

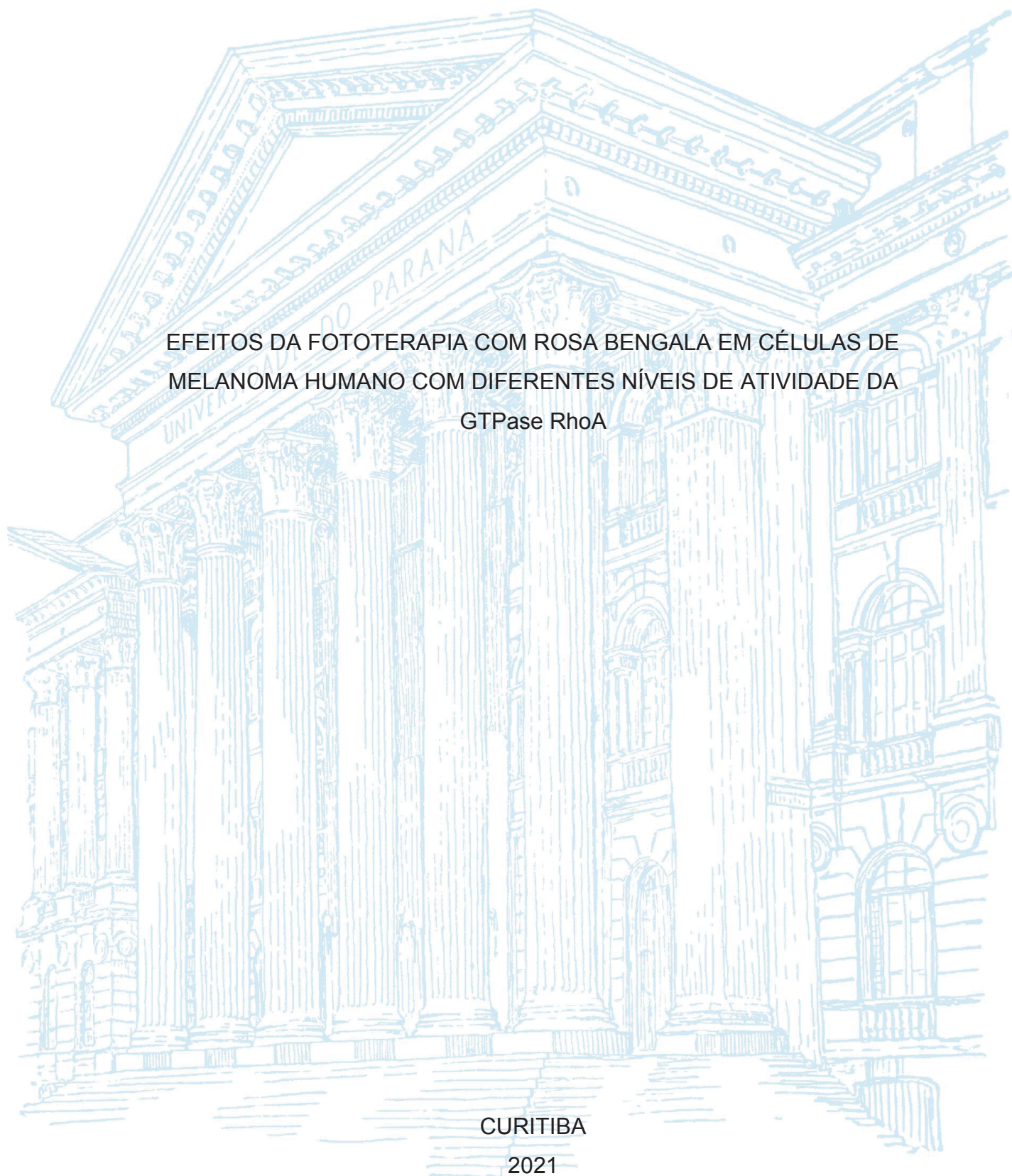
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUIZ CARLOS RAMOS GARCIA JUNIOR

EFEITOS DA FOTOTERAPIA COM ROSA BENGALA EM CÉLULAS DE
MELANOMA HUMANO COM DIFERENTES NÍVEIS DE ATIVIDADE DA
GTPase RhoA

CURITIBA

2021



LUIZ CARLOS RAMOS GARCIA JUNIOR

EFEITOS DA FOTOTERAPIA COM ROSA BENGALA EM CÉLULAS DE
MELANOMA HUMANO COM DIFERENTES NÍVEIS DE ATIVIDADE DA
GTPase RhoA

Dissertação apresentada ao curso de
Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Ciências
Bioquímica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Glauca Regina
Martinez

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Garcia Junior, Luiz Carlos Ramos
Efeitos da fototerapia com rosa bengala em células de melanoma humano com diferentes níveis de atividade da GTPase RhoA. / Luiz Carlos Ramos Garcia Junior. – Curitiba, 2021.
57 p.: il.

Orientadora: Glaucia Regina Martinez.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

1. Melanoma. 2. Proteína rhoA de ligação ao GTP. 3. Citoesqueleto. I. Título II. Martinez, Glaucia Regina. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

CDD (22. ed.) 616.99477



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **LUIZ CARLOS RAMOS GARCIA JUNIOR** intitulada: **EFEITOS DA FOTOTERAPIA COM ROSA BENGALA EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO COM DIFERENTES NÍVEIS DE ATIVIDADE DA GTPase RhoA**, sob orientação da Profa. Dra. GLAUCIA REGINA MARTINEZ, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Abril de 2021.

Assinatura Eletrônica

05/05/2021 13:42:02.0

GLAUCIA REGINA MARTINEZ

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

05/05/2021 14:27:26.0

GUILHERMINA RODRIGUES NOLETO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

05/05/2021 14:19:21.0

LIA SUMIE NAKAO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: pgbioq@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 90833

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 90833

Dedico esse trabalho a minha mãe, pela criação,
amor e todo carinho durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pela criação, suporte e por sempre estarem comigo.

À minha esposa pela companhia, paciência nos tempos difíceis e por toda ajuda.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Glaucia Regina Martinez, por acreditar no meu trabalho, por todo apoio, ajuda e por estar sempre à disposição para me orientar.

Ao Prof. Dr. Fabio Luis Forti do Instituto de Química da USP pelas células MeWo utilizadas nesse trabalho.

À Prof.a. Dr.^a Carolina Camargo de Oliveira pelo auxílio nos ensaios de imunomarcacão e pelas análises no confocal.

Às professoras do grupo de oxidações biológicas, onde todas contribuíram um pouquinho em meu trabalho e por todo ensinamento.

Ao casal de meus melhores amigos, por cuidarem de mim e sempre estarem disponíveis para me auxiliar.

Aos colegas do oxidações 3, pela ajuda gigantesca que me prestaram, tanto em experimentos e por me acolherem tão bem no laboratório.

Ao grupo de oxidações por toda companhia, risadas e ensinamentos do dia a dia.

Ao auxílio financeiro da CAPES (bolsa e projeto PRINT), CNPq, Fundação Araucária e PRPPG-UFPR.

Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana. (CARL JUNG)

RESUMO

O melanoma tem origem nos melanócitos e é um câncer extremamente agressivo e com alto índice de metástase. Ao contrário do câncer de pele não-melanoma, essa neoplasia é bastante resistente a um tipo de tratamento conhecido como terapia fotodinâmica (PDT), na qual existe a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente o oxigênio molecular singlete ($^1\text{O}_2$) pela ação da luz sobre um composto fotossensibilizador. Por outro lado, o desenvolvimento do melanoma tem sido associado com a radiação UV. Quando células são expostas a raios UVA (320 - 400 nm), existe a geração de ROS e $^1\text{O}_2$. Anteriormente, um estudo mostrou que a atividade da RhoA, uma GTPase envolvida em várias respostas celulares, agindo principalmente sobre o citoesqueleto celular e a polimerização de fibras de estresse, resulta em respostas um pouco diferentes quando células de melanoma humano são expostas à radiação UV. Sendo assim, objetiva-se avaliar os efeitos do $^1\text{O}_2$ gerado por PDT com Rosa Bengala em células da linhagem de melanoma humano MeWo com diferentes níveis de atividade de RhoA. Foi investigada a resposta celular em termos de sobrevivência, alterações de citoesqueleto de actina e motilidade imediatamente após PDT e após um período de recuperação. Os resultados mostraram que uma atividade aumentada ou diminuída de RhoA não favoreceu a sobrevivência celular ou a motilidade, entretanto, pequenas diferenças foram observadas em relação a aspectos morfológicos e do citoesqueleto de actina, indicando que as células com menor atividade de RhoA aparentemente apresentam um fenótipo mais parecido com células resistentes à PDT.

Palavras-chave: Melanoma, RhoA, ROS, PDT e citoesqueleto.

ABSTRACT

Melanoma originates from melanocytes and is an extremely aggressive cancer with a high rate of metastasis. Unlike non-melanoma skin cancer, this neoplasm is quite resistant to a type of treatment known as photodynamic therapy (PDT), in which there is the generation of reactive species of oxygen (ROS), mainly singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$) by the action of light on a photosensitizing compound. On the other hand, the development of melanoma has been associated with UV radiation. When cells are exposed to UVA rays (320 - 400 nm), ROS and $^1\text{O}_2$ are generated. Previously, a study has shown that the activity of RhoA, a GTPase involved in various cellular responses, acting mainly on the cellular cytoskeleton and the polymerization of stress fibers, results in slightly different responses when human melanoma cells are exposed to UV radiation. Therefore, the objective is to evaluate the effects of $^1\text{O}_2$ generated by PDT with Rose Bengal on cells of the human melanoma lineage MeWo with different levels of RhoA activity. The cellular response in terms of survival, changes in actin cytoskeleton and motility were investigated immediately after PDT and after a recovery period. The results showed that the increased or decreased RhoA activity did not favor cell survival or motility, however, small differences were observed in relation to morphological aspects and the actin cytoskeleton, indicating that cells with lower RhoA activity apparently have a phenotype like PDT resistant cells.

