓ Analisar a ativação por fosforilação das proteínas Chk1, Chk2 e H2AX, envolvidas nas vias de sinalização de resposta a danos no DNA possivelmente

reguladas por estas GTPases, quando as células são expostas a radiação gama.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares de mamíferos

As células de adenocarcinoma humano - HeLa (célula epitelial de câncer cervical- CCL-2), utilizadas neste projeto foram obtidas junto a American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA, e nos foram cedidas pelo laboratório do Prof. Hugo A. Armelin (CAT-Cepid-Instituto Butantan). Para o cultivo, as células foram sempre mantidas incubadas em meio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen) contendo 10% de soro bovino fetal (Cultilab) a 37°C e 5% de CO₂, em incubadora Sanyo modelo MCO-19AIC(UV).

3.2 Obtenção das sublinhagens mutantes de RhoA-GTP e Rac1-GTP

As sublinhagens de HeLa mutantes estáveis para as duas GTPases foram geradas previamente pelo nosso laboratório da seguinte forma: células empacotadoras da linhagem Φ NX-Ampho (Phoenix) foram transfectadas com Lipofectamina 2000 (Invitrogen) com plasmídeo contendo cDNA que codifica RhoA ou Rac1 selvagem ou mutados correspondendo ao genótipo dominante negativo (RhoA N19 - Thr→Asn) e (Rac1 N17 - Thr→Asn) ou constitutivamente ativo (RhoA V14 - Gly→Val) e (Rac1 V12- Gly→Val) clonados originalmente no vetor retroviral pCM (pCLNCX “backbone”). Os plasmídeos foram empacotados em partículas retrovirais que foram usadas na transdução de células HeLa parental na presença de 4 ug/mL polibreno (Sigma) por 24h. A seleção das células HeLa transduzidas foi feita em meio de cultura contendo antibiótico G418 na concentração de 400 μ g/mL até o surgimento de colônias isoladas resistentes, uma vez que o vetor pCM contém o gene de resistência a Neomicina que é análoga ao antibiótico G418. Após o isolamento das colônias estas foram expandidas e mantidas em meio de

manutenção (DMEM + 10% SBF +100 $\mu\text{g}/\text{m}$ de G418), incubadas em atmosfera 5% CO_2 a 37°C. Protocolo adaptado de (Forti & Armelin, 2007).

3.3 Irradiação das linhagens celulares

As células foram irradiadas com radiação gama, a temperatura ambiente no meio de cultura em que se encontram cultivadas, utilizando um irradiador experimental de Cobalto-60, modelo Gamacell 220 localizado no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), com doses de 0,5; 2; 5 e 15 Gy. Após os tratamentos com radiação gama, o meio de cultura foi sistemática e imediatamente trocado e as células foram retornadas à incubadora (quando assim desejado), nas próprias placas de cultura para posteriores experimentos.

3.4 Preparação de lisados celulares totais e quantificação

Para a obtenção dos lisados proteicos, as células foram plaqueadas 24h antes ao tratamento, em placas p100 para atingirem densidade celular de aproximadamente 80% de confluência. As células foram lavadas duas vezes com PBS gelado (80mmol/L Na_2HPO_4 , 20mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100mmol/L NaCl) e rompidas com tampão de lise celular RIPA (50mmol/L Tris-HCl pH7.2, 1% Triton X-100, 0,5% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS, 500 mmol/L NaCl, 10mmol/L MgCl_2) (Ren et al, 1999) gelado acrescidos de inibidores de proteases (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Leupetina Pepstatina A e Aprotinina, 1 mmol/L PMSF) e fosfatases (1mmol/L Ortovanadato de sódio e 1mmol/L fluoreto de sódio). As células foram mantidas em gelo por 10 minutos e removidas das placas com auxílio de espátula. O homogenato foi centrifugado em centrífuga Eppendorf modelo 5424, por 10 minutos a 13400 rpm a 4

°C, a fração sobrenadante foi recolhida em tubo novo, aliquotadas e armazenada em freezer -80°C.

As proteínas foram quantificadas segundo método de Bradford (1976), em microplacas utilizando Protein Assay (Bio-Rad), utilizando albumina de soro bovino como padrão de concentração de proteína (Bradford, 1976).

3.5 Preparação das beads RBD-GST e Pak1-GST, para o ensaio de atividade de RhoA ou Rac1 (Ren et al, 1999)

O plasmídeo Pak1-PBD, o qual contém a sequência que codifica para a proteína de fusão PBD-GST (para o ensaio de atividade de Rac1) ou o plasmídeo Rhotekin-RBD, o qual contém a sequência que codifica para a proteína de fusão RBD-GST (para o ensaio de atividade de RhoA) nos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Gary Bokoch (The Scripps Research Institute, La Jolla-CA-USA), foram utilizados 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 1h a 37 °C sob agitação constante a 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 *E. coli* estirpe BL21(DE3) já transformada com plasmídeo Pak1-PBD ou 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 re-inoculada em 2 L de meio LB, a cultura de células foi mantida a 37 °C sob agitação constante de 250 rpm até atingir aproximadamente $D.O_{600nm} = 0,6$. A essa cultura, foi adicionado indutor de expressão IPTG (isopropil β-D tiogalactosídeo) 0,5 mmol/L e incubada a 37 °C sob constante agitação. Após 2h de indução, as células foram

recuperadas por 10 minutos de centrifugação a 8000 rpm a 4 °C. O precipitado bacteriano foi ressuspensão em 20 mL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mmol/L pH7.5, NaCl 150 mmol/L, 1% Triton X-100, 5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT, 1mmol/L PMSF, 10 µg/mL Leupetina 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 minutos a 14000 rpm a 4°C e a fração solúvel contendo a proteína de fusão Pak1-PBD ou Rhotekin-RBD foi coletada.

Aproximadamente 12 mL dessa fração solúvel foi incubada com 0,5 mL de resina Glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare) por 1h 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 pH7.5, 0,5% Triton X-100, 150 mmol/L NaCl, 5mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT, 1µg/mL Leupetina e Aprotinina, 0,1 mmol/L PMSF) as beads (proteína de fusão ligada a resina) foram ressuspensas em 5mL do tampão de lavagem contendo 10% de glicerol, aliqüotadas e armazenadas em ultrafreezer -80 °C (modelo MDF-U33V-PE - Sanyo).

3.6 Determinação da atividade de RhoA e Rac1 GTPase por ensaio de pull-down (adaptado de (Ren et al., 1999)

Ensaio de pull-down foram realizados para determinar a atividade das GTPases Rac1 e RhoA, considerando que Rho GTPases se encontram ativas quando ligadas a GTP. Neste experimento foram utilizadas proteínas de fusão PBD-GST (Pak1 Binding Domain- Glutathione-S Transferase) ou RBD-GST (Rhotekin Binding Domain - Glutathione S-Transferase). Pak1 é uma proteína efetora de Rac1 que possui na extremidade N-terminal o domínio de ligação p21 que reconhece e se

liga especificamente Rac1 e Cdc42 ativo, por esse motivo o ensaio de pull-down é específico para determinar a ativação de Rac1 e dessa maneira será possível caracterizar com segurança os clones mutantes para Rac1 (Benard et al., 1999). RBD é um domínio da proteína Rhotekin, que é uma proteína efetora de RhoA com capacidade de reconhecer e se ligar especificamente a RhoA ativa ligada a GTP (Reid et al, 1996; Ren et al, 1999).

A proteína de fusão ligada a resina Glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare) a qual denominamos de beads, na concentração de 100 ug para beads-PAK-GST e 50 ug para beads RBD-GST, foi incubada por 90 min, com quantidades variáveis de lisado celular (500 e 100 ug) das células irradiadas ou não irradiadas. As beads foram lavadas por 3 vezes com tampão buffer B (50 mmol/L Tris-HCl pH7.2, 1% Triton X-100, 150 mmol/L NaCl, 10mmol/L MgCl₂, 10µg/mL Leupetina e Aprotinina e 0,1 mmol/L PMSF). As proteínas precipitadas foram analisadas por immunobloting com anticorpos primários específicos contra Rac1 ou RhoA (Santa Cruz) como 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 de 5% e no gel separador de 13% ou 12%, espessura do gel de 1,5mm 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; 25mM Tris) a temperatura ambiente e as proteínas foram coradas com Coomassie Brilliant Blue R-250 para quantificação da beads (PAK ou RBD) ou não coradas se o gel fosse

utilizado 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, 25mM Tris pH8.3) e as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose-Millipore utilizando o sistema úmido (Mini Trans-Blot, Bio-Rad) 350mA, por 1h 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 1h sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida, foram incubadas com diferentes anticorpos primários poli ou monoclonais: 1:1000 Rac1 (C-11), 1:1000 RhoA (26C4), 1:2000 alpha-tubulin (B-7) (Santa Cruz); 1:1000 phospho-Chk1(Ser-345), 1:1000 phospho-Chk2 (Thr-68), 1:1000 Chk1 (2G1D5), 1:1000 Chk2 (D9C6) (Cell Signaling), 1:1500 phospho-γH2AX(Ser-139) (R&D System).

Por fim, as membranas foram incubadas com o respectivo anticorpo secundário fluorescente, dependendo do animal do anticorpo primário, na diluição de 1:15000 IRDye 800CW ou 680RD (LI-COR Biosciences), por 1h 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 formação de colônia ou clonogênico

Para analisar a sobrevivência e proliferação celular das diferentes sublinhagens, em resposta aos danos no DNA ocasionados pela radiação gama,

foram realizados ensaios de formação de colônia ou clonogênicos. O experimento se baseia na capacidade de uma única célula em proliferar e formar colônia, é considerado uma colônia quando pelo menos 50 células reunidas são observadas (Franken et al., 2006).

Quantidades conhecidas de células (1×10^3 ou 2×10^3 células) foram plaqueadas em placas de 60 mm, contendo meio DMEM+10% FBS para HeLa parental e meio DMEM+10% FBS+100ug/mL G418 para sublinhagens clonais, 24h antes da irradiação. As células foram expostas a radiação gama nas doses de 0,5; 2 e 5 Gy. Após a irradiação o meio de cultura foi trocado e as células mantidas em cultura por 10 a 14 dias, então as colônias foram fixadas por 10 minutos com formaldeído (10% em PBS), coradas com cristal violeta (0,5%) e contadas manualmente. Os resultados são expressos em número de colônias, obtido da media aritmética de 3 ensaios independentes realizados em triplicata.

3.10 Curva de crescimento celular

Experimentos de curva de crescimento foram realizados para determinar a influência da modulação das GTPases na proliferação celular, em resposta aos efeitos provocados pela exposição das células a radiação gama. Para o ensaio foram plaqueadas 35×10^3 células em meio de cultura 24h antes do tratamento. As células foram expostas a doses de 0,5 e 5 Gy de radiação ionizante gama e re-incubadas. A cada 24h durante um período de cinco dias para um bloco de experimento e oito dias para outro bloco experimental, foram retirados um par de placas de cada condição e tipo celular. As células contidas nas placas foram lavadas com PBSA 3 vezes, removidas por tripsinização, fixadas por 10 minutos de formaldeído em PBS e preparadas para contagem em câmara de Fuchs-Rosenthal.

Os resultados são expressos em número de células x1000, obtido da média aritmética de 3 ensaios independentes realizados em duplicata.

3.11 Ensaio de cometa alcalino e neutro

Para verificar os efeitos da radiação ionizante sobre a maquinaria de reparo do DNA nas diferentes linhagens celulares sob investigação, foi realizado o ensaio cometa, também conhecido como eletroforese em gel de célula única (Single Cell Gel Electrophoresis, SCG). Essa técnica permite a detecção rápida de quebras de fita simples e dupla no DNA em células individuais. O método consiste em isolar células individualizadas em gel de agarose de baixo ponto de fusão, sobre lâminas recobertas por uma fina camada de agarose e submetê-las a um campo elétrico, o qual faz com que os fragmentos de DNA migrem de acordo com a corrente elétrica, formando uma cauda semelhante à de um cometa. Há formação de cauda é um indicativo que o DNA foi fragmentado (dano no DNA) quando as células foram submetidas a determinados tratamentos e a intensidade deste dano é dada por uma correlação entre a intensidade de fluorescência e o tamanho da cauda (Dusinska and Collins, 2008).

O protocolo usado nesta tese foi adaptado de Singh e colaboradores com algumas modificações (Singh et al., 1988; Wojewodzka et al., 2002). Foram plaqueadas 200×10^3 células em placas p35, 24 h antes da irradiação e mantidas incubadas em atmosfera 5% CO₂ a 37°C. Após o tratamento com radiação gama na dose de 5Gy, as células foram coletadas por tripsinização e misturadas ao gel de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (LMP) a 37°C; a mistura celular foi aplicada em uma lâmina de vidro de microscopia com extremidade fosca, previamente preparada contendo uma fina camada de 1,5% de agarose de ponto de fusão normal

e incubada a 4°C até solidificar. As células foram lisadas em solução de lise (10mmol/L Tris pH10, 2,5 mmol/L NaCl, 100mmol/L EDTA, 1% Triton X-100 e 10% DMSO) para o cometa alcalino, ou se para o cometa neutro (10mmol/L Tris pH9.5, 2,5 mmol/L NaCl, 100mmol/L EDTA, 0.5% Triton X-100 e 10% DMSO) por 24h em geladeira, para que permanecessem nas lâminas apenas o nucleóide celular aderido ao substrato de agarose.

Após esta lise, as lâminas foram colocadas numa cuba de eletroforese horizontal e foi adicionado tampão de eletroforese para o cometa alcalino (300mmol/L NaOH, 1mmol/L EDTA) ou para o cometa neutro (300mmol/L Acetato de sódio, 100mmol/L Tris-HCL, pH8.3), gelado até cobrir as lâminas. O sistema foi mantido em repouso por 25 min para desnaturação do DNA para o cometa alcalino, em seguida as lâminas foram submetidas à eletroforese sob corrente de 1 V/cm e 300 mA por 30 min. Já para o cometa neutro o sistema foi mantido em repouso por 1h e então, submetida a eletroforese sob corrente de 0.5 V/cm e 11-12 mA por 1h. Após a corrida as lâminas foram incubadas em tampão de neutralização por 15 min (0,4mmol/L Tris-HCl pH7,5) e fixadas em etanol 99% por 5 min. O DNA do nucleóide contido nas lâminas foi corado com brometo de etídeo em solução aquosa (na concentração de 2µg/mL) e visualizado em microscópio de fluorescência (Olympus).

Análise do dano no DNA foi expressa utilizando a relação Olive Tail Moment (OTM), que é dado pela multiplicação da percentagem de DNA na cauda (a partir da fluorescência emitida) com o tamanho da cauda em micrometros. Esses parâmetros foram obtidos através do software Komet 6.0 (Andor) e foram analisadas 100 células por amostra (50 por lâmina) a partir de triplicatas de experimental.

3.12 Ensaio de migração celular

Para determinar o envolvimento das Rho GTPases na migração celular, em resposta aos efeitos da exposição a radiação gama, foram realizados ensaios de migração (“wound healing assay”). Este é um método fácil e de baixo custo, baseado na observação de uma fenda ou risco gerado numa monocamada de células confluentes, as quais irão migrar da borda do risco para o interior da fenda a fim de fechar o espaço criado (adaptado de (Liang et al., 2007).

As células foram plaqueadas em placas p35 e incubadas até atingirem confluência de 100%. Imediatamente após o tratamento por radiação gama em diferentes doses, foi feito um risco na direção do diâmetro da placa na monocamada de células com uma ponteira de micropipeta p200 reta, para criar uma fenda. As placas foram lavadas com PBS (80mmol/L Na₂HPO₄, 20mmol/L NaH₂PO₄.2H₂O, 100mmol/L NaCl) e as células mantidas sob incubação por 24h. A migração celular foi avaliada medindo-se a largura da fenda num tempo inicial e final após o tratamento, utilizando microscopia de campo claro num aumento de 200X, sendo as medições feitas com software Cell-F (Olympus). Foram feitas três medidas por fenda por placa, em triplicata de placas, e calculada a media aritmética entre elas; os dados foram expressos como porcentagem de migração, onde 100% de migração corresponde a migração total ou fechamento completo da fenda.

3.13 Inibição da atividade de RhoA através da transfecção transiente do plasmídeo contendo a sequência de DNA da toxina C3.

Para auxiliar nas análises do envolvimento de RhoA na resposta aos efeitos da exposição celular a radiação gama, utilizamos a toxina C3 que é uma exoenzima secretada pela bactéria *Clostridium botulinum* capaz de inibir a ativação da

seletivamente as GTPases RhoA, RhoB e RhoC (Aktories et al., 2004; Rohrbeck et al., 2012; Sahai and Olson, 2006).

As células HeLa foram transfectadas transientemente com um plasmídeo de expressão eucariótica pEF-myc (Invitrogen), contendo a sequência de DNA que codifica para a toxina C3, esse plasmídeo foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Gary Bokoch (The Scripps Research Institute, La Jolla-CA-USA). A transfecção foi realizada através da formação do complexo lipossomo + plasmídeo, utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

Células HeLa foram plaqueadas em placas p100 (para experimentos de immunoblotting) ou em p35 (para experimentos de ensaio cometa) até confluência de 80%. Para o processo de transfecção foram preparados dois tubos com soluções, tubo A (14ug de DNA plasmidial em 500uL de meio DMEM sem SBF e sem antibiótico, para placa p100 e 2ug em 150uL de meio DMEM sem SBF e sem antibiótico para placa p35); tubo B (14uL de lipofectamina em 500uL de meio DMEM sem SBF e sem antibiótico, para placa p100 e 3uL de lipofectamina em 150uL de meio DMEM sem SBF e sem antibiótico para placa p35). Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida as soluções contidas nos tubos A e B foram misturadas e incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos.

As células aderidas às placas foram lavadas duas vezes com meio DMEM sem SBF e sem antibiótico, a mistura dos tubos A+B foi adicionada as células e mantidas incubadas por 6h, após esse tempo o meio foi trocado por DMEM +10% SBF. A eficiência de transfecção das células HeLa com o plasmídeo contendo a sequência de DNA que codifica para a toxina C3, foi de aproximadamente 90%. As células foram mantidas incubadas por 24h, onde se observou experimentalmente

maior inibição da ativação de RhoA, após esse tempo as células foram expostas a radiação gama.

3.14 Geração de sublinhagens mutantes estáveis DR-GFP e EJ5-GFP em células HeLa

Para determinar o possível envolvimento de RhoA na cascata de sinalização da via de reparo de quebras de fita dupla, utilizamos o ensaio específico para as vias de reparo HR e NHEJ, onde foram geradas sublinhagens estáveis de célula HeLa contendo um gene reporter que possui um ou dois sítios de restrição para enzima de corte raro I-SceI (Gunn and Stark, 2012).

A geração das sublinhagens estáveis de HeLa foi realizada segundo protocolo fornecido e publicado por Gunn e Stark (2012) (Gunn and Stark, 2012), graças aos vetores doados pelo Prof. Dr. Jeremy Stark (Department of Radiation Biology, Beckman Research Institute of the City of Hope, Duarte, California, United States of America). Células humanas de carcinoma de cervix – HeLa (ATCC CCL-2) foram transfectadas utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) com vetor recombinante DR-GFP (carregando a sequência de DNA que codifica para proteína GFP, truncado pelo sítio de restrição para enzima I-SceI) ou EJ5-GFP (carregando a sequência de DNA que codifica para proteína GFP truncada pela sequência que codifica para o antibiótico puromicina, o qual é flanqueado por um sítio de restrição para enzima I-SceI em cada extremidade da sequência de puromicina).

As células HeLa foram plaqueadas em placas de p60mm de diâmetro, após atingirem confluência de aproximadamente 80% as células foram transfectadas com o vetor recombinante utilizando o agente de transfecção Lipofectame 2000 (Invitrogen). Para o processo de transfecção foram preparados dois tubos com soluções, tubo A (DNA plasmidial em 500uL de meio DMEM sem SBF e sem

antibiótico); tubo B (3uL de lipofectamina em 150uL de meio DMEM sem SBF e sem antibiótico). Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida as soluções contidas nos tubos A e B foram misturadas e incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos.

As células aderidas as placas foram lavadas duas vezes com meio DMEM sem SBF e sem antibiótico, a mistura dos tubos A+B foi adicionada as células e mantidas incubadas por 6h, após esse tempo o meio foi trocado por DMEM +10% SBF. As sublinhagens foram selecionadas e isoladas com 5 ug/mL de puromicina, após a seleção as sublinhagens foram mantidas em meio de manutenção DMEM+10%SBF suplementado com 1 ug/mL de puromicina. Os clones estáveis contendo a inserção para o ensaio de HR, foi chamado de HeLa-DR-GFP, e para os que possuíam inserção para o ensaio de NHEJ foi chamado de HeLa-EJ5-GFP.

3.15 Ensaio celulares do reparo de DNA exógeno contendo danos de quebra dupla: Reparo por Recombinação Homóloga (HR) e Não-homóloga (NHEJ)

Os ensaios de HR e NHEJ foram realizados como descrito por Gunn e Stark, 2012, com modificações. Foram plaqueadas em placas p35, 200.000 células dos clones estáveis HeLa-DR-GFP ou HeLa-EJ5-GFP em meio de cultura DMEM+10%SBF+ 1 ug/mL de puromicina 24h antes da co-transfecção; esta última foi realizada com 4 ug de vetor de expressão contendo a sequencia que codifica para enzima de restrição I-SceI ou do vetor vazio, com ou sem 2ug do vetor com sequencia que codifica para C3 para inibição da atividade de RhoA. Para a co-transfecção foi utilizado como agente de transfecção a Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Após 72h da transfecção, a porcentagem de células expressando a proteína EGFP foi determinada por citometria de fluxo (Excitação: 488nm / Emissão:

540nm) no citômetro FACSVerse (BD biosciences). Os dados foram analisados com o software Kaluza 1.3 Flow Analysis (Bekman Coulter). A eficiência de transfecção das células HeLa-DR-GFP ou HeLa-EJ5-GFP com o plasmídeo I-Scel foi de aproximadamente 0,8%. Para chegar a essa estimativa de eficiência, analisamos por citometria de fluxo as células GFP+ e fizemos a relação com o número total de eventos (células).

3.16 Ensaio de apoptose em células marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídeo

Para analisar morte celular por apoptose em nossas sublinhagens celulares, e identificar alguma contribuição positiva ou negativa de RhoA neste processo, utilizamos 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) e análises de fluorescência emitida por células individuais no citômetro de fluxo.

Para o ensaio de análise de morte celular por apoptose, em placas p35 foram plaqueadas 150.000 células 24h antes do tratamento com radiação gama (5 e 15Gy). Utilizamos como controle positivo 60J/m² de radiação ultravioleta (UVC). Após 48h ou 72h do tratamento com radiação gama e UVC as células foram coletadas e processadas. Primeiramente foram coletadas por centrifugação a temperatura ambiente utilizando centrífuga 5424 (Eppendorf) as células contidas no meio de cultura, em seguida as placas foram lavadas duas vezes com PBS, as células 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 ressuspendidas cuidadosamente em tampão de ligação da Anexina-V (50 mM HEPES pH7.4; 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/mL) e adicionado 5 μ L de Anexina-V conjugada com FITC (BD Biosciences) e 1,5 μ L de iodeto de propídeo (1mg/mL). As amostras foram incubadas por 15min 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 foram analisadas por citometria de fluxo com citômetro FACSVerse (BD Bioscience) (excitação a 488 nm/ emissão a 560nm para iodeto de propídeo e excitação a 496 nm/ emissão a 520nm para Anexina-V-FITC). Os dados obtidos foram analisados com o software Kaluza 1.3 Flow Analysis (Bekman Coulter).

3.17 Análise de senescência celular por atividade de beta-galactosidase

Para analisar o envolvimento da pequena GTPase RhoA no processo de senescência, utilizamos o ensaio de determinação da atividade de senescência pela coloração de Beta-Galactosidase associada a senescência. A técnica é baseada no fato de que células senescentes possuem atividade aumentada da enzima β -galactosidase, dessa forma a enzima digere o reagente X-Gal (que é um análogo da lactose) presente na solução de coloração, resultando em um precipitado azul (Dimri et al, 1995).

Para o ensaio de senescência foram plaqueadas em duplicata, 30×10^3 células em placas de 35mm de diâmetro, 24h antes da exposição a radiação gama. Após ao

tratamento com radiação, as células retornaram para incubadora por 96h. Passado esse tempo de incubação, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas 3 vezes com PBS. As células foram fixadas com solução de fixação (2% formaldeído, 0,2% Glutaraldeído em PBS) por 3 min, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS e foi adicionado 2mL de solução de coloração pH 6 (5mmol/L $K_3Fe(CN)_6$, 2mmol/L $MgCl_2$, 150mmol/L NaCl, 30 mmol/L tampão fosfato/ Ácido cítrico, 5 mmol/L $K_4Fe(CN)_6$, 1 mg/mL X-Gal) as placas foram mantidas incubadas por no máximo 18h a 37 °C (Dimri et al, 1995). Após a incubação as células foram lavadas 2 vezes com PBS e armazenadas em geladeira no PBS, para posterior análise.

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.

3.18 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados utilizando teste de significância teste *t* de Student ou two-way ANOVA com Bonferroni post-test , e expressos em média \pm desvio padrão amostral (SEM) de triplicata experimental. Foi utilizado o software GraphPad Prism 5.00 (San Diego, CA) para a representação gráfica de todos os resultados.

4. RESULTADOS

4.1 Envolvimento da proteína RhoA GTPase na resposta de células expostas a radiação gama

4.1.1 Caracterização das sublinhagens clonais de células HeLa mutantes para a GTPase RhoA

A utilização de sublinhagens clonais tem sido extensivamente utilizada para analisar a função da proteína Rho. Geralmente é utilizado dois tipos de mutações pontuais, uma que confere característica constitutivamente ativa e outra que confere característica de dominante negativa para a proteína (Ridley, 2001).

As sublinhagens estáveis de células HeLa mutantes para RhoA, as quais expressam exogenamente a sequência de cDNA que codifica para RhoA constitutivamente ativa (HeLa-RhoA V14) ou dominante negativa (HeLa-RhoA N19), já haviam sido obtidas anteriormente no laboratório (pelo Prof. Dr. Fabio Forti), segundo materiais e métodos descritos no item 3.6, no entanto ainda não haviam sido testadas. O clone constitutivamente ativo, possui a substituição de Ala para Val na posição 14; dominante negativo substituição de Thr por Asn na posição 19. As mutações ficam localizadas no loop de ligação ao fosfato e não ocasionam mudanças conformacionais significantes nesta região, no entanto, há grande mudança na região do switch II e I. Estas mutações são equivalentes as encontradas naturalmente na mutação oncogênica de Ras, onde Ras V12 apresenta ganho de função (constitutivamente ativo) e Ras N17 perda de função (dominante negativo) (Qiu et al., 1995; Ridley et al., 1992).

No total foram gerados 182 clones mutantes RhoA-V14 e 41 clones mutantes RhoA-N19, e dentre esses foram isolados, expandidos e congelados 6 clones mutantes RhoA-V14 e 6 clones RhoA-N19. Oito destes clones foram testados, sendo quatro dominante negativos (HeLa-RhoA N19 1G; HeLa-RhoA N19 2P; HeLa-RhoA N19 1P; HeLa-RhoA N19 4G) e quatro constitutivamente ativos (HeLa-RhoA V14 1G; HeLa-RhoA V14 2G; HeLa-RhoA V14 2P; HeLa-RhoA V14 4G).

Como parâmetro inicial de caracterização, analisamos os níveis de RhoA ativo destas sublinhagens celulares, ou seja os níveis de RhoA-GTP. Utilizamos o ensaio de pull-down para determinar os níveis de RhoA ativo intracelular, onde o lisado celular foi incubado com beads RBD-GST, as quais são a proteína de fusão RBD-GST (Glutathione S-Transferase fundida a RhoA Binding Domain da proteína Rhotekin) ligada a resina Glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare). O ensaio de pull-down é baseado na capacidade do domínio de ligação a RhoA da proteína Rhotekin em reconhecer e se ligar especificamente a RhoA ligada a GTP (Reid et al., 1996; Ren et al., 1999).

Para esses ensaios, as células foram carenciadas com 0% de soro bovino fetal (SBF) por 48h e então estimuladas ou não com 30%SBF por 1h, ou simplesmente mantidas em crescimento exponencial na presença direta de 10% de SBF (sem prévio carenciamento). A presença de SBF ao meio de cultura é capaz de ativar RhoA, pois possui fatores de crescimento como por exemplo epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), além de outros compostos como o lysophosphatidic acid (LPA), dentre muitos outros, e os quais possuem a capacidade de ativar RhoA (Gohla et al., 1998; Ren et al., 1999).

De acordo com a figura 9, podemos observar que a sublinhagem dominante negativa HeLa-RhoA N19 1G apresenta menores níveis de RhoA-GTP em

comparação com HeLa-RhoA V14 4G e HeLa parental quando as células estão em crescimento sem carenciamento. No entanto, a mesma redução não foi observada no segundo mutante dominante negativo HeLa-RhoA N19 4G.

Os mutantes constitutivamente ativos RhoA V14 4G e V14 2G, apresentaram níveis de RhoA ativo maior em relação a HeLa parental e RhoA N19, quando em crescimento não carenciado (Figura 9).

Quando as células foram carenciadas com 0%SBF por 48h, observamos uma redução sensível dos níveis de RhoA-GTP em HeLa-RhoA N19 4G e mais expressiva em HeLa-RhoA V14 2G, já nos mutantes RhoA N19 1G, RhoA V14 4G e em HeLa parental observamos um aumento dos níveis de RhoA-GTP. Após o carenciamento de 48h e ao adicionarmos 30% de SBF por 1h, observamos aumento sensível dos níveis de RhoA-GTP em relação ao carenciamento, nas sublinhagens testadas.

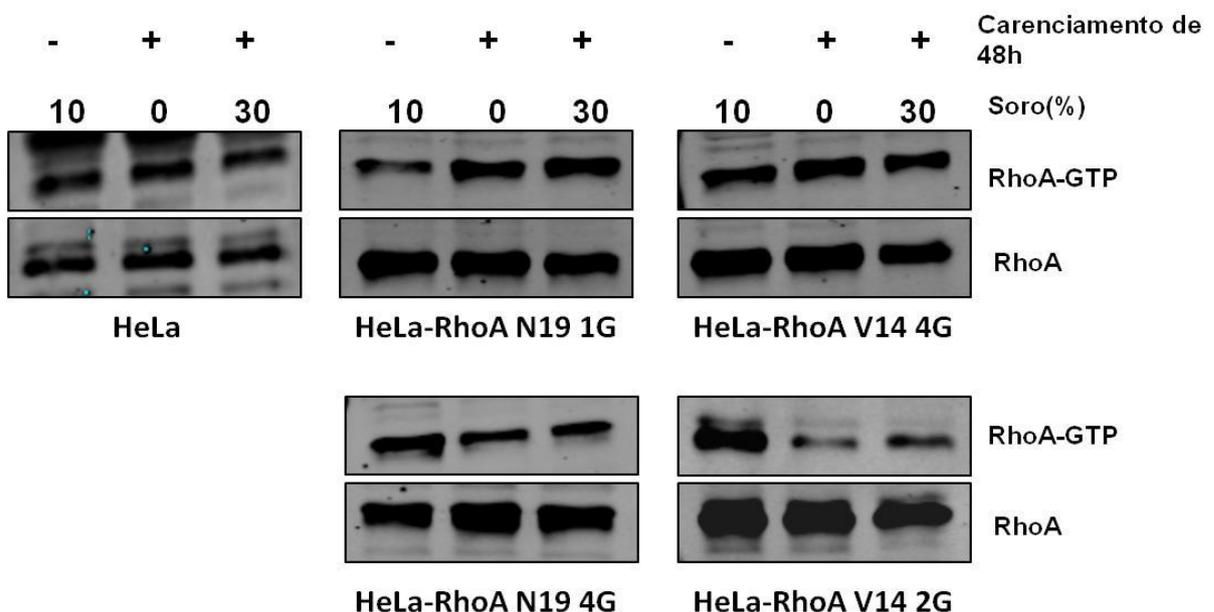


Figura 9- Caracterização dos mutantes de HeLa-RhoA pelo ensaio de atividade (Pull-down). O ensaio de atividade de RhoA foi realizado utilizando beads RBD-GST, as quais capturam e precipitam RhoA ativa (RhoA-GTP). A atividade de RhoA foi determinada em células em crescimento normal (10%SBF); em células carenciadas por 48h com 0%SBF e em células estimuladas com 30% SBF após carenciamento. Os níveis de RhoA-GTP foram determinados por imunoblot utilizando anticorpo anti-RhoA (Santa Cruz). As imagens são representativas de três experimentos independentes.

Como tradicionalmente a RhoA GTPase, dentre todas as três Rho GTPases, possui papel ímpar na migração celular, utilizamos o ensaio de migração (“wound healing assay”) também como ferramenta para auxiliar na caracterização das sublinhagens clonais mutantes. Para os ensaios de migração utilizando HeLa parental e os clones RhoA N19 e RhoA V14, um risco no diâmetro da placa de cultura totalmente confluenta foi feito, de modo que fosse possível a formação de uma fenda livre de células. Foram realizadas três medições do diâmetro da fenda por placa, no momento em que o risco foi feito 0h e 24h após.

O ensaio de migração foi dividido em três blocos; em um bloco experimental as células não foram carenciadas no segundo e terceiro blocos experimentais primeiramente as células foram carenciadas com 0% de SBF por 24h e então uma fenda foi produzida com auxílio de uma ponteira de micropipeta, nesse momento realizamos a primeira medição do diâmetro da fenda (0h). Em um bloco de experimentos mantivemos as células carenciadas com 0% de SBF por mais 24h, somando 48h de carenciamento e em outro bloco experimental adicionamos 10% SBF ao meio de cultura, também por 24h. A segunda medição da fenda foi realizada após 24h da adição ou não de SBF. Novamente, estes ensaios apresentam condições semelhantes aos dos ensaios de pull-down mostrados anteriormente visto que se pretende modular a atividade de RhoA de forma semelhante.