Keywords: Melanoma, RhoA, ROS, PDT. cytoskeleton.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratégia Experimental	16
Figura 2. Fontes de ROS e seus efeitos celulares.	18
Figura 3. Esquema de geração de ROS.	22
Figura 4. Superfamília RAS.....	23
Figura 5. Mecanismo de funcionamento das GTPases.....	24
Figura 6. Etapas da movimentação celular.	25
Figura 7. Via de sinalização de RhoA.	27
Figura 8. Resultado MTT grupo 0h escuro.....	31
Figura 9. Resultado MTT grupo 0h claro.....	32
Figura 10. Resultado MTT grupo 18h escuro.....	33
Figura 11. Resultado MTT grupo 18h claro.....	34
Figura 12. Imunomarcção da linhagem parental.	36
Figura 13. Imunomarcção da linhagem Vetor.....	37
Figura 14. Imunomarcção da linhagem V14.....	39
Figura 15. Imunomarcção da linhagem N19.....	40
Figura 16. Ensaio de migração da linhagem Parental (Escuro).	42
Figura 17. Ensaio de migração da linhagem Parental (Claro).	43
Figura 18. Ensaio de migração da linhagem Vetor (Escuro).	43
Figura 19. Ensaio de migração da linhagem Vetor (Claro).	43
Figura 20. Ensaio de migração da linhagem V14 (Escuro).	44
Figura 21. Ensaio de migração da linhagem V14 (Claro).	45
Figura 22. Ensaio de migração da linhagem N19 (Escuro).	45
Figura 23. Ensaio de migração da linhagem N19 (Claro).	46

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

$^1\text{O}_2$	- Oxigênio molecular singlete
8-oxoGua	- 8-oxo-7,8-dihidroguanina
BER	- Excisão de base
CDK4	- Ciclina dependente de quinase 4
CDKN2A	- Ciclina inibidora dependente de quinase 2A
DMSO	- Dimetilsulfóxido
FCR	- Fase de crescimento radial
FCV	- Fase de crescimento vertical
GAP	- GTPase ativadoras
GDP	- Guanosina difosfato
GEF	- Guanosine-exchange-factors
GTP	- Guanosina trifosfato
MEC	- Matrix extracelular
mRNA	- RNA mensageiro
NOX	- NADPH oxidase
OGG1	- 8-oxoguanina glicolase
PDT	- Terapia fotodinâmica
pRb	- Proteína retinoblastoma
Rbac	- Rosa bengala acetato
ROCK	- Quinases associadas a rho
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
TEM	- Transição epitélio mesenquima
UVA	- Raios ultravioletas A

LISTA DE SÍMBOLOS

© - copyright

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 JUSTIFICATIVA	15
1.2 OBJETIVOS	15
1.2.1 Objetivo geral	15
1.2.2 Objetivos específicos.....	16
1.3 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 MELANOMA.....	17
2.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DANOS AO DNA	20
2.3 RHO GTPASES	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 CULTIVO CELULAR	28
3.2 FOTOSENSIBILIZAÇÃO DAS CÉLULAS	28
3.3 VIABILIDADE CELULAR.....	29
3.4 MARCAÇÃO DO CITOESQUELETO COM FALOIDINA.....	29
3.5 ENSAIO DE MIGRAÇÃO	30
4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	31
4.1 VIABILIDADE CELULAR.....	31
4.2 MARCAÇÃO DO CITOESQUELETO COM FALOIDINA.....	35
4.3 ENSAIO DE MIGRAÇÃO	42
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
REFERÊNCIA	49
ANEXO I – AUTORIZAÇÃO DO USO DE IMAGEM DA FIGURA 2	54
ANEXO II – AUTORIZAÇÃO DE USO DE IMAGEM DA FIGURA 5 E 7	56
ANEXO III – AUTORIZAÇÃO DE USO DE IMAGEM DA FIGURA 6	57

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um grupo de doenças caracterizado pelo crescimento anormal de células de um determinado tipo celular. Algumas células também possuem a capacidade de se deslocar para outras partes do corpo, seja pela corrente sanguínea, ou pelos vasos linfáticos, este processo se denomina metástase. Geralmente o câncer se desenvolve em razão de danos no DNA das células, entretanto, enquanto seja comum o reparo deste DNA nas células saudáveis, em células tumorais, esse processo não ocorre ou não é eficiente (S, 2009).

O melanoma é um tipo agressivo de câncer que representa 30% dos tumores malignos de pele no Brasil. O melanoma cutâneo tem origem nos melanócitos (células que produzem a melanina), sendo um câncer extremamente agressivo e de alta possibilidade de metástase. Eram estimados para 2020, 8.450 novos casos no Brasil, sendo 4.200 homens e 4.250 mulheres (INCA, 2020).

O desenvolvimento de melanomas está ligado intrinsecamente com a exposição à raios ultravioletas (UV). Aproximadamente 95% dos raios UV que chegam à terra são raios UVA (comprimento de onda de 320 a 400nm), os outros 5% são raios UVB (290-320nm). O mecanismo genóxico do UVA se dá pela liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), essas espécies podem exercer a peroxidação de lipídios e causar danos no DNA (SWALWELL, et al; 2012).

As ROS estão associadas com o processo de carcinogênese e pelo processo de morte de células tumorais. Em níveis moderados de ROS, ocorre a indução do processo carcinogênico a partir de mutações no DNA e a promoção da instabilidade genômica, nesse contexto, são moléculas de sinalização que proporcionam a proliferação, sobrevivência e metástase. Entretanto, em níveis mais elevados as ROS são responsáveis por danos no DNA, lipídios e proteínas, levando a morte celular pela via da apoptose ou por necrose (ZHOU; et al. 2018).

No DNA, o oxigênio molecular singlete (1O_2) reage quase que exclusivamente com a guanina, ocasionando sua oxidação e gerando 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoGua), sendo essa, mutagênica pelo pareamento com a adenina (RAVANAT et al, 2000). Em eucariotos, o dano 8-oxoGua no DNA é reparado pelo reparo de excisão de base (BER) pela enzima 8-oxoguanina glicosilase (OGG1) (GERMAN et al. 2013; HAJAS et al. 2013; BOLDOGH et al. 2012).

As Rho GTPases estão associadas com mudanças no citoesqueleto e estabilidade genômica por sua associação a vias de reparo de DNA. OGG1 se liga ao seu substrato de reparo 8-oxoG com alta afinidade em um local independente de seu sítio catalítico de reconhecimento de lesão de DNA e o complexo OGG1•8-oxoG interage fisicamente com membros da família Ras canônica e outras GTPases (GERMAN et al. 2013; HAJAS et al. 2013; BOLDOGH et al. 2012).

O entendimento do papel de Rho em condições de aumento dos níveis de 8-oxoGua se torna interessante no entendimento da resistência de melanomas à terapia fotodinâmica (PDT). Essa terapia vem se mostrando promissora no tratamento de vários tipos de tumores, a técnica é mais eficaz em lesões mais superficiais como cutâneas e as sessões são associadas com melhora da resposta imune. O agente citotóxico essencial da PDT é o $^1\text{O}_2$ (TURAN et al; 2016).

1.1 JUSTIFICATIVA

Visto que a geração do $^1\text{O}_2$ na PDT interage predominantemente no DNA com as bases de guanina, além disso, RhoA interage diretamente com o complexo OGG1•8-oxoG que funciona como uma GEF, recuperando a forma ativa de RhoA-GTP assim aumentando sua atividade. Torna-se interessante avaliar os efeitos na viabilidade, migração e citoesqueleto celular de células de melanoma com diferentes níveis de atividade de RhoA frente a altos níveis de $^1\text{O}_2$ gerado pela fotossensibilização.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Compreender o impacto da geração de oxigênio singlete em células de melanoma MeWo com diferentes níveis de atividade de RhoA.

1.2.2 Objetivos específicos

a) verificar a diferença de viabilidade das linhagens com diversos níveis de atividade de RhoA, frente a fotossensibilização.

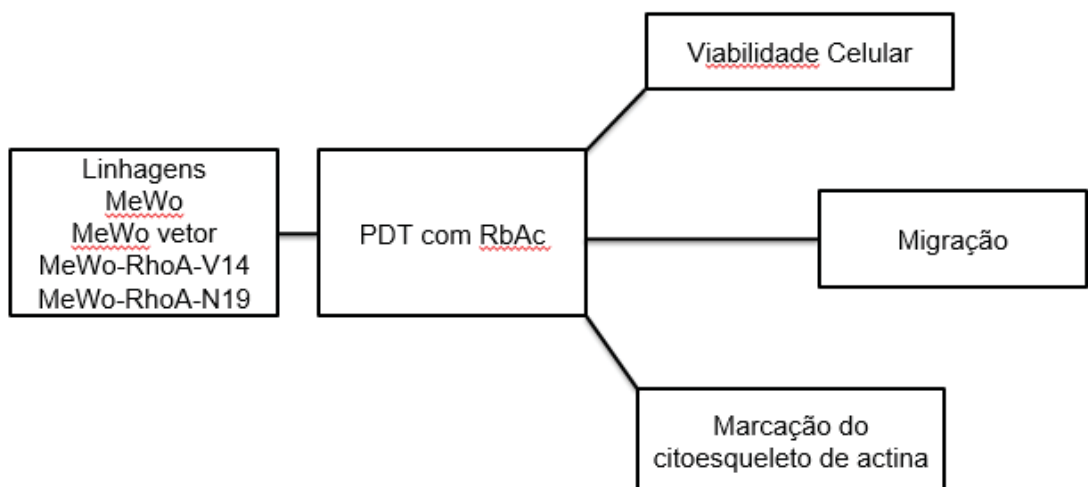
b) avaliar a diferença de motilidade das linhagens após a geração de oxigênio singlete.

c) observar as diferenças no citoesqueleto celular das linhagens e polimerização de fibras de estresse após a irradiação das células com o fotossensibilizador.

1.3 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

As linhagens MeWo Parental, MeWo Vetor, MeWo N19 e MeWo V14 foram submetidas ao fluxograma de experimentos, conforme visto na figura 1.

Figura 1. Estratégia Experimental



FONTE: O Autor, 2021.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MELANOMA

A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo dividida em derme e epiderme. O câncer de pele é um dos mais comuns em humanos, os tumores de pele podem ser divididos em dois grandes grupos, os tumores não-melanoma e os melanomas. Os cânceres de pele não-melanoma possuem uma incidência maior e um prognóstico melhor quando comparados com os melanomas. Isso se deve pela tendência dos tumores não melanoma de permanecerem no sítio primário da doença (SIMÕES, SOUSA, PAIS, 2015).

O câncer de pele melanoma é o mais prevalente na faixa etária de 25 aos 35 anos nos EUA e o Brasil ocupa 15ª posição com relação à incidência do tumor no mundo (WAINSTEIN, BELFORT, 2018). Como a maioria dos tumores, seu prognóstico varia com o estágio em que a doença é descoberta, aproximadamente 85% dos pacientes apresentam a doença localizada, em torno de 13% com a doença espalhada na região e em torno de 2% estão em sítios distantes, com a forma metastática da doença (COIT, 2009).

A população de pele mais clara é a mais atingida pelos melanomas cutâneos, enquanto as populações asiáticas e de pele mais escura desenvolvem predominantemente melanoma de mucosa e melanoma acral, com uma menor taxa de incidência (SCHADENDORF; et al. 2015). A maior incidência do melanoma (cutâneo e ocular) em sujeitos de pele clara geralmente é atribuída ao fato de pessoas de pele clara possuírem predominantemente feomelanina, enquanto pessoas de pele escura possuem predominantemente eumelanina (BROZYNA; et al. 2007).

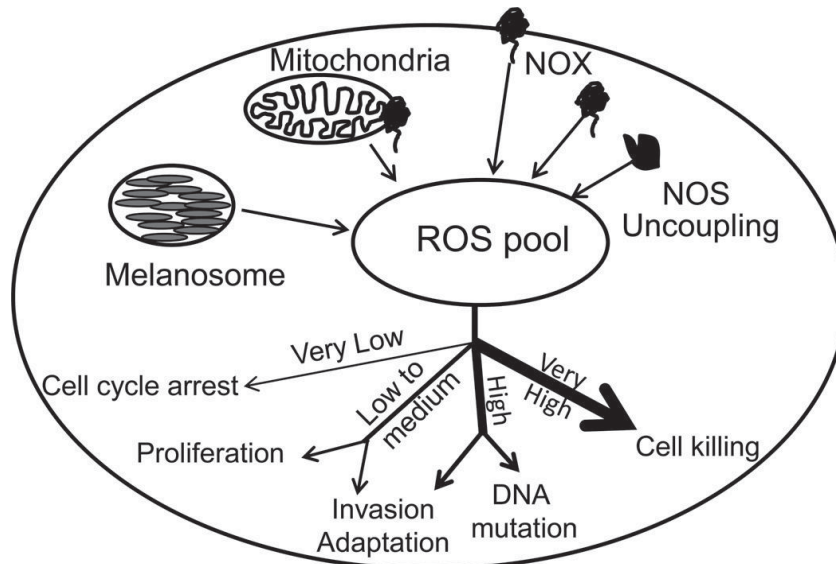
O processo de formação de melanomas consiste na transformação maligna dos melanócitos, esse processo complexo requer vários gatilhos de origem endógena e exógena para ativação de fatores pró tumorais e de evasão tumoral. Embora os melanócitos tenham baixa taxa de proliferação (em torno de duas vezes ao ano), esse processo é acompanhado constantemente de mutações. Análises genéticas feitas em melanoma metastático demonstraram um alto índice nas mutações de bases (>10 mutações por megabase), além disso, foram encontradas

diversas mutações C→T características da exposição ao UVB e G→T, sendo estas características da radiação UVA (SCHADENDORF; et al. 2018).

As ROS geradas por raios UVA causam danos substanciais no DNA, sendo potencialmente mutagênico pela oxidação da base guanina em melanomas. Alguns genes alvo do dano ao DNA causado por UVA foram identificados, sendo estes p16 e CDKN2 (inibidor 2A da ciclina-dependente de quinase) e BRAF (CHEN et al; 2002). Além da 8-oxoGua, o UVA é responsável por quebras de fita simples e oxidação de bases pirimídicas (CADET, DOUKI, 2011).

Conforme apontado na revisão de (LIU-SMITH, DELLINGER, MEYSKENS JR, 2014), apesar de existir uma maior produção de ROS em melanomas, não se sabe com exatidão a origem do excesso de ROS produzido no tumor, sendo geralmente atribuído ao desacoplamento ou disfunção mitocondrial (Figura 2). Entretanto, os autores destacam que existem outras fontes de ROS em melanomas como a família de proteínas NADPH oxidase (Nox) e a óxido nítrico sintase, oriundos de peroxissomos e melanossomos.

Figura 2. Fontes de ROS e seus efeitos celulares.



FONTE: LIU-SMITH, DELLINGER, MEYSKENS JR, 2014.

LEGENDA: ROS podem ser gerados a partir de melanossomos, mitocôndrias, enzimas da família NOX e / ou desacoplamento de NOS. ROS gerados a partir dessas fontes diferentes podem interagir entre si e formar um pool de ROS celulares. Quando os níveis de ROS são adequados, eles servem como sinais de proliferação; quando ROS é aumentado, eles mostram efeitos adversos, incluindo a promoção de invasão e mutações oxidativas no DNA. Se o nível de ROS estiver além da capacidade de tamponamento antioxidante celular, eles podem matar as células diretamente.

Outras mutações recorrentes no melanoma estão no gene RAC1, membro da superfamília de oncoproteínas Ras e pertencente a subfamília Rho. Devido a uma mutação no códon 29 de RAC1, existe a substituição de um resíduo de prolina por uma serina, que gera o mutante RAC1p29S. A mudança no resíduo 29 gera uma forma que liga guanosina difosfato (GDP) de forma menos favorável energeticamente. Entretanto, Rac1p29S é capaz de interagir com ligações de hidrogênio com as cadeias adjacentes, estabilizando sua forma ativa ligada a Guanosina trifosfato (GTP). Rac1-GTP é conhecido por regular processos *downstream* relevantes para a tumorigênese; sendo assim, há evidências que em melanomas a família das Rho GTPases possa agir como oncogene (HODIS; et al, 2012).

Além disso, Rac1 também é ativador crucial das proteínas Nox, Rac1 pode se ligar a extremidade carboxi-terminal de Nox1 gerando uma holoenzima. Entretanto, em situações de mutantes de Rac1 é documentado que pode ativar com mais intensidade p67, sendo este, um ativador citosólico de Nox1. A holoenzima é capaz de ativar Nox1, levando assim a geração de ROS. O complexo Rac1-Nox1 é capaz de promover um fenótipo de maior agressividade tumoral, visto que, a superexpressão de Nox1 é capaz de induzir a expressão das metaloproteínas de matriz (MMP) 2 e 9 (LIU-SMITH, DELLINGER, MEYSKENS JR, 2014). Rac1 também pode ser ativado pelo ácido hialurônico a partir da interação entre CD44 e os guanosine exchange factors (GEF) como Tiam1 e Vav2, levando a ativação de Nox, aumentando a produção de ROS e um fenótipo de maior motilidade em melanomas (KIM et al; 2008).

Também é documentada uma redução da expressão da E-caderina, enquanto há um aumento da N-caderina, sendo que esse processo caracteriza a transição epitélio- mesênquima (TEM), o qual favorece uma transição de um fenótipo celular de baixa motilidade para um fenótipo de maior motilidade (LI, HERLYN, 2000).

Em situações normais, o gene CDKN2A (ciclina inibidora dependente de quinase 2A) é responsável pela tradução das proteínas supressoras de tumor p16INK4A e p14ARF, onde o primeiro é capaz de regular o ciclo celular pela inibição da CDK4 (ciclina dependente de quinase 4) ou pela fosforilação de CDK6 (ciclina dependente de quinase 6) levando a inativação da proteína do retinoblastoma (pRb).

Por sua vez, p14ARF previne a ubiquitinação da proteína p53, sendo assim, impedindo seu envio para o proteossoma e sua posterior degradação. Este perfil de desativação de CDKN2A é observado no histórico familiar de pacientes de melanoma (SCHADENDORF; et al. 2015).

2.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DANOS AO DNA

As ROS são um grupo composto por radicais livres (possuem elétron desemparelhado) e agentes não radicalares. Exemplos de radicais livres: radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), radical peroxila ($\text{RO}_2\cdot$) e radical hidroperoxila ($\text{HO}_2\cdot$), já os compostos não-radicalares: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HClO) e ozônio (O_3) (BAYR, 2005). O oxigênio molecular singlete ($^1\text{O}_2$) é também documentado como uma ROS não-radicalar (MIYAMOTO, 2003).

Esse grupo de moléculas foi inicialmente descrito em meados de 1900, entretanto, apenas em torno de 1940 começou a se documentar a importância dessas no meio biológico (RIBEIRO; et al 2005). A produção das ROS acontece de forma natural no metabolismo humano, entretanto, quando a produção dessas espécies se torna muito elevada há ativação de fatores de transcrição que geram um sistema antioxidante a fim de restaurar o equilíbrio oxidativo do organismo (VASCONCELOS; et al, 2007).

Quando há o desequilíbrio do sistema redox, seja pelo aumento da produção das ROS ou a ineficiência do sistema antioxidante, é gerado o estresse oxidativo (ANDRADE; et al. 2010).

O estresse oxidativo está relacionado com diversas doenças como câncer, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, artrite reumatoide, diabetes e isquemia. Além do grande impacto em diversas patologias, ainda há grandes evidências de seu papel no processo de envelhecimento (SIES, JONES, BERNDT, 2017).

A geração fotoquímica do $^1\text{O}_2$ pode ocorrer por uma molécula orgânica (sensibilizador) que absorve luz na região do visível ou UV, esse sensibilizador excitado transfere sua energia gerando a transição triplete-singlete do oxigênio (PIBIRI et al; 2018).

No DNA, o $^1\text{O}_2$ reage quase que exclusivamente com a guanina, ocasionando sua oxidação e gerando 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoGua), sendo

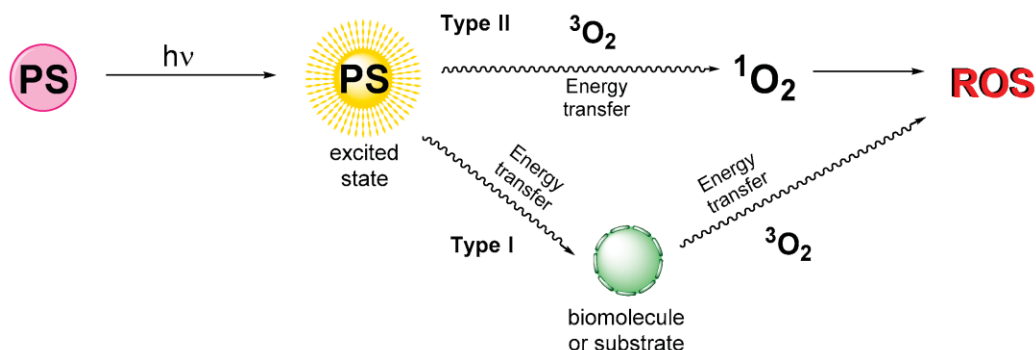
essa, mutagênica pelo pareamento com a adenina (RAVANAT et al, 2000). Em eucariotos, o dano 8-oxoGua no DNA é reparado pelo reparo de excisão de base (BER) pela enzima 8-oxoguanina glicosilase (OGG1) (GERMAN et al. 2013; HAJAS et al. 2013; BOLDOGH et al. 2012).

A 8-oxoGua pode ser reparada pela via longa ou curta de BER, no primeiro caso há a atividade de glicosilases que são capazes de extrair a base danificada da ribose, por fim há a remoção da ribose e a reposição do nucleotídeo no sítio do DNA, entretanto, na via longa de reparo há a retirada de vários nucleosídeos vizinhos do nucleotídeo comprometido, para então a reposição dos mesmos afim de recuperar a integridade do DNA. Quando não há reparo da base danificada, há o potencial de transversão de bases, que geram um perfil de danos de UVA presentes nos tumores de pele não melanoma. Ainda é discutida a presença deste perfil dentro de melanomas (KAMENISCH; et al. 2018).