Os ensaios de migração demonstram que HeLa parental, mesmo na ausência de SBF mantêm a capacidade de migrar, porém essa capacidade é reduzida em torno de 60%, não havendo fechamento total da fenda. Com adição de 10% de SBF

ao meio de cultura por 24h, as células restabeleceram sua capacidade normal de migrar, evidenciado pelo fechamento total da fenda (Figura 10).

Os mutantes dominante negativos HeLa-RhoA N19 testados, apresentaram variação na taxa de migração entre si, no entanto nenhum dos clones foi capaz de fechar totalmente a fenda. As sublinhagens mutantes RhoA-N19 1G e RhoA-N19 4G apresentaram menor taxa de migração quando não carenciados, migrando somente 40% e 55% respectivamente. E após o carenciamento por 24h e a adição de 10% SBF ao meio de cultura, não observamos aumento significativo da porcentagem de migração. Indicando que em relação a atividade de migração, esses mutantes se comportam como melhores dominante negativos de RhoA, pois migram menos em relação a HeLa parental (Figura 10).

Os mutantes constitutivamente ativos RhoA-V14, também apresentaram variação na taxa de migração. As sublinhagens RhoA-V14 4G e RhoA-V14 2G apresentaram a maior taxa de migração dentre os outros mutantes, fechando totalmente a fenda. No entanto, observamos redução na porcentagem de migração quando as células foram carenciadas, migraram somente 30% e 40% respectivamente. Os mutantes restabeleceram totalmente a capacidade de migração quando adicionamos SBF ao meio de cultura, dessa forma observamos que o perfil desses clones é semelhante ao da HeLa parental (Figura 10).

Experimentos de migração realizados em nosso laboratório utilizando inibidor de divisão celular mitomicina C (Sigma-Aldrich), que se liga e promove crosslinks nas fitas duplas do DNA (Cleaver, 2011), demonstraram que em células HeLa tratadas previamente com 2 µg/mL de mitomicina C durante 4h, não apresentam alteração na sua migração celular em experimentos realizados nas mesmas condições descritas. Ou seja, ocorre migração celular quando as células são

mantidas em meio de cultura suplementado com 10%SBF e analisadas 24h após, demonstrando que a migração vista nos experimentos anteriores não é devido a proliferação ou divisão celular (Espinha, G.T. et al. dados não publicados).

Esses dados sugerem que os mutantes RhoA-N19 (1G e 4G) apresentam fenótipos de dominante negativo, uma vez que apresentam reduzida capacidade de migração e menores níveis de RhoA-GTP quando não carenciados. Nos mutantes constitutivamente ativos RhoA-V14 (2G e 4G), as células migram normalmente e apresentam altos níveis de RhoA-GTP, quando as células não estão carenciadas.

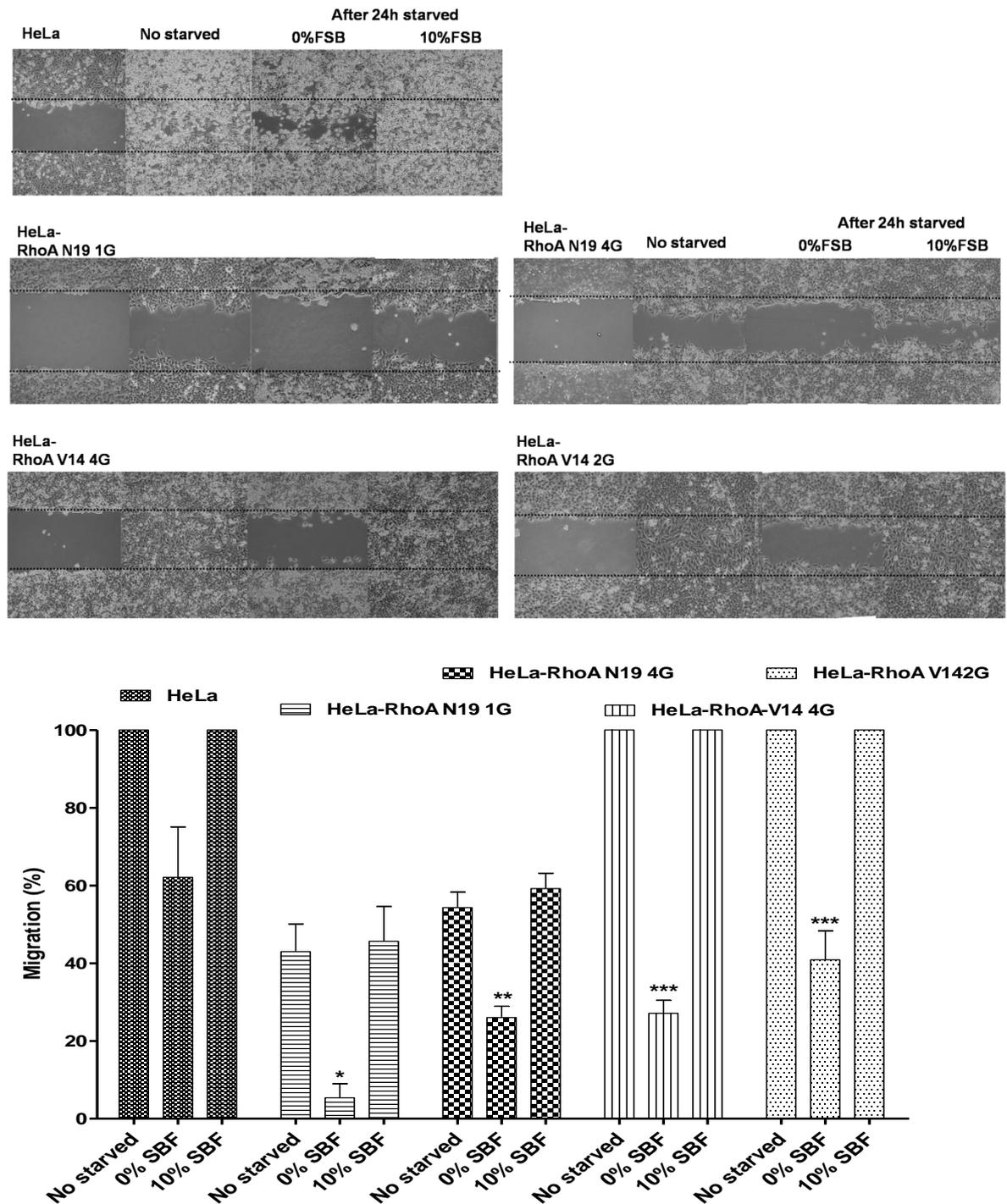


Figura 10 -Ensaio de migração celular das células HeLa parental e dos mutantes HeLa-RhoA N19 e HeLa-RhoA V14, na presença ou ausência de 10%SBF. Primeira foto de cada painel: células logo após o risco; Segunda foto de cada painel: células em crescimento normal na presença de 10% SBF; Terceira foto: células carenciadas por 24hr e não estimuladas; Quarta e última foto de cada painel: células carenciadas por 24hr e estimuladas com 10% SBF por 24hr. As imagens são representativas de três experimentos independentes. As células foram fotografadas com aumento de 200X e as fendas medidas utilizando o software Cell-F (Olympus). O gráfico representa a porcentagem de migração celular. As células foram fotografadas com aumento de 200X e as fendas medidas utilizando o software Cell-F (Olympus). Análise estatística 1way ANOVA $P < 0.05$ entre controle não carenciado e células carenciadas ou após adição de 10%SBF.

Observamos ainda que as sublinhagens clonais mutantes, dominante negativas e constitutivamente ativas, apresentam modificação da morfologia celular em relação a linhagem HeLa parental. Os mutantes são mais espalhados e maiores do que a célula parental HeLa, porém não observamos variação morfológica significativa que se destaque entre os clones mutantes (Figura 11).

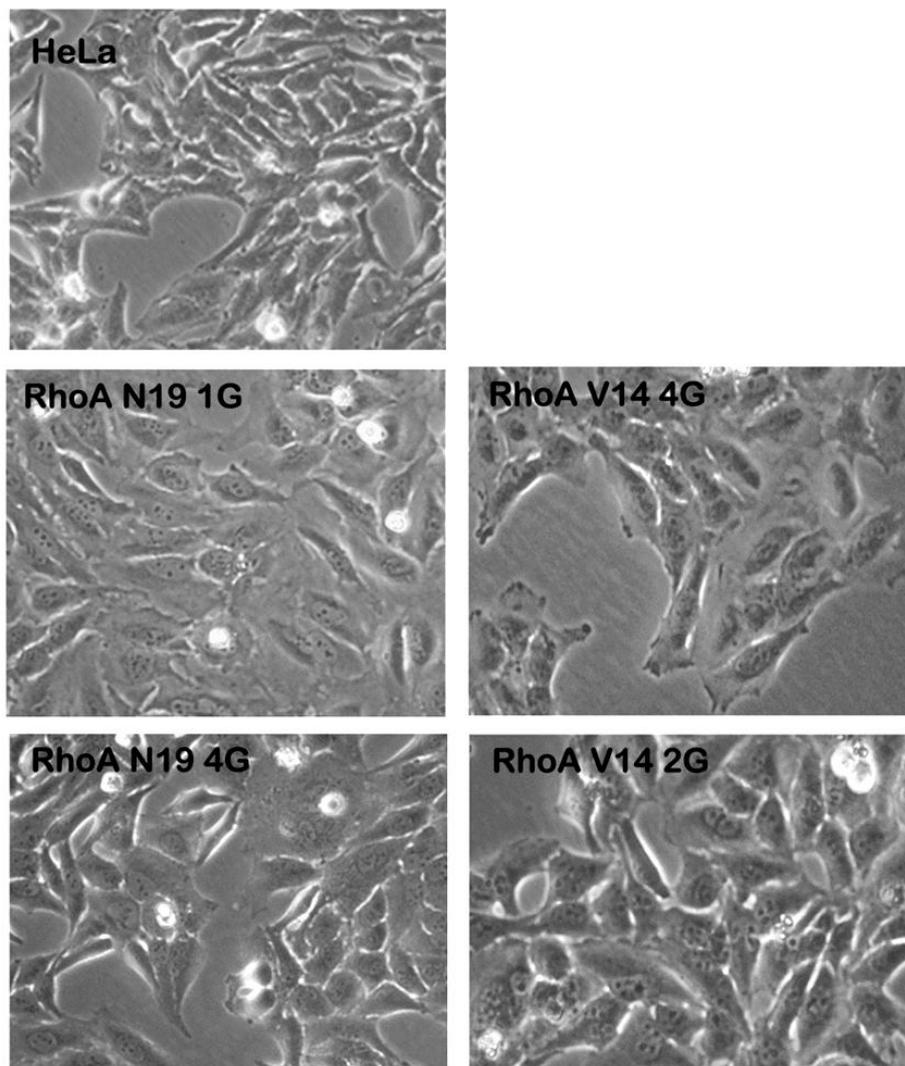


Figura 11 - As sublinhagens clonais mutantes RhoA V14 e RhoA N19 apresentam variação morfológica em relação a linhagem HeLa parental como maior volume, maior espalhamento e menor densidade de compactação. As células foram analisadas e fotografadas em microscópio invertido (Olympus) no aumento de 200X, em condições de crescimento normal com 10% de SBF.

4.1.2 A atividade de RhoA é aumentada pela exposição a radiação gama

Após analisar os experimentos anteriores, decidimos seguir os experimentos utilizando somente as sublinhagens clonais HeLa-RhoA N19 1G e HeLa-RhoA V14 4G. Pois o clone RhoA N19 1G apresentou menor nível de RhoA-GTP (ativo) já na situação basal, observado pelo ensaio de pull-down, e também apresentou menor porcentagem de migração celular (Figuras 9 e 10). A decisão de utilizar o clone RhoA V14 4G, foi baseada nos experimentos de pull-down, onde observamos níveis altos de RhoA –GTP (ativo) e também foi baseada nos experimentos e migração, onde manteve a porcentagem de migração alta (Figuras 9 e 10).

Para determinar o envolvimento da pequena GTPase RhoA na resposta celular quando as células são expostas a radiação gama, primeiramente analisamos os efeitos da radiação sob os níveis de ativação de RhoA, através do ensaio de ativação (pull-down). As células HeLa e as sublinhagens clonais mutantes (RhoA V14 4G e RhoA N19 1G) foram expostas a diferentes doses de radiação gama (2Gy, 5Gy e 15Gy) e o lisado celular foi obtido após meia hora da irradiação. O tempo de meia hora após a exposição das células a radiação gama, foi baseada em dados presentes na literatura, onde observamos que em linhagens celulares a ativação de RhoA foi máxima meia hora após a radiação gama (Frisan et al., 2003; Gabrys et al., 2007; Guerra et al., 2008).

Podemos observar que a ativação de RhoA na linhagem HeLa parental é regulada em resposta aos efeitos da radiação gama, pois houve um aumento dos níveis de RhoA-GTP (ativo) com a exposição da célula a radiação gama e esse aumento é dose dependente (Figura 12).

Quando as sublinhagens clonais mutantes foram expostas a doses crescentes de radiação gama, pudemos observar que houve uma pequena

modulação positiva da atividade de RhoA nos dois clones mutantes, RhoA N19 1G e RhoA V14 4G. Essa modulação se deve ainda a atividade residual da RhoA endógena, não totalmente eliminada pelos efeitos da proteína exógena uma vez que durante o processo de obtenção das sublinhagens clonais mutantes a expressão de RhoA endógena muito provavelmente não foi alterada. No entanto, essa modulação é muito pequena a ponto de considerarmos que ela não invalida os fenótipos dos clones mutantes obtidos e empregados nesta tese. Dessa forma a atividade de RhoA-GTPase é positivamente modulada pelos efeitos gerados pela radiação gama (Figura 12).

Além disso, vale lembrar que o clone RhoA N19 1G apresenta atividade basal de RhoA ativo (células sem tratamento) extremamente baixo, em relação a sublinhagem clonal RhoA V14 e a linhagem HeLa. Quando submetemos RhoA N19 1G a radiação gama, também não observamos modulação positiva da ativação de RhoA de maneira significativa (Figura 12). Já o clone constitutivamente ativo RhoA V14 4G apresenta atividade de RhoA ativo muito alto já na condição basal (sem tratamento), e provavelmente por isso que não vemos modulação de RhoA GTPase nestes clones (Figura 12), pois RhoA (em sua maioria) já se encontra no estado ativo.

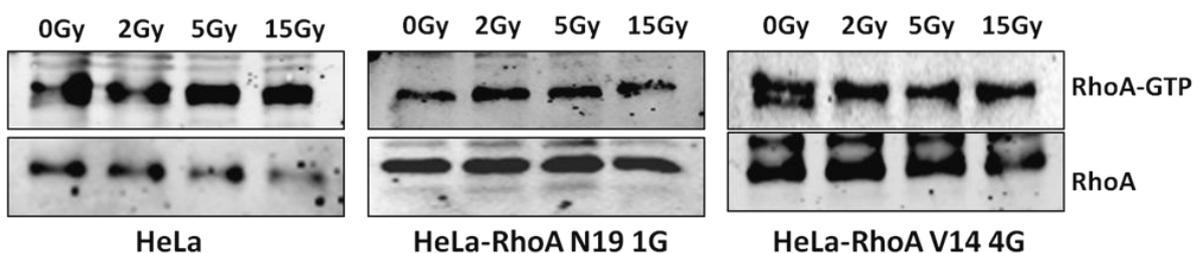


Figura 12 - Modulação da ativação de RhoA pelos efeito da radiação gama. As células foram irradiadas com diferentes doses de radiação gama (2Gy, 5Gy e 15Gy) e lisadas 30 minutos após ao tratamento. O ensaio de atividade de RhoA foi realizado utilizando beads RBD-GST. Os níveis de RhoA-GTP foram determinados por imunoblot utilizando anticorpo anti-RhoA (Santa Cruz). As imagens são representativas de três experimentos independentes.

Com objetivo de auxiliar a análise do comportamento de RhoA em resposta aos efeitos da radiação gama, foram geradas sublinhagens clonais HeLa-pCM mock e HeLa-RhoA WT. A sublinhagem pCM-Mock foi gerada a partir da transdução em células HeLa do plasmídeo pCM vazio, que contém o marcador de resistência para Neomicina, esse plasmídeo foi utilizado para inserir de forma estável a sequência de RhoA mutada no material genético da célula HeLa, dando origem aos mutantes dominante negativos (RhoA N19) e constitutivamente ativos (RhoA V14). Também foram geradas por transdução linhagens que expressam RhoA não mutada ou carregando a sequência selvagem (RhoA-WT).

As sublinhagens HeLa-pCM Mock e HeLa-RhoA WT não apresentaram mudanças da morfologia celular, em relação a HeLa parental (ANEXO 1). E também observamos que a modulação da atividade de RhoA nas sublinhagens HeLa-pCM-Mock e HeLa-RhoA WT em resposta a radiação gama é muito semelhante a encontrada em HeLa parental. Em ambas sublinhagens clonais, RhoA WT e RhoA-pCM Mock, RhoA é ativada quando as células são expostas a radiação gama e esta ativação também é dose dependente (dados em ANEXO 2).

4.1.3 A radiação gama estimula a migração celular nas linhagens HeLa e HeLa-RhoA V14

A capacidade de migração das sublinhagens clonais RhoA N19 e RhoA V14 também foi testada na presença da radiação gama. As células foram plaqueadas em alta densidade, 24 hr antes do tratamento com radiação gama, e as placas foram riscadas minutos antes da exposição à radiação. As linhagens foram submetidas às doses de 0,5; 5 e 15 Gy a temperatura ambiente e retornadas à incubadora.

Pudemos observar que na linhagem HeLa parental, há o fechamento da fenda nas doses de 0,5 e 5 Gy, porém é visível uma menor densidade celular na região da fenda na dose mais alta de 15 Gy, onde não ocorreu fechamento total. Nessa dose observamos uma redução da migração, mas ainda as células migraram em relação a condição controle, indicando que em HeLa a migração celular é afetada de maneira dose dependente pela radiação gama, apesar do aumento dose-dependente da atividade de RhoA (Figura 13).

Nas sublinhagens dominante negativas RhoA N19 de maneira geral, a atividade de migração possui maior sensibilidade à radiação gama quando comparada com HeLa e RhoA V14, pois já na menor dose de radiação (0,5 Gy) a taxa de migração foi sensivelmente menor em relação ao controle não irradiado, para os dois mutantes RhoA N19. Isto está de acordo também com o menor aumento da atividade de RhoA nestes clones. Porém a redução da migração celular foi mais expressiva quando as células foram expostas as maiores doses de radiação (5 e 15Gy), onde podemos observar menor migração celular. O mutante RhoA N19 1G migrou 50% menos e o mutante RhoA N19 4G migrou 25% menos em relação ao seu controle não irradiado. O mutante RhoA N19 1G apresentou maior redução da migração celular em relação ao mutante RhoA N19 4G, quando as células foram expostas a radiação gama (Figura 13).

O perfil de migração dos mutantes constitutivamente ativos, RhoA V14, foi bem semelhante ao das células parentais, onde a migração não foi muito afetada na dose mais baixa de radiação (0,5 Gy) e houve o fechamento total da fenda, porém também apresentou menor densidade celular na região da fenda, isto é devido a morfologia das células, onde são maiores e mais espreiadas. O mutante RhoA V14 2G, apresentou maior sensibilidade da migração quando as células foram expostas a

dose de 5Gy, pois houve menor taxa de migração, migrou somente 90% em relação ao mutante RhoA V14 4G que migrou 100% na mesma dose. No entanto, essa diferença da taxa de migração foi invertida, pois o mutante RhoA V14 4G apresentou menor migração quando exposto a dose de 15Gy, migrou somente 60% em relação ao mutante RhoA V14 2G, o qual migrou mais de 80% (Figura 13). Entretanto, apesar destas pequenas diferenças de motilidade, em todos estes clones RhoA-V14 observou-se que os níveis altos de atividade de RhoA são imprescindíveis para a migração, mesmo que pequena, e nas maiores doses de radiação gama.

Os dados obtidos indicam que dentro dos dois grupos de clones mutantes de RhoA N19 e RhoA V14 testados, há diferenças internas entre os variantes clonais como esperado, porém de maneira geral, a capacidade de migração das linhagens é afetada pela radiação gama e os mutantes constitutivamente ativos RhoA V14, assim como as células parentais HeLa, são menos afetados pela radiação gama, em relação aos mutantes dominantes negativos RhoA N19.

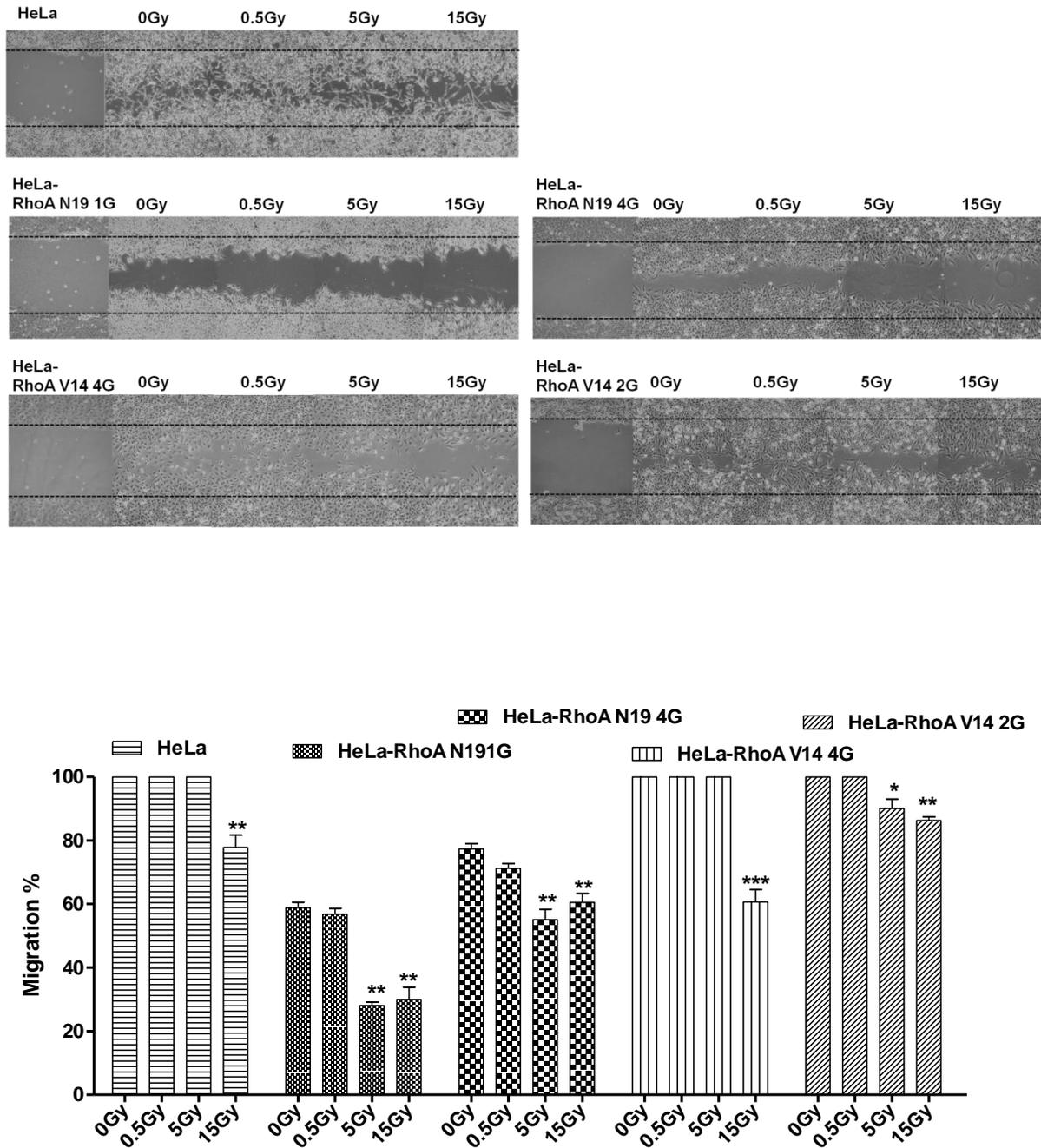


Figura 13 – Os clones HeLa-RhoA N19 migram menos em relação a HeLa e HeLa-RhoA V14 quando submetidos a diferentes doses de radiação gama. Tempo zero: logo após o risco, primeira foto de cada painel. Nas demais fotos dos painéis, as células foram submetidas a doses crescentes de radiação gama de 0,5; 5 e 15Gy respectivamente. As imagens são representativas de três experimentos independentes. O gráfico representa a porcentagem de migração celular. As células foram fotografadas com aumento de 200X e as fendas medidas utilizando o software Cell-F (Olympus). Análise estatística 1way ANOVA $P < 0.05$ entre controle não irradiado e células irradiadas.

4.1.4 As sublinhagens clonais mutantes RhoA N19 e RhoA V14 apresentam menor capacidade de proliferação em relação as células HeLa

As sublinhagens celulares clonais foram submetidas a duas doses de radiação gama (0,5 e 5 Gy) e sua capacidade proliferativa foi determinada através do ensaio de curva de crescimento.

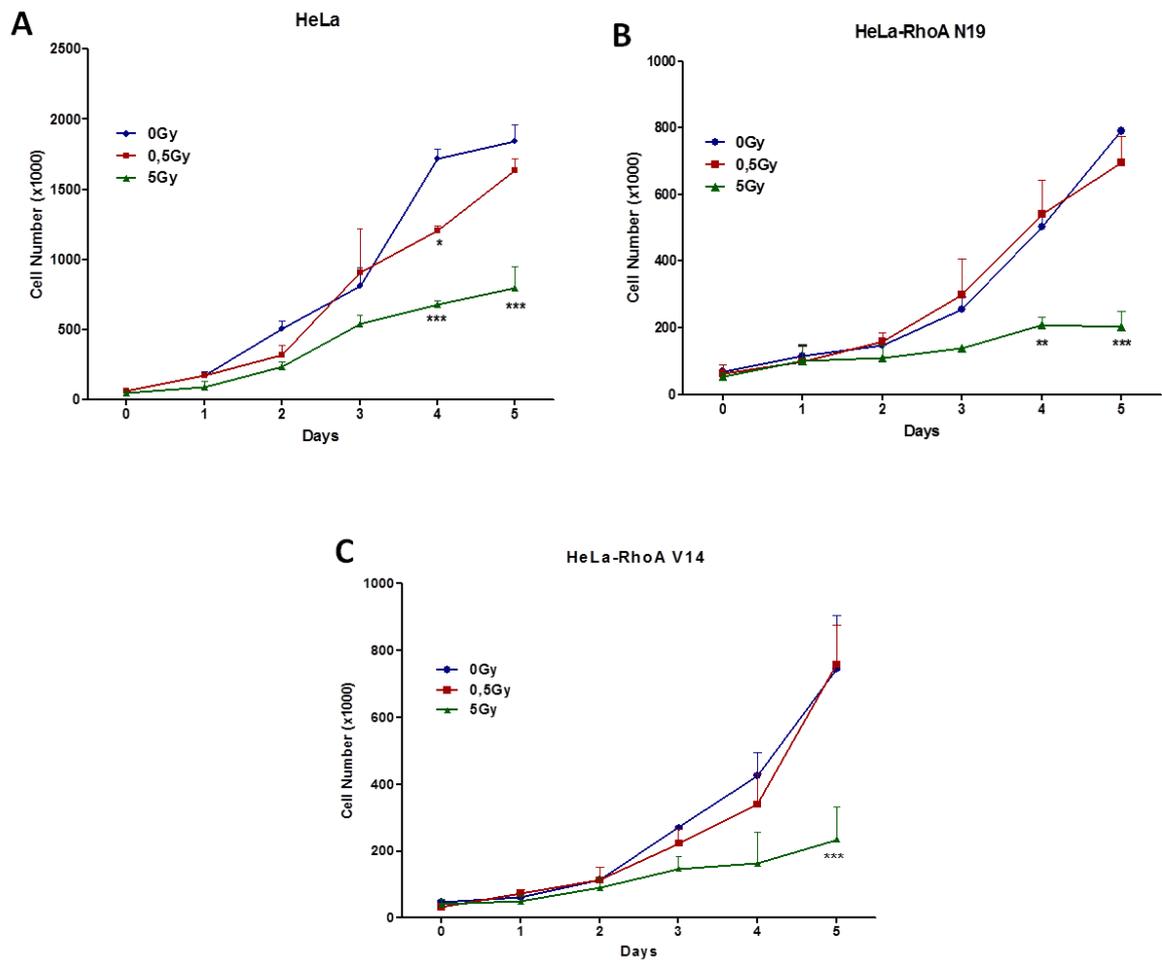
A linhagem HeLa apresentou maior proliferação celular, com tempo de dobramento de aproximadamente 0,8 dia das células sem tratamento. A exposição a dose de 0,5 Gy não afetou significativamente na proliferação celular em relação ao controle HeLa não irradiado, com tempo de dobramento médio de 1,0 dia. No entanto, quando as células foram e expostas a 5 Gy houve menor crescimento celular, com aumento do tempo de dobramento para 1,3 dia (Figura 14A).

O mutante RhoA N19 1G de modo geral apresentou menor proliferação em comparação a HeLa e o mutante constitutivamente ativo, com tempo de dobramento de 1,5 dia. De maneira semelhante a HeLa, RhoA N19 quando submetida a 0,5 Gy não demonstrou diferenças significativas na proliferação, foi bem próximo ao controle não irradiado. Contudo, RhoA N19 1G possui maior sensibilidade quando submetida a dose de 5 Gy, uma vez que ao longo da curva de crescimento observamos pouca variação no número de células ao decorrer dos dias, o tempo de dobramento celular foi significativamente maior aumentando para 2,7 dias. Podemos observar melhor essa redução no crescimento celular observando a curva obtida com maior número de coletas, nessa curva as células foram coletadas até 8 dias após ao tratamento com radiação gama (Figuras 14B e 14E).

Já o clone mutante RhoA V14 4G também apresentou uma redução na proliferação celular em comparação a HeLa parental, o tempo de dobramento foi de

1,2 dia. Quando as células foram submetidas a 5 Gy observamos redução na proliferação celular, o tempo de dobramento aumentou para 2,2 dias. No entanto, o mutante RhoA V14 4G prolifera mais que o mutante dominante negativo RhoA, como podemos observar melhor na curva de crescimento com as células coletadas até o oitavo dia após ao tratamento com radiação gama (Figuras 14C e 14F).

Dessa forma, as sublinhagens clonais mutantes para RhoA e a célula parental HeLa apresentam menor sensibilidade a baixa dose de radiação gama 0,5 Gy e apresentam maior sensibilidade as doses maiores como a de 5 Gy, pois há menor proliferação celular quando submetidas a essa dose de radiação. Ambas sublinhagens clonais mutantes por sua vez, apresentaram menor proliferação celular quando comparadas a células HeLa.



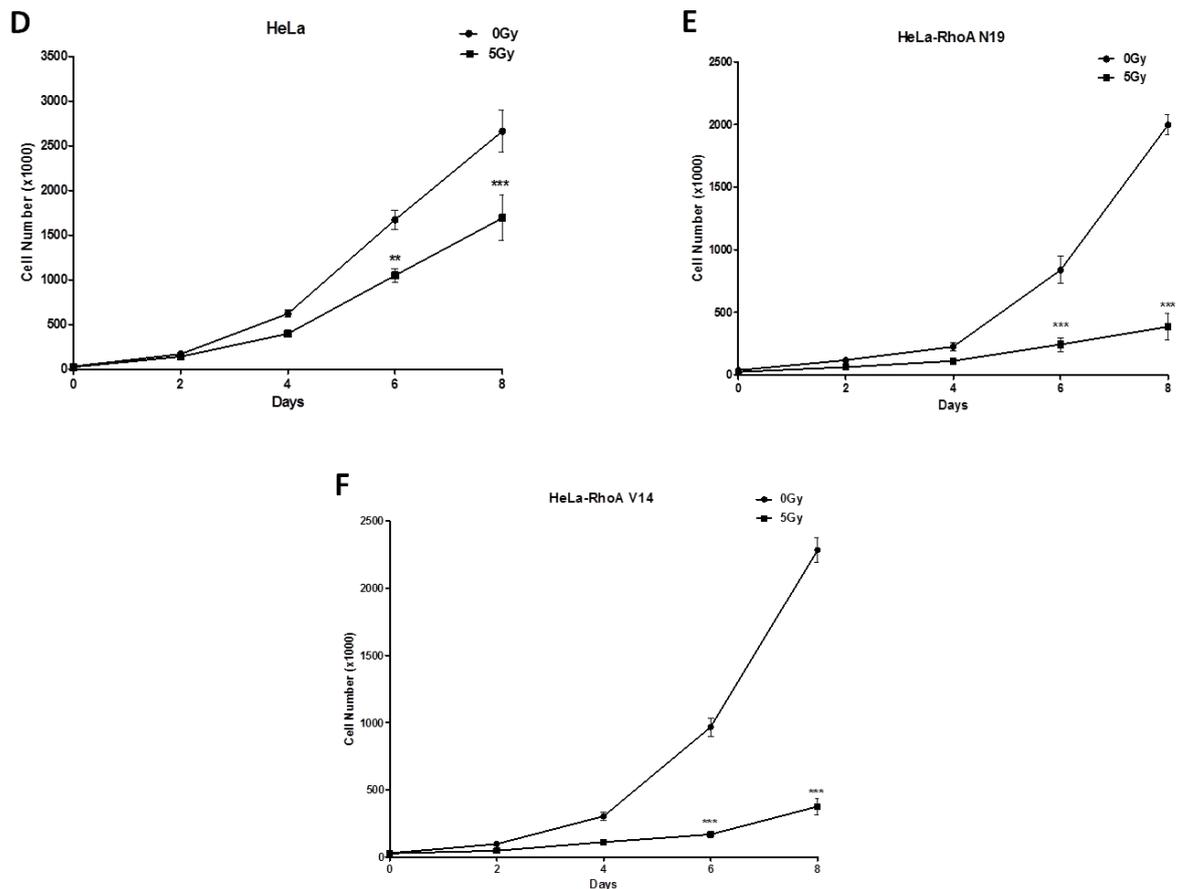


Figura 14 - Os mutantes RhoA V14 e N19 apresentaram redução na proliferação celular em relação a HeLa parental. Em placas de 35mm, 35×10^3 células foram plaqueadas 24h antes de serem expostas as doses de 0,5 e 5Gy. A e D Curva de crescimento de HeLa; B e E Curva de crescimento de HeLa-RhoA N19; C e F Curva de crescimento de HeLa-RhoA V14. Os gráficos são a representação de triplicata experimental independente. Teste estatístico two-way ANOVA * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ entre controle não tratado versus células tratadas.