Quando não há o processo de replicação de DNA, a lesão 8-oxoGua não parece ter potencial mutagênico; entretanto, esse dano possui a capacidade de interferir no processo de transcrição, sendo assim, até células em senescência apresentam riscos. É documentado pelo menos 3 maneiras da qual a 8-oxoGua pode interferir com o processo de transcrição, o primeiro é a mudança da força de interação entre diversos fatores de transcrição e o DNA, a segunda é o aumento de erros da RNA polimerase II, esse processo também é chamado de mutagênese do RNA, além disso, a 8-oxoGua também pode suprimir genes, aparentemente em qualquer região do DNA a partir da redução da capacidade transcrição (ALLGAYER; et al. 2016).

De modo geral, várias terapias para o tratamento do câncer geralmente usam os mesmos mecanismos de geração de dano celular que inicialmente poderiam ter iniciado a tumorigênese. A terapia fotodinâmica (PDT) consiste em um método não invasivo para o tratamento de tumores, seu mecanismo citotóxico se dá pela combinação de fotossensibilizadores, oxigênio e um estímulo luminoso, sendo assim, o 1O_2 é o agente citotóxico principal na PDT, sendo capaz de oxidar uma grande gama de biomoléculas no sítio fotossensibilizado, induzindo danos oxidativos nas células alvo, levando a apoptose, necrose e dano tecidual (LI; et al. 2020). Pode-se observar na figura 3, o esquema da PDT.

Figura 3. Esquema de geração de ROS.



FONTE: GALLARDO-VILLAGRAN; et al. 2019. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

Um aspecto crítico nesse processo é o fotossensibilizador. Um sensibilizador fotoquímico deve possuir as seguintes características: pureza química, retenção favorável em células tumorais, absorção e eliminação rápida, boa penetração no tecido e não ser tóxico no escuro (BALDEA, FILIP, 2012).

O Rosa Bengala é um fotossensibilizador que pode ter aplicação prática e é muito utilizado para estudos do papel do $^1\text{O}_2$, uma vez que usando comprimento de onda do visível, não há formação de outras ROS (Allen, 1991). Além disso, a introdução de grupos acetato ao rosa bengala (RbAc) facilitam a passagem do composto de interesse pela membrana plasmática (PANZARINI, INGUSCIO, DINI, 2011).

Após sua absorção, esterases presentes no citoplasma removem esses grupos acetato, restaurando o rosa bengala que por sua vez se redistribui pelo citoplasma e após a irradiação causa danos a diversas organelas. Foi observado que a PDT na presença do RbAc foi altamente eficiente em induzir morte celular por apoptose e autofagia em células HeLa (PANZARINI, INGUSCIO, DINI, 2011).

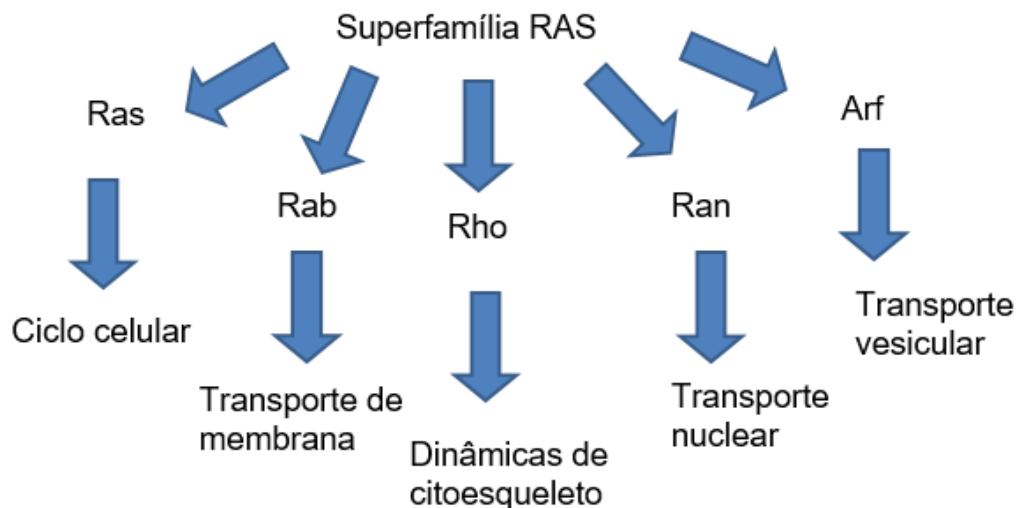
2.3 Rho GTPases

A superfamília Ras de guanosina trifosfatases (GTPases) é composta por oncoproteínas divididas em cinco famílias, sendo estas: Ras, Rho, Rab, Ran e Arf

(Figura 4). Essa família possui mais de 150 membros em humanos onde possuem em torno de 20 à 30 kDa. Essas pequenas GTPases funcionam como um interruptor, onde sua forma ativa se dá pela ligação ao GTP e à forma inativa com o GDP (GOITRE; et al. 2014).

O funcionamento da superfamília Ras se dá pela ligação do GTP ao sítio ativo, promovida pelas GEF. Após a formação do complexo enzima-substrato, as proteínas GTPase ativadoras (GAP) promovem a hidrólise do GTP a GDP (ETIENNE-MANNEVILLE, 2002; WENNERBERG, ROSSMAN, DER, 2005). Conforme pode ser observado na figura 5.

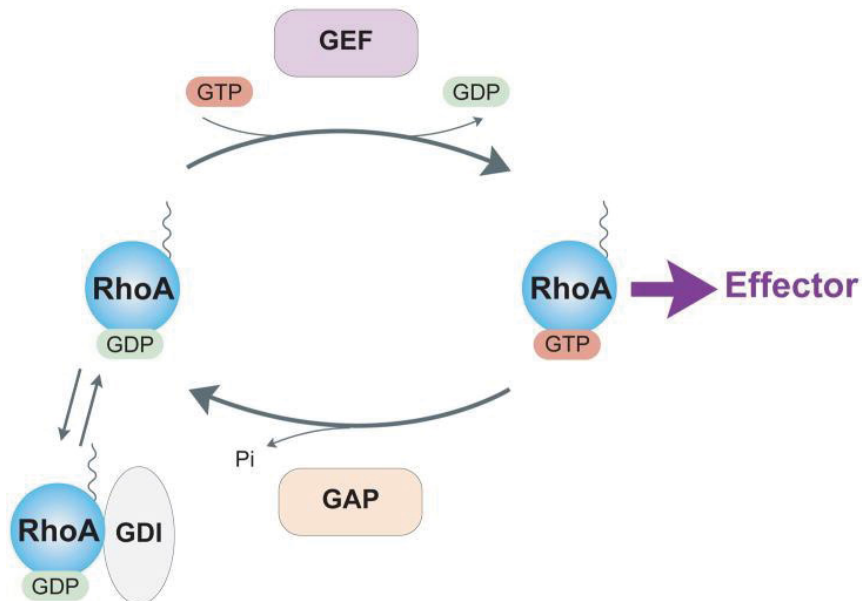
Figura 4. Superfamília RAS.



FONTE: O Autor, 2020.

LEGENDA: Esquema da superfamília de oncoproteínas RAS, tendo em vista seus membros e principais funções biológicas.

Figura 5. Mecanismo de funcionamento das GTPases.



FONTE: Reprinted with permission from LESSEY, GUILLUY, BURRIDGE, 2012. Copyright 2012 American Chemical Society.

LEGENDA: Como a maioria das proteínas G, a RhoA circula entre uma forma ligada ao GDP inativa e uma forma ligada ao GTP ativa. A ativação é mediada por fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) que catalisam a troca de GDP por GTP. As proteínas ativadoras de GTPase (GAPs) inativam RhoA por meio da estimulação da atividade GTPase intrínseca. A GDI sequestra RhoA ligada a GDP inativa no citoplasma.

Além disso, é conhecido que RAS é um ativador de Rac1, que por sua vez, é um ativador de RhoA. Na metástase, CDC42 é responsável pela formação do filopódia, por sua vez, Rac é responsável pela polimerização do lamelipódio para que o movimento celular se concretize, e, por fim, é necessário a ativação de RhoA para geração da força necessária para o movimento celular (SAHAI, MARSHALL, 2002).

As GTPases Rho estão associadas com motilidade e protrusão celular pela ativação de proteínas modificadoras de citoesqueleto, a proteína RhoA tem demonstrado papel central em dinâmicas do citoesqueleto como adesão celular e migração, responsável pela mediação da estabilidade e integridade genômica a partir da sua interação indireta com vias de reparo de DNA. RhoA também modula várias vias relacionadas ao metabolismo celular, diferenciação, proliferação e ciclo

celular, efeitos que se tornam mais evidentes na carcinogênese. A GTPase RhoA tem funcionamento similar aos homólogos Ras (HEO et al, 2006).

De acordo com RIDLEY (2001), a movimentação celular ocorre de acordo com a figura 6 e pode ser descrita em 4 etapas, sendo estas:

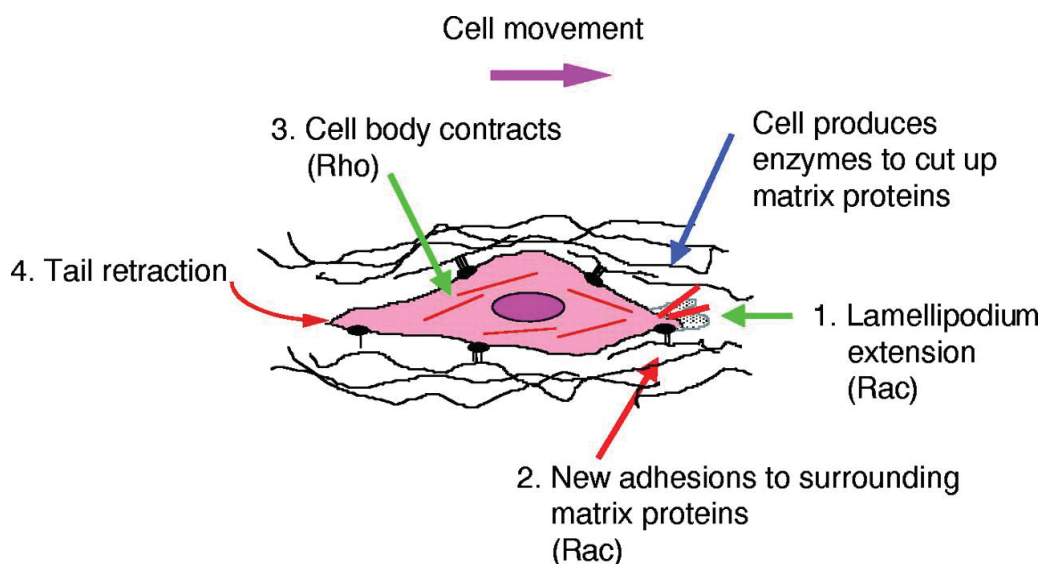
1. A formação e extensão do lamelipódio, que envolve a polimerização de actina, é documentado já o papel de Rac nesse processo.