A capacidade de sobrevivência celular foi analisada através do ensaio de capacidade de formação de colônias em baixa densidade celular. As células foram plaqueadas em baixa densidade (1×10^3 e 2×10^3 células) e submetidas a radiação gama nas doses de 0,5 e 5Gy.

No ensaio de formação de colônias, assim como na curva de crescimento, HeLa parental apresentou maior número de colônias em relação aos mutantes RhoA N19 1G e RhoA V14 4G, quando comparamos as células não tratadas e também quando comparamos célula tratadas com radiação gama (0,5 Gy e 5 Gy) (Figura 15A). Quando comparamos HeLa-pCM-Mock e HeLa-RhoA-WT com HeLa parental,

observamos diferenças significativas somente entre o número de colônias dos controles não tratados com radiação. Entretanto, quando expomos as células a radiação gama não observamos diferenças significativas entre estas 3 linhagens (dados em ANEXO 3).

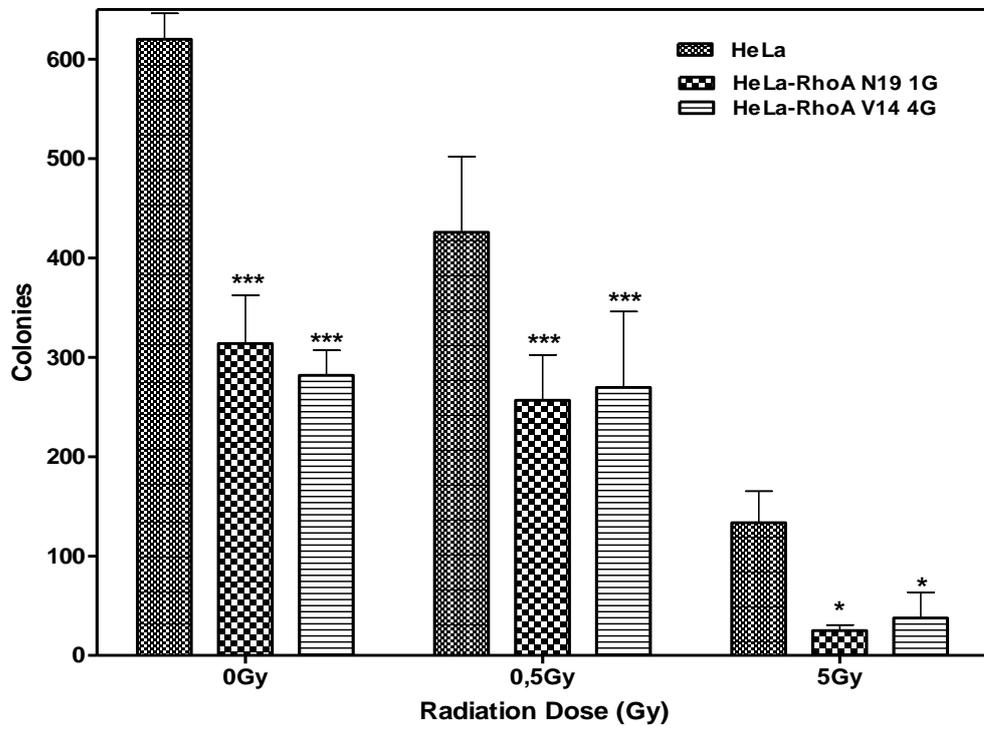
As sublinhagens clonais mutantes HeLa-RhoA V14 4G e HeLa-RhoA N19 1G não apresentaram diferenças significativas entre si, em relação ao número de colônias, nas condições testadas (Figura 15A).

Analisando os dados plotados como fração de sobrevivência, podemos observar que as linhagens testadas estão bem próximas uma da outra, não havendo diferenças significativas entre elas. O mutante dominante negativo RhoA N19 1G apresenta maior sensibilidade aos efeitos da radiação gama, porém não há diferença estatisticamente significativa entre RhoA V14 4G. A sublinhagem constitutivamente ativa RhoA V14 4G possui maior taxa de sobrevivência em relação a HeLa parental e o mutante N19 1G na dose mais baixa de radiação gama (0,5 Gy), enquanto que na maior dose de radiação (5 Gy) torna-se mais sensível somente em relação a linhagem parental HeLa (Figura 15C).

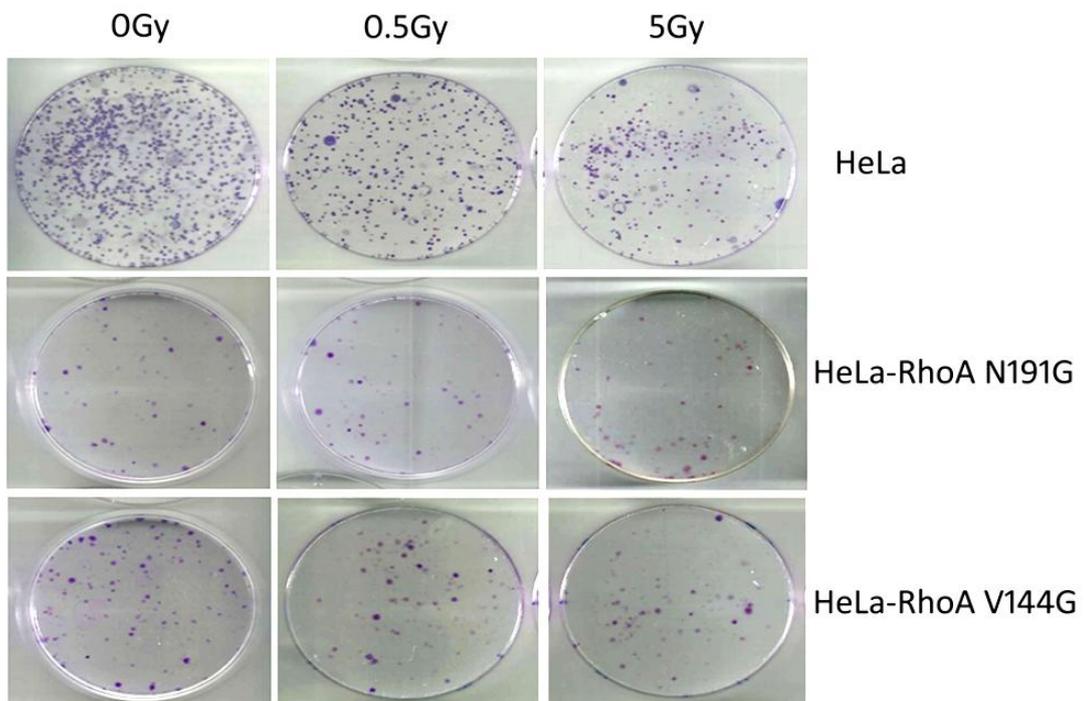
As sublinhagens HeLa-RhoA-WT e HeLa-pCM-Mock apresentaram taxas fração de sobrevivência semelhantes. No entanto a sublinhagem HeLa-RhoA-WT mostra-se com fração de sobrevivência sensivelmente maior em relação as outras linhagens quando exposta a 0,5Gy, ao passo que na dose de 5 Gy a fração reduz a valores abaixo aos de HeLa parental, um comportamento semelhante ao clone RhoA-V14. HeLa-pCM-Mock ocupa posição intermediária entre HeLa parental e HeLa-RhoA-WT na menor dose de radiação, enquanto que na dose de 5Gy a taxa de sobrevivência fica extremamente semelhante a da sublinhagem HeLa-RhoA-WT, ambos abaixo da sobrevivência apresentada pela HeLa (dados em ANEXO 3).

Ambos ensaios, de curva de crescimento e de formação de colônia, indicam que todas as linhagens celulares testadas são sensíveis a altas doses de radiação gama (5 Gy ou maior, dados não mostrados) e que os clones dominante negativo e constitutivamente ativo, possuem no geral uma menor capacidade de proliferação em relação a linhagem celular parental. Aparentemente a falta ou deficiência de RhoA torna a célula HeLa mais sensível aos efeitos gerados pela radiação gama, pois o clone dominante negativo mostrou-se sistematicamente mais sensível a radiação, proliferando menos quando exposto a dose de 5Gy. A sublinhagem clonal RhoA V14, além de exibir altos níveis endógenos de RhoA já apresentados pela célula HeLa, também torna a célula sensível aos efeitos da radiação gama.

A



B



C

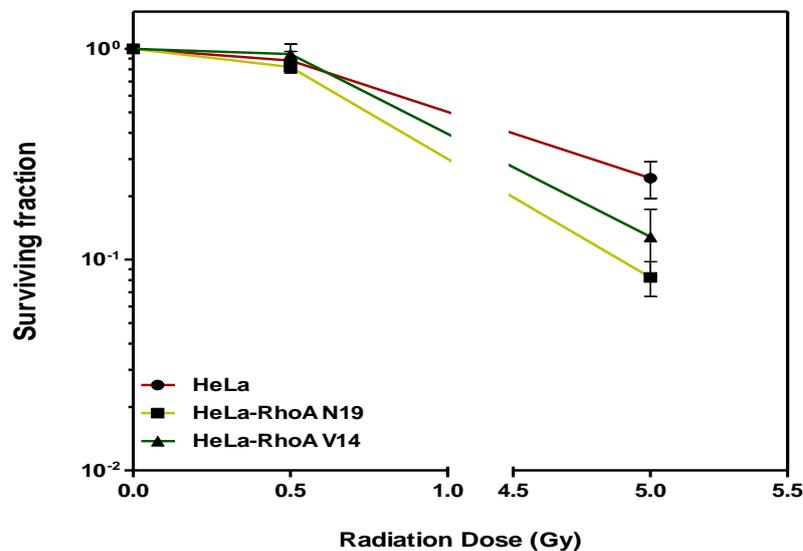


Figura 15 – Os clones HeLa-RhoA N19 1G e HeLa-RhoA V14 4G são mais sensíveis aos efeitos da radiação gama em relação a linhagem HeLa parental. Foram plaqueadas 2000 células em placas de 60 mm de diâmetro, 24h antes de serem expostas a radiação nas doses de 0,5 Gy e 5 Gy. Após 10-12 dias em cultura as células foram fixadas com formaldeído 10% em PBS, coradas com cristal violeta 0,5% e contadas manualmente. Os resultados são a média +/- SEM de três experimentos independentes. Foi utilizado para análise estatística ANOVA * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ entre os clones versus HeLa parental.

4.1.5 O clone mutante deficiente em RhoA, HeLa-RhoA N19 1G, apresenta acúmulo de células na fase G1 do ciclo celular em resposta aos efeitos da radiação gama

A proteína RhoA GTPase está relacionada com a progressão no ciclo celular, modulando a negativamente os níveis de p27 que é um inibidor de CDK, RhoA é importante para degradação de p27 e regulando a expressão da ciclina D1 através da via RhoA-ROCK-LIMK (Heng and Koh, 2010; Morin et al., 2009; Villalonga and Ridley, 2006). Dessa forma decidimos investigar o comportamento do ciclo celular dos clones mutantes frente a exposição a radiação gama. Células em crescimento exponencial foram expostas a 5 Gy ou 15 Gy, retornadas para a incubadora e coletadas após 6, 12 (não mostradas) e 24h. A análise do ciclo celular foi realizada

utilizando incorporação de iodeto de propídeo, substância fluorescente intercalante ao DNA que permite analisar a população de células ao longo das fases do ciclo celular, utilizando citometria de fluxo.

Podemos observar que o mutante dominante negativo HeLa-RhoA N19 1G apresentou um acúmulo mais evidente de células na fase G1 do ciclo celular, quando exposto a dose maior de 15 Gy de radiação gama e, conseqüentemente, uma redução do número de células em G2/M. Essas variações não são evidentemente observadas quando as células foram expostas a menor dose de 5 Gy (Figura 16).

Na literatura há informações indicando que células quando submetidas a um radiomimético (toxina bacteriana CDT), leva a parada no ciclo celular na fase G2 os autores correlacionam essa parada no ciclo celular com a ativação de RhoA, pois em outros trabalhos utilizando essa mesma toxina CDT, observou-se ativação de RhoA (Frisan et al., 2003; Guerra et al., 2008)

Esses dados são semelhantes aos obtidos por Yan e colaboradores (2012), que observaram em células de câncer de mama MCF-7 a inibição da ativação de Rac1 GTP, que é uma pequena GTPase da mesma família de RhoA GTPase, na presença de radiação gama leva a uma atenuação da parada do ciclo celular na fase G2/M e atenuando também a ativação das proteínas de checkpoint (Yan et al., 2012).

Já o mutante constitutivamente ativo HeLa-RhoA V14 4G apresentou o perfil do ciclo celular, bem semelhante ao da HeLa parental, em ambos tratamentos com radiação gama (Figura 16). Essa semelhança nos indica que a regulação normal do ciclo celular de células HeLa expostas a radiação gama se deve aos altos níveis de RhoA ativo.

Analisando os resultados de proliferação celular (Figura 14), podemos fazer uma correlação desses dados com os obtidos da análise do ciclo celular, onde o clone RhoA N19 apresenta menor proliferação celular e com aumento do tempo de dobramento celular, em relação de RhoA V14 4G e HeLa. Essa redução da proliferação celular provavelmente se deve ao acúmulo de células observado na fase G1 do ciclo celular, onde essas células permanecem mais tempo aumentando o tempo de dobramento celular.

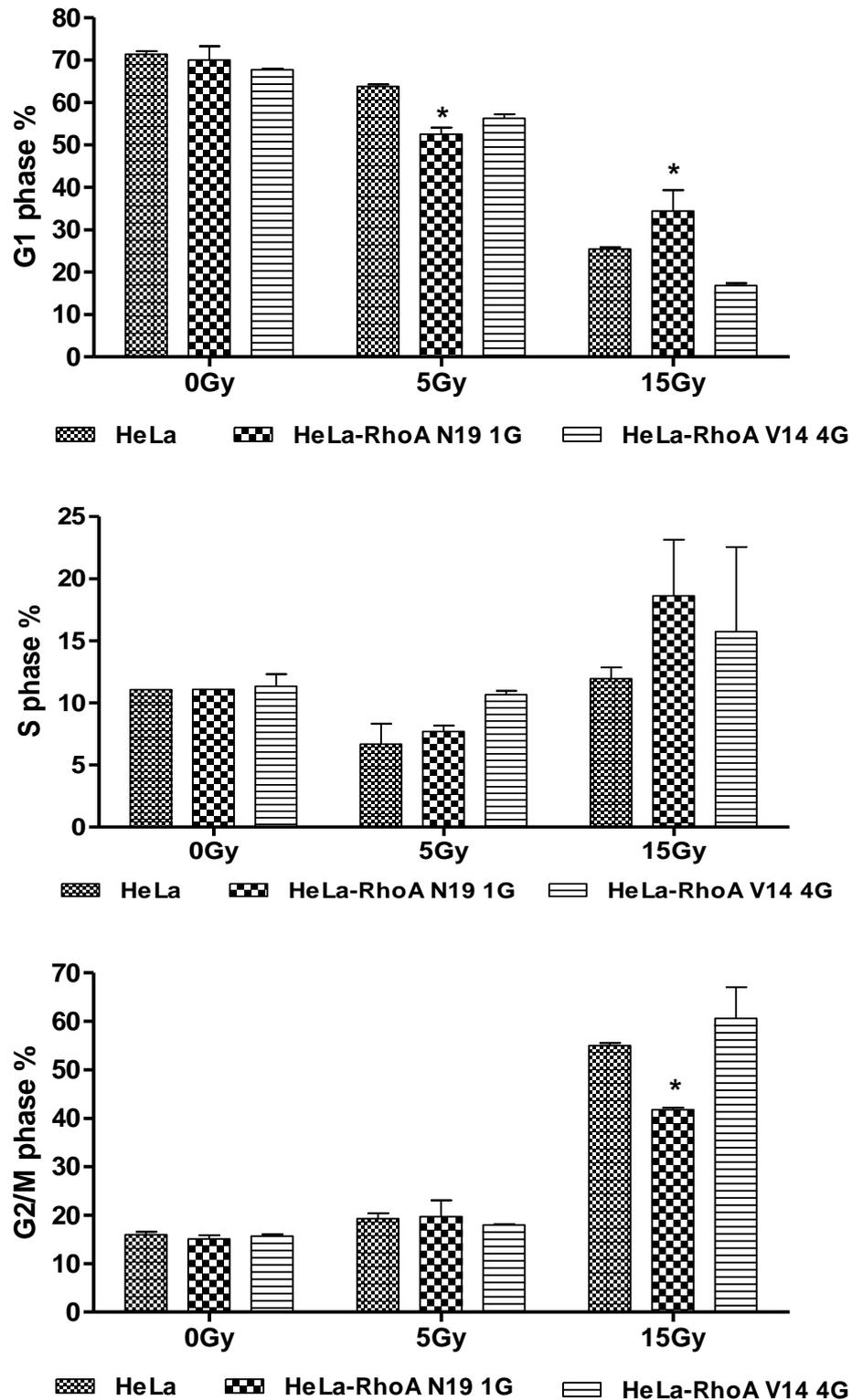


Figura 16 – O clone mutante HeLa-RhoA N19 1G apresenta maior acúmulo de células na fase G1 do ciclo celular, quando exposto a radiação gama. As células foram expostas a 5Gy e 15Gy, e analisadas após 24h do tratamento. Os gráficos representam a porcentagem do número de eventos (células), em cada fase do ciclo celular, foram analisados 30.000 eventos em triplicata experimental. A quantificação dos eventos foi realizada pelo software Kaluza 1.3 (Beckman Coulter). Análise estatística utilizada foi ANOVA * P<0,05 HeLa parental versus mutantes.

4.1.6 Avaliação da Senescência celular por associação com atividade de B-Galactosidase.

Células senescentes possuem atividade de β -galactosidase aumentada, essa característica é a mais utilizada e aceita como marcador de células senescentes, sendo conhecida como senescência associada a atividade de β -galactosidase (SA- β -gal) (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Dimri et al., 1995).

Estudos anteriores demonstram que RhoA está envolvida no processo de senescência ativada por FGF2 em células de camundongo Y1 e 3T3-B61 (Costa et al, 2008; Vávrová & Rezácová, 2010). A literatura cita que células expostas a agentes genotóxicos induzem a senescência, é a chamada senescência induzida por stress. Dessa forma, para determinar se há envolvimento de RhoA no processo de senescência em resposta a quebra dupla do DNA, as linhagens celulares foram expostas a diferentes doses de radiação (0,5, 5 e 15 Gy).

Testes foram realizados para determinar o melhor tempo para detecção das células senescentes. As células foram retiradas da incubação 48, 72 e 96 hr (dados não mostrados) após exposição a radiação gama e coradas com solução de coloração para senescência. Foi observado que a coloração fica mais evidente 96 hr após a radiação, dessa forma os ensaios subsequentes foram corados 96 hr após a radiação.

Os experimentos demonstraram, que não há diferença na entrada em senescência das células HeLa e os clones mutantes RhoA N19 e RhoA V14, nas diferentes doses de radiação gama utilizadas. No entanto, observamos uma ligeira maior sensibilidade da sublinhagem mutante RhoA N19, nas menores doses de radiação gama, porem essa diferença não é estatisticamente significativa (0,5 e 5 Gy) (Figura 17).

Dessa forma, podemos inferir que em células HeLa a RhoA GTPase aparentemente não está envolvida na indução da senescência celular em resposta ao efeitos da exposição das células a diferentes doses da radiação gama.

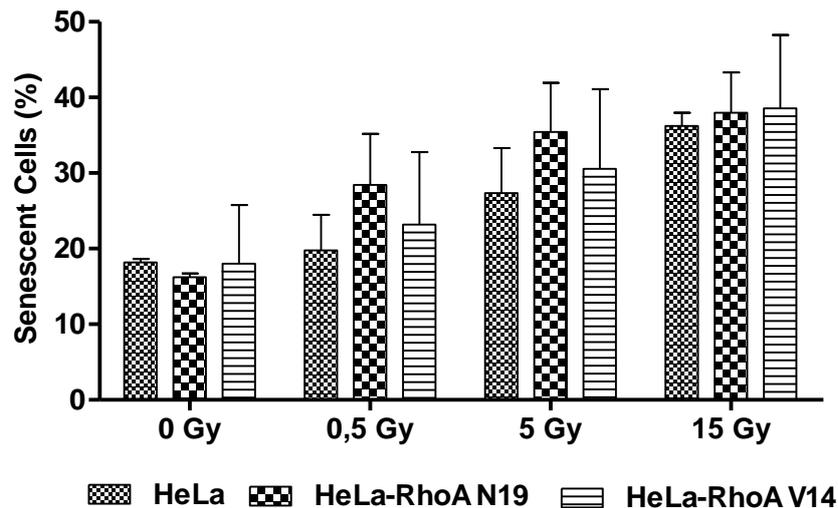


Figura 17 – Não há diferença entre os clones na entrada da senescência celular. As células foram plaqueadas em placas de 35mm, 24h antes de serem expostas as doses radiação, 0,5, 5 e 15 Gy. Após o tratamento as placas foram reincubadas por 96h e então coradas com solução de coloração contendo X-gal, por no máximo 18h. As análises foram feitas em microscópio invertido contando células senescentes (azul) em um total de pelo menos 1000 células. Os dados são a média +/- SEM de quatro experimentos individuais.

4.1.7 Mutantes deficientes e proficientes de RhoA GTPase não alteram substancialmente sua morte por apoptose após radiação gama

A radiação gama conhecidamente induz morte celular por apoptose (também chamada de morte celular programada). O evento de sinalização para ativação da apoptose segue a ativação de caspases, extravasamento de citocromo c da mitocôndria, externalização da fosfatidilserina da bicamada lipídica, clivagem da proteína PARP e fragmentação internucleossômica do DNA genômico (Elmore, 2007; Mirzaie-Joniani et al., 2002).

Para analisar morte celular por apoptose em nossas linhagens celulares, e identificar alguma contribuição positiva ou negativa de RhoA neste processo, utilizamos marcação celular dupla com anexina-V (anticorpo que reconhece a fosfatidilserina externalizada) e iodeto de propídeo (que se conjuga ao DNA, quando a membrana está desestabilizada permitindo sua entrada na célula), e análises de fluorescência emitida por células individuais no citômetro de fluxo. As células foram irradiadas com gama nas doses de 5 e 15 Gy e mantidas incubadas por 48 h (ou 72h) (Figura 18).

Para os ensaios utilizamos radiação ultravioleta – UVC, como controle positivo, já que dados presentes na literatura indicam que UVC induz apoptose e em nosso sistema experimental houve grande indução de apoptose nas três linhagens celulares testadas (Batista et al., 2009). Primeiramente observamos que a radiação gama induz apoptose nas linhagens testadas e a indução é dose dependente, pois observamos mais células apoptóticas quando submetidas a dose de 15 Gy (Figura 18). Em ambas as doses de radiação gama (5 e 15 Gy), não há diferença significativa entre os mutantes RhoA N19 e V14, nem entre os mutantes e HeLa parental. Podemos observar que na maior dose de radiação gama (15 Gy) o clone RhoA N19 apresentou maior porcentagem de células mortas, em relação a HeLa parental e RhoA V14, no entanto essa diferença não é estatisticamente significativa (Figura 18).

Dessa forma podemos inferir que em HeLa a mutação em RhoA, quando as células são expostas a radiação gama, não altera significativamente a modulação da morte celular, uma vez que a sublinhagem RhoA N19 apresentou uma pequena alteração na morte e a HeLa e RhoA V14 apresentaram valores de morte bem similares.

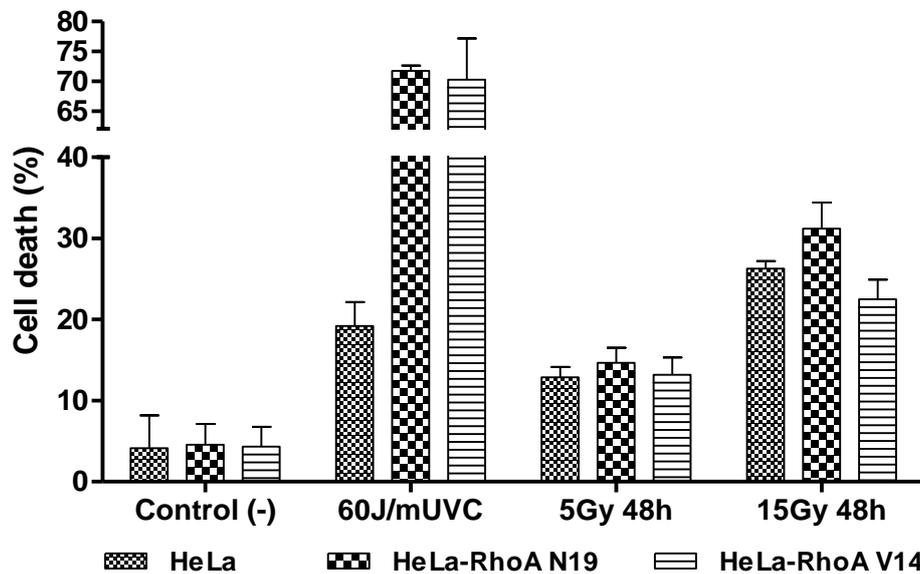


Figura 18 – A mutação em RhoA em células HeLa não altera significativamente a indução de morte celular por apoptose. As células foram plaqueadas 24 h antes do tratamento com radiação gama 5 ou 15 Gy e com 60 J/m² UVC (controle positivo). Após 48 h do tratamento as células foram coletadas, processadas e analisadas por citometria de fluxo no citômetro BD FACSVersé (BD Biosciences). Os dados foram analisados no Software Kaluza 1.3 (Beckman Coulter). Os dados são a média +/- SEM de três experimentos individuais.

4.1.8 A GTPase RhoA é importante para o início rápido do reparo de danos no DNA.

De acordo com os resultados de proliferação e morte celular obtidos, principalmente, por estarmos procurando por respostas celulares após o estresse promovido pela radiação ionizante gama, realizamos experimentos para tentar determinar um possível envolvimento de RhoA no reparo do DNA. Para isso realizamos o ensaio cometa (alcalino e neutro), o qual é muito utilizado para medir os níveis dano (quebras simples e duplas) e reparo no DNA de células de maneira individual, sendo que os danos podem ser induzidos pelos mais diversos tipos de fatores. É um ensaio relativamente fácil, onde o nucleóide (DNA nuclear livre de histonas e de membrana celular e nuclear), imerso numa matriz de agarose ao ser

submetido a uma corrente elétrica faz com que o DNA fragmentado migre formando uma cauda que lembra a de um cometa (Azqueta and Collins, 2013; Collins, 2004).

O cometa alcalino é uma variante do ensaio cometa, onde a corrida eletroforética é feita sob condições fortemente alcalinas. É uma técnica amplamente utilizada para observar quebras de fita dupla e simples no DNA. Já o cometa neutro a corrida eletroforética é feita em condições neutras e o ensaio detecta com mais especificidade quebras de fita dupla do DNA (Collins, 2004).

Com o ensaio cometa pudemos investigar os níveis de dano e a cinética de reparo ou redução dos mesmos no DNA nas diferentes linhagens estudadas. A medida da cinética do reparo dos danos no DNA se dá pela redução do parâmetro Olive Tail Moment (OTM), que é uma relação da quantidade de DNA presente na cauda e do tamanho da cauda do cometa em função do tempo (Calini et al., 2002). Assim, as diferentes linhagens de células foram expostas a 5 Gy de radiação gama e após o tratamento as células foram coletadas em diferentes tempos (controle = 0h, 0,5h; 1h; 2h; e 6h) e processadas. Na linhagem HeLa parental não pudemos observar a redução total do DNA fragmentado (até os níveis do controle) com o passar do tempo (até 6h) após a radiação gama, tanto no cometa neutro como no cometa alcalino, indicando que provavelmente o reparo destes danos de quebras na célula parental HeLa é mais lento e/ou ineficiente em comparação com os clones mutantes de RhoA. Nestes últimos é possível observar uma redução da cauda à níveis próximos ao do controle não irradiado (0h) no tempo de seis horas após o tratamento com radiação. O pico de maior nível de fragmentação do DNA variou de 0,5h a 1h, tanto no cometa alcalino como no neutro, e em ambos os ensaios a linhagem HeLa apresentou maiores níveis de fragmentação comparada com as sublinhagens clonais de RhoA (Figura 19).

O clone RhoA-N19 1G apresentou um atraso no início da recuperação dos danos do material genético, em relação ao mutante V14 4G e em relação a células HeLa, com início somente após 2h da irradiação, tanto para o cometa alcalino assim como para o neutro. Esse resultado sugere que RhoA pode ter um papel primordial para o início do reparo do DNA. Apesar do clone dominante negativo (HeLa-RhoA N19), apresentar do atraso no início do reparo, aparentemente a maquinaria de reparo dessa célula é eficaz em reparar o dano nas próximas horas até valores muito próximos dos níveis basais (Figura 19).

O mutante RhoA-V14 4G de maneira geral apresentou menores níveis de fragmentação no DNA, tanto na situação controle assim como após os tratamentos com radiação gama, nas duas variantes do ensaio cometa. Uma justificativa para os menores níveis de fragmentação do DNA já em 0,5h após o tratamento pode ser que o clone tenha iniciado a recuperação da fragmentação do DNA já em 0,5h após o dano, antes mesmo que o mutante deficiente RhoA-N19 e HeLa. Dessa forma os experimentos de cometa alcalino e neutro utilizando o clone V14 4G reforçam que RhoA tem um provável e necessário papel modulador positivo do início rápido de mecanismos de reparo de quebras no DNA (Figura 19).

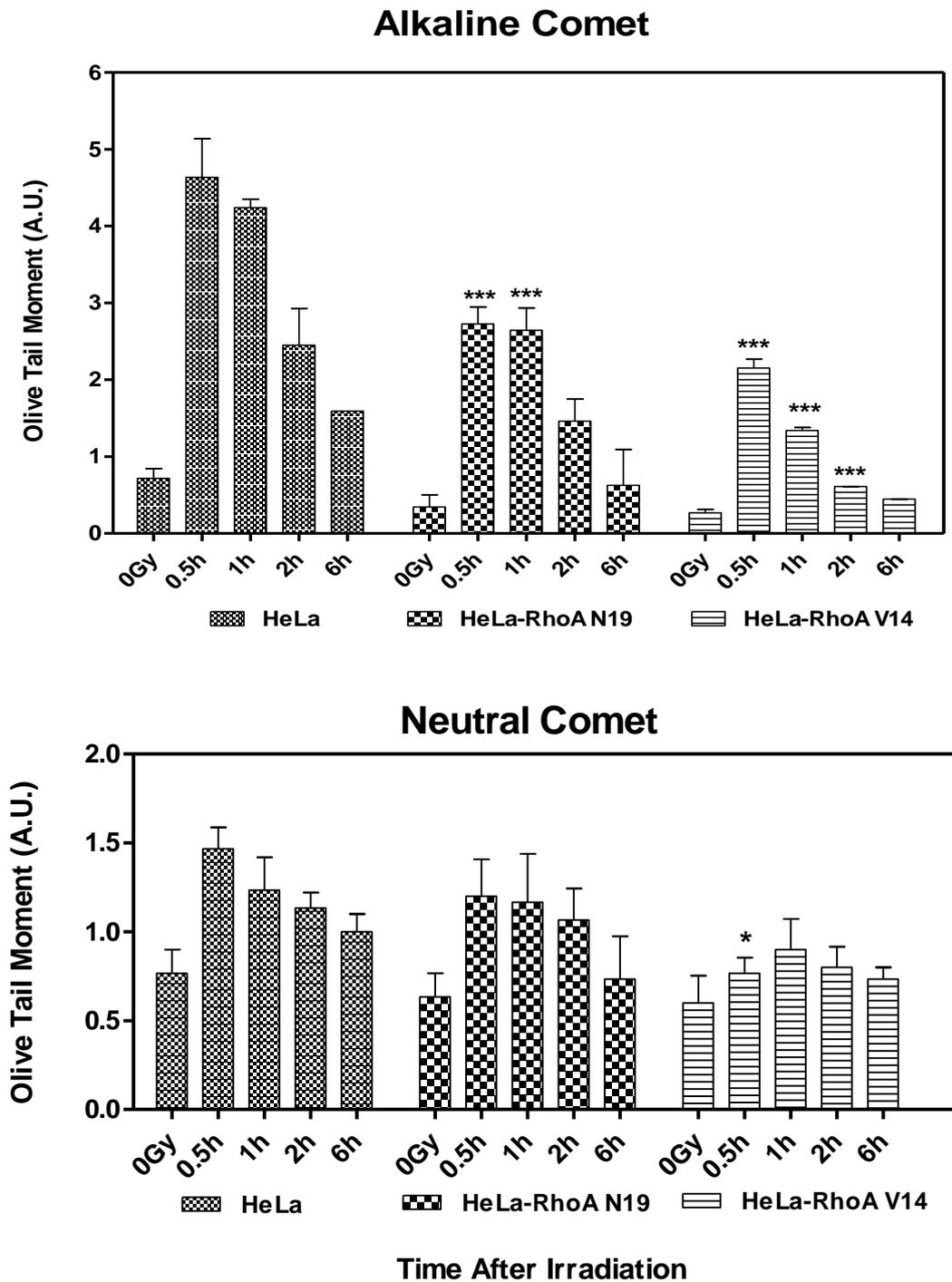


Figura 19 – A proteína RhoA GTPase é importante para o início rápido do reparo do DNA. As células foram expostas a dose de 5Gy de radiação gama. Após a radiação as células foram coletadas em diferentes tempos (0; 0,5; 1; 2 e 6h). Os cometas foram analisados utilizando o software Komet 6.0 (Andor). Os gráficos são a representação de triplicata experimental independente. Teste estatístico ANOVA * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ entre HeLa parental versus mutantes.