2. Formação de novas adesões na matriz celular, pequenas estruturas de adesão focal estão localizadas no lamelipódio de células em processo de migração. Essas estruturas são responsáveis pela adesão e extensão do lamelipódio sobre a matriz extracelular, embora Rac esteja relacionado com o processo de formação dessas estruturas, ainda não é claro se é um processo dirigido por Rac.

3. A contração do corpo celular é um processo dependente do potencial de contração de fibras de actinmiosina, sendo regulado principalmente por Rho.

4. Perda de adesão da cauda, esse processo geralmente é a etapa limitante do processo, entretanto, não há indicativos que as GTPases Rho estejam envolvidas nesse processo.

Figura 6. Etapas da movimentação celular.



FONTE: RIDLEY, 2001.

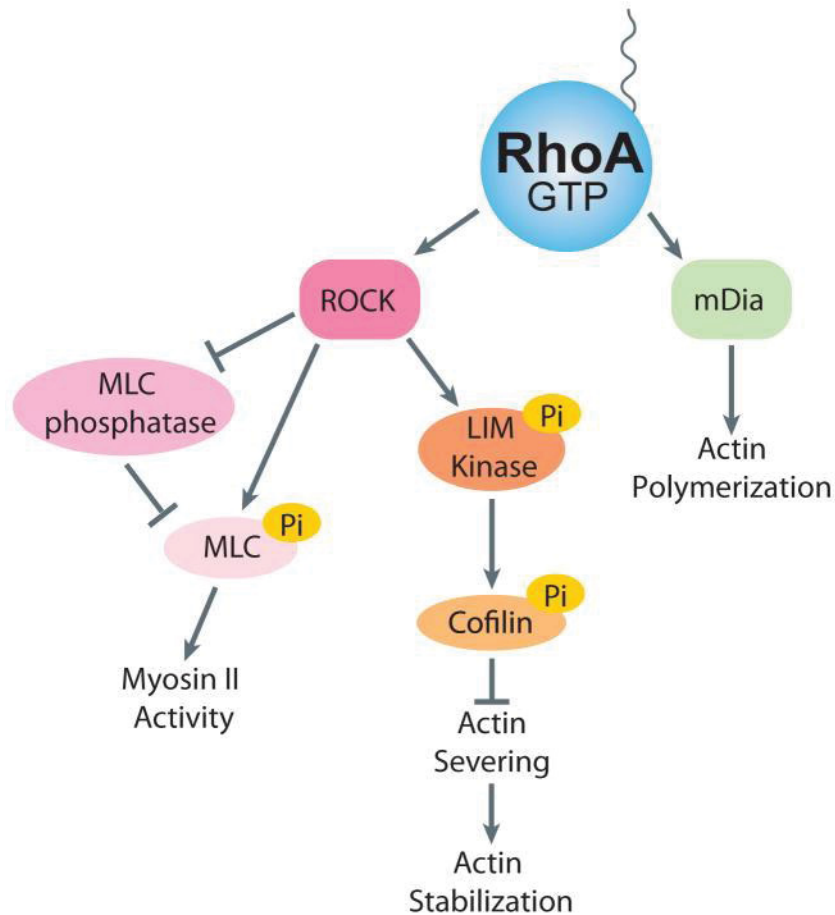
LEGENDA: As quatro etapas da movimentação celular, extensão do lamelipódio (1), novas adesões na matriz extracelular (2), contração do corpo celular mediado por Rho(3) e por fim a retração da cauda (4).

As células animais podem ter propriedades mecânicas diferenciadas, isto se dá pelo fato de o citoesqueleto celular ser adaptável, ou seja, é dependente do arranjo de microtúbulos, filamentos de actina e filamentos intermediários (Figura 7). No caso de um alto *crosslink* entre os filamentos, o resultado é um córtex celular duro, entretanto, essa situação pode ser revertida para que a célula possa formar protrusões levando a um fenótipo de maior motilidade. O papel principal de RhoA está relacionado com a atividade da miosina 2, uma ATPase que se move sobre a actina no processo de movimentação, seu principal efetor é ROCK1 e ROCK2 (LESSEY, GUILLUY, BURRIDGE, 2012).

Embora não tenha sido identificado mutações em RhoA em cânceres humanos, já é documentado o aumento da função de RhoA a partir do aumento de RNA mensageiro (mRNA) de RhoA. O aumento da atividade de RhoA também está relacionado com a passagem de checkpoints de senescência e sua supressão é relacionada com a diminuição do grau de invasão em tumores. O complexo de transcrição Myc-Sky2-Miz1 é imprescindível para a transcrição de RhoA, quando há superexpressão desse complexo em tumores o processo de metástase ocorre via ativação de RhoA (CHAN; et al, 2010).

Também é documentado o papel de RhoA na resistência a quimioterapia em tumores gastrointestinais. Foi documentado que em células SNU638/RhoA que um total de 19 genes estavam até 2 vezes superexpressos, entre eles proteínas que envolviam a defesa antioxidante como a superóxido dismutase, além de proteínas relacionadas a resistência a quimioterápicos, como por exemplo fator de crescimento endotelial (KANG, LEE, PARK, 2005).

Figura 7. Via de sinalização de RhoA.



FONTE: Reprinted with permission LESSEY, GUILLUY, BURRIDGE, 2012. Copyright 2012 American Chemical Society

LEGENDA: Rota *downstream* de RhoA mostrando seus principais efetores e suas funções biológicas.

O complexo OGG1•8-oxoG é capaz de gerar a mudança de RhoA-GDP para RhoA-GTP, mas não é capaz de promover a hidrólise do GTP ligado à RhoA, sendo assim, agindo como uma GEF. Em células sob efeito da oxidação de guanina, os níveis das Rho GTPases encontram-se alterados, demonstrando o papel do complexo OGG1•8-oxoG na ativação de Rho. Foi observado a partir da marcação do GDP por fluorescência que ao adicionar 8-oxoGua e OGG1 gerava uma rápida diminuição da fluorescência, indicando a mudança do GDP para o GTP, em torno de 50% do GTP foi substituído dentro de 60 segundos (LUO, et al; 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTIVO CELULAR

A linhagem MeWo de melanoma humano foi cultivada em meio RPMI-1640 (Cultilab) contendo 10% de soro fetal bovino (GIBCO) a 37°C e 5% CO₂. As linhagens modificadas descritas por ESPINHA et al. (2016) foram obtidas a partir de uma transfecção retroviral com um plasmídeo contendo DNA complementar de RhoA, tendo modificação na região N19 (dominante negativa de RhoA) ou modificado na região V14 (RhoA constitutivamente ativa). As células mutantes MeWo-RhoA-N19 exibiram um nível basal reduzido de RhoA-GTP em comparação com as células MeWo e as células MeWo-RhoA-V14 exibiram níveis mais altos de atividade RhoA. Sendo assim foram usadas as linhagens MeWo-RhoA N19, MeWo-RhoA V14 e a linhagem vetor vazio (MeWo Vetor). As linhagens foram cultivadas com RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino e 100 µg/mL do antibiótico G418 (SIGMA-ALDRICH) à 37°C e 5% CO₂.

3.2 FOTOSSENSIBILIZAÇÃO DAS CÉLULAS

Como fotossensibilizador foi usado o RbAc, que foi sintetizado conforme descrito por (BOTTIROLI et al, 1997). O composto é estocado dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO), mantido em freezer (-20°C).

As células MeWo parental, MeWo Vetor, MeWo RhoA-V14 e MeWo RhoA-N19 foram plaqueadas em placas de 24 ou 96 poços dependendo do ensaio (1.10⁵ células por poço na placa de 24 poços e 2.10⁴ células por poço na placa de 96 poços) e incubadas por 37°C e 5% CO₂ por 24h para adesão.

Então, o meio dos poços foi removido e foram adicionados 1000 µL (placa de 24 poços) ou 200 µL (placa de 96 poços) de RbAc (10µg/mL em meio RPMI sem soro) em cada poço e a placas foram incubadas por 2h protegidas da luz, enquanto ao controle foi adicionado meio RPMI sem soro contendo 0,1% DMSO (dimetilsulfóxido, veículo do RbAc). Após esse período de incubação, o

sobrenadante foi removido e substituído por 1 mL (placa de 24 poços) ou 200 µL (placa de 96 poços) de HBSS. Para o grupo chamado de Claro, as células foram irradiadas por LEDs de cor verde (526nm, 1,5 J/cm² de energia) em HBSS para geração do ¹O₂ conforme descrito por (SUZUKAWA; et al, 2012). Para o grupo chamado de Escuro, as células do grupo Controle receberam HBSS, mas não foram expostas à irradiação.

Foram feitas análises imediatamente após esse período que foram chamadas de 0h. Para avaliar após recuperação, o HBSS foi substituído por meio com 10% de soro fetal bovino (com G418 para linhagens transformadas) e análises também foram feitas após 18h (viabilidade por MTT e marcação do citoesqueleto).

3.3 VIABILIDADE CELULAR

Após o processo de tratamento descrito no item 3.2, aos grupos de 0h, a solução de HBSS foi removida e foram adicionados 200µL de uma solução de MTT (0,5 mg/mL dissolvido em HBSS) por 3h protegido da luz, enquanto isso, as placas do grupo de 18h foram receberam meio RPMI 10% (com G418 para linhagens transformadas) e voltaram para estufa. Após esse período foi removido o meio e adicionada a mesma solução de MTT por 3h protegido da luz.

Após a incubação com MTT, a solução foi removida e os cristais de formazan solubilizados em DMSO, as amostras foram analisadas pelo leitor de microplacas (Epoch) na absorbância de 550nm. A viabilidade foi normalizada a partir do grupo 0h Controle Escuro (adaptado de SUZUKAWA; et al, 2012).

Os dados foram analisados com o software Prisma, utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey. Os níveis de significância são indicados nas legendas.

3.4 MARCAÇÃO DO CITOESQUELETO COM FALOIDINA

As lamínulas foram submetidas a 3 ciclos de limpeza com água e extran em banho de ultrassom, em seguida as lamínulas foram limpas com álcool e submetidas a ciclos de esterilização por UV em fluxo laminar, sendo feito 2 ciclos de 15 minutos de cada lado da lamínula. Então as lamínulas foram colocadas com auxílio de uma

pinça dentro dos poços de uma placa de 24 poços, sendo a placa submetida a mais 30 minutos de UV dentro do fluxo laminar.

Para o plaqueamento e tratamento das células foram preservados os grupos conforme foi descrito no item 3.2. Após o tratamento, foi removido o meio dos poços e as células lavadas com 200 μ L de PBS por 3 vezes, em seguida foram adicionados 200 μ L de paraformaldeído 1% em PBS por 20 minutos para fixação celular no agitador de placas. Após a fixação das células, foi removida a solução de paraformaldeído e as células lavadas com PBS por 2 vezes, então foi adicionado 1 mL de uma solução 0,1% de Triton-X100 (SIGMA-ALDRICH) durante 15 minutos na gangorra para permeabilização da membrana, então, as células foram lavadas 2 vezes com PBS.

Para marcação do citoesqueleto, foi utilizado o actinred 555 (INVITROGEN) na proporção de uma gota para cada mL de PBS, foi utilizado 100 μ L de solução por poço e incubado por 1h no agitador de placas, por fim, após a incubação as lamínulas foram lavadas mais 2 vezes com PBS.

As lâminas foram limpas com álcool 70%, então foi utilizado 8 μ L de Fluoromont® com DAPI na lâmina, então as lamínulas foram removidas dos poços das placas com auxílio de uma pinça e colocadas sobre o Fluoromont® com o lado das células em contato com o composto. No dia seguinte, as lamínulas foram seladas com esmalte incolor e guardadas na geladeira, protegidas de luz para uma análise posterior no microscópio laser confocal A1R MP+ da Nikon, com objetiva de 40x, imersão em H₂O, abertura numérica: 1.15, lasers: 405 nm e 561 nm, detectores: Dapi - 450/50 (425-475); Faloidina 595/50 (570-620).

3.5 ENSAIO DE MIGRAÇÃO

Após o processo de tratamento descrito no item 3.2, as soluções de RbAc ou HBSS com DMSO foram removidos dos poços e os mesmos foram lavados 2 vezes com 200 μ L de PBS. Então foi feito um risco na monocamada de células com auxílio de uma ponteira de 10 μ L, após a confecção do risco, o PBS foi removido e foi adicionado RPMI com 2% de soro fetal bovino com 10 μ g/mL de Mitomicina C (Sigma-Aldrich) e G418 para as linhagens transformadas durante 48h, as fotos foram tiradas em microscópio (Zeiss, Axiovert 40 CFL) no tempo 0h, 24h e 48h após o risco.

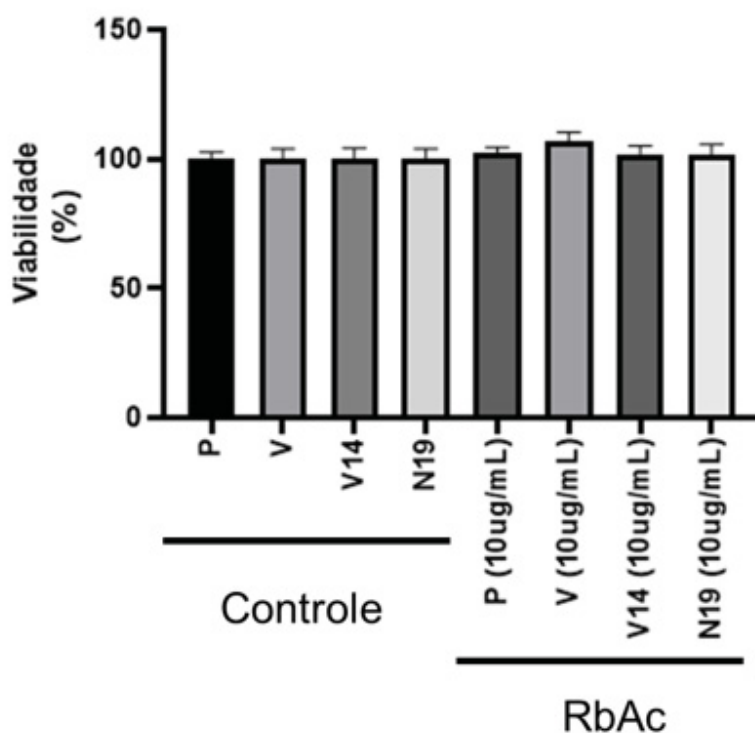
4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

4.1 VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil-2H-tetrazólio) baseia-se na conversão do composto em cristais de formazan por células vivas (VAN MEERLOO, KASPERS, CLOOS, 2011). Foram analisadas as condições de tempo 0 e 18h, além do grupo Claro (com irradiação) e Escuro (sem irradiação).

No tempo de 0h, ou seja, imediatamente após os 15 min de irradiação, tanto no grupo Claro quanto no grupo Escuro (que ficou os 15 min com HBSS protegido da luz) não se observa diferença na viabilidade celular das linhagens, como pode ser visto nas figuras 8 e 9.

Figura 8. Resultado MTT grupo 0h escuro.

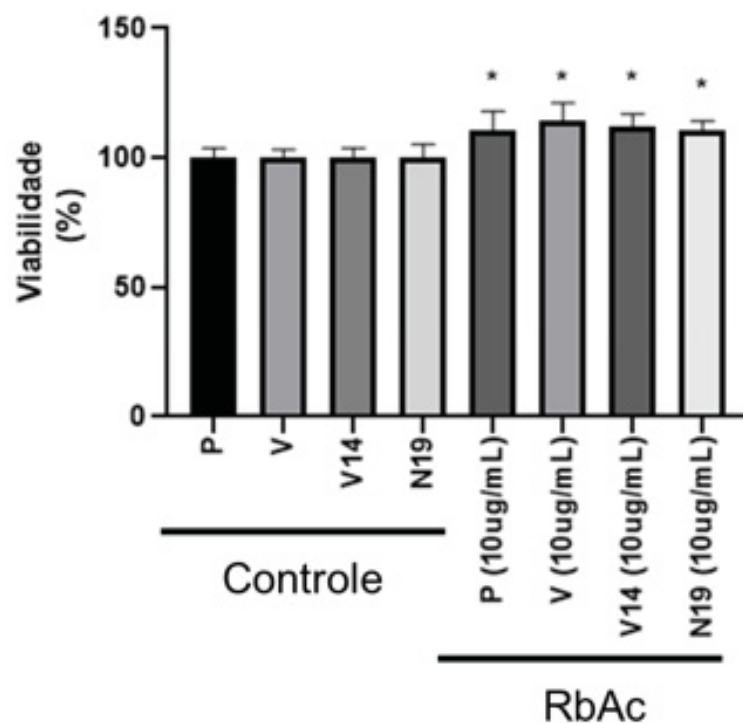


FONTE: O autor, 2021.

NOTA: Os resultados obtidos foram feitos em 3 experimentos independentes em quadruplicata, o experimento foi realizado conforme descrito nos tópicos 3.2 e 3.3. Dados pertencentes ao grupo não-fotossensibilizado no tempo de 0h. Linhagens MeWo P (parental), V (vetor vazio), V14 (RhoA ativo), N19 (dominante negativo de RhoA). Concentrações entre parênteses se referem a concentração de RbAc utilizada.

As células tratadas com RbAc por 2h e depois mantidas no escuro por 18h, mostraram mais células viáveis que as respectivas não tratadas com RbAc (figura 9). Entretanto, quando é observado o efeito da fotossensibilização após o período de 18h como visto na figura 10, é nítida a diminuição da viabilidade celular em todas as linhagens no grupo Claro. As células parentais tratadas com RbAc e irradiadas mostraram-se mais resistentes que as células transformadas (V, V14 e N19).

Figura 9. Resultado MTT grupo 0h claro.

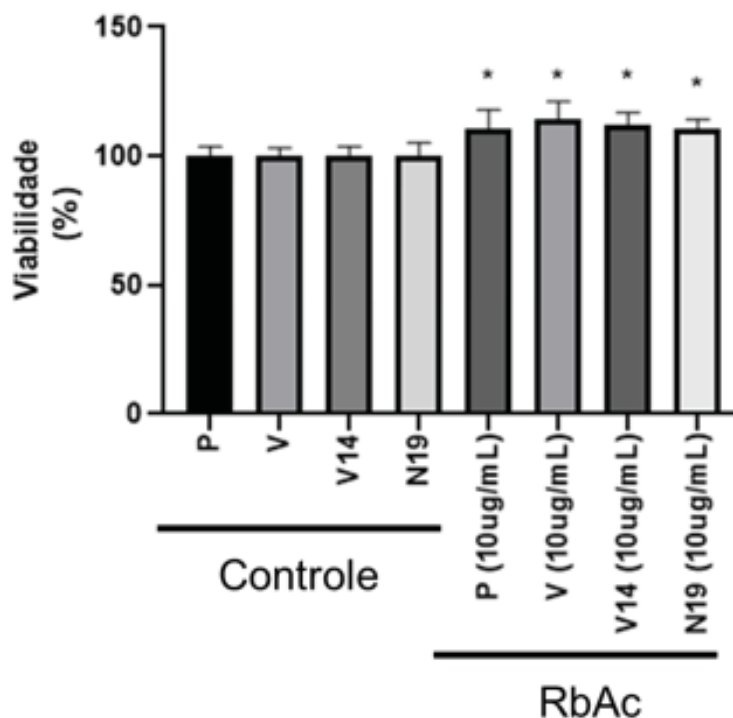


FONTE: O autor, 2021.

NOTA: Os resultados obtidos foram feitos em 3 experimentos independentes em quadruplicata, o experimento foi realizado conforme descrito nos tópicos 3.2 e 3.3. Dados pertencentes ao grupo não-fotossensibilizado no tempo de 18h. Linhagens MeWo P (parental), V (vetor vazio), V14 (RhoA ativo), N19 (RhoA dominante negativo). Grupo claro comparado com grupo escuro de cada linhagem. Concentrações entre parênteses se referem a concentração de RbAc utilizada. *

$p < 0,0001$.

Figura 10. Resultado MTT grupo 18h escuro.

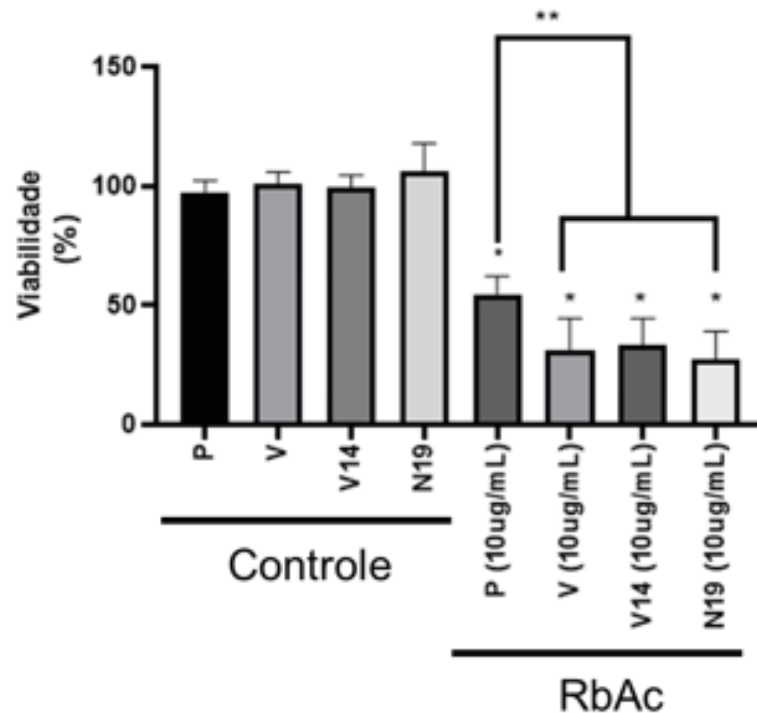


FONTE: O autor, 2021.