4.1.9 A inibição direta da ativação da RhoA GTPase endógena pela exoenzima C3 proporciona perfil semelhante ao do clone dominante negativo (HeLa-RhoA N19)

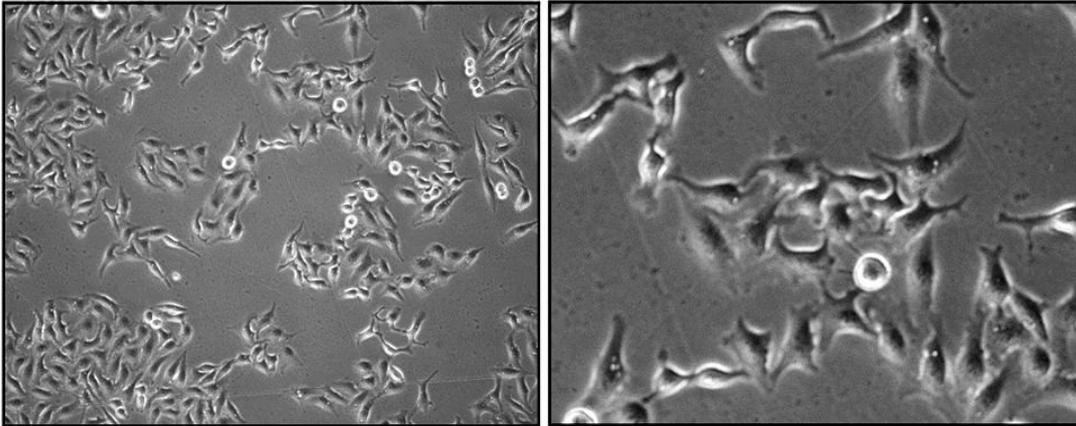
A exoenzima C3 é uma proteína secretada pela bactéria *Clostridium botulinum* e possui capacidade de inativar seletivamente as GTPases RhoA, RhoB e RhoC. Essa toxina tem sido extensivamente utilizada como agente inibidor nos mais diversos trabalhos envolvendo Rho (A, B e C) GTPases, pois Rac1 e Cdc42 não são substratos dessa enzima (Aktories et al., 2004; Rohrbeck et al., 2012; Sahai and Olson, 2006). Dessa forma para auxiliar na determinação do envolvimento de RhoA na resposta aos danos no DNA induzidos por radiação gama, utilizamos a enzima C3 para inibir a atividade de RhoA em células HeLa.

A exoenzima C3 catalisa a transferência da ADP-ribose do NAD para o resíduo de asparagina da posição 41 da Rho GTPase, que está localizado próximo a região do switch-1, o qual muda de conformação quando a proteína está ativada transmitindo o sinal para as proteínas efetoras. A ADP ribosilação do resíduo 41 da asparagina impede que ocorra essa mudança conformacional (Aktories et al., 2004). A inibição de RhoA pela toxina C3 pode ser facilmente detectada pela alteração morfológica da células, uma vez que RhoA está envolvida diretamente com a reorganização do citoesqueleto e formação de fibras de stress (Aktories et al., 2004).

Inicialmente foram transfectadas duas concentrações de plasmídeo contendo a sequência de DNA que codifica para exoenzima C3 (7 ug e 14 ug), nas células HeLa, plaqueadas em placas p35, e acompanhamos ao longo do tempo a alteração morfológica das células. Após 24h da transfecção já pudemos observar que a concentração de 14 ug de plasmídeo leva à alteração na morfologia celular; as células apresentaram aspecto dendrítico característico da perda da formação de

fibras de stress e, com o passar do tempo 48 e 72 h após a transfecção, notamos um aumento significativo de células com formato arredondadas, se soltando do fundo da placa e com aspecto semelhante de morte celular (Figura 20). Este dado é consistente com vários outros encontrados na literatura onde, por exemplo, células de fibroblasto de camundongo (NIH 3T3) e células neuronais de camundongo (HT22) ao serem incubadas com toxina C3 apresentaram aspecto dendrítico semelhante, resultante da forte e específica inativação de RhoA GTPase (Rohrbeck et al., 2012; Sahai and Olson, 2006). Realizamos também, em nossos experimentos, o ensaio de pull-down par avaliar a atividade de RhoA e pudemos comprovar que a atividade de RhoA está sendo fortemente inibida pela toxina C3 (Figura 20). Dessa forma, podemos inferir que a transfecção de células HeLa com o plasmídeo contendo a toxina C3 leva a uma alteração drástica na morfologia celular e esse efeito pode ser correlacionado com a inibição da atividade de RhoA.

HeLa



HeLa+C3

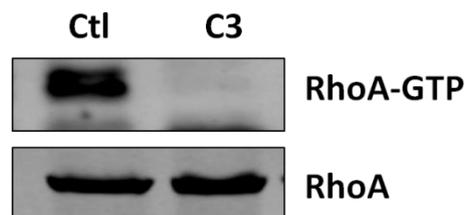
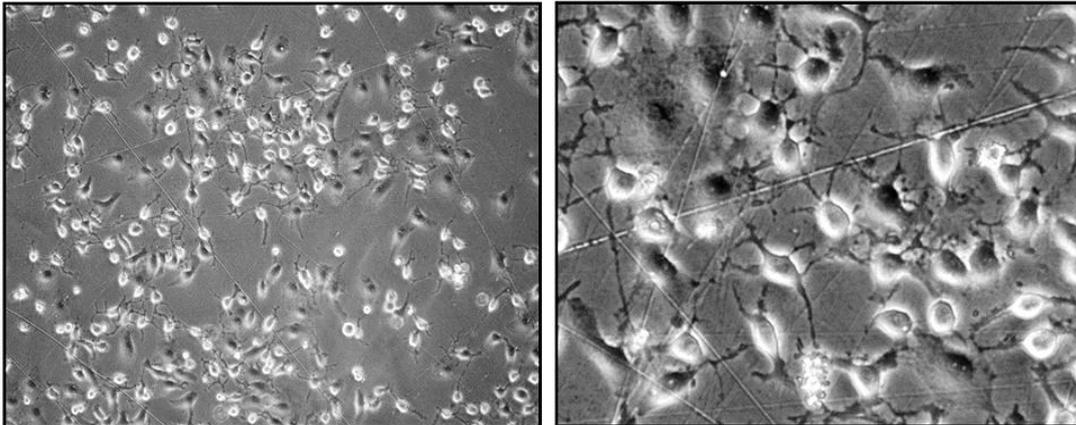


Figura 20 - Alteração da morfologia celular e inibição da ativação de RhoA pela toxina C3. As Células HeLa foram plaqueadas em placas p35 e após 24 h foram transfectadas com 14 ug de plasmídeo contendo a sequência que codifica para C3. As células foram analisadas e fotografadas em microscópio invertido (Olympus) no aumento de 200X, as fotos foram tiradas 24 h após a transfecção. O ensaio de atividade de RhoA foi realizado 24h após a transfecção com o plasmídeo. Os níveis de RhoA-GTP foram determinados por imunoblot utilizando anticorpo anti-RhoA (Santa Cruz). As imagens são representativas de três experimentos independentes

Para tentarmos confirmar os resultados anteriores de que a modulação da atividade de RhoA, usando clones mutantes dominante negativos RhoA-N19, interfere no reparo do DNA, realizamos o ensaio cometa alcalino utilizando a C3 exoenzima como inibidor da atividade de RhoA. Com este ensaio pudemos determinar os níveis de dano, basais e a cinética de reparo do DNA fragmentado. As células HeLa ou HeLa transfectada com o plasmídeo contendo a sequência para toxina C3, foram expostas a 5Gy de radiação gama e mantidas sob incubação a 37 °C até o momento da coleta e processamento das células (Figura 21).

Observamos que com a inibição de RhoA pela toxina C3, a cinética de aumento e redução dos níveis de dano no DNA seguiram uma tendência semelhante a observada com o clone mutante HeLa-RhoA-N19. O pico de dano foi detectado em 0,5 h e o início da recuperação ocorreu em 1 h nas células HeLa e em 2 h nas células com a atividade de RhoA inibida pela toxina C3. É importante destacar que a inibição da ativação da RhoA leva a um maior atraso na recuperação do dano, uma vez que após 6h do tratamento com radiação gama, os níveis de DNA fragmentado ainda permaneceram altos em comparação com a HeLa controle (Figura 21).

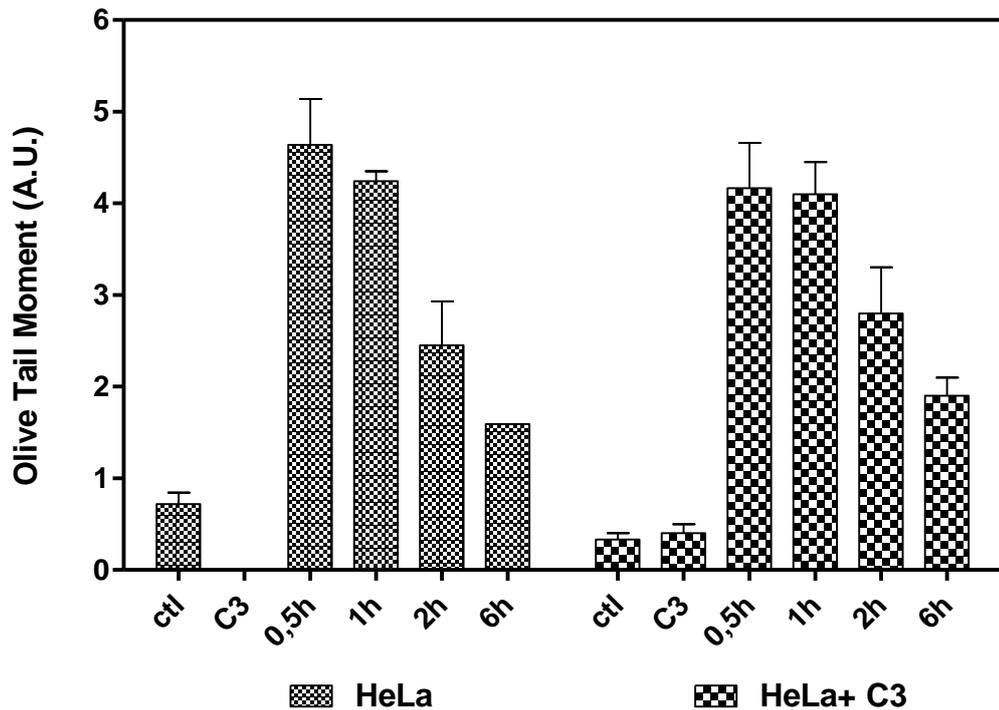


Figura 21 – A inibição da ativação de RhoA pela toxina C3 em célula HeLa, altera a cinética de reparo do DNA. As células foram transfectadas com o plasmídeo 24h antes da exposição a dose de 5Gy de radiação gama. Após a radiação as células foram coletadas em diferentes tempos (0; 0,5; 1; 2 e 6h). Os cometas foram analisados utilizando o software Komet 6.0 (Andor). Os gráficos são a representação de triplicata experimental independente.

4.1.10 RhoA GTPase é requerida para o reparo do DNA por Recombinação Homóloga (HR: Homologous Recombination) e Não-homóloga (NHEJ: Non-homologous end joining)

A radiação gama induz principalmente a formação de quebras de fita dupla no DNA, as quais podem ser reparadas por duas vias de reparo distintas, por recombinação homóloga (HR) ou por recombinação não-homóloga de extremidades (NHEJ) (Jeggo et al., 2011). De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de cometa, onde pudemos identificar uma possível e importante participação de RhoA em mecanismos gerais de reparo do DNA lesado pela radiação gama, partimos aqui para investigar o possível envolvimento de RhoA nestas duas vias específicas de reparo de quebras de fita dupla. Utilizamos para isso, ensaios específicos para as

vias de reparo HR e NHEJ, baseados na geração de sublinhagens estáveis de células HeLa expressando exogenamente um gene reporter de GFP contendo um ou dois sítios de restrição para enzima de corte raro I-SceI. Esta última digere o seu sítio de restrição levando a formação de uma quebra de fita dupla no DNA, lesão esta que leva a ativação das maquinarias endógenas de reparo do DNA da célula, mais especificamente de HR e NHEJ (Bennardo et al., 2009; Gunn and Stark, 2012).

Para o ensaio de reparo de HR, foi utilizada a sublinhagem HeLa-DR-GFP, a qual contém o gene reporter codificando para proteína GFP truncada por um sítio de restrição da enzima I-SceI. A lesão, quebra de fita dupla do DNA realizada pela enzima, é reparada pela maquinaria de reparo da via de HR utilizando a sequência de GFP homóloga localizada downstream, levando a expressão da proteína GFP (Figura 22). Para o ensaio de NHEJ foi utilizada a sublinhagem HeLa-EJ5-GFP, que também possui o gene repórter para a proteína GFP, mas separado da sua região promotora pela sequência que codifica o gene de resistência para o antibiótico puromicina, flanqueada por dois sítios de restrição para enzima I-Sce-I. Após a digestão do fragmento pela enzima, a sequência de resistência a puromicina é retirada e a maquinaria de reparo da via de NHEJ une a região promotora ao gene GFP levando a expressão da proteína GFP (Bennardo et al., 2009; Gunn and Stark, 2012) (Figura 22).

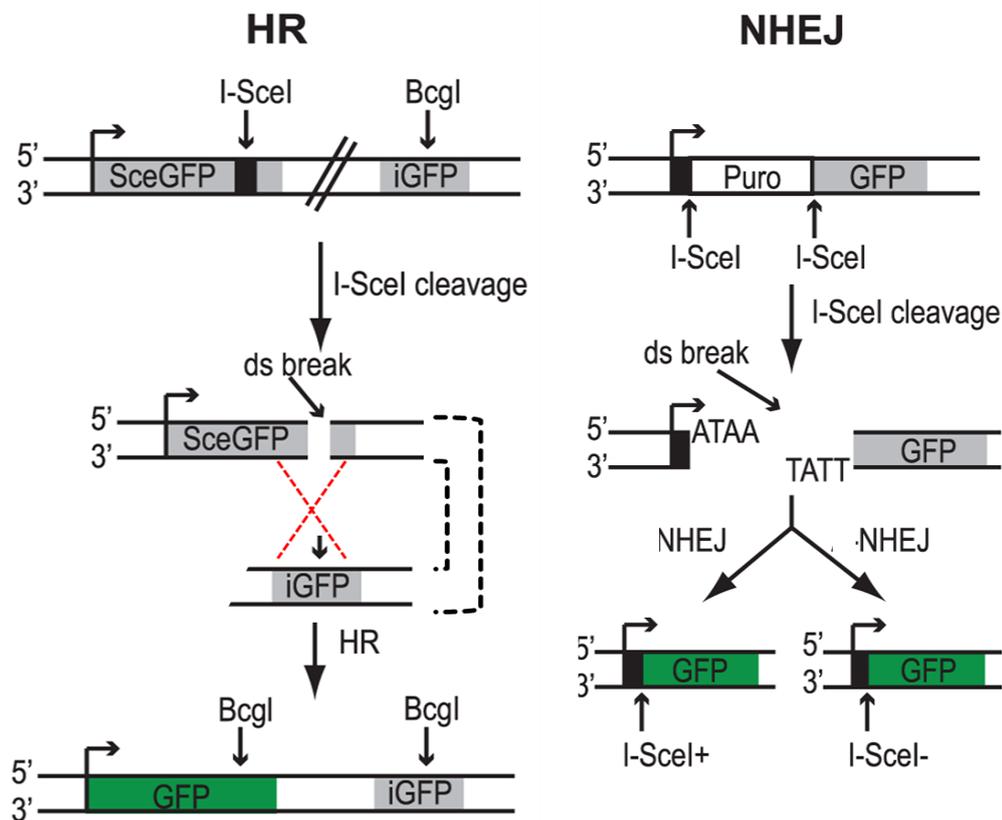


Figura 22 – Representação esquemática do ensaio de Recombinação Homóloga (HR) e Recombinação não-homóloga (NHEJ). No ensaio de HR o gene repórter para GFP, o qual é truncado pela sequência da enzima de restrição I-SceI, utiliza a sequência homóloga para reparar a sequência digerida. No ensaio de NHEJ, o gene repórter para GFP é separado de seu promotor pelo gene de puomicina o qual é flanqueado pela sequência de restrição da enzima I-SceI, após a digestão o gene de puomicina é retirado e o DNA é reparado estabelecendo o gene GFP funcional. Figura modificada de (Schumacher et al., 2012).

Várias sublinhagens clonais estáveis de HeLa-DR-GFP e HeLa-EJ5-GFP foram geradas, isoladas e congeladas para o ensaio de reparo, das quais foram selecionadas para o estudo funcional dois mutantes de DR-GFP e dois de EJ5-GFP. Essa seleção foi realizada levando em consideração a maior taxa de reparo, representada pelo aparecimento de células GFP+, quando as células foram transfectadas transientemente somente o plasmídeo contendo a enzima de restrição I-SceI. Concomitantemente, fizemos um acompanhamento por microscopia de fluorescência do aparecimento ou não de células GFP+ (Figura 23). Já 24h após da transfecção da enzima I-SceI observamos o aparecimento de células GFP+, porém

72h após foi o tempo em que a maior expressão do repórter GFP foi observado, por fim, analisamos também as células por citometria de fluxo para melhor quantificar a taxa de células GFP+.

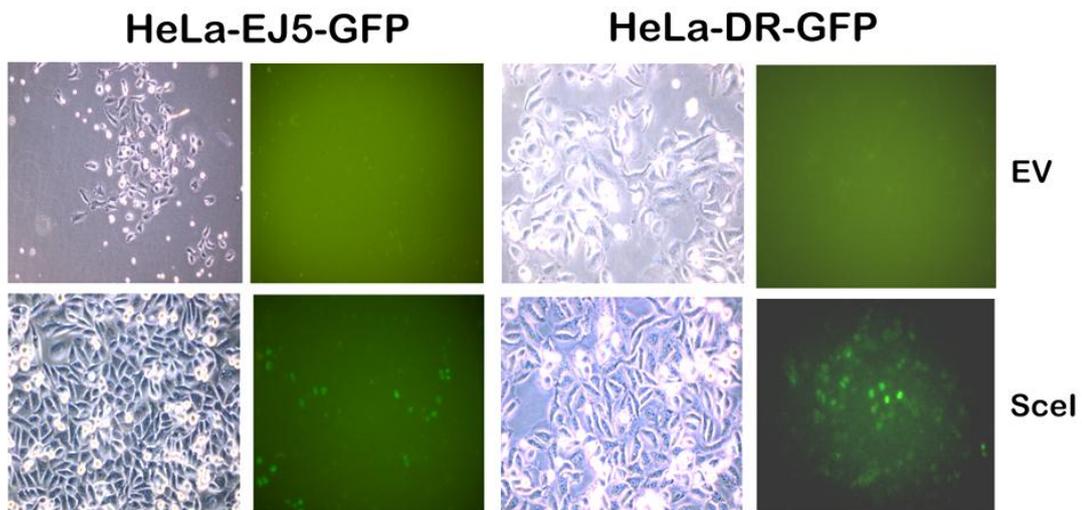


Figura 23 – Visualização das células GFP+ após reparo do DNA. As células HeLa-DR-GFP e HeLa-EJ5-GFP foram plaqueadas em placas p35 24h antes da transfecção com plasmídeo vazio (EV) ou com plasmídeo contendo a sequência para enzima de restrição I-SceI (SceI). As células foram fotografadas 72h após a transfecção, com microscópio invertido de fluorescência (Olympus), em aumento de 200X.

Após a determinação dos melhores (mais funcionais) clones de HeLa-DR-GFP e HeLa-EJ5-GFP, as células foram co-transfectadas com o plasmídeo contendo a C3 exoenzima, para inibição da atividade de RhoA, juntamente com o plasmídeo contendo a enzima de restrição I-SceI. Após 72h as células foram analisadas por citometria de fluxo para quantificação de células GFP+. Podemos observar que a inibição da ativação de RhoA reduz drasticamente a porcentagem de células GFP+, tanto para o ensaio de reparo por HR como para NHEJ. A redução das células GFP+ foi mais expressiva para o ensaio de HR, onde observamos redução de 3x nas células tratadas com o inibidor C3. No ensaio de NHEJ, a redução da porcentagem de células GFP positivas foi de 2x quando comparamos células tratadas somente

com a enzima de restrição I-SceI e células tratadas com enzima de restrição juntamente com o inibidor C3 (Figura 24).

Esses resultados indicam que a inibição da atividade endógena de RhoA, através da expressão intracelular da toxina C3, leva a uma expressiva redução do reparo do DNA exógeno, pela via de HR e NHEJ, nas sublinhagens mutantes estáveis HeLa-DR-GFP e HeLa-EJ5-GFP, respectivamente. De forma similar, sugerimos que RhoA possa estar afetando vias de reparo de DNA que são acionadas em células HeLa, após sofrerem danos pela radiação ionizante gama.

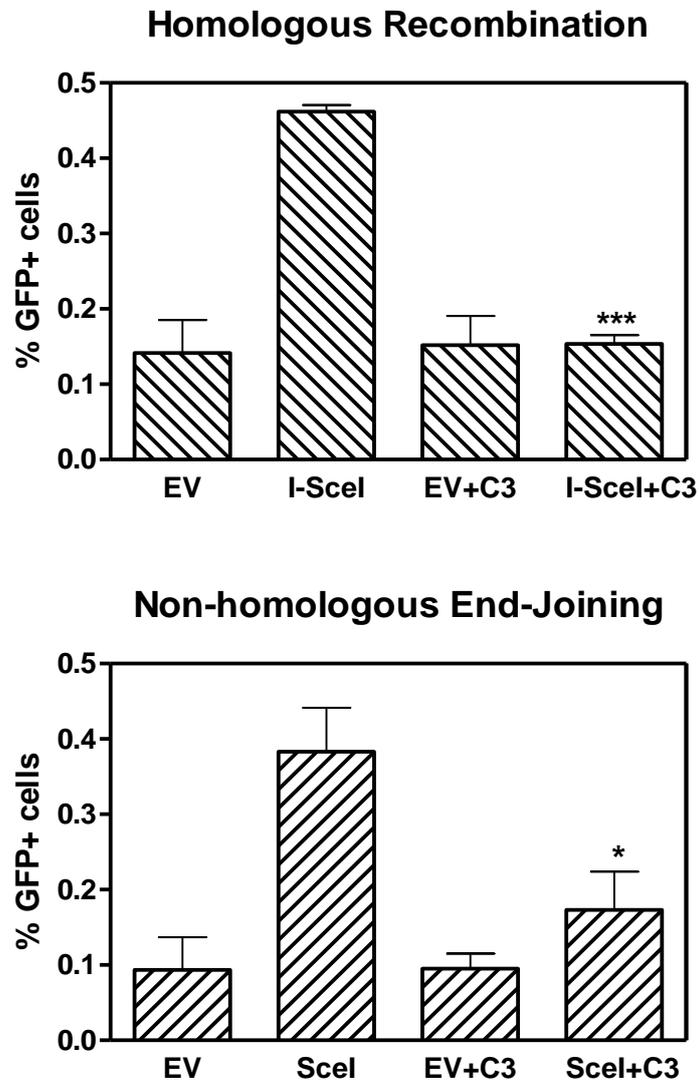


Figura 24 – A inibição da ativação de RhoA leva a redução do reparo do DNA exógeno, pela vida de reparo por Recombinação Homóloga e Recombinação não-homóloga. As sublinhagens HeLa-DR-GFP (para ensaio de HR) e HeLa-EJ5-GFP (para ensaio de NHEJ) foram tranfectadas 24h após seu plaqueamento, com 4ug de vetor de expressão para enzima I-SceI (Scel) ou vetor vazio (EV), concomitantemente com 2ug de pEF-myc-C3. A porcentagem de células GFP positivas foi determinada 72h após a transfecção por citometria de fluxo. Teste estatístico teste T de Student * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ entre Scel versus Scel+C3. Os dados representam a média +/- SEM de triplicata experimental independente.

4.1.11 RhoA é capaz de modular negativamente a fosforilação das proteínas quinases de resposta a danos no DNA, Chk1 e Chk2, após tratamento com a radiação gama.

Danos no DNA, como por exemplo, quebras de fita dupla, levam imediatamente ao acionamento de uma complexa rede de sinalização celular em resposta aos danos. Uma das vias acionadas está relacionada a maquinaria de reparo do DNA (DNA damage response - DDR), a qual atua promovendo a parada do ciclo celular a fim de possibilitar que subseqüentes vias de reparo atuem no DNA lesado. Caso o DNA não possa ser reparado, DDR desencadeia a ativação da sinalização das vias de morte celular como, por exemplo, apoptose e senescência (Kastan and Bartek, 2004; Mathon and Lloyd, 2001; Mirzaie-Joniani et al., 2002).

Ao longo do ciclo celular há pontos de checagem conhecidos como checkpoints de parada, nos quais se for detectado alguma alteração no material genético, há a possibilidade de reparo da lesão antes da célula prosseguir para próxima fase do ciclo. Os checkpoints estão localizados temporalmente na transição G1/S, dentro da fase S ou na transição G2/M. A regulação da parada do ciclo celular nos checkpoints se deve a uma série de proteínas, dentre elas as “Checkpoint kinases” 1 e 2 (Chk1 e Chk2), as principais proteínas transdutoras de sinal de parada do ciclo em resposta a lesões no DNA (Bartek et al., 2001; Kastan and Bartek, 2004). As proteínas Chk1 e Chk2 são ativadas por fosforilação, pelas proteínas ATR e ATM, respectivamente, as quais são as principais proteínas sensoras dos sinais de dano no DNA (Reinhardt and Yaffe, 2009).

As proteínas Chk1 e Chk2 são ativadas através de fosforilação em resposta a danos no DNA, sendo que Chk2 (através de ATM) é ativada principalmente quando

há danos induzidos por radiação gama. A proteína ATR fosforila Chk1 no resíduo de Ser 345 e Ser 317, levando na ativação da proteína. ATM fosforila o resíduo Thr 68, essa fosforilação induz a dimerização da proteína Chk2 levando a fosforilação de outros resíduos no sítio catalítico Thr 383 e Thr 387 promovendo sua atividade. Uma vez ativadas Chk1/2 então envolvidas na promoção da parada do ciclo celular fosforilando Cdc25 e possibilitando o reparo do DNA lesado (Bartek et al., 2001; Reinhardt and Yaffe, 2009; Stracker et al., 2009).

Assim, para se determinar o envolvimento de RhoA na via de reparo de DNA, em resposta aos danos no DNA induzido pela radiação gama, submetemos os mutantes HeLa-RhoA V14 (RhoA constitutivamente ativo), HeLa-RhoA N19 (RhoA dominante negativo) e células HeLa parental a dose de 15Gy de radiação gama. Seguimos temporalmente numa cinética curta, de até 2h após dano, através de immunoblots. A dose de 15 Gy de radiação foi determinada previamente por ensaios de atividade de RhoA (pull-down), onde observamos que os níveis de RhoA-GTP são mais elevados.

Observamos que quando submetemos as células a radiação gama, a fosforilação de Chk1 e Chk2 é significativa e sistematicamente reduzida no mutante dominante negativo HeLa-RhoA N19 em comparação com células parentais HeLa e o clone HeLa-RhoA-V14 (Figura 25).

Resultados semelhantes, por exemplo, em células de câncer coloretal, onde a inibição farmacológica da ativação de Chk1 e Chk2 levou a radio sensibilização celular, inibindo o reparo do DNA, e a sérios prejuízos celulares devido a ativação de catástrofe mitótica (Riesterer et al., 2011). No entanto, não observamos essa redução da ativação de Chk1 e Chk2 quando utilizamos a inibição de RhoA pela toxina C3. É provável que a inibição colateral da atividade de RhoB e RhoC,

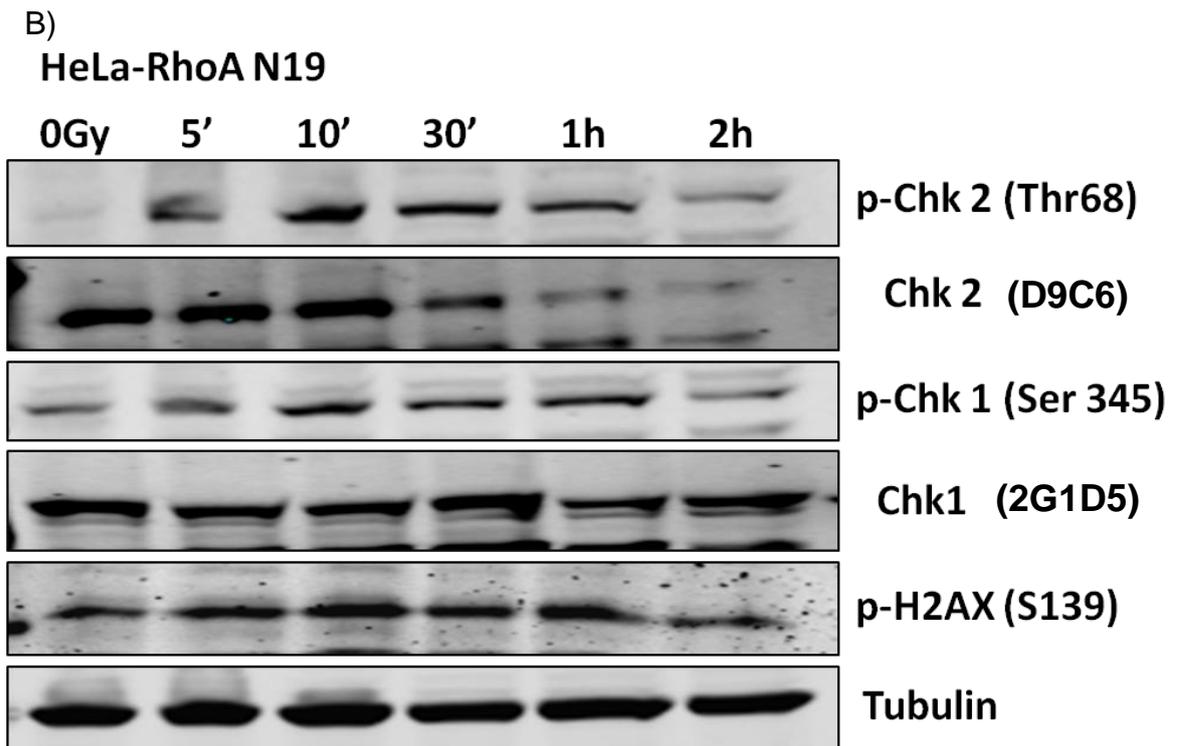
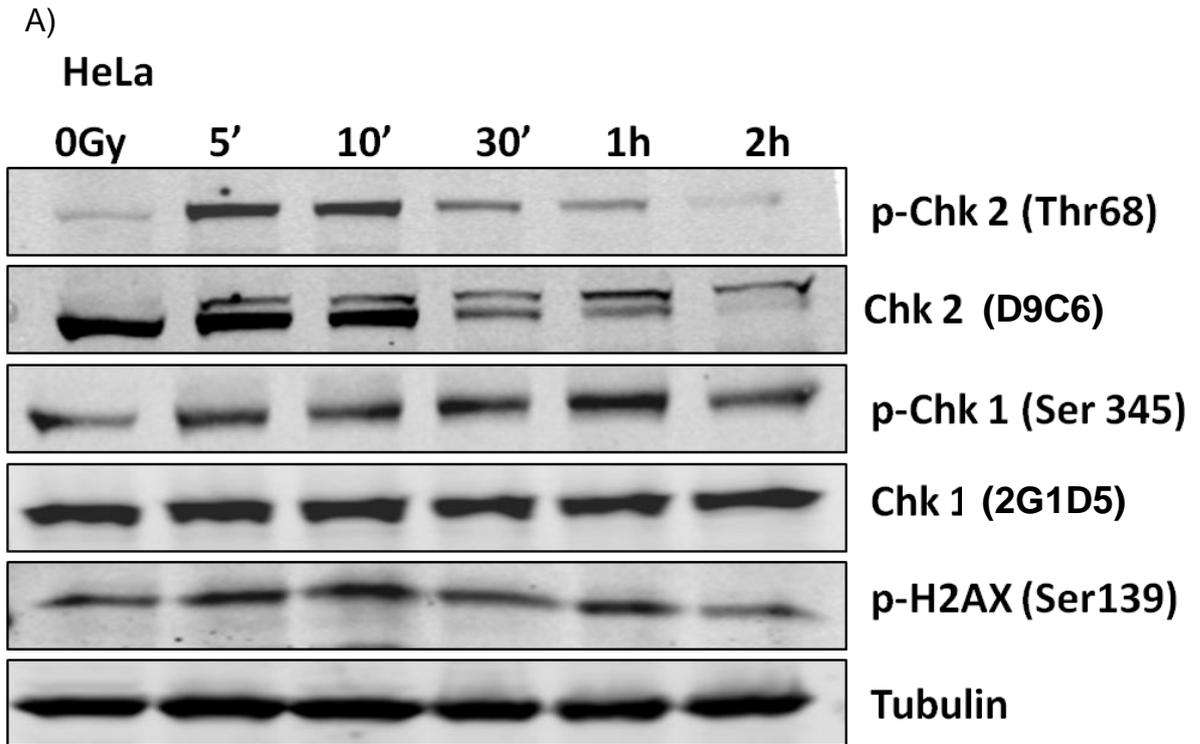
ocasionada também pela toxina C3, esteja de alguma maneira que não sabemos, e não há relatos na literatura sobre isso, levando a ativação da fosforilação de Chk1 e Chk2 (Figura 25).

Nos immunoblots da figura 25, observamos também os níveis de fosforilação da histona H2AX (γ -H2AX-Ser 139), a qual é substrato direto da proteína ATM, ATR e DNA-PK, em resposta quebras de fita do DNA (An et al., 2010; Katsube et al., 2014; Paull et al., 2000). A fosforilação da histona H2AX é necessária para o recrutamento de fatores de reparo de dano no DNA, como por exemplo, o complexo MRN (Mre11, Rad50 e Nbs1) e as proteínas 53BP1 e BRCA1. Dessa forma, a persistência da histona γ -H2AX no DNA, indica que o dano ainda não foi reparado ou seu reparo ainda não foi iniciado (Cleaver, 2011; Paull et al., 2000; Reinhardt and Yaffe, 2009). Não observamos variação da cinética de ativação da histona γ -H2AX entre os clones mutantes e a célula parental HeLa, em resposta aos efeitos da exposição a radiação gama. No entanto observamos certa persistência na ativação da γ -H2AX quando utilizamos o inibidor da ativação de RhoA a toxina C3, nas células HeLa (Figura 25).

Em células de adenocarcinoma de colon humano, tratadas com inibidor específico de ATR e submetidas ao tratamento com cisplatina (induz danos no DNA do tipo quebras), apresentaram redução da fosforilação de Chk1, no entanto a cinética de ativação de histona H2AX não variou muito em relação as células não tratadas com o inibidor. Essa não variação da histona se deve a ativação de um mecanismo compensatório, o qual leva a ativação de ATM (Reaper et al., 2011). Provavelmente em nosso sistema, esteja ocorrendo o mesmo mecanismo compensatório, pois no clone RhoA N19 observamos redução drástica da ativação de Chk1, no entanto a cinética de ativação de γ -H2AX não foi alterada.

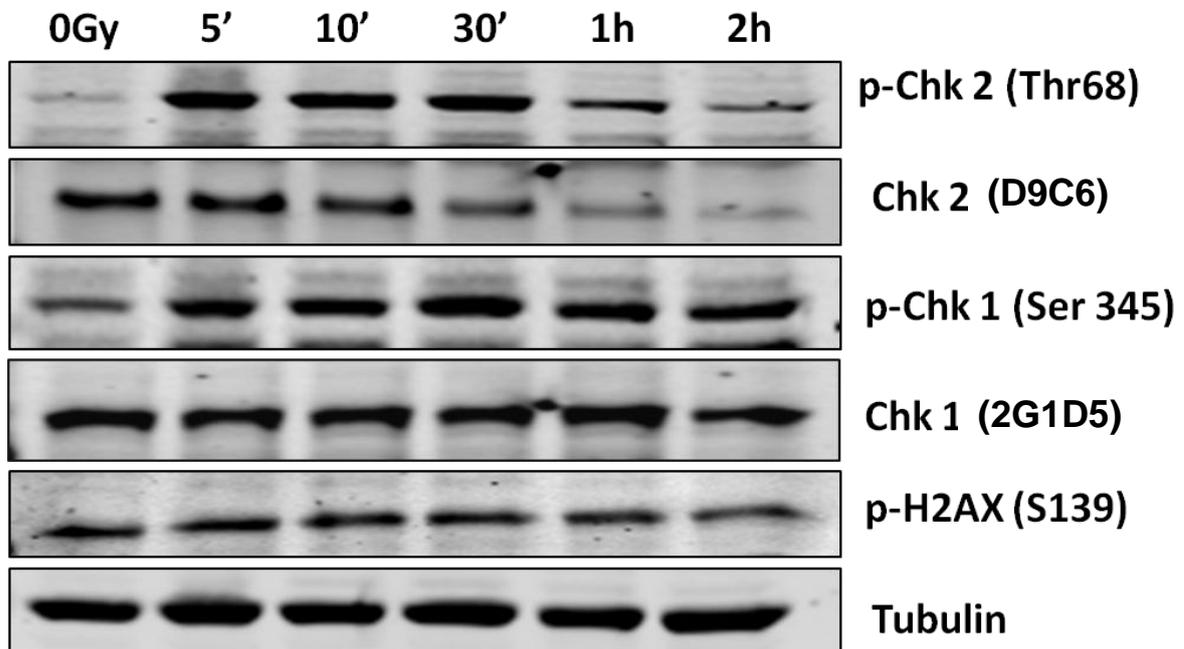
De maneira diferente ao observado em nosso trabalho, células de fibroblasto humano GM637, quando expostas a toxina CDT que induz quebras de fita dupla no DNA, há ativação das proteínas de resposta a danos no DNA, porém a cinética de ativação de algumas proteínas é diferente da observada quando as células são expostas a radiação gama. Como por exemplo, a fosforilação de Chk1 quando as células são tratadas com CDT há uma ativação persistente, assim como a da histona H2AX. Os autores discutem que essa diferença se deve ao modo que como o dano é induzido pelos diferentes tratamentos, CDT induz quebras de fita simples muito próximas uma das outras, porém em fitas diferentes, produzindo dessa forma quebras de fita dupla no DNA e a radiação gama induz além de quebra de fita dupla, induz a quebras de fita simples, assim como modificações oxidativas de bases do DNA (Fahrer et al., 2014; Frisan et al., 2003).

Dessa forma, acreditamos que RhoA esteja envolvida na modulação da resposta celular, da via ATR/Chk1 e ATM/Chk2 em células HeLa submetidas a radiação gama. Já que observamos redução significativa da fosforilação de Chk1 e Chk2, quando o clone defectivo em RhoA ativo foi submetido a radiação gama.



C)

HeLa-RhoA V14



D)

HeLa+C3

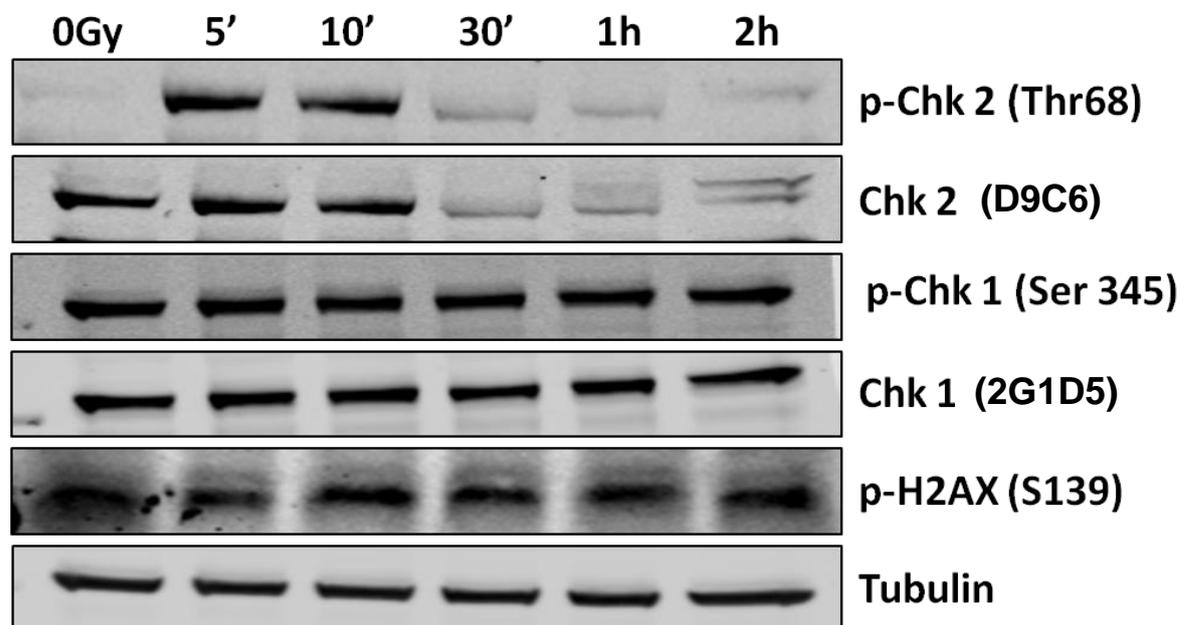


Figura 25 - A fosforilação de Chk1 e Chk2 é reduzida no mutante dominante negativo HeLa-RhoA N19. As linhagens HeLa parenta (A), mutantes dominante negativo HeLa-RhoA N19 (B), constitutivamente ativo HeLa-RhoA V14 (C) I foram plaqueadas em placas de 100mm, 24h antes da exposição a 15Gy de radiação gama. Para o ensaio onde foi utilizado o inibidor C3 (D), as células HeLa foram transfectadas com o plasmídeo contendo a sequência de DNA que codifica para C3 24h antes da exposição a dose de 15Gy de radiação gama. As células foram lisadas nos diferentes tempos após a radiação e as proteínas foram analisadas por imunoblot para fosfo-Chk1(Ser 345) Cell Signaling, fosfo-Chk2 (Thr 68) Cell Signaling, fosfo-Histone H2AX (Ser139) R&D systems. Os imunoblots são os representativos de três experimentos independentes.

4.2 Estudo do envolvimento da proteína Rac1 GTPase na resposta celular de células expostas a radiação gama.

4.2.1 Caracterização das sublinhagens clonais de células HeLa mutantes para a GTPase Rac1

Para estudarmos o envolvimento de Rac1 GTPase na resposta celular aos efeitos da radiação gama, de forma semelhante a adotada para a GTPase RhoA, foram gerados sublinhagens clonais estáveis em células HeLa mutantes da proteína Rac1. Tais mutantes expressam a sequência de cDNA que contém a substituição do aminoácido Thr para Asp na posição 17 que confere caráter de dominante negativo (Rac1 N17) e a substituição do aminoácido Gly para Val na posição 12 que confere o caráter de constitutivamente ativo (Rac1 V12). Essas mutações são equivalentes as encontradas naturalmente na mutação oncogênica de Ras, onde Ras V12 apresenta ganho de função (constitutivamente ativo) e Ras N17 perda de função (dominante negativo) (Ridley et al., 1992). As sublinhagens clonais foram geradas previamente em nosso laboratório (pelo Prof. Dr. Fábio Forti) segundo protocolo de uso corrente no laboratório e descrito em Materiais e Métodos. Os clones celulares foram caracterizados quanto a atividade de Rac1 pelo ensaio de pull-down e por ensaios clonogênicos de sobrevivência.

No 1º método de caracterização, lisados celulares foram incubados com beads PAK-GST, que contém a proteína de fusão PBD-GST ligada a resina Glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare). A proteína PAK1 (p21 activated kinase I) é a principal das proteínas efetoras de Rac1, mais conhecida e melhor estudada, possuindo na extremidade N-terminal o domínio de ligação a p21 que reconhece especificamente Rac1 e Cdc42 ativos ou ligados a GTP (Benard et al., 1999;

Ellenbroek and Collard, 2007). Uma vez ligada a proteína de fusão, Rac1-GTP é recuperada por centrifugação e seus níveis revelados por immunoblotting utilizando anticorpo anti-Rac1 específico. Foram testados no total cinco mutantes, onde um era dominante negativo (Rac1 N17) e quatro constitutivamente ativos (Rac1 V12).

Para o ensaio de pull-down, as células foram plaqueadas 24h antes do tratamento e então carenciadas com 0% de soro fetal bovino por 24, 48 ou 72h, com objetivo de diminuir a ativação de Rac1 basal e assim determinar funcionalmente qual seria o melhor clone mutante para o estudo. O soro fetal bovino é composto por vários fatores de crescimento, dentre outros hormônios, citocinas e compostos bioativos, os quais conhecidamente ativam as Rho GTPases e, dessa maneira, podemos caracterizar os variantes clonais pois, por exemplo, espera-se que o clone constitutivamente ativo mantenha níveis basais altos de Rac1-GTP, independente do carenciamento (Maddala et al., 2003; Ren et al., 1999; Ridley et al., 1992).

Entretanto, também como esperado, observamos que há uma variação da atividade de Rac1 nas diferentes sublinhagens clonais. Por exemplo, na linhagem parental HeLa os níveis de Rac1 ativa foram reduzidos pelo carenciamento das células, assim como na linhagem dominante negativa N17 3G, entretanto nessa última observamos um discreto aumento na ativação de Rac1 48h após carenciamento (Figura 26).

Já dentre as duas linhagens constitutivamente ativas testadas, observamos que os clones V12 2P e V12 4G são os melhores candidatos para estudo, uma vez que com o carenciamento das células não houve redução da atividade de Rac1, o que era esperado e observamos, uma vez que os clones mutantes V12 possuem uma maior afinidade por GTP e mantiveram os níveis de Rac1-GTP altos,

independente da presença dos fatores de crescimento no soro fetal bovino (Gohla et al., 1998).

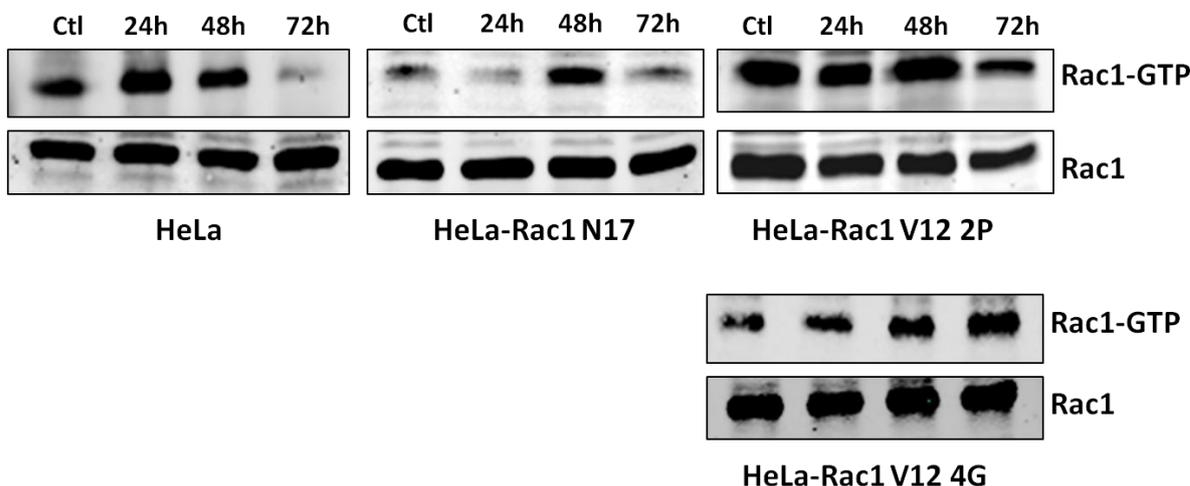


Figura 26 - Ensaio de pull-down para determinação da ativação de Rac1, o mutante Rac1 N17 apresenta menores níveis de Rac1 ativo em relação da HeLa parental e Rac1 V12. As sublinhagens celulares foram carenciadas com 0% SBF por 24h, 48h e 72h. Os lisados celulares foram incubados com beads PAK-GST para precipitar Rac1 ativa (GTP-Rac1) segundo materiais e métodos item 4.4. As amostras foram analisadas por imunoblotting utilizando anticorpo anti-Rac1 (Santa Cruz).

Já que Rac1 também está envolvida na proliferação celular, pois também esta envolvida com a regulação do ciclo celular, estimulando a transcrição de ciclina D1 através da ativação do fator de transcrição NF- κ B, o qual é importante para transcrição da proteína ciclina D1 (Jaffe and Hall, 2005; Sahai and Marshall, 2002; Vega and Ridley, 2008), realizamos ensaios clonogênicos em duas densidades celulares (1000 e 2000 células) para auxiliar a caracterização das sublinhagens clonais mutantes. Observamos que o clone dominante negativo Rac1 N17 apresentou reduzido número de colônias em relação a célula parental e aos clones constitutivamente ativos, e que há uma diferença clonal dentre as linhagens de Rac1 V12, pois o número médio de colônias variou significativamente entre estes clones mutantes; por exemplo, os clones Rac1 V12 2P e V12 4G demonstraram o número

de colônias significativamente maior em relação a célula HeLa, cerca de 2x mais colônias, no mínimo (Figura 27).

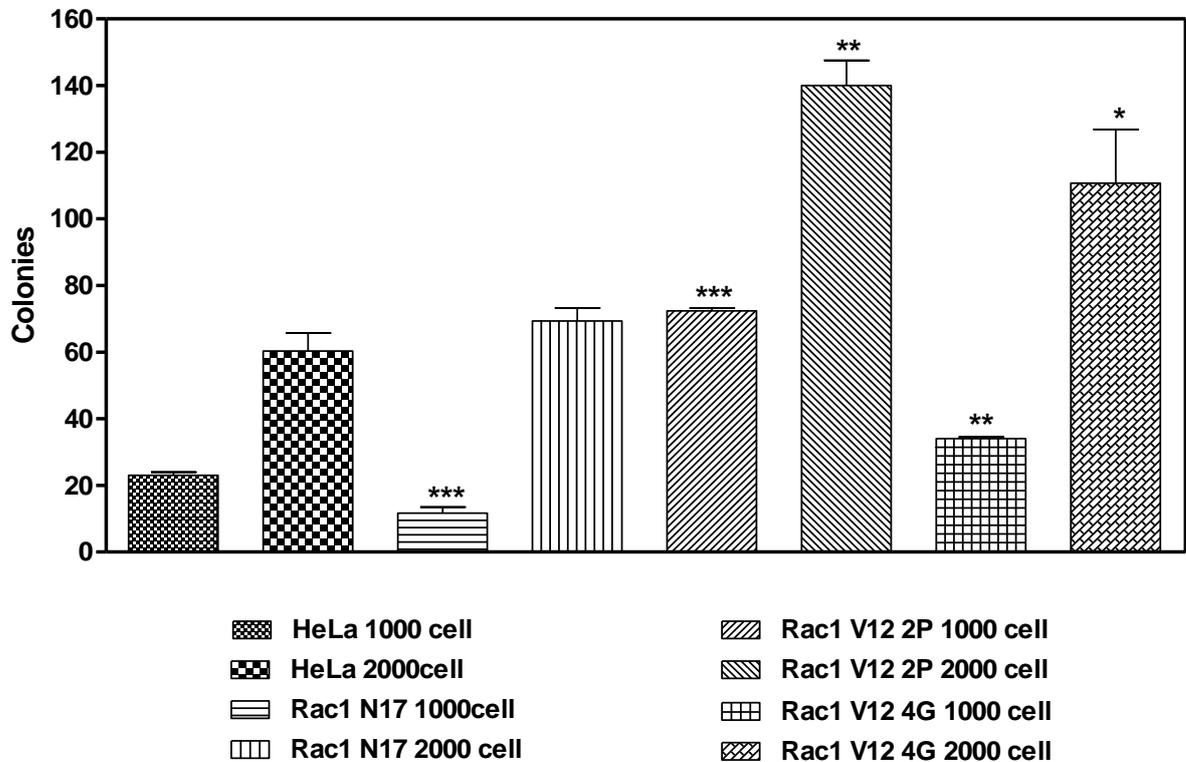


Figura 27 - Ensaio clonogênico das linhagens HeLa, HeLa-Rac1 N17 3G, HeLa-Rac1 V12 4G e HeLa-Rac1 V12 2P. Foram plaqueadas duas densidades celulares 1000 e 2000 em placas de 60 mm de diâmetro. Após 10-12 dias em cultura as células foram fixadas com formaldeído 10% em PBS, coradas com cristal violeta 0,5% e contadas manualmente. Os resultados são a média +/- SEM de três experimentos independentes. Foi utilizado para análise estatística ANOVA * $P < 0.05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0.001$ entre os clones versus HeLa parental.

Assim como os mutantes RhoA, os mutantes Rac1 também apresentaram alteração da morfologia celular. O que também já era esperado uma vez que Rac1 regula a dinâmica de remodelamento do citoesqueleto, pois promove a reunião dos filamentos de actina requeridos para formação dos lamelipódios e ondulações da membrana (Maddala et al., 2003; Wertheimer et al., 2012). Ambos os clones mutantes de Rac1, seja V12 ou N17, apresentaram morfologia semelhantes entre si, porém com aspecto mais espreado em relação a HeLa parental (Figura 28).

Os ensaios para caracterização funcional dos clones para Rac1, usando pull-down e formação de colônias, permitiram determinar que as sublinhagens clonais mutantes constitutivamente ativos (HeLa-Rac1 V12 2P e V12 4G) apresentam fenótipo adequado que respondem ao seu genótipo, pois ao serem carenciados mantiveram alto os níveis de Rac1 ativo (Rac1-GTP) e apresentaram maior número de colônias, indicativo de maior capacidade de proliferação. O mutante dominante negativo (HeLa-Rac1 N17 3G) apresentou baixo nível de Rac1 ativo já no controle não carenciado e um número de colônias também reduzido, uma vez que a falta de Rac1-GTP leva a diminuição na proliferação celular.

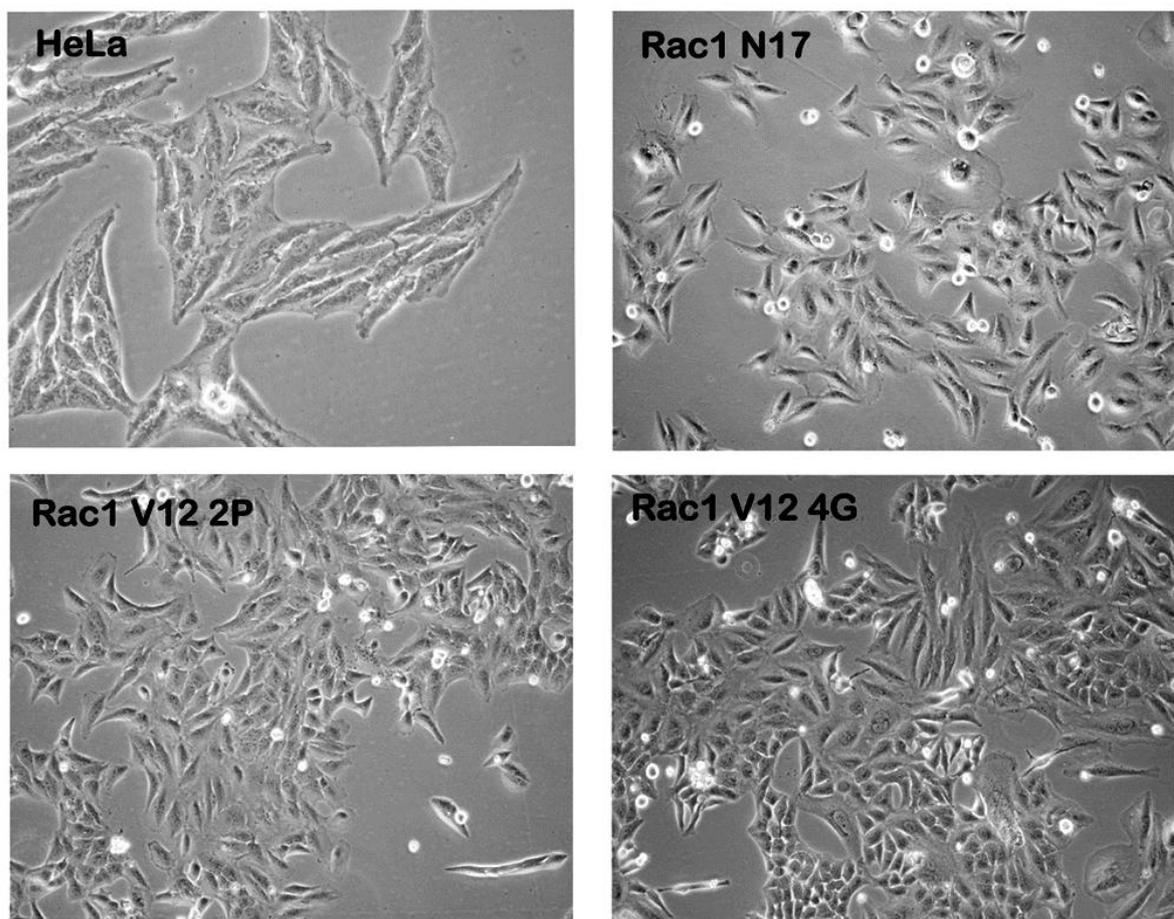


Figura 28 – Alteração da morfologia celular dos mutantes Rac1. As células foram analisadas e fotografadas em microscópio invertido (Olympus) no aumento de 200X, em condições de crescimento normal com 10% de SBF.

4.2.2 A proteína Rac1 GTPase é ativada em resposta a radiação gama

Para se determinar o comportamento da regulação de Rac1 frente a exposição a radiação gama, as sublinhagens clonais Rac1 dominante negativo HeLa-Rac1 N17 e constitutivamente ativo HeLa-Rac1 V12 2P, além da linhagem HeLa parental, foram expostas a radiação gama nas doses de 2Gy e 5Gy. Essas doses foram escolhidas, pois observamos com o ensaio de sobrevivência, que os clones Rac1 N17 e Rac1 V12 são mais sensíveis em relação aos clones de RhoA, a sobrevivência celular diminui muito quando as células são expostas a doses mais altas que 5Gy (dados não mostrados). Esta determinação foi feita através do ensaio de atividade (pull-down) descrito anteriormente, em lisados celulares obtidos 1h após a exposição das células a radiação gama.

Os resultados mostram que na linhagem parental HeLa Rac1 é ativada em resposta a radiação gama e sua ativação é dose dependente, pois quando submetida a 5Gy houve maior aumento dos níveis de Rac1 ativa em relação aos níveis de Rac1 ativa quando as células foram expostas a 2Gy, ou as não tratadas (Figura 29). Quando submetemos os mutantes, dominante negativo Rac1 N17 3G e constitutivamente ativo Rac1 V12 2P a radiação gama, observamos pequenas variações na atividade de Rac1 que se devem provavelmente a ativação de Rac1 endógena, uma vez que a proteína endógena existente (e ainda em níveis consideráveis) é passível de regulação pela radiação. Observamos também que no mutante dominante negativo HeLa-Rac1 N17 3G os níveis de Rac1 ativo são menores em relação ao mutante constitutivamente ativo HeLa-Rac1 V12 2P e HeLa parental, demonstrando que o fenótipo dominante negativo dessa sublinhagem clonal é mantida, mesmo quando submetida a radiação gama (Figura 29).

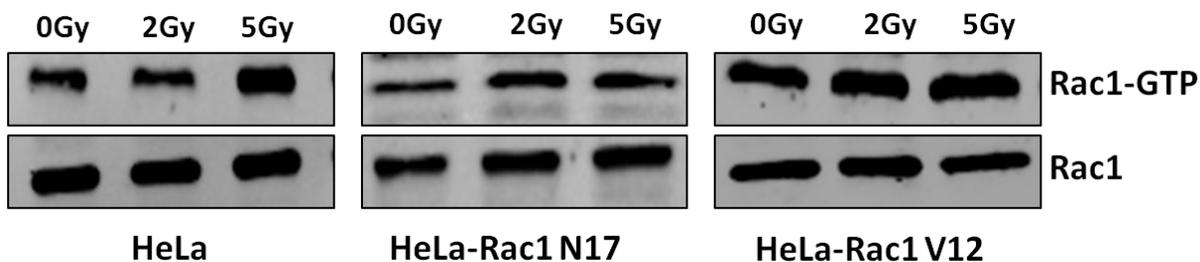


Figura 29– Em célula HeLa Rac1 é ativada em resposta aos efeitos da exposição a radiação gama. As sublinhagens celulares foram expostas a radiação gama nas doses de 2 e 5Gy. Os lisados celulares foram obtidos após 1h do tratamento com radiação e incubados com beads PAK-GST para precipitar Rac1 ativa (GTP-Rac1) segundo materiais e métodos item 4.4. As amostras foram analisadas por immunoblotting utilizando anticorpo anti-Rac1 (Santa Cruz). As imagens são representativas de três experimentos independentes.

4.2.3 A linhagem clonal HeLa-Rac1 N17 3G apresenta menor proliferação e sobrevivência frente a radiação gama.

As sublinhagens clonais Rac1 V12 e N17 foram expostas a diferentes doses de radiação gama e sua capacidade de sobrevivência e proliferação foram determinadas. O clone dominante negativo Rac1 N17 apresentou-se mais sensível frente a radiação gama, pois possui menor taxa de sobrevivência e menor número de células na curva de crescimento, quando comparado com células parentais HeLa (Figuras 30 e 31). A redução na proliferação é expressiva, como podemos observar na diferença dos valores do eixo Y dos gráficos, o clone Rac1 N17 apresentou no último dia de experimento redução de 80% em relação a célula parental, observando somente controle não tratado (0 Gy) e quando observamos a taxa de proliferação das células tratadas com 2 Gy, observamos redução de 70% da proliferação em relação da HeLa (Figura 30). Houve redução semelhante na taxa de sobrevivência celular, onde Rac1 N17 apresentou redução de 74% em relação a célula parental HeLa quando exposta a 2Gy (Figura 31). Essa sensibilização celular ocasionada pela deficiência de Rac1-GTP também é observada em células de câncer de mama

MCF-7 quando expostas a doses crescentes de radiação gama na presença de diferentes tipos de inibição da GTPase Rac1 (Yan et al., 2012).

No entanto, o clone Rac1 V12 também apresentou baixa resistência e alta sensibilidade aos efeitos inibitórios da radiação gama, em comparação com células HeLa, uma vez que possui menor taxa de sobrevivência e menor proliferação celular, como demonstrada pelas curvas de crescimento e na capacidade de formação de colônias medidas (Figuras 30 e 31). Como podemos observar no último dia do experimento, houve redução de 80% na taxa de proliferação celular em relação a célula parental HeLa, sem tratamento. E quando comparamos o tratamento com 2Gy observamos redução de somente 25%, em relação a HeLa (Figura 30). No entanto, quando analisamos a taxa de sobrevivência, notamos que houve redução de 58% em relação a célula parental HeLa, quando exposta a dose de 2Gy (Figura 31). Esses dados vão de acordo com Debidda e colaboradores, onde observaram que em fibroblasto primário murino (MEF) a expressão exógena de Rac1 constitutivamente ativo, leva a diminuição da proliferação, pois induz senescência celular e afeta a transição da fase G2 para fase M do ciclo celular (Debidda et al., 2006).

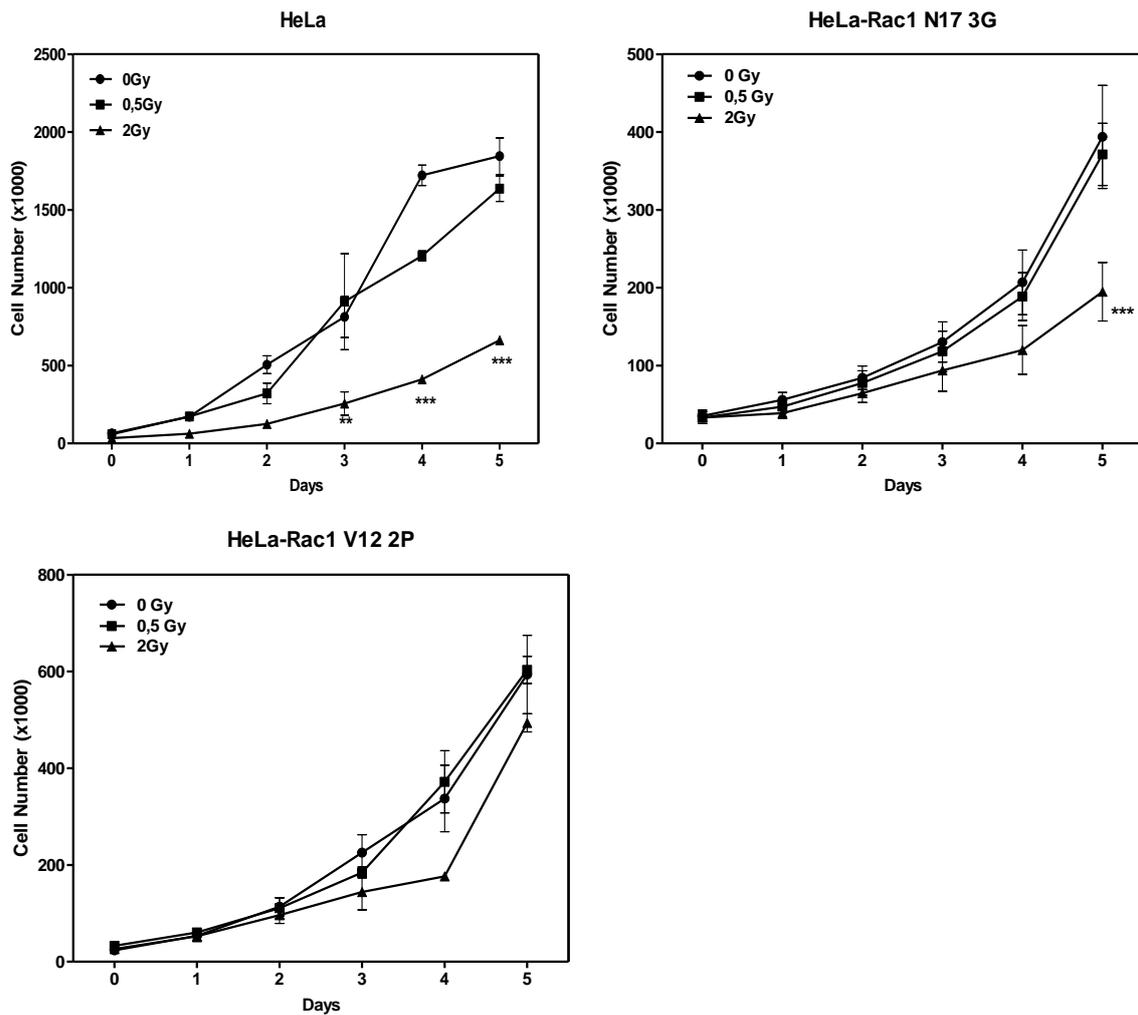


Figura 30 - Curva de crescimento das linhagens celulares HeLa parental, HeLa-Rac1 N17 3G e HeLa-Rac1 V12 2P, demonstrando que os clones mutantes proliferam menos em relação a HeLa parental. Foram plaqueadas 35.000 células e submetidas as doses de 0,5 e 2Gy de radiação gama. As células foram coletadas a cada 24hr durante 5 dias consecutivos e contadas manualmente na câmara de Fucks-Rosental. Cada gráfico é a representação de três experimentos independentes. Para análise estatística foi utilizada ANOVA $**P<0,01$; $***P<0.001$ entre as células tratadas versus não tratadas.