NOTA: Os resultados obtidos foram feitos em 3 experimentos independentes em quadruplicata, o experimento foi realizado conforme descrito nos tópicos 3.2 e 3.3. Dados pertencentes ao grupo nãoofotossensibilizado no tempo de 18h. Linhagens MeWo P (parental), V (vetor vazio), V14 (RhoA ativo), N19 (Rhoa dominante negativo). Grupo claro comparado com grupo escuro de cada linhagem. Concentrações entre parênteses se referem a concentração de RbAc utilizada. * $p < 0,0001$.

Como discutido na revisão de (PANZARINI, INGUSCIO, DINI, 2011), a PDT com a utilização do RbAc pode levar a vários mecanismos de morte celular, sendo primariamente pela ativação de caspases que por sua vez levam a apoptose. Entretanto, este processo não é um processo instantâneo, é necessário a geração do estresse do retículo endoplasmático para a ativação dessas caspases e assim a geração de uma eventual apoptose, é documentado que esse processo pode levar entre 24 a 72h. Também é possível ter a indução da apoptose por vias sem envolvimento de caspases, como por exemplo quando há apoptose mediada pela família das proteínas Bcl-2, onde esse processo demora 1h.

Figura 11. Resultado MTT grupo 18h claro.



FONTE: O autor, 2021.

NOTA: Os resultados obtidos foram feitos em 3 experimentos independentes em quadruplicata, o experimento foi realizado conforme descrito nos tópicos 3.2 e 3.3. Dados pertencentes ao grupo fotossensibilizado no tempo de 18h. Linhagens MeWo P (parental), V (vetor vazio), V14 (RhoA ativo), N19 (RhoA dominante negativo). Concentrações entre parênteses se referem a concentração de RbAc utilizada. * p < 0,0001 e ** p < 0,015.

Como observado por PANZARINI et al, (2006), embora o mecanismo principal de morte celular causado pelo RbAc seja a apoptose, é presente também a necrose celular, sendo essa mais predominante em tempos de recuperação maiores como 48 e 72h. Os principais eventos que levam a apoptose por este método é a perda de potencial da membrana mitocondrial devida à geração de ROS, estresse no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi também estão relacionados com a ativação do processo apoptótico.

Também é relatado que células de melanoma A375 perderam em torno de 50% da viabilidade no tempo de 24h, tendo um aumento para 60% após 48h com o método da PDT com curcuminas, entretanto, não houve perda de viabilidade no tempo 0h (SZLASA et al; 2020).

Os resultados obtidos corroboram os de ESPINHA et al. (2016), visto que, o comportamento de sobrevivência foi semelhante nas mesmas linhagens, sendo a

parental a mais resistente das linhagens, seguida da V14 e então a N19 como observado na figura 10. Neste trabalho ainda houve a inclusão da linhagem vetor, onde o comportamento em relação a sobrevivência celular ficou semelhante com as linhagens V14 e N19, como observado na figura 10.

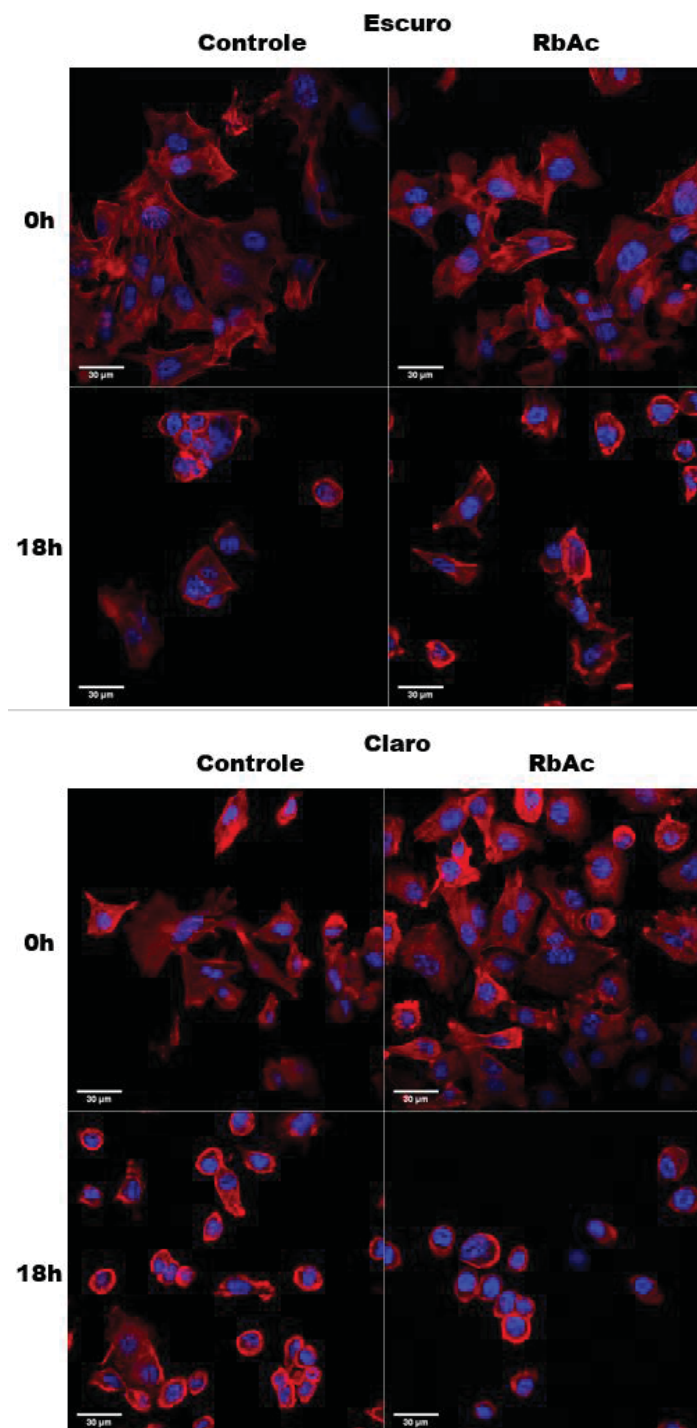
Embora o comportamento observado seja similar, o tratamento utilizado neste trabalho resultou em uma diminuição da viabilidade maior em relação ao trabalho de ESPINHA et al. (2016), a radiação UVA não possui o mesmo potencial de geração do 1O_2 como o tratamento do RbAc é capaz, além disso, a tendência do composto a se concentrar em certas organelas celulares (BOTTIROLI et; 1997), aumenta ainda mais a citotoxicidade do tratamento em relação à exposição de apenas a luz UVA.

4.2 MARCAÇÃO DO CITOESQUELETO COM FALOIDINA

Como é possível observar na figura 12, 13, 14 e 15 não há diferenças estruturais ou na distribuição das fibras de estresse nos grupos que não sofreram irradiação (Escuro), entretanto, é possível observar os filamentos de actina bem distribuídos, quando comparada com os grupos irradiados (Claro) no tempo 0h.

Já nos grupos de 18h ocorre uma mudança do padrão de marcação dos grupos não irradiados até então não prevista. É possível observar que nos grupos irradiados após 18h, que houve uma mudança no padrão de distribuição das fibras de estresse, estando principalmente concentradas nas bordas das células das linhagens. Também é possível reparar que a linhagem vetor possui diferenças estruturais em relação a linhagem parental, indicando que, de fato, o vetor de transfecção pode estar interferindo na polimerização da actina.

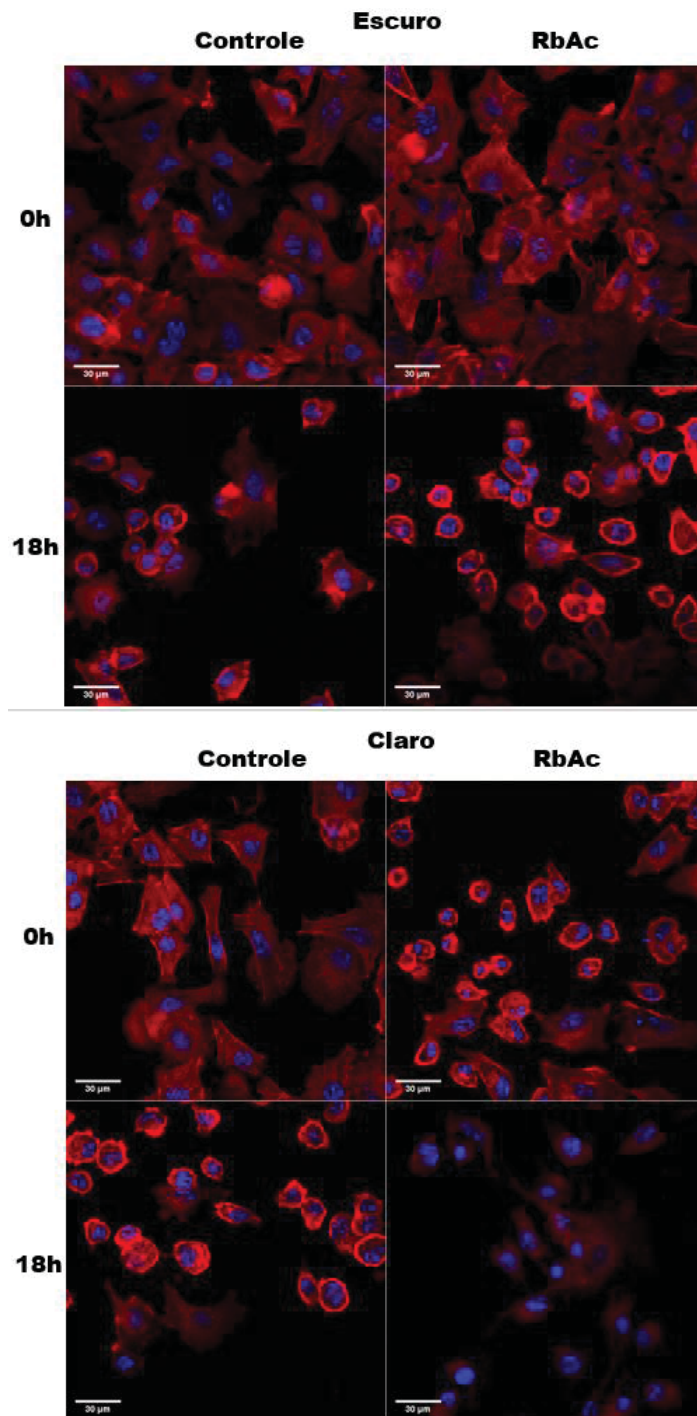
Figura 12. Imunomarcação da linhagem parental.