Estes resultados nos levam a sugerir que não somente a falta ou deficiência da atividade de Rac1-GTP, mas também o excesso de Rac1 ativa, leva a uma maior sensibilidade das células HeLa aos efeitos da radiação gama; porém esses efeitos ficam mais evidentes na linhagem defectiva em Rac1. Esses efeitos podem ser reflexos tanto da importância e necessidade da ciclagem eficiente de Rac1 GTP/GDP, assim como de um balanço da atividade de Rac1 para a célula em momentos específicos pós estresse genotóxico.

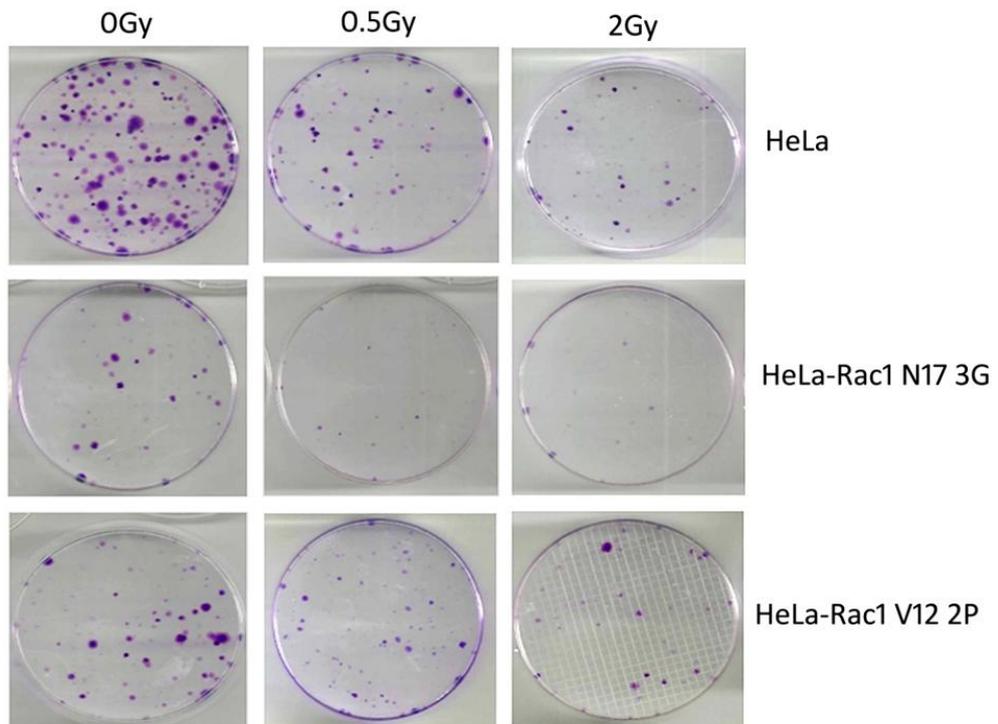
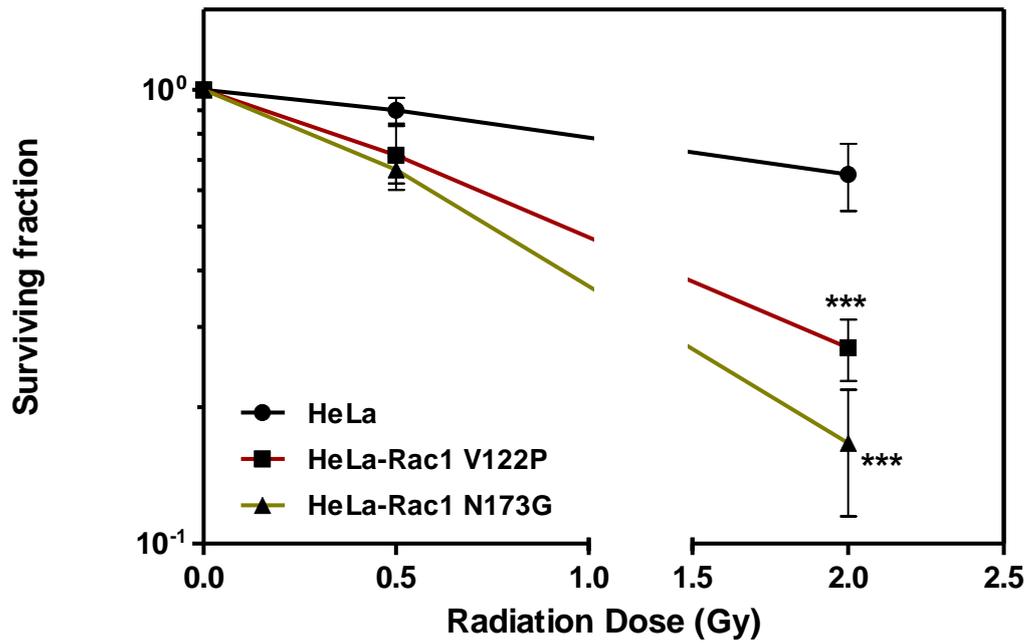


Figura 31 – Os clones mutantes HeLa-Rac1 N17 3G e HeLa-Rac1 V12 2P são mais sensíveis aos efeitos da radiação gama. As células foram plaqueadas em baixa densidade (2000 células) e irradiadas com as seguintes doses de radiação ionizante do tipo gama: 0,5; e 2Gy. Após 10-12 dias em cultura, as colônias formadas foram fixadas com formaldeído 10% em PBS, coradas com cristal violeta 0,5% e contadas manualmente. Os resultados são a média +/- SEM de três experimentos independentes. Teste estatístico ANOVA *** $P < 0.001$ entre mutantes versus HeLa parental.

4.2.4 Os clones mutantes HeLa-Rac1 V12 e HeLa-Rac1 N17 apresentam maiores níveis de apoptose

Debidda e colaboradores demonstraram que Rac1 é importante regulador da estabilidade genômica, sendo que o ganho ou a perda de função de Rac1 aumenta significativamente a entrada das células em apoptose (Debidda et al., 2006). Dessa forma, analisamos os clones mutantes HeLa-Rac1 V12 e HeLa-Rac1 N17 quanto a entrada em morte celular programada (apoptose), quando as células são expostas a radiação gama.

Para analisar morte celular por apoptose em nossas linhagens celulares, e identificar alguma contribuição positiva ou negativa de Rac1 neste processo, utilizamos marcação celular dupla com anexina-V e iodeto de propídeo, a fluorescência emitida pelas células foi detectada por citometria de fluxo. Como descrito anteriormente, a sinalização para entrada em apoptose envolve vários eventos de sinalização celular, dentre eles ocorre a externalização da fosfatidilserina presente na bicamada lipídica, e essa proteína é reconhecida pelo anticorpo Anexina V que por ser conjugada com FITC é detectada pelo citômetro de fluxo (Elmore, 2007; Mirzaie-Joniani et al., 2002).

Também utilizamos como controle positivo a radiação ultravioleta – UVC, pois dados presentes na literatura indicam que UVC induz apoptose (Batista et al., 2009). As células foram submetidas a radiação gama nas doses de 2 e 5 Gy e mantidas incubadas por 48h. Observamos que os clones mutantes de Rac1 N17 e Rac1 V12, apresentam maiores níveis de células mortas já no controle negativo (75% e 87% respectivamente), ou seja, quando as células não foram submetidas a nenhum tratamento, em relação a HeLa (Figura 32). Esses dados vão de acordo com os observados por Debidda e colaboradores, onde em células de fibroblasto

embrionário de camundongo (MEF), os clones com perda ou ganho de atividade de Rac1 em crescimento normal (sem tratamento algum), apresentaram aumento de apoptose em relação ao controle selvagem (Debidda et al., 2006).

Houve indução de morte celular nas linhagens, quando foram submetidas a radiação gama. Porém observamos que os clones Rac1 N17 e Rac1 V12, sempre apresentaram mais células apoptóticas, 80% mais células apoptóticas, em relação da HeLa. É importante ressaltar que quando as células foram expostas a 2Gy de radiação, não observamos alteração significativa dos níveis de células mortas, o que não ocorre em relação aos clones, nos quais há aumento de morte celular (Figura 32) (Espinha, G.T. et al. dados não publicados).

Os dados observados em HeLa, vão de acordo com os obtidos na literatura, onde quando as células HeLa-Hep2 (células de adenocarcinoma humanas) foram submetidas a dose de 2Gy, não foi observado aumento significativo de células apoptóticas, os autores observam aumento da apoptose (acima de 60%) quando as células foram submetidas a dose a partir de 5Gy (Mirzaie-Joniani et al., 2002), assim como observamos em nossos experimentos para HeLa parental.

Quando observamos o clone dominante negativo (Rac1 N17), notamos que há aumento das células apoptóticas já quando expomos as células na dose de 2Gy, o que não é observado no clone constitutivamente ativo (Rac1 V12) (Figura 32) (Espinha, G.T. et al. dados não publicados). No entanto, quando analisamos os dados do clone Rac1 N17 exposto a dose de 5Gy não temos aumento expressivo de apoptose, esse dado discrepante pode ser resultado de algum erro experimental, o qual deve ser confirmado com mais réplicas experimentais.

De qualquer forma o clone Rac1 N17, aparentemente é mais susceptível aos efeitos da radiação gama, assim como Yan Y. e colaboradores observaram em

células de câncer de mama (MCF-7) e de câncer de pâncreas (CD18/HAPF). A inibição farmacológica de Rac1 em células MCF-7, bem como a expressão exógena de Rac1 N17 nestas mesmas e também em células CD18/HAPF induzem a apoptose quando as células são expostas a 10 Gy de radiação gama (Yan et al., 2012; Yan et al., 2014).

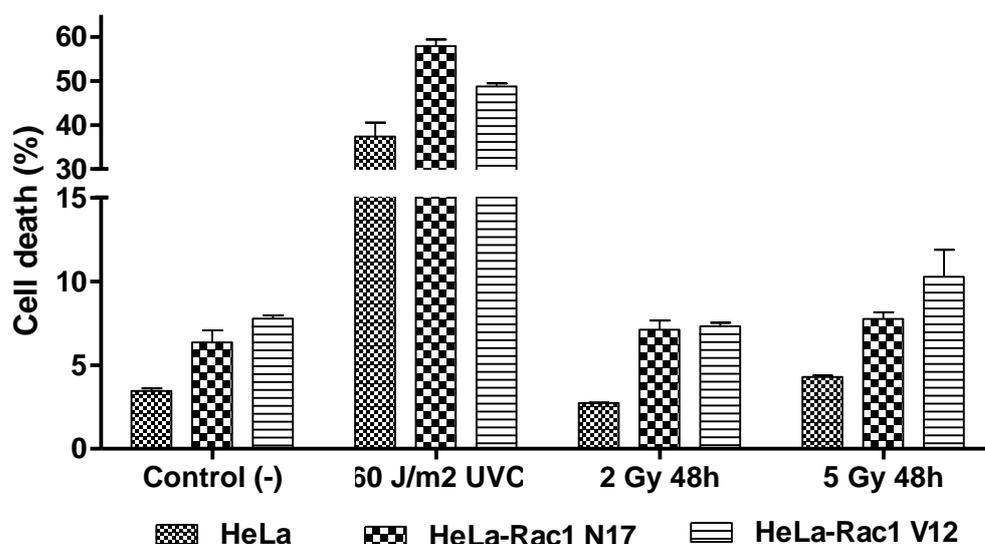


Figura 32 – Os clones mutantes apresentam maior porcentagem de células apoptóticas em relação a Hela parental. As células foram plaqueadas 24 h antes ao tratamento com radiação gama 2 ou 5 Gy e com 60 J/m² UVC (controle positivo). Após 48 h do tratamento as células foram coletadas, processadas e analisadas por citometria de fluxo no citômetro BD FACSVerse (BD Biosciences). Os dados foram analisados no Software Kaluza 1.3 (Beckman Coulter). O gráfico representa média aritmética de um experimento em duplicata.

4.2.5 O clone defeitivo em Rac1-GTP (HeLa-Rac1 N17 3G) apresenta menor capacidade de migração.

Como a proteína Rac1 GTPase também está envolvida diretamente na migração celular, decidimos investigar como os clones mutantes se comportam em relação a migração celular quando expostos a radiação gama. Dessa forma, a capacidade de migração dos mutantes HeLa-Rac1 N17 e HeLa-Rac1 V12 foi testada em resposta aos efeitos ocasionados pela radiação gama. As células foram

plaqueadas em alta densidade 24 hr antes do tratamento e mantidas incubadas até atingirem confluência total; a seguir, após a exposição a radiação nas doses de 0,5; 2 e 5 Gy as placas foram riscadas com ponteira de micropipeta p200 . As fendas foram fotografadas no momento do risco (0h) e 24h após o tratamento com radiação e a invasão ou fechamento das mesmas foram quantificadas e expressas em % de migração.

Podemos observar dos resultados obtidos que na condição controle, onde as células não foram submetidas a radiação, as linhagens HeLa e o clone HeLa-Rac1 V12 apresentaram porcentagem de migração semelhante (~80%) 24hs após a geração da fenda, enquanto que o mutante defeutivo Rac1-N17 apresentou migração de apenas 45%, o que demonstra a influência e participação de Rac1 na mobilidade celular das linhagens em estudo (Figura 33).

Por outro lado, quando expostas a doses crescentes de radiação gama, o mutante V12 mostrou-se sensível aos efeitos da radiação nas doses 2 e 5Gy, ocorrendo uma redução de aproximadamente 30% de migração em relação ao seu controle não tratado (Figura 33). A sublinhagem clonal dominante negativa não mostrou redução drástica na migração celular, mas manteve a porcentagem de migração um pouco menor que ~40%, em todas as doses de radiação gama utilizada, ou seja, ainda houve redução de migração após radiação (Figura 33). Já a linhagem parental HeLa não apresentou redução significativa de migração nas 3 doses usadas, o que vai de acordo com os resultados mostrados na figura 13.

Esses dados vão de encontro com os obtidos por Hwang e colaboradores, onde em células de glioma de rato expressando estavelmente Rac1 dominante negativo, demonstraram aumento dos níveis de migração celular quando expostas a radiação gama. Os autores sugerem que a indução da migração em resposta a

radiação gama, é dependente de JNK (Jun N-terminus kinase) a qual é uma proteína ativa em resposta a stress celular (Hwang et al., 2006).

Em conjunto, os dados obtidos indicam que o balanço entre Rac1 ativo/inativo e/ou a sua ciclagem eficiente também são importantes para manutenção da motilidade celular, uma vez que o mutante constitutivamente ativo, apesar de possuir níveis mais altos de Rac1-GTP, demonstrou-se sensível as doses crescentes de radiação gama, reduzindo significativamente a migração celular, o que não ocorre com a linhagem HeLa parental.

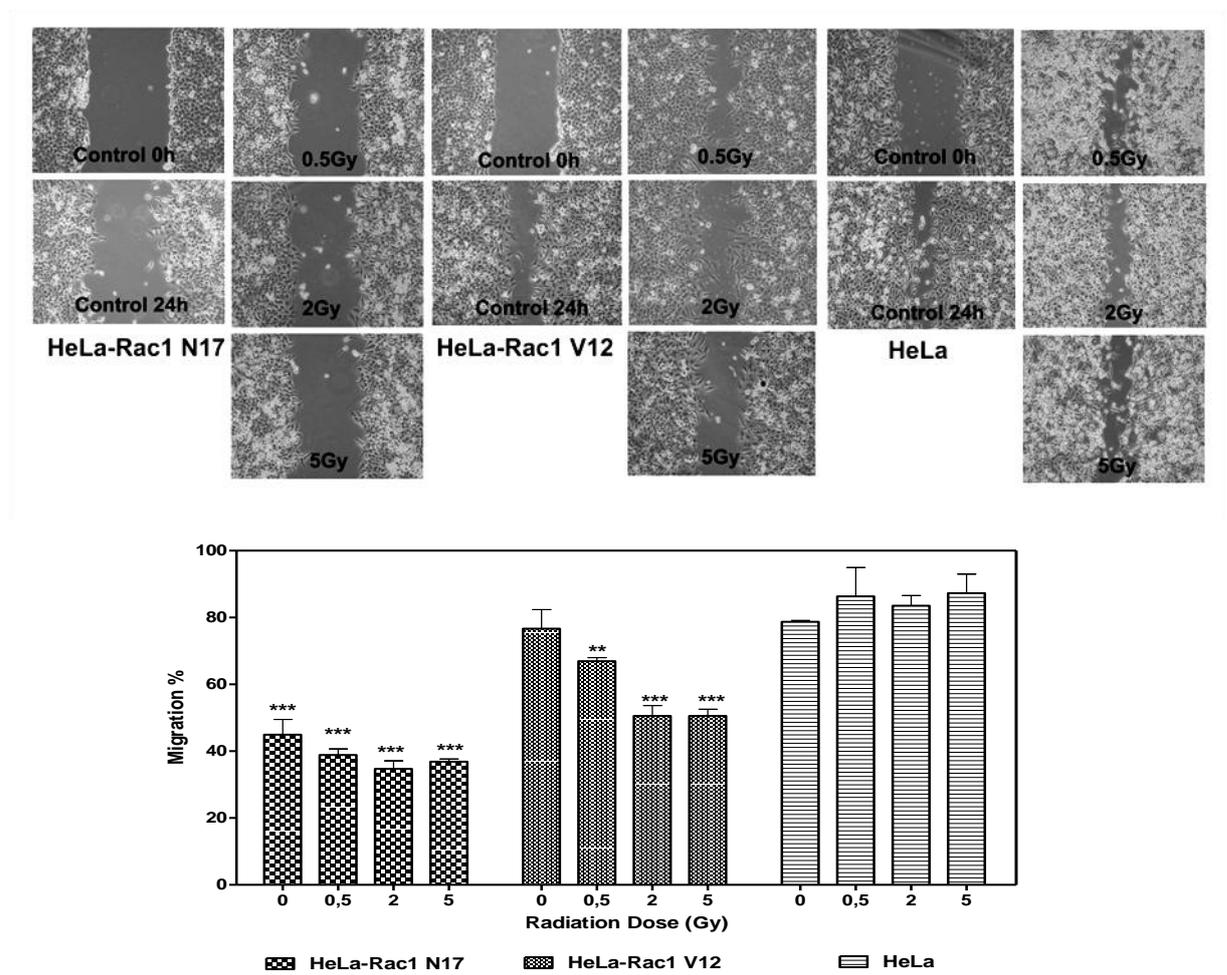


Figura 33- Em célula HeLa a mutação em Rac1 (Rac1 N17 e Rac1 V12), leva a redução na migração celular. As células foram plaqueadas em alta densidade, expostas a radiação gama nas doses de 0,5; 2 e 5Gy. Em seguida, uma fenda foi feita com auxílio de uma ponteira de micropipeta. As fendas foram fotografadas no momento do risco e 24h após o tratamento com aumento de 200X em microscópio invertido (Olympus) e medidas utilizando o software Cell-F (Olympus). Os resultados são a média +/- SEM de três experimentos independentes. Para a análise estatística utilizamos NOVA **P<0,01; ***P<0.001 entre os mutantes tratadas versus HeLa parental.

4.2.6 A cinética de recuperação do DNA fragmentado nas linhagens clonais HeLa-Rac1 N17 e HeLa-Rac1 V12, pelo ensaio cometa alcalino, se diferencia da observada para célula HeLa após exposição a radiação gama

Para se determinar os níveis de danos no DNA e sua cinética de reparo nas linhagens celulares HeLa, HeLa-Rac1 N17 e HeLa-Rac1 V12, foi utilizado o ensaio cometa alcalino, uma variante do ensaio cometa amplamente utilizada como técnica para observar quebras de fitas duplas e simples no DNA genômico lesado por diferentes tratamentos (Collins, 2004). Para tal, as células foram submetidas a radiação gama na dose de 5Gy e após foram coletadas nos tempos de 0,5; 1; 2; e 6h.

O clone mutante defectivo em Rac1 N17 apresentou maiores níveis de dano no DNA com pico entre 0,5-1h após a irradiação e com início da redução da cauda de DNA 2h após o tratamento. Dessa maneira, a exemplo do que ocorre em RhoA, Rac1 provavelmente também tem um papel importante para os momentos iniciais do reparo do DNA, porém mesmo com o atraso no início do reparo aparentemente a maquinaria de reparo é eficaz em reparar ou diminuir os danos no DNA (Figura 34).

O clone Rac1 V12, por sua vez, demonstrou um perfil de dano e recuperação aparentemente mais eficiente do que até as próprias células parentais HeLa. Um menor dano basal no DNA e pico da cauda foi encontrado em 0,5 h após a irradiação e com o reparo, representado pela redução da cauda de DNA, já iniciado em 1h pós tratamento com gama, ou seja, antes mesmo da linhagem parental HeLa (Figura 34).

Todos juntos esses dados dos clones mutantes de HeLa-Rac1 (V12 e N17) nos levam a afirmar que Rac1 pode muito provavelmente estar envolvida e mediando mecanismos iniciais de reparo do DNA e, devido ao seu excesso de

atividade por parte do clone constitutivamente ativo, muito Rac1-GTP nas células leva ao disparo rápido e precoce do reparo dos danos, o que poderia até estar impactando na progressão do ciclo celular (Figura 34).

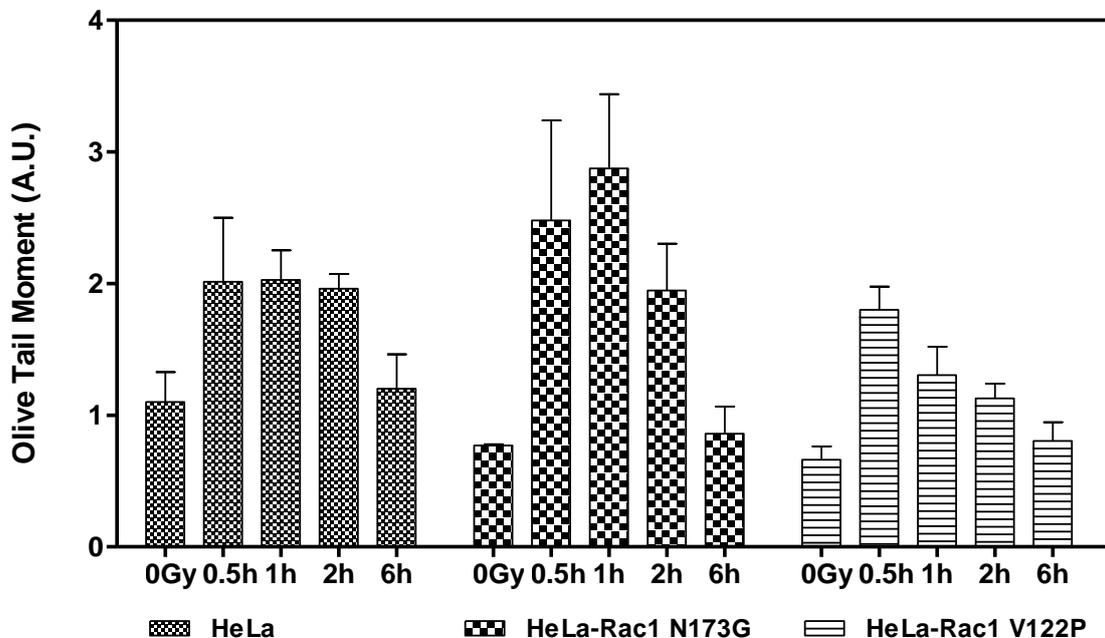


Figura 34 - Ensaio de cometa alcalino das linhagens celulares HeLa parental HeLa-Rac1 N173G e HeLa-Rac1 V122P, demonstrando que Rac1 GTPase altera a cinética de reparo do DNA. As células foram expostas a dose de 5Gy de radiação gama. Após a radiação as células foram coletadas nos tempos de 0,5h; 1h; 2h e 6h. Os cometas foram analisados utilizando o software Komet 6.0 (Andor). O gráfico representa a média de três experimentos independentes

4.2.7 Em células HeLa o mutante dominante negativo Rac1 N17 modula negativamente a fosforilação da histona H2AX e Chk1 após exposição a radiação gama

A radiação gama é há muito tempo conhecida por induzir quebras de fita dupla no DNA (Azzam et al., 2012). Como mencionado anteriormente, um marcador de danos no DNA tipo quebras de fita, amplamente utilizado é a fosforilação da histona H2AX na Ser139 (também chamada como γ -H2AX). A histona H2AX pode ser fosforilada pelas proteínas kinases ATM, ATR e DNA-PK em resposta a diferentes tipos de danos no DNA (Podhorecka et al., 2010). Os níveis de

fosforilação da histona H2AX, bem como das proteínas quinases da via de DDR, Chk1 e Chk2, foram analisados por immunoblotting nas células HeLa e clones mutantes de Rac1. As células foram submetidas a dose única de 2Gy de radiação gama e coletadas ao longo do tempo até 6h após o tratamento. Podemos observar que na linhagem HeLa parental, há aumento transiente de fosforilação da histona H2AX (Ser139) imediatamente após a radiação gama e defosforilação a partir de 2h (Magalhães, Y. T. dados não publicados) (Figura 35). Esse perfil da variação da fosforilação de histona γ H2AX em HeLa também foi observada por Wang e colaboradores, num trabalho onde os autores irradiaram células com a dose de 10Gy de radiação gama (Wang et al., 2005).

Já quando os mutantes V12 e N17 foram analisados observamos que o perfil de γ H2AX modificou drasticamente. O mutante dominante negativo Rac1 N17, apresentou redução significativa dos níveis de γ H2AX, em relação a HeLa parental e Rac1 V12 (Magalhães, Y. T. dados não publicados), sendo praticamente indetectável (Figura 35). Por outro lado no mutante constitutivamente ativo Rac1 V12, os níveis de γ H2AX são altos já no controle não irradiado e se mantiveram altos até o último tempo de coleta, 6h após radiação (Magalhães, Y. T. dados não publicados) (Figura 35).

Estes resultados de não fosforilação de γ -H2AX no clone dominante negativo de Rac1, foram melhor investigados olhando-se para os níveis das proteínas Chk1/2 fosforiladas, uma vez que suspeitamos da existência de possíveis falhas de ativação das vias de ATM/Chk2 e/ou ATR/Chk1, o que poderia explicar estes resultados. Assim observamos que a fosforilação de Chk1-Ser345 também é praticamente indetectável nos clones HeLa-Rac1 N17, bem diferente da cinética de ativação transiente observada em HeLa e nos clones Rac1 V12. E em relação a fosforilação

de Chk2-Thr68, não encontramos variação significativa nos perfis de fosforilação entre as três células, o que mostra que há uma provável alteração de funcionamento da via de ATR/Chk1, a qual provavelmente é afetada de maneira negativa pela deficiência ou redução de atividade da GTPase Rac1 (Figura 35).

Os dados de modulação negativa da fosforilação de Chk1 é também observados por Yan e colaboradores, onde em células de câncer de mama (MCF-7) a inibição farmacológica da ativação de Rac1 leva a redução da fosforilação de Chk1 quando as células são expostas a radiação gama. Mais recentemente em outro trabalho, Yan e colaboradores, observaram que em células câncer de pâncreas (CD18/HPAF) expressando exogenamente Rac1 dominante negativo (Rac1 N17) há também a redução da fosforilação de Chk1 quando as células são submetidas a radiação gama. Em ambos os trabalhos, os autores observaram que a redução da fosforilação de Chk1 é refletida no ciclo celular, onde observaram redução da ativação do checkpoint G2/M induzido por radiação gama (Yan et al., 2012; Yan et al., 2014).

Com os dados obtidos experimentalmente, podemos levantar a hipótese que Rac1 possa estar modulando a ativação de Chk1 e da histona H2AX, através da modulação da ATM e ATR, já que ambas fazem a ativação das proteínas Chk1 e histona H2AX. Assim como visto por Yan e colaboradores, em seus dois trabalhos, onde a inibição da ativação de Rac1 leva a atenuação da ativação de ATM e ATR em resposta aos efeitos ocasionados pela radiação gama (Yan et al., 2012; Yan et al., 2014).

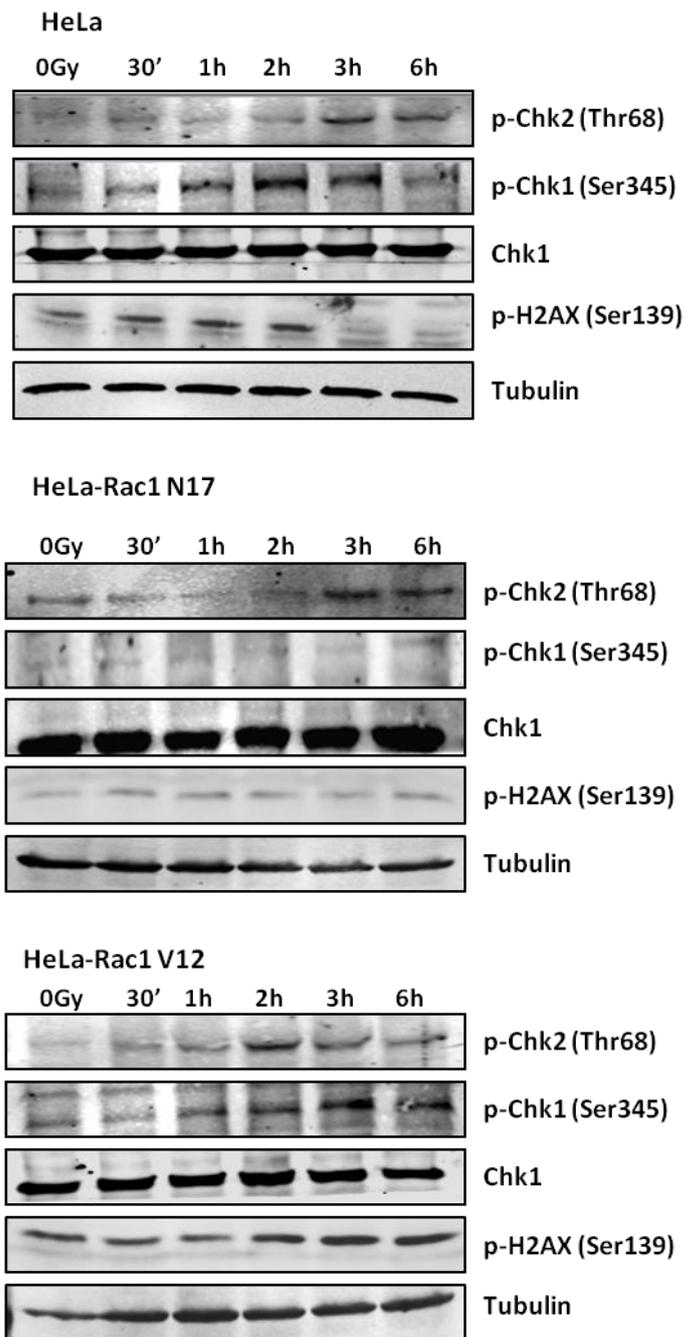


Figura 35 – Modulação negativa da fosforilação da histona H2AX, Chk1 e Chk2 no clone HeLa-Rac1 N17. As linhagens mutantes dominante negativo HeLa-Rac1 N17, constitutivamente ativo HeLa-Rac1 V12 e HeLa parental foram plaqueadas em placas de 100mm, 24h antes da exposição a 2Gy de radiação gama. As células foram lisadas nos diferentes tempos após a radiação e as proteínas foram analisadas por imunoblot fosfo-Histone H2AX (Ser139) R&D systems, p-Chk1 (Ser345), p-Chk2 (Thr68), Chk1 (Cell Signaling). Os imunoblots são os representativos de três experimentos independentes para os ensaios com p-H2AX e de dois experimentos independentes para os ensaios com p-Chk1, p-Chk2 e Chk1.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo analisamos o envolvimento das GTPases RhoA e Rac1 na resposta celular da linhagem HeLa de adenocarcinoma de cérvix humano exposta a radiação gama. Para essa finalidade foram geradas sublinhagens estáveis de clones mutantes, os quais conferem à estas proteínas características bioquímicas de dominante negativa (HeLa-RhoA N19 e HeLa-Rac1 N17) ou de constitutivamente ativa (HeLa-RhoA V14 e HeLa-Rac1 V12), além de alguns clones controles (HeLa-Mock e HeLa-RhoA-WT). As mutações são equivalentes as encontradas naturalmente na proteína oncogênica de Ras, onde Ras V12 apresenta ganho de função (constitutivamente ativo; Gly→Val na posição 12) e Ras N17 perda de função (dominante negativo; Ser→Asn na posição 17), estas mutações estão localizadas no loop de ligação do fosfato do GTP o que permite conferir as características dos mutantes (Qiu et al., 1995; Ridley et al., 1992).

➤ Envolvimento da GTPase RhoA na resposta aos efeitos da exposição celular a radiação gama

Inicialmente pudemos observar que a própria linhagem parental HeLa apresenta atividade aumentada de RhoA, ou seja, altos níveis de RhoA-GTP quando em crescimento assíncrono sob condições normais de cultura. Uma vez que a proteína RhoA GTPase já foi encontrada super-expressa ou com atividade aumentada em vários tipos de câncer, como por exemplo câncer de mama, pulmão e de cólon retal (Leve and Morgado-Diaz, 2012; Ridley, 2013), nossos achados em HeLa estão dentro do esperado em se tratando de uma célula tumoral. Também Xia e Land demonstraram que em células murinas e humanas deficientes em p53 e com

atividade de Ras aumentada, há um aumento dos níveis de RhoA-GTP e da migração celular. Pois com a ausência de p53, a ativação de p190-RhoGAP (enzima que catalisa a hidrólise de GTP para GDP inativando a GTPase, específica para RhoA) fica prejudicada, aumentando-se assim os níveis de RhoA intracelular ativa, aumentando-se a formação de fibras de stress e a migração (Xia and Land, 2007).

Em um trabalho muito recente, Todorovic e colaboradores demonstraram que a proteína E7 do papiloma vírus HPV16 é capaz de atuar como regulador negativo da p190-RhoGAP, no entanto ainda não se sabe qual é o mecanismo envolvido nesta atividade. Os autores observaram que a interação da proteína E7 com p190-RhoGAP leva a alterações no citoesqueleto, pois não há a redução dos níveis de RhoA-GTP intracelular, devido a inibição da GAP pela interação com a proteína E7 (Todorovic et al., 2014). Dessa forma, como a célula HeLa que utilizamos em nosso trabalho também contém a sequência do vírus HPV, pode ser que os níveis altos de RhoA ativo encontrados na célula, possa ser resultante de uma possível interação inibitória da proteína E do vírus com a proteína p190-RhoGAP, levando ao aumento dos níveis de RhoA-GTP intracelular.

Outros trabalhos da literatura demonstraram que mutação em p53 também induz a um ganho de atividade de determinadas proteínas-chave que participam da regulação de RhoA, como por exemplo, a indução da expressão da GEF-H1 (enzima que catalisa a troca de GDP por GTP ativando a GTPase, específica para RhoA), levando a maior atividade de RhoA (Mizuarai et al., 2006). Dessa forma podemos inferir que provavelmente em HeLa parental, os altos níveis de RhoA ativa encontrados podem ser decorrentes de efeitos na redução da ativação de GAP-190 e/ou do aumento na expressão de GEF-H1, via redução da ativação por p53, uma

vez que essa linhagem celular é mutante para p53 (Mizuarai et al., 2006; Xia and Land, 2007) .

Os clones mutantes RhoA V14 e RhoA N19 apresentaram mudanças morfológicas em relação a linhagem HeLa parental como um volume maior e mais espalhadas. Uma vez que a proteína RhoA GTPase, está intimamente relacionada a reorganização do citoesqueleto, formação de fibras de stress e migração celular via ativação da polimerização da actina, observar alteração morfológica dos mutantes em relação a HeLa parental é desejável e esperado (Jaffe and Hall, 2005; Ren et al., 1999), porém o impacto destes efeitos morfológicos nos processos de detecção e reparo de DNA lesado por radiação ionizante gama não são muito explorados na literatura. No entanto, na literatura há trabalhos onde RhoA é ativada em resposta a danos no DNA provocado por um radiomimético, a toxina CDT, induzindo quebras de fita dupla no DNA, assim como a radiação gama. Observou-se que RhoA é ativada quando células são expostas a essa toxina, sendo a ativação de RhoA dependente de ATM. Os danos no DNA induzidos pelo CDT são reparados pelas vias clássicas de reparo de quebras duplas no DNA, a Recombinação Homóloga e a Recombinação não-homóloga (Fahrer et al., 2014; Frisan et al., 2003; Guerra et al., 2008).

O mutante dominante negativo HeLa-RhoA N19 apresentou menor ativação de RhoA e também apresentou reduzida migração celular sob condições normais de crescimento, em relação a HeLa parental e o mutante constitutivamente ativo HeLa-RhoA V14, demonstrando a funcionalidade da sublinhagem mutante. Em células tronco hematopoiéticas (HSC), a mesma mutação em RhoA a qual confere característica dominante negativa, também foi observada a redução da migração celular; no entanto essa inibição de RhoA foi seguida de aumento da proliferação

celular via alteração do ciclo celular, pois houve aumento da expressão da ciclina D1 e redução dos níveis de p21 (Ghiaur et al., 2006).

No geral, nossos resultados obtidos indicam que RhoA GTPase, em células HeLa, é ativada em resposta a danos no DNA induzidos pela radiação gama, seja por efeitos diretos ou indiretos, que levam a quebras nas fitas do DNA. Esses dados vão de acordo com a rara literatura relacionada, uma vez que a utilização de uma toxina bacteriana a qual mimetiza a quebra de fita dupla da DNA gerada pela radiação gama (um radiomimético), também leva a ativação de RhoA GTPase em células HeLa. Nesse trabalho os autores discutem que a ativação de RhoA observada é dependente ATM (ataxia telangiectasia mutated - principal regulador do reparo do DNA a danos induzidos por radiação gama) (Frisan et al., 2003).

Como a radiação gama, de maneira indireta, também pode levar a formação de danos no DNA pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), através da radiólise da água intracelular (Azzam et al., 2012), RhoA em nossas células HeLa também pode estar sendo regulada positivamente por ROS, resultante da exposição das células ao tratamento com radiação gama. Similarmente, mostrou-se que em células de fibroblasto de rato REF-52 RhoA é ativada diretamente por ROS (Aghajanian et al., 2009). E também que em células de fibroblasto de pulmão humano (HFL-1), foi observado que ROS é capaz de induzir a ativação de RhoA, pois está envolvida na dissociação da interação de RhoA e GDI (proteína que sequestra RhoA da membrana celular para o citoplasma, impedindo sua ativação). Nestas células, RhoA ativa está envolvida no aumento da síntese de colágeno (Kondrikov et al., 2011). Reforçando a hipótese de que a ativação de RhoA em nossas células HeLa, possa estar sendo modulada por ROS.

Em outro trabalho, Guerra e colaboradores demonstraram que RhoA é ativada em resposta a danos no DNA promovidos por radiação gama (usada como controle) ou pela toxina bacteriana CDT (cytoletal distending toxin), ativação esta mediada pela ação da GEF Net1, normalmente encontrada no núcleo celular. Quando a ativação de Net1 é inibida observa-se redução da ativação de RhoA, seguida de redução da formação de fibras de stress, após tratamento das células com a toxina CDT ou exposição a radiação gama (Guerra et al., 2008).

Outra resposta que observamos em nossos experimentos foi a redução na proliferação celular e do número de colônias de ambos os clones mutantes de RhoA, em relação a linhagem parental HeLa na situação controle (onde as células não foram submetidas a radiação gama) e também quando as células foram submetidas ao tratamento com a radiação gama. Esses resultados de capacidade proliferativa e sobrevivência reduzidas podem ser explicadas devido a alterações no ciclo celular, uma vez que RhoA também atua na regulação do ciclo celular através da regulação da expressão de ciclina D1, ou indução de apoptose (Watts et al., 2006) os quais vão de acordo com os resultados observados para ambos clones mutantes, que apresentaram maiores porcentagens de células apoptóticas e o clone mutante RhoA N19 apresentou um acúmulo maior de células na fase G1 do ciclo celular. Assim como em células de fibroblasto de rato (Swiss 3T3), expressando o mutante constitutivamente ativo de RhoA (RhoA V14) há também redução na proliferação celular e essa redução se deve a uma alteração no ciclo celular, pois os autores observaram que nestas células expressando RhoA V14, há redução da ativação de ERK e conseqüente levando a redução da indução da expressão de ciclina D1, resultando no atraso das células na entrada da fase S e levando a um acúmulo de células na fase G1 do ciclo celular (Morin et al., 2009).

Uma das propostas desta tese ao usar tratamentos com radiação ionizante gama nas células, os quais sabidamente levam a danos do tipo quebras ao DNA (Vignard et al., 2013) é investigar se a GTPase RhoA pode modular mecanismos gerais ou vias específicas de reparo de DNA. A princípio podemos afirmar que RhoA modula o reparo do DNA, uma vez que observamos no mutante constitutivamente ativo (RhoA V14) um adiantamento do início do reparo e no mutante dominante negativo (RhoA N19) atraso do início do reparo, além de encontrarmos menores níveis de DNA fragmentado no clone RhoA V14, tanto em condições basais (controle) quanto nas células irradiadas, como observado pelos ensaios cometa. A modulação de RhoA no reparo também foi observada no clone RhoA N19, onde observamos que o atraso no início do reparo foi maior quando observamos o ensaio cometa neutro (específico para quebras duplas das fitas do DNA), indicando que provavelmente RhoA esteja modulando positivamente o reparo do DNA, mais especificamente o reparo de quebras duplas. Já que células tratadas com a toxina CDT, que induz quebras de fita duplas no DNA levando a ativação da maquinaria de resposta a danos no DNA, a inibição da ativação de RhoA pela toxina C3 ou utilização de clone RhoA N19 levou a sensibilização celular (Fahrer et al., 2014; Frisan et al., 2003; Guerra et al., 2008)

Dando continuidade e aprofundando os resultados obtidos com o ensaio cometa, os ensaios de reparo de DNA exógeno (quantificado pela expressão da proteína GFP) incorporado pelas células HeLa, apontam e reforçam o papel de RhoA na modulação do reparo. Assim, a inibição da ativação de RhoA pela exoenzima ou toxina botulínica C3 reduziu drasticamente o reparo de danos de quebra dupla do DNA, induzidos pela enzima de restrição I-SceI, realizado pela via de recombinação homóloga (HR), muito mais afetada em comparação com a via da

recombinação não-homóloga (NHEJ). Esses dados vão de acordo com os observados com o ensaio cometa, principalmente o cometa neutro, onde observamos atraso no início da recuperação do dano no DNA e também não observamos redução total da fragmentação do DNA. Provavelmente RhoA GTPase esteja modulando o reparo do DNA, via ativação de p38 MAPK, pois em células HeLa tratadas com a toxina CDT ou 20 Gy de radiação gama, a inibição de RhoA pelo por siRNA ou com a toxina C3 leva a redução da ativação de p38 MAPK e consequente sensibilização celular, já que p38 MAPK faz parte da rede de resposta a danos no DNA (Guerra et al., 2008; Reinhardt and Yaffe, 2009).

Em células de fibroblasto humano RG37, o ensaio de reparo de DNA exógeno demonstrou que o silenciamento de uma outra Rho GTPase, a RhoB, por siRNA leva a uma redução significativa no reparo por recombinação homóloga (HR), porém este silenciamento não surtiu efeitos no reparo por recombinação não-homóloga (NHEJ), indicando que RhoB está envolvida na promoção do reparo por recombinação homóloga (Mamouni et al., 2014). A inibição mais acentuada da recombinação homóloga (HR), obtida em nosso trabalho, quando inibimos a ativação de RhoA com a toxina C3 pode ser reflexo da ação de RhoB, pois a toxina C3 além de inibir a ativação de RhoA, também inibe RhoB (Aktories et al., 2004), dessa forma a redução acentuada pode ser o somatório dos efeitos das duas inibições, a de RhoA e de RhoB.

Dados contidos na literatura atual relacionam ativação de RhoA com o reparo de danos no DNA provocados pela ação de espécies reativas de oxigênio. Em células de fibroblasto humano (MRC5) e fibroblasto embrionário murino (MEF), quando expostas ao agente oxidante GOx (agente que aumenta os níveis de ROS e danos oxidativos no DNA), há aumento dos níveis de RhoA ativo (RhoA-GTP).

Quando as células são expostas a espécies reativas de oxigênio, ocorre formação de mutações de bases do DNA e a mutação 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG) é encontrada em maior número. A 8-oxoG é removida do DNA pela via de reparo de excisão de base - BER, iniciada por 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1). Os autores do trabalho, demonstraram que a interação física entre OGG1 e 8-oxoG forma um complexo que atua como uma GEF (enzima que catalisa a troca de GDP por GTP) ativando RhoA, a qual leva em seguida a formação de fibras de stress e mudanças da morfologia celular (Luo et al., 2014).

Outro trabalho demonstrou que a proteína FEN1, que tem atividade exonucleasica e pertence a via de reparo de BER, é ativada em resposta a danos no DNA induzidos pela toxina CDT. A proteína FEN1 tem capacidade de se ligar diretamente a proteína GDI (GDP dissociation inhibitor), a qual sequestra RhoA para o citoplasma impedindo a sua ativação. A interação de FEN1 com a GDI, impede com que a proteína GDI se ligue a RhoA, levando ao aumento dos níveis de RhoA GTP em resposta ao dano no DNA (Guerra et al., 2011). Uma vez que um dos efeitos da exposição celular a radiação gama é a produção de ROS, dessa forma também pode ocorrer a indução de danos oxidativos no DNA, dentre eles a formação de 8-oxoG (Breen and Murphy, 1995) e possa estar ocorrendo em nossas células HeLa o mesmo fenômeno de ativação de RhoA por OGG1 e 8-oxoG.

Quando expomos as células a dose de 15 Gy, observamos alteração do perfil de células no ciclo celular; há um acúmulo significativo de células na fase G1 e conseqüentemente redução de células na fase G2 do ciclo celular. Dessa forma optamos por analisar os níveis de ativação das proteínas Chk1 e Chk2, as quais estão envolvidas na regulação da parada do ciclo celular (Reinhardt and Yaffe, 2009).

Uma atenuação na ativação das proteínas reguladoras da parada do ciclo celular foi observada no clone mutante HeLa-RhoA N19, no qual há uma diminuição da ativação por fosforilação de Chk1 (Ser 345) e Chk2 (Thr 68) em resposta aos efeitos da radiação gama (15 Gy). Em células tronco embrionárias (ES) de ratos deficientes em Chk2 (Chk2 knockout), Hirao e colaboradores observaram uma grande redução do número de células na fase G2 e na entrada prematura em mitose, quando as células foram submetidas a radiação gama com dose de 10 Gy (Hirao et al., 2000). Dessa forma podemos inferir que, de maneira semelhante as células ES deficientes em Chk2, a sublinhagem HeLa-RhoA N19 apresenta redução da fosforilação de Chk1/2, a qual leva a redução do número de células na fase G2 quando as células são submetidas a radiação gama.

Um resultado surpreendente e inesperado que obtivemos em células parentais HeLa e em todos os clones para RhoA, foi que observamos redução dos níveis totais da proteína Chk2 já 30 minutos após exposição a radiação gama. Essa variação na proteína total Chk2 foi observada pela primeira vez por Schwarz e colaboradores em 2003, quando submeteram as células HeLa a 10Gy de radiação gama; mas no entanto ainda não se sabe muito bem o porquê dessa redução (Schwarz et al., 2003). Em células de câncer de ovário (A2780) quando tratadas com cisplatina, que é um agente antitumoral indutor de danos no DNA, também há uma redução dos níveis de Chk2 mediada via ubiquitina-proteassoma (Zhang et al., 2005). Células de câncer de coloretal (HCT15) quando tratada com radiomimético NSC (neocarzinostatina, induz quebras de fita dupla no DNA), também ocorre redução dos níveis de Chk2 via aumento da atividade da ubiquitina-proteassoma (Kass et al., 2007). Dessa forma, podemos inferir que RhoA não está interferindo na estabilidade da proteína Chk2.

Com os dados obtidos podemos inferir que RhoA está regulando o ciclo celular através da regulação da ativação das proteínas Chk1 e Chk2, uma vez que observamos redução da fosforilação destas proteínas quando submetemos o clone dominante negativo RhoA N19 a radiação gama. As proteínas Chk1/2 são de extrema importância para regulação dos pontos de checagem do ciclo celular, atuando na indução da degradação proteína fosfatase Cdc25 o que faz com que a progressão do ciclo celular pare (Bartek and Lukas, 2001; Deckbar et al., 2011). Com isso, a redução da ativação de Chk1/2 no clone RhoA N19, leva a redução da degradação de Cdc25, a qual por sua vez continua defosforilando a proteína Cdk impedindo a parada do ciclo celular, mesmo quando a célula é exposta a radiação gama, impedindo que os danos no DNA sejam reparados. Por essa ação, observamos no clone RhoA N19 mais danos do DNA no ensaio cometa e redução drástica da via de reparo HR e NHEJ quando utilizamos inibidor da ativação de RhoA.

Quando avaliamos os níveis de ativação da histona H2AX, que é um marcador de dano que quebra de fita dupla do DNA, notamos que quando submetemos as células a 15 Gy, não houve alteração da cinética de ativação de γ -H2AX nos clones RhoA N19 e RhoA V14 em relação a célula parental HeLa, apesar da redução da ativação de Chk1 e Chk2 no clone mutante RhoA N19. Esses resultados podem ser reflexo da ativação de uma outra Rho GTPase, a RhoB, a qual é ativada em resposta a danos no DNA provocados por camptotecina (agente indutor de quebras de fita dupla no DNA). A GTPase RhoB promove a defosforilação da γ -H2AX através da ativação da fosfatase PP2A, promovendo também o reparo do DNA (Mamouni et al., 2014). No entanto quando utilizamos o inibidor de ativação de RhoA a toxina C3, notamos aumento sensível dos níveis de γ -H2AX, o que também

pode ser reflexo da ação da GTPase RhoB. Já que a toxina C3 também inibe a ativação de RhoB (Aktories et al., 2004), e como a deficiência de RhoB promove a persistência da γ -H2AX em células tratadas com camptotecina (Mamouni et al., 2014), provavelmente quando utilizamos a toxina C3 na célula HeLa, inibimos a ativação de RhoA e RhoB, levando a persistência da γ -H2AX.

➤ **Envolvimento da GTPase Rac1 na resposta celular das células expostas a radiação gama**

Nesta tese também determinamos o comportamento da pequena GTPase Rac1 frente aos efeitos provocados pela exposição a radiação gama. Similarmente ao que ocorre com RhoA, observamos que Rac1 também é ativada quando as células HeLa são expostas a diferentes doses de radiação gama, ativação esta já observada em células de câncer de mama MCF-7 expostas a radiação gama. Diferentemente do que ocorre em células de câncer de pâncreas AsPC, Capan1 e CD18/HPAF, as quais possuem Rac1 superexpressa e os níveis de Rac1 ativo também é alto, quando essas células são expostas a radiação gama não há variação da ativação de Rac1, permanecendo alto (Yan et al., 2012; Yan et al., 2014).

Os clones mutantes de Rac1, assim como os mutantes de RhoA, apresentaram redução da taxa de sobrevivência celular, quando as células foram expostas a radiação gama. Porém, os clones Rac1-V12 e Rac1-N17 foram mais sensíveis frente aos efeitos da radiação gama, pois ambas sublinhagens clonais apresentaram significativa redução da fração de sobrevivência celular em relação a célula parental HeLa. De maneira diferente aos nossos foi observado na literatura,

que em fígado de camundongos knockout para Rac1, o tratamento com doxorubicina (a qual é uma droga que inibe a topoisomerase II resultando na formação de quebras de fita dupla no DNA) levou a um aumento da proliferação celular em células tratadas com doses agudas de doxorubicina. Os autores observaram que o knockout Rac1, apresentou aumento de células apoptóticas na condição basal (sem tratamento com doxorubicina), no entanto 1 semana após ao tratamento não foi observado diferença entre as amostras Rac1 selvagem e Rac1 knockout, os autores observaram diferenças significativas quando analisaram a porcentagem de células apoptóticas 96 h após ao tratamento, onde Rac1 knockout apresentou mais apoptose. Foram observados também os níveis de apoptose desses animais Rac1 knockout, 96 h após serem expostos a 6 Gy de radiação gama e foi constatado que também há aumento de apoptose nos Rac1 knockouts (Bopp et al., 2013). Da mesma maneira observamos em nossos resultados, onde o clone Rac1 N17 apresenta maior porcentagem de células apoptóticas em relação a célula parental HeLa, tanto no controle sem tratamento assim como quando as células foram expostas a radiação gama, no entanto o clone Rac1 V12 possui porcentagem semelhante a Rac1 N17 em todas as situações.

Debidda e colaboradores (2006) observaram que mutações em Rac1, as quais conferem característica Rac1 dominante negativo ou constitutivamente ativo em fibroblasto embrionário de camundongo (MEF) são prejudiciais para proliferação celular através da desregulação do ciclo celular, indução de apoptose e senescência celular (Debidda et al., 2006). Em células de câncer de mama MCF-7 a inibição farmacológica de Rac1, bem como a expressão exógena de Rac1-N17 e siRNA para Rac1, levam a um aumento da sensibilidade das células aos efeitos da radiação gama promovendo indução de apoptose. E em células de câncer de pâncreas

expressando exogenamente Rac1-N17, assim como o inibidor farmacológico de Rac1 NSC23766, os mesmos efeitos são observados (Yan et al., 2012; Yan et al., 2014), o que sustenta em muito nossos resultados na linhagem HeLa.

Estes dados nos levam a inferir que Rac1 GTPase, em nosso sistema experimental, é importante para sobrevivência e proliferação celular frente a exposição de células HeLa a radiação gama. Isto porque ensaios de sobrevivência e proliferação celular indicaram que o clone dominante negativo HeLa-Rac1 N17, apresenta uma menor proliferação e sobrevivência em relação a HeLa e no entanto, esta redução não foi significativamente menor que no mutante constitutivamente ativo HeLa-Rac1 V12, a qual foi significativamente menor que na linhagem HeLa. Isto sugere que a ciclagem de Rac1 entre GDP e GTP é importante para a homeostase celular (em termos de sobrevivência e proliferação) quando submetidas a radiação gama.

Rac1 também pode ser ativada pelo complexo OGG1 e 8-oxoG, demonstrando que não somente RhoA, mas também Rac1 tem relação direta com a via de reparo por excisão de base - BER. Como Rac1 também está envolvida no controle da NADPH-oxidase 4 (Nox4), os autores observaram que o aumento de Rac1 ativo na célula via complexo OGG1 e 8-oxoG, levou ao aumento de ROS intracelular via regulação da Nox4 pela Rac1 ativa. Os autores demonstraram que Rac1, NOX4 e OGG1 estão localizados perto umas das outras na membrana nuclear, e que devido a essa proximidade leva a um aumento localizado de ROS, via ativação de Rac1 através da ação iniciada pela OGG1 pela ativação da resposta do dano no DNA. Os autores especulam também que a falha do controle da atividade de OGG1, possa levar a excisão excessiva de 8-oxoG do DNA, levando a hiperativação de Rac1 resultando processos biológicos como senescência,

processos de envelhecimento e outras respostas celulares (Hajas et al., 2013). Dessa maneira, em nossas células Rac1 pode também estar sendo ativada pelo o complexo OGG1 e 8-oxoG, já que assim como descrito anteriormente, a exposição celular a radiação gama leva a formação de ROS e conseqüentemente a indução de danos no DNA (8-oxoG) (Breen and Murphy, 1995), demonstrando a existência de mais uma via de regulação da atividade de Rac1.

Quando investigamos a ativação por fosforilação de proteínas que fazem parte das vias de resposta a danos no DNA (DDR), observamos que Rac1 está modulando não somente a fosforilação da histona H2AX (Ser139), mas também a fosforilação de Chk1 (Ser-345), pois quando a sublinhagem dominante negativa Rac1 N17 foi submetida a radiação gama não apresentou fosforilação da γ H2AX e Chk1. Já na sublinhagem constitutivamente ativa (Rac1 V12) apresentou maior tempo de fosforilação da γ H2AX (mais prolongada) em comparação a linhagem parental HeLa, o mesmo ocorrendo para fosfo-Chk1.

Interessantemente, Kang e colaboradores demonstraram que a histona H2AX por si só pode induzir a formação de ROS através da via Nox1/Rac1. Os autores submeteram as células a um composto mimético aos efeitos da radiação gama e com isso observaram que há dois eventos de formação de ROS. O primeiro evento é concomitante a exposição das células ao composto, o segundo evento é via complexo histona H2AX/Nox1/Rac1. Nesse segundo evento de formação de ROS, a histona H2AX se liga a proteína 14-3-3 zeta, esta proteína se liga a NoxA1 atuando como inibidor de Nox1. A atividade Nox1 é dependente de Rac1 ativo, dessa forma ROS é formada através da ativação de Rac1 e Nox1, via sequestro da proteína 14-3-3 zeta pela histona H2AX, a qual foi ativada através da ação do radiomimético (Kang et al., 2012). Dessa forma na sublinhagem mutante constitutivamente ativa Rac1

V12, a persistência da ativação da histona H2AX possa estar sendo fruto de um possível aumento dos níveis de ROS intracelular, os quais induzem danos ao DNA que é sinalizado pelo aumento da fosforilação da histona H2AX.

Já a redução da fosforilação de Chk1 no clone mutante Rac1 N17, quando exposta a radiação gama, também foi observada por Yan e colaboradores em dois trabalhos diferentes. Eles mostraram que as células MCF-7 tratadas com inibidor farmacológico de Rac1 e células CD18/HPAF expressando exogenamente Rac1 dominante negativo (Rac1 N17), também há uma redução da fosforilação de Chk1 quando as células são submetidas a radiação gama, levando a menor ativação do checkpoint G2/M e dessa forma sensibilizado também as células aos efeitos da radiação gama (Yan et al., 2012; Yan et al., 2014), como supostamente está ocorrendo em nosso sistema celular.

Dessa forma, podemos inferir que em nosso sistema experimental Rac1 possa de alguma maneira interferir na ativação de Chk1 e da histona H2AX, através da modulação da ATM e ATR, já que ambas fazem a ativação das proteínas Chk1 e histona H2AX. Pois Yan e colaboradores observaram em seus dois trabalhos, que a inibição da ativação de Rac1 leva a atenuação da ativação de ATM e ATR em resposta aos efeitos ocasionados pela radiação gama (Yan et al., 2012; Yan et al., 2014).

Foi demonstrado que o knockout de Rac1 no fígado de camundongo, leva a redução da fosforilação de histona H2AX, quando o animal foi tratado com doxorubicina, no entanto quando o animal Rac1 knockout foi irradiado com 6 Gy de radiação gama, não foi observada variação da ativação de γ -H2AX em relação ao controle não tratado 24 h após ao tratamento. Os autores discutem que essa modulação da γ -H2AX pela Rac1, seja dependente do tipo do agente genotóxico

(Bopp et al., 2013). Esses dados vão de encontro com os observados em nosso trabalho, pois observamos redução extremamente significativa da γ -H2AX nos clones Rac1 N19, essa diferença pode ser reflexo da cinética utilizada nos trabalhos e também pode ser tecido específico, em nosso trabalho utilizamos sublinhagens clonais de células HeLa. Nesse mesmo trabalho, Bopp e colaboradores, demonstraram que Rac1 knockout modula a expressão gênica de proteínas reguladoras da progressão do ciclo celular (p21, ciclina E), choque térmico (Hsp701b) e reparo do DNA (Fen, TopoII, XPV e WRN), quando tratados com doxorubicina ou radiação gama (Bopp et al., 2013; Fritz and Kaina, 2013). Lançando a hipótese que em nosso sistema de estudo, a expressão gênica de proteínas reguladoras do ciclo celular e de reparo de DNA possam estar sendo reguladas, já que observamos modulação na regulação do ciclo celular, na sobrevivência celular e no reparo do DNA.

Em cardiomioblastos de rato H9c2, a inibição da ativação de Rac1 pela droga lovastatina e pelo NSC23766, reduziram a fosforilação da histona H2AX das células tratadas com doxorubicina (inibidor da topoisomerase II). Nestas células, H9c2, a GTPase Rac1 estaria mediando a fosforilação da histona H2AX através da via SAPK/JNK (stress-activated protein kinase/ Jun amino-terminal kinase) (Huelsenbeck et al., 2011). Desta mesma forma, a redução que observamos na fosforilação da histona H2AX em nosso clone Rac1 N17, quando o submetemos ao agente de dano no DNA (radiação gama), nos permite inferir que Rac1 possa estar modulando a regulação da fosforilação de H2AX, também através da via SAPK/JNK.

6. CONCLUSÕES

Nesse trabalho demonstramos o envolvimento das proteínas RhoA GTPase e Rac1 GTPase na resposta celular aos efeitos resultantes da exposição a radiação gama. Observamos que em células HeLa, as pequenas GTPases RhoA e Rac1 são ativadas em resposta aos efeitos da radiação gama.

Em relação a GTPase RhoA, observamos que os clones mutantes demonstraram reduzida taxa de proliferação e sobrevivência em relação a células HeLa, expostas ou não a radiação gama. No entanto, o mutante deficiente para RhoA apresentou maior redução em relação ao mutante proficiente em RhoA, a qual pôde ser observada nas diferenças do ciclo celular entre estas células, mais acentuadas ainda quando as células são expostas a maiores doses de radiação gama. Dessa forma podemos inferir que modular (positiva ou negativamente) a atividade de RhoA em células HeLa prejudica a proliferação celular.

Os níveis de danos do tipo quebras e a eficiência de reparo do DNA de células HeLa também foram afetados quando se reduz a atividade de RhoA, pois o mutante deficiente desta GTPase apresentou um retardamento do início do reparo. Tal mediação de RhoA sobre reparo do DNA também pôde ser observado no ensaio de reparo por HR ou NHEJ, onde a inibição de RhoA levou a uma redução significativa da taxa de reparo do DNA.

RhoA pode estar modulando o reparo do DNA através da regulação da fosforilação de Chk1 e Chk2, proteínas as quais são essenciais para sinalização de parada nos pontos de checagem do ciclo celular e ativação de vias de reparo, uma vez que no mutante deficiente em RhoA a ativação de Chk1/2 é reduzida.

Em relação a GTPase Rac1, tanto os clones proficientes como deficientes desta enzima apresentaram significativa redução da proliferação e sobrevivência

celular em relação a linhagem parental HeLa. Porém, clones mutantes deficientes de Rac1 levaram a prejuízos ainda maiores a proliferação e sobrevivência em relação aos clones mutantes proficientes desta GTPase.

Rac1 também pode regular os níveis de danos através da modulação do reparo do DNA, pois quando submetemos as células a tratamentos com radiação gama o clone dominante negativo Rac1 N17, apresentou níveis mais altos de danos no DNA em relação a HeLa parental e ao mutante constitutivamente ativo Rac1 V12, que por sua vez é o mais eficiente em reparar estes danos.

A mediação dos mecanismos de reparo de DNA pela GTPase Rac1 pode estar ocorrendo através do controle indireto da fosforilação da histona H2AX (Ser139) e Chk1 (Ser345), via modulação da ativação de ATM e/ou ATR, em resposta a radiação gama.

Por fim, de acordo com nossos resultados e suas correlações com dados da literatura, podemos afirmar que RhoA e Rac1 possuem funções biológicas que vão além da regulação da dinâmica do citoesqueleto, sendo também importantes na mediação de mecanismos nucleares de reparo de DNA após estresse genotóxico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aghajanian, A., Wittchen, E.S., Campbell, S.L., and Burridge, K. (2009). Direct activation of RhoA by reactive oxygen species requires a redox-sensitive motif. *PLoS One* 4, e8045.
- Aktories, K., Wilde, C., and Vogelsgesang, M. (2004). Rho-modifying C3-like ADP-ribosyltransferases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 152, 1-22.
- An, J., Huang, Y.C., Xu, Q.Z., Zhou, L.J., Shang, Z.F., Huang, B., Wang, Y., Liu, X.D., Wu, D.C., and Zhou, P.K. (2010). DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression. *BMC Mol Biol* 11, 18.
- Azqueta, A., and Collins, A.R. (2013). The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch Toxicol* 87, 949-968.
- Azzam, E.I., Jay-Gerin, J.P., and Pain, D. (2012). Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett* 327, 48-60.
- Bartek, J., Falck, J., and Lukas, J. (2001). CHK2 kinase--a busy messenger. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 877-886.
- Bartek, J., and Lukas, J. (2001). Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 13, 738-747.
- Bartek, J., and Lukas, J. (2007). DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol* 19, 238-245.
- Batista, L.F., Kaina, B., Meneghini, R., and Menck, C.F. (2009). How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. *Mutat Res* 681, 197-208.
- Benard, V., Bohl, B.P., and Bokoch, G.M. (1999). Characterization of rac and cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. *J Biol Chem* 274, 13198-13204.
- Bennardo, N., Gunn, A., Cheng, A., Hasty, P., and Stark, J.M. (2009). Limiting the persistence of a chromosome break diminishes its mutagenic potential. *PLoS Genet* 5, e1000683.
- Bernstein, K.A., and Rothstein, R. (2009). At loose ends: resecting a double-strand break. *Cell* 137, 807-810.
- Bishop, A.L., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2, 241-255.
- Blanpain, C., Mohrin, M., Sotiropoulou, P.A., and Passegue, E. (2011). DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. *Cell stem cell* 8, 16-29.
- Bopp, A., Wartlick, F., Henninger, C., Kaina, B., and Fritz, G. (2013). Rac1 modulates acute and subacute genotoxin-induced hepatic stress responses, fibrosis and liver aging. *Cell Death Dis* 4, e558.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Breen, A.P., and Murphy, J.A. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* 18, 1033-1077.
- Calini, V., Urani, C., and Camatini, M. (2002). Comet assay evaluation of DNA single- and double-strand breaks induction and repair in C3H10T1/2 cells. *Cell Biol Toxicol* 18, 369-379.
- Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 729-740.