FONTE: O autor, 2021.

NOTA: As imagens obtidas foram de um experimento, os tratamentos dos grupos Claro e Escuro estão de acordo com o apresentado no tópico 3.2, a marcação feita com a faloidina seguiu o protocolo do tópico 3.4, as imagens foram obtidas com auxílio do microscópio confocal Nikon e o tratamento das imagens foi feito com o imageJ e NIS-Elements.

Figura 13. Imunomarcação da linhagem Vetor.



FONTE: O autor, 2021.

NOTA: As imagens obtidas foram de um experimento, os tratamentos dos grupos Claro e Escuro estão de acordo com o apresentado no tópico 3.2, a marcação feita com a faloidina seguiu o protocolo do tópico 3.4, as imagens foram obtidas com auxílio do microscópio confocal Nikon e o tratamento das imagens foi feito com o imageJ e NIS-Elements.

Quando comparamos as figuras 14 e 15, podemos observar uma diferença no nível de organização das fibras de estresse no tempo de 0h, com a linhagem V14 exibindo níveis superiores de organização em relação a linhagem N19, estes resultados corroboram com os de ESPINHA et al, (2016), onde foi possível observar o mesmo comportamento nas linhagens transformadas.

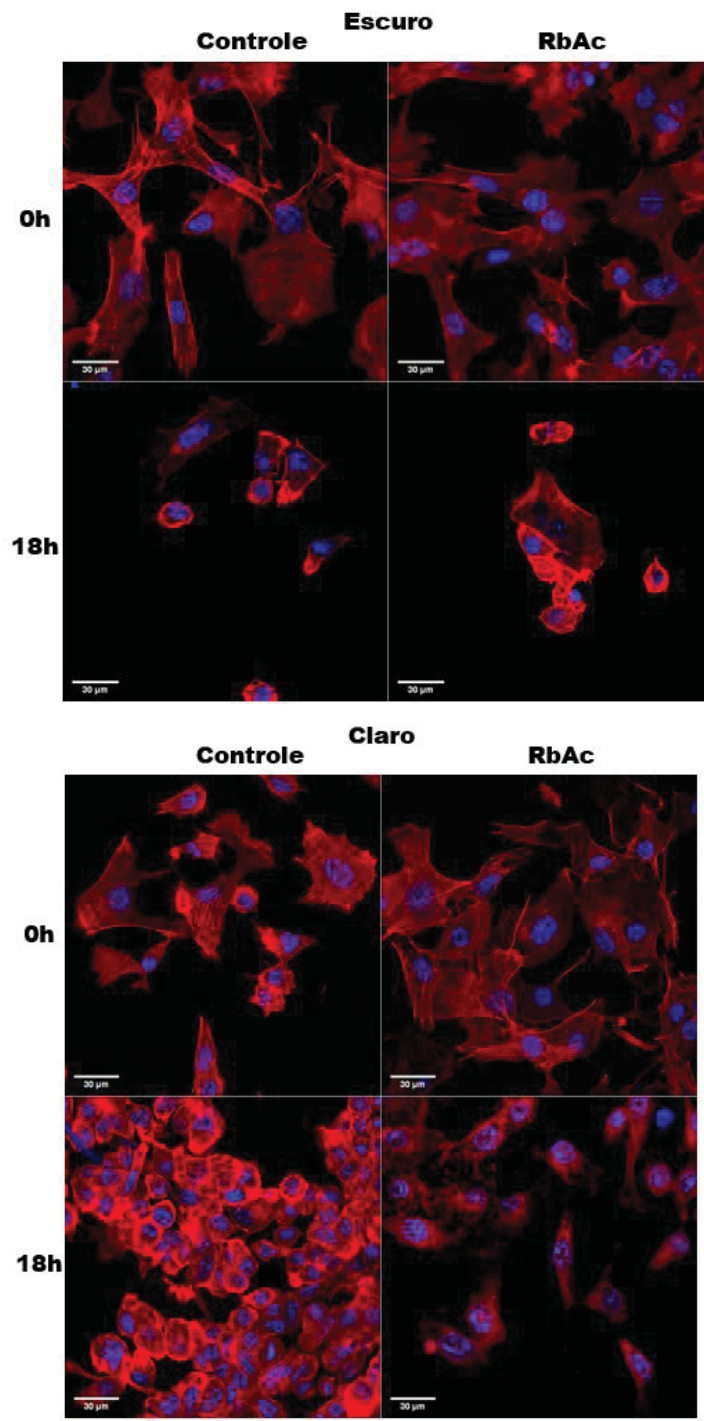
É documentado que a PDT mediada por RbAc é capaz de alterar a organização de resíduos de glicanos na membrana plasmática das células, foi observado em células HeLa em processo apoptótico promovido pelo RbAc, que houve uma exposição exacerbada de diversos resíduos, como por exemplo, a N-Acetilgalactosamina (PANZARINI et al, 2013).

No mesmo modelo celular, outro estudo mostrou que células tratadas com RbAc exibiram mudanças de organização do citoesqueleto celular, as mudanças ocorrem no tempo de 24h e 48h sendo possível observar o aumento da concentração de actina filamentosa na região cortical (SOLDANI et al, 2007).

Conforme apontado na revisão de DI VENOSA et al. (2015), o maior alvo da PDT no citoesqueleto são os microfilamentos de actina, entretanto, os efeitos da PDT sob o citoesqueleto celular aparentam depender da morfologia inicial da célula. Visto que, as Rho GTPases estão intrinsecamente correlacionadas com o citoesqueleto celular, principalmente RhoA, é muito provável sua contribuição no processo de *bleb*, já que a inibição de adesão focal e a formação de fibras de estresse são fatores chave da mudança da morfologia celular.

A PDT utilizando o ALA mostrou uma desorganização das fibras de estresse na primeira hora após a PDT em células HB4a, após 3h as células começaram a apresentar uma forma mais arredondada. Entretanto, quando comparado com a linhagem transfectada com RAS, além de a linhagem exibir um menor nível de organização das fibras de estresse no tempo 0h após a irradiação foi possível identificar uma transição para o formato de *bleb* após 1h de PDT, também foi encontrado possíveis pontos de adesão de actina na periferia das células, a recuperação das estruturas de actina começaram em torno de 6 a 24h estando completa no tempo de 48h (DI VENOSA et al; 2012). É possível ver a formação destas projeções celulares nas células irradiadas, visto que a actina está concentrada predominantemente na periferia da célula.

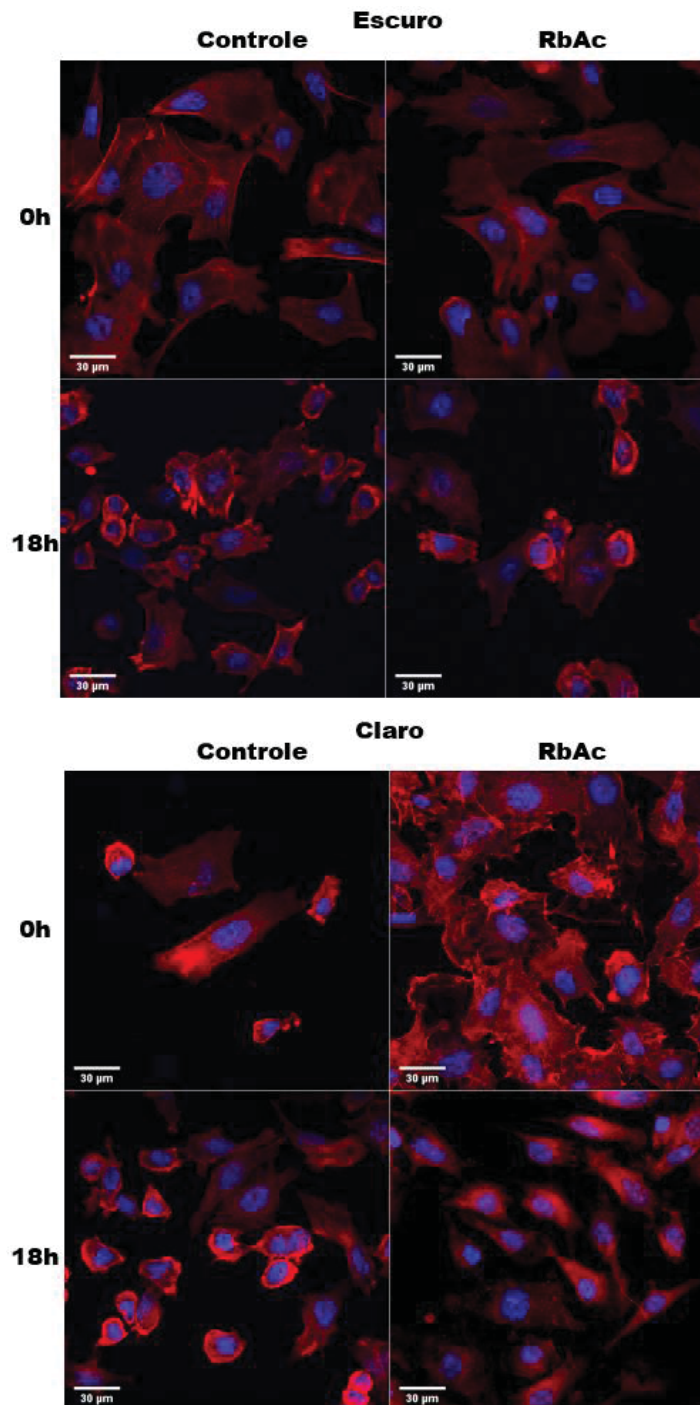
Figura 14. Imunomarcação da linhagem V14.



FONTE: O autor, 2021.

NOTA: As imagens obtidas foram de um experimento, os tratamentos dos grupos Claro e Escuro estão de acordo com o apresentado no tópico 3.2, a marcação feita com a faloidina seguiu o protocolo do tópico 3.4, as imagens foram obtidas com auxílio do microscópio confocal Nikon e o tratamento das imagens foi feito com o imageJ e NIS-Elements.

Figura 15. Imunomarcação da linhagem N19.



FONTE: O autor, 2021.

NOTA: As imagens obtidas foram de um experimento, os tratamentos dos grupos Claro e Escuro estão de acordo com o apresentado no tópico 3.2, a marcação feita com a faloidina seguiu o protocolo do tópico 3.4, as imagens foram obtidas com auxílio