- Cleaver, J.E. (2011). gammaH2Ax: biomarker of damage or functional participant in DNA repair "all that glitters is not gold!". *Photochem Photobiol* 87, 1230-1239.
- Cline, S.D., and Hanawalt, P.C. (2003). Who's on first in the cellular response to DNA damage? *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 361-372.
- Collado, M., and Serrano, M. (2006). The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer* 6, 472-476.
- Collins, A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26, 249-261.
- Costa, E.T., Forti, F.L., Matos, T.G., Dermargos, A., Nakano, F., Salotti, J., Rocha, K.M., Asprino, P.F., Yoshihara, C.K., Koga, M.M., *et al.* (2008). Fibroblast growth factor 2 restrains Ras-driven proliferation of malignant cells by triggering RhoA-mediated senescence. *Cancer Res* 68, 6215-6223.
- D'Amico, G., Robinson, S.D., Germain, M., Reynolds, L.E., Thomas, G.J., Elia, G., Saunders, G., Fruttiger, M., Tybulewicz, V., Mavria, G., *et al.* (2010). Endothelial-Rac1 is not required for tumor angiogenesis unless alphavbeta3-integrin is absent. *PLoS One* 5, e9766.
- Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.
- David, S.S., O'Shea, V.L., and Kundu, S. (2007). Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 447, 941-950.
- Debidda, M., Williams, D.A., and Zheng, Y. (2006). Rac1 GTPase regulates cell genomic stability and senescence. *J Biol Chem* 281, 38519-38528.
- Deckbar, D., Jeggo, P.A., and Lobrich, M. (2011). Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 46, 271-283.
- Dianov, G.L., and Parsons, J.L. (2007). Co-ordination of DNA single strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 6, 454-460.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., *et al.* (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9363-9367.
- Dubash, A.D., Guilluy, C., Srougi, M.C., Boulter, E., Burrridge, K., and Garcia-Mata, R. (2011). The small GTPase RhoA localizes to the nucleus and is activated by Net1 and DNA damage signals. *PLoS One* 6, e17380.
- Dusinska, M., and Collins, A.R. (2008). The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis* 23, 191-205.
- Ellenbroek, S.I., and Collard, J.G. (2007). Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clin Exp Metastasis* 24, 657-672.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516.
- Fahrer, J., Huelsenbeck, J., Jaurich, H., Dorsam, B., Frisan, T., Eich, M., Roos, W.P., Kaina, B., and Fritz, G. (2014). Cytolethal distending toxin (CDT) is a radiomimetic agent and induces persistent levels of DNA double-strand breaks in human fibroblasts. *DNA Repair (Amst)* 18, 31-43.
- Fernandez-Capetillo, O., Celeste, A., and Nussenzweig, A. (2003). Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors. *Cell Cycle* 2, 426-427.
- Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M., and Nussenzweig, A. (2004). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)* 3, 959-967.

- Forti, F.L., and Armelin, H.A. (2007). Vasopressin triggers senescence in K-ras transformed cells via RhoA-dependent downregulation of cyclin D1. *Endocr Relat Cancer* *14*, 1117-1125.
- Frank-Vaillant, M., and Marcand, S. (2002). Transient stability of DNA ends allows nonhomologous end joining to precede homologous recombination. *Mol Cell* *10*, 1189-1199.
- Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., and van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* *1*, 2315-2319.
- Friedberg, E.C., Aguilera, A., Gellert, M., Hanawalt, P.C., Hays, J.B., Lehmann, A.R., Lindahl, T., Lowndes, N., Sarasin, A., and Wood, R.D. (2006). DNA repair: from molecular mechanism to human disease. *DNA Repair (Amst)* *5*, 986-996.
- Frisan, T., Cortes-Bratti, X., Chaves-Olarte, E., Stenerlow, B., and Thelestam, M. (2003). The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin induces DNA double-strand breaks and promotes ATM-dependent activation of RhoA. *Cell Microbiol* *5*, 695-707.
- Fritz, G., and Kaina, B. (2013). Rac1 GTPase, a multifunctional player in the regulation of genotoxic stress response. *Cell Cycle* *12*, 2521-2522.
- Gabrys, D., Greco, O., Patel, G., Prise, K.M., Tozer, G.M., and Kanthou, C. (2007). Radiation effects on the cytoskeleton of endothelial cells and endothelial monolayer permeability. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* *69*, 1553-1562.
- Ghiaur, G., Lee, A., Bailey, J., Cancelas, J.A., Zheng, Y., and Williams, D.A. (2006). Inhibition of RhoA GTPase activity enhances hematopoietic stem and progenitor cell proliferation and engraftment. *Blood* *108*, 2087-2094.
- Gire, V., Roux, P., Wynford-Thomas, D., Brondello, J.M., and Dulic, V. (2004). DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *EMBO J* *23*, 2554-2563.
- Gohla, A., Harhammer, R., and Schultz, G. (1998). The G-protein G13 but not G12 mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho. *J Biol Chem* *273*, 4653-4659.
- Guerra, L., Carr, H.S., Richter-Dahlfors, A., Masucci, M.G., Thelestam, M., Frost, J.A., and Frisan, T. (2008). A bacterial cytotoxin identifies the RhoA exchange factor Net1 as a key effector in the response to DNA damage. *PLoS One* *3*, e2254.
- Guerra, L., Guidi, R., Slot, I., Callegari, S., Sompallae, R., Pickett, C.L., Astrom, S., Eisele, F., Wolf, D., Sjogren, C., *et al.* (2011). Bacterial genotoxin triggers FEN1-dependent RhoA activation, cytoskeleton remodeling and cell survival. *J Cell Sci* *124*, 2735-2742.
- Gunn, A., and Stark, J.M. (2012). I-SceI-based assays to examine distinct repair outcomes of mammalian chromosomal double strand breaks. *Methods Mol Biol* *920*, 379-391.
- Guo, D., Zhang, J.J., and Huang, X.Y. (2010). A new Rac/PAK/GC/cGMP signaling pathway. *Mol Cell Biochem* *334*, 99-103.
- Hajas, G., Bacsi, A., Aguilera-Aguirre, L., Hegde, M.L., Tapas, K.H., Sur, S., Radak, Z., Ba, X., and Boldogh, I. (2013). 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1 links DNA repair to cellular signaling via the activation of the small GTPase Rac1. *Free Radic Biol Med* *61*, 384-394.
- He, M., Cheng, Y., Li, W., Liu, Q., Liu, J., Huang, J., and Fu, X. (2010). Vascular endothelial growth factor C promotes cervical cancer metastasis via up-regulation and activation of RhoA/ROCK-2/moesin cascade. *BMC Cancer* *10*, 170.
- Heng, Y.W., and Koh, C.G. (2010). Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle. *Int J Biochem Cell Biol* *42*, 1622-1633.

- Hirao, A., Kong, Y.Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S.J., and Mak, T.W. (2000). DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 287, 1824-1827.
- Huelsenbeck, J., Henninger, C., Schad, A., Lackner, K.J., Kaina, B., and Fritz, G. (2011). Inhibition of Rac1 signaling by lovastatin protects against anthracycline-induced cardiac toxicity. *Cell Death Dis* 2, e190.
- Humpal, S.E., Robinson, D.A., and Krebs, J.E. (2009). Marks to stop the clock: histone modifications and checkpoint regulation in the DNA damage response. *Biochem Cell Biol* 87, 243-253.
- Hwang, S.Y., Jung, J.W., Jeong, J.S., Kim, Y.J., Oh, E.S., Kim, T.H., Kim, J.Y., Cho, K.H., and Han, I.O. (2006). Dominant-negative Rac increases both inherent and ionizing radiation-induced cell migration in C6 rat glioma cells. *Int J Cancer* 118, 2056-2063.
- Iden, S., and Collard, J.G. (2008). Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 846-859.
- Ihara, K., Muraguchi, S., Kato, M., Shimizu, T., Shirakawa, M., Kuroda, S., Kaibuchi, K., and Hakoshima, T. (1998). Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *J Biol Chem* 273, 9656-9666.
- Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 247-269.
- Jeggo, P.A., Geuting, V., and Lobrich, M. (2011). The role of homologous recombination in radiation-induced double-strand break repair. *Radiother Oncol* 101, 7-12.
- Kanaar, R., and Wyman, C. (2008). DNA repair by the MRN complex: break it to make it. *Cell* 135, 14-16.
- Kang, M.A., So, E.Y., Simons, A.L., Spitz, D.R., and Ouchi, T. (2012). DNA damage induces reactive oxygen species generation through the H2AX-Nox1/Rac1 pathway. *Cell Death Dis* 3, e249.
- Karagiannis, T.C., and El-Osta, A. (2004). Double-strand breaks: signaling pathways and repair mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 61, 2137-2147.
- Karlsson, R., Pedersen, E.D., Wang, Z., and Brakebusch, C. (2009). Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1796, 91-98.
- Kass, E.M., Ahn, J., Tanaka, T., Freed-Pastor, W.A., Keezer, S., and Prives, C. (2007). Stability of checkpoint kinase 2 is regulated via phosphorylation at serine 456. *J Biol Chem* 282, 30311-30321.
- Kastan, M.B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316-323.
- Katsube, T., Mori, M., Tsuji, H., Shiomi, T., Wang, B., Liu, Q., Neno, M., and Onoda, M. (2014). Most hydrogen peroxide-induced histone H2AX phosphorylation is mediated by ATR and is not dependent on DNA double-strand breaks. *J Biochem* 156, 85-95.
- Kondrikov, D., Caldwell, R.B., Dong, Z., and Su, Y. (2011). Reactive oxygen species-dependent RhoA activation mediates collagen synthesis in hyperoxic lung fibrosis. *Free Radic Biol Med* 50, 1689-1698.
- Leve, F., and Morgado-Diaz, J.A. (2012). Rho GTPase signaling in the development of colorectal cancer. *J Cell Biochem* 113, 2549-2559.
- Liang, C.C., Park, A.Y., and Guan, J.L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2, 329-333.

- Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U., and Schwarz, K. (2003). Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 712-720.
- Lim, S., and Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* 140, 3079-3093.
- Luo, J., Hosoki, K., Bacsi, A., Radak, Z., Hegde, M.L., Sur, S., Hazra, T.K., Brasier, A.R., Ba, X., and Boldogh, I. (2014). 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1-mediated DNA repair is associated with Rho GTPase activation and alpha-smooth muscle actin polymerization. *Free Radic Biol Med* 73, 430-438.
- Maddala, R., Reddy, V.N., Epstein, D.L., and Rao, V. (2003). Growth factor induced activation of Rho and Rac GTPases and actin cytoskeletal reorganization in human lens epithelial cells. *Mol Vis* 9, 329-336.
- Mamouni, K., Cristini, A., Guirouilh-Barbat, J., Monferran, S., Lemarie, A., Faye, J.C., Lopez, B.S., Favre, G., and Sordet, O. (2014). RhoB promotes gammaH2AX dephosphorylation and DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 34, 3144-3155.
- Mathon, N.F., and Lloyd, A.C. (2001). Cell senescence and cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 203-213.
- Mendenhall, M.D., and Hodge, A.E. (1998). Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1191-1243.
- Mirzaie-Joniani, H., Eriksson, D., Sheikholvaezin, A., Johansson, A., Lofroth, P.O., Johansson, L., and Stigbrand, T. (2002). Apoptosis induced by low-dose and low-dose-rate radiation. *Cancer* 94, 1210-1214.
- Mizuarai, S., Yamanaka, K., and Kotani, H. (2006). Mutant p53 induces the GEF-H1 oncogene, a guanine nucleotide exchange factor-H1 for RhoA, resulting in accelerated cell proliferation in tumor cells. *Cancer Res* 66, 6319-6326.
- Mladenov, E., Magin, S., Soni, A., and Iliakis, G. (2013). DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy. *Frontiers in oncology* 3, 113.
- Morin, P., Flors, C., and Olson, M.F. (2009). Constitutively active RhoA inhibits proliferation by retarding G(1) to S phase cell cycle progression and impairing cytokinesis. *Eur J Cell Biol* 88, 495-507.
- Moshous, D., Callebaut, I., de Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., Tezcan, I., Sanal, O., Bertrand, Y., Philippe, N., *et al.* (2001). Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* 105, 177-186.
- Nimnual, A.S., Taylor, L.J., Nyako, M., Jeng, H.H., and Bar-Sagi, D. (2010). Perturbation of cytoskeleton dynamics by the opposing effects of Rac1 and Rac1b. *Small GTPases* 1, 89-97.
- Norbury, C., and Nurse, P. (1992). Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem* 61, 441-470.
- Nurse, P. (2000). A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 100, 71-78.
- O'Connor, K., and Chen, M. (2013). Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion. *Small GTPases* 4, 141-147.
- O'Driscoll, M., and Jeggo, P.A. (2006). The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat Rev Genet* 7, 45-54.
- Padanilam, B.J. (2003). Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 284, F608-627.

- Pandita, T.K. (2014). Unraveling the novel function of the DNA repair enzyme 8-oxoguanine-DNA glycosylase in activating key signaling pathways. *Free Radic Biol Med* 73, 439-440.
- Park, C., Lee, I., Jang, J.H., and Kang, W.K. (2007). Inhibitory role of RhoA on senescence-like growth arrest by a mechanism involving modulation of phosphatase activity. *FEBS Lett* 581, 3800-3804.
- Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., and Bonner, W.M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 10, 886-895.
- Peng, G., and Lin, S.Y. (2011). Exploiting the homologous recombination DNA repair network for targeted cancer therapy. *World journal of clinical oncology* 2, 73-79.
- Podhorecka, M., Skladanowski, A., and Bozko, P. (2010). H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J Nucleic Acids* 2010.
- Qin, C., Chen, X., Bai, Q., Davis, M.R., and Fang, Y. (2014). Factors associated with radiosensitivity of cervical cancer. *Anticancer Res* 34, 4649-4656.
- Qiu, R.G., Chen, J., McCormick, F., and Symons, M. (1995). A role for Rho in Ras transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11781-11785.
- Reaper, P.M., Griffiths, M.R., Long, J.M., Charrier, J.D., McCormick, S., Charlton, P.A., Golec, J.M., and Pollard, J.R. (2011). Selective killing of ATM- or p53-deficient cancer cells through inhibition of ATR. *Nat Chem Biol* 7, 428-430.
- Reid, T., Furuyashiki, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Watanabe, N., Fujisawa, K., Morii, N., Madaule, P., and Narumiya, S. (1996). 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* 271, 13556-13560.
- Reinhardt, H.C., and Yaffe, M.B. (2009). Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr Opin Cell Biol* 21, 245-255.
- Ren, X.D., Kiosses, W.B., and Schwartz, M.A. (1999). Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J* 18, 578-585.
- Ridley, A.J. (2001). Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 114, 2713-2722.
- Ridley, A.J. (2013). RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration. *J Microsc* 251, 242-249.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401-410.
- Riesterer, O., Matsumoto, F., Wang, L., Pickett, J., Molkenkine, D., Giri, U., Milas, L., and Raju, U. (2011). A novel Chk inhibitor, XL-844, increases human cancer cell radiosensitivity through promotion of mitotic catastrophe. *Invest New Drugs* 29, 514-522.
- Rodier, F., and Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 192, 547-556.
- Rohrbeck, A., Kolbe, T., Hagemann, S., Genth, H., and Just, I. (2012). Distinct biological activities of C3 and ADP-ribosyltransferase-deficient C3-E174Q. *FEBS J* 279, 2657-2671.
- Sahai, E., and Marshall, C.J. (2002). RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 133-142.
- Sahai, E., and Olson, M.F. (2006). Purification of TAT-C3 exoenzyme. *Methods Enzymol* 406, 128-140.
- Satyanarayana, A., and Kaldis, P. (2009). A dual role of Cdk2 in DNA damage response. *Cell Div* 4, 9.

- Schmidt, A., and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16, 1587-1609.
- Schumacher, A.J., Mohni, K.N., Kan, Y., Hendrickson, E.A., Stark, J.M., and Weller, S.K. (2012). The HSV-1 exonuclease, UL12, stimulates recombination by a single strand annealing mechanism. *PLoS Pathog* 8, e1002862.
- Schwarz, J.K., Lovly, C.M., and Piwnica-Worms, H. (2003). Regulation of the Chk2 protein kinase by oligomerization-mediated cis- and trans-phosphorylation. *Mol Cancer Res* 1, 598-609.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., and Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175, 184-191.
- Smits, K., Iannucci, V., Stove, V., Van Hauwe, P., Naessens, E., Meuwissen, P.J., Arien, K.K., Bentahir, M., Plum, J., and Verhasselt, B. (2010). Rho GTPase Cdc42 is essential for human T-cell development. *Haematologica* 95, 367-375.
- Spiering, D., and Hodgson, L. (2011). Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adh Migr* 5, 170-180.
- Stracker, T.H., Usui, T., and Petrini, J.H. (2009). Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* 8, 1047-1054.
- Suryadinata, R., Sadowski, M., and Sarcevic, B. (2010). Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Bioscience reports* 30, 243-255.
- Symington, L.S., and Gautier, J. (2011). Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet* 45, 247-271.
- Thumkeo, D., Watanabe, S., and Narumiya, S. (2013). Physiological roles of Rho and Rho effectors in mammals. *Eur J Cell Biol* 92, 303-315.
- Todorovic, B., Nichols, A.C., Chitilian, J.M., Myers, M.P., Shepherd, T.G., Parsons, S.J., Barrett, J.W., Banks, L., and Mymryk, J.S. (2014). The human papillomavirus E7 proteins associate with p190RhoGAP and alter its function. *J Virol* 88, 3653-3663.
- Vadlamudi, R.K., Li, F., Barnes, C.J., Bagheri-Yarmand, R., and Kumar, R. (2004). p41-Arc subunit of human Arp2/3 complex is a p21-activated kinase-1-interacting substrate. *EMBO Rep* 5, 154-160.
- Vavrova, J., and Rezacova, M. (2011). The importance of senescence in ionizing radiation-induced tumour suppression. *Folia Biol (Praha)* 57, 41-46.
- Vega, F.M., and Ridley, A.J. (2008). Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett* 582, 2093-2101.
- Vermes, I., Haanen, C., and Reutelingsperger, C. (2000). Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of immunological methods* 243, 167-190.
- Vignard, J., Mirey, G., and Salles, B. (2013). Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: a direct and indirect lighting up. *Radiother Oncol* 108, 362-369.
- Villalonga, P., and Ridley, A.J. (2006). Rho GTPases and cell cycle control. *Growth Factors* 24, 159-164.
- Wang, H., Wang, M., Bocker, W., and Iliakis, G. (2005). Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors. *J Cell Physiol* 202, 492-502.
- Watts, K.L., Cottrell, E., Hoban, P.R., and Spiteri, M.A. (2006). RhoA signaling modulates cyclin D1 expression in human lung fibroblasts; implications for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory research* 7, 88.

- Wennerberg, K., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 118, 843-846.
- Wertheimer, E., Gutierrez-Uzquiza, A., Rosembliit, C., Lopez-Haber, C., Sosa, M.S., and Kazanietz, M.G. (2012). Rac signaling in breast cancer: a tale of GEFs and GAPs. *Cell Signal* 24, 353-362.
- Wojewodzka, M., Buraczewska, I., and Kruszewski, M. (2002). A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. *Mutat Res* 518, 9-20.
- Xia, M., and Land, H. (2007). Tumor suppressor p53 restricts Ras stimulation of RhoA and cancer cell motility. *Nat Struct Mol Biol* 14, 215-223.
- Yamaguchi, H., Wyckoff, J., and Condeelis, J. (2005). Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol* 17, 559-564.
- Yan, Y., Greer, P.M., Cao, P.T., Kolb, R.H., and Cowan, K.H. (2012). RAC1 GTPase plays an important role in gamma-irradiation induced G2/M checkpoint activation. *Breast Cancer Res* 14, R60.
- Yan, Y., Hein, A.L., Etekpo, A., Burchett, K.M., Lin, C., Enke, C.A., Batra, S.K., Cowan, K.H., and Ouellette, M.M. (2014). Inhibition of RAC1 GTPase sensitizes pancreatic cancer cells to gamma-irradiation. *Oncotarget* 5, 10251-10270.
- Yentrapalli, R., Azimzadeh, O., Sriharshan, A., Malinowsky, K., Merl, J., Wojcik, A., Harms-Ringdahl, M., Atkinson, M.J., Becker, K.F., Haghdoost, S., *et al.* (2013). The PI3K/Akt/mTOR pathway is implicated in the premature senescence of primary human endothelial cells exposed to chronic radiation. *PLoS One* 8, e70024.
- Zeman, M.K., and Cimprich, K.A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol* 16, 2-9.
- Zhai, G.G., Malhotra, R., Delaney, M., Latham, D., Nestler, U., Zhang, M., Mukherjee, N., Song, Q., Robe, P., and Chakravarti, A. (2006). Radiation enhances the invasive potential of primary glioblastoma cells via activation of the Rho signaling pathway. *J Neurooncol* 76, 227-237.
- Zhang, P., Gao, W., Li, H., Reed, E., and Chen, F. (2005). Inducible degradation of checkpoint kinase 2 links to cisplatin-induced resistance in ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 567-572.

ANEXO 1

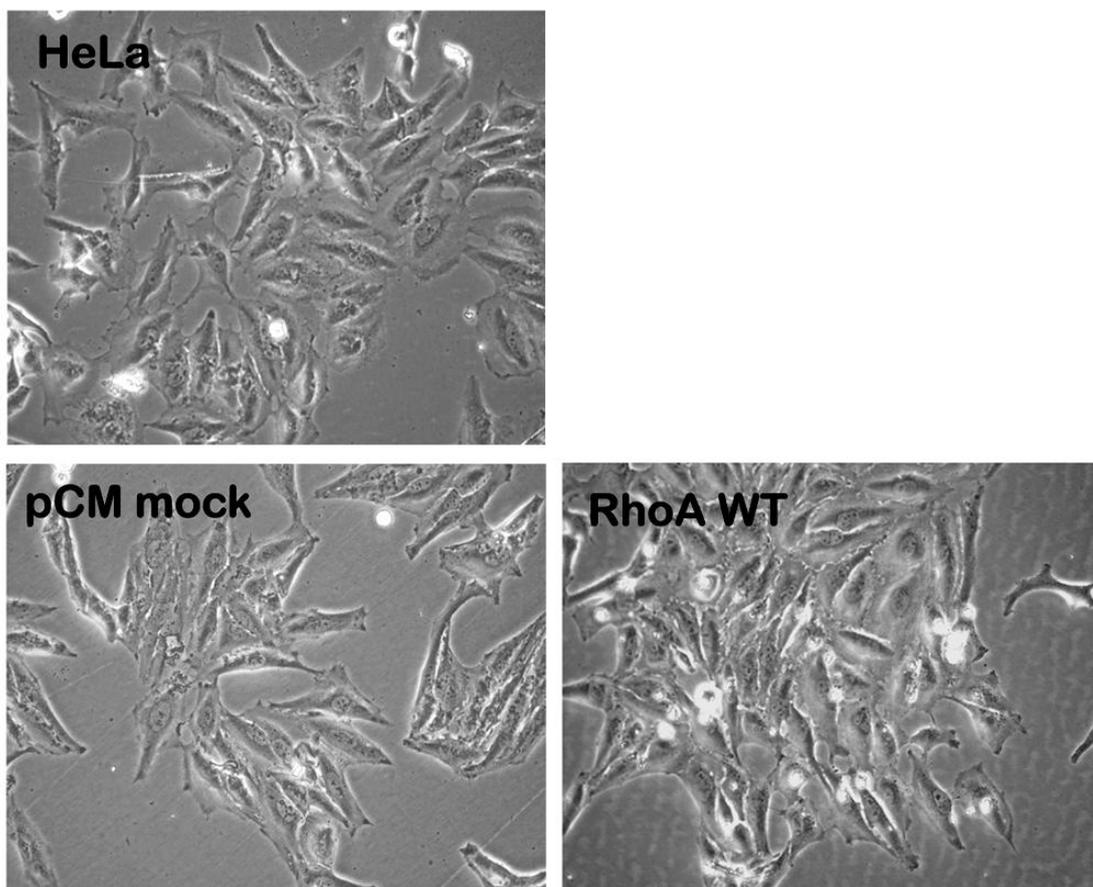


Figura 36 - Aspecto morfológico das sublinhagens HeLa-pCM mock e HeLa-RhoA WT. As células foram analisadas e fotografadas em microscópio invertido (Olympus) no aumento de 200X, em condições de crescimento normal com 10% de SBF.

ANEXO 2

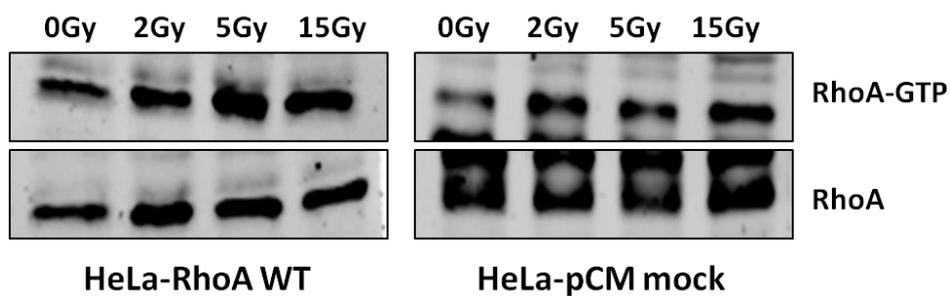
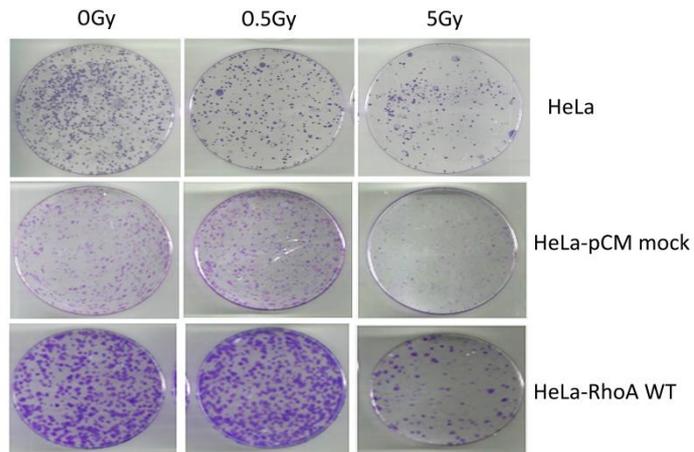
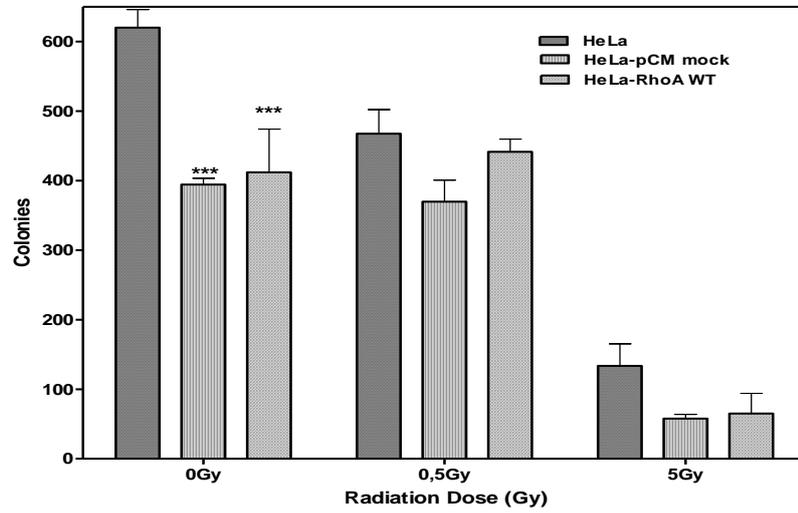


Figura 37 - Modulação positiva da ativação de RhoA pelos efeito da radiação gama nas sublinhagens HeLa-RhoA WT e HeLa-pCM mock. As células foram irradiadas com diferentes doses de radiação gama (2Gy, 5Gy e 15Gy) e lisadas 30 minutos após ao tratamento. O ensaio de atividade de RhoA foi realizado utilizando beads RBD-GST. Os níveis de RhoA-GTP foram determinados por immunoblot utilizando anticorpo anti-RhoA (Santa Cruz). As imagens são representativas de três experimentos independentes.

ANEXO 3



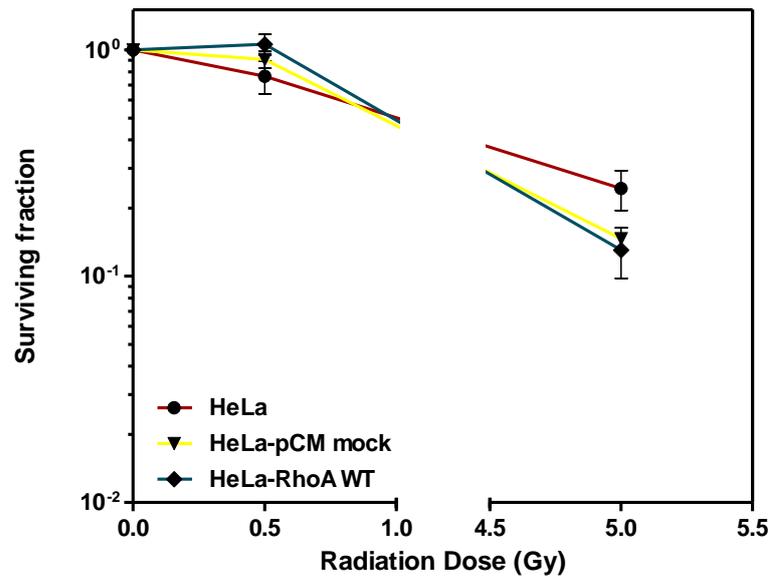


Figura 38 - AS linhagens HeLa-pCM mock e HeLa-RhoA WT apresentam menor número de colônias em relação a HeLa parental, no entanto, apresenta sensibilidade aos efeitos da radiação gama semelhante a HeLa parental. Foram plaqueadas 2000 células em placas de 60 mm de diâmetro, 24h antes de serem expostas a radiação nas doses de 0,5Gy e 5Gy. Após 10-12 dias em cultura as células foram fixadas com formaldeído 10% em PBS, coradas com cristal violeta 0,5% e contadas manualmente. Os resultados são a média +/- SEM de três experimentos independentes. Foi utilizado para análise estatística ANOVA *P<0.05; ***P<0.001 entre os clones versus HeLa parental.

SÚMULA CURRICULAR

Dados pessoais

Juliana Harumi Osaki
Curitiba/PR - Brasil

Formação acadêmica/titulação

- 2010 Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: O papel das Rho GTPases na resposta aos danos no DNA induzidos por radiação ionizante do tipo gama.
Orientador: Fábio Luís Forti
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2007 - 2009 Mestrado em Ciências (Bioquímica).
Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, Brasil
Título: Caracterização funcional da proteína NtrX de *Herbaspirillum seropedicae*,
Ano de obtenção: 2009
Orientador: Liu Un Rigo
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2002 - 2007 Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, Brasil
Título: Expressão e purificação da proteína NtrX de *Herbaspirillum seropedicae*
Orientador: Rose Adele Monteiro
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação complementar

- 2013 - 2013 Curso de curta duração em Workshop - A New Frontier in Flow Cytometry-Kaluza.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
- 2012 - 2012 Curso de curta duração em Cell Migration.
Sociedade Brasileira de Biologia Celular, SBBC, Sao Paulo, Brasil
- 2010 - 2010 Curso de curta duração em Ensaio cometa e análise de expressão gênica.
Sociedade Brasileira de Mutagenese Carcinogenese e Teratogenese Ambiental,
SBMCTA, Ribeirao Preto, Brasil

Prêmios e títulos

- 2014 Prêmio Clodowaldo Pavan, melhor trabalho na área de Mutagenese, 60 Congresso Brasileiro de Genética

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. OSAKI, J. H., Espinha G.T. da S, FORTI, FL.
THE SMALL GTPase RhoA MEDIATES DNA DAMAGE REPAIR SIGNALING PROMOTED BY GAMMA AND ULTRAVIOLET RADIATION In: 60 Congresso Brasileiro de Genética, 2014, Guarujá.
60 Congresso Brasileiro de Genética. , 2014.

2. OSAKI, J. H., Espinha G.T. da S, FORTI, FL.
 THE SMALL GTPases RhoA AND Rac1 ARE INVOLVED IN DNA DAMAGE REPAIR INDUCED BY LOW DOSES OF GAMMA RADIATION In: 40th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, 2013, Dublin.
 40th Annual Meeting of the European Radiation Research Society. , 2013.

3. OSAKI, J. H., Espinha G.T. da S, FORTI, FL.
 COMPARATIVE RESPONSES TO STRESS CAUSED BY IONIZING RADIATION (GAMMA AND ULTRAVIOLET) IN HELA CELLS: A STUDY FOR RAC1 GTPASE ROLES In: 2012 Annual Meeting of the American Society For Cell Biology, 2012, San Francisco.
 Molecular Biology of the Cell. , 2012. v.23.

4. OSAKI, J. H., Espinha G.T. da S, FORTI, FL.
 PROBABLE INVOLVEMENT OF THE RAC1 GTPASE IN RADIOSENSITIVITY OF HELA CELLS In: 10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2012, Rio de Janeiro.
 10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology. , 2012.

5. OSAKI, J. H., Espinha G.T. da S, FORTI, FL.
 Implications of RhoA regulation in HeLa cells exposed to stress radiation In: 2011 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2011, Denver.
 2011 AscB Annual Meeting abstracts. , 2011.

6. OSAKI, J. H., FORTI, FL.
 Roles of RhoA GTPase in response to DNA damage induced by gamma radiation In: X Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA), 2011, São Pedro.
 Livro de Resumos. , 2011.

Artigos em Revisão

Espinha, G.; Osaki, J.; Magalhaes, Y.; Forti, F.L.
 Rac1 GTPase mediates migration, proliferation and DNA repair in HeLa cells following stress caused by UV and gamma radiation. Melamona Research.

Artigos em preparação

OSAKI, J.H., Espinha, G.T., Forti, F.L.
 RhoA GTPase modulation sensitizes human cervix carcinoma cells to ionizing γ -radiation. Molecular Cancer Research.

Produção técnica

1. OSAKI, J. H.
 VIII Curso de Inverno Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular., 2013. (Extensão, Curso de curta duração ministrado).

2. OSAKI, J. H.
 VI Curso de Inverno Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011. (Extensão, Curso de curta duração ministrado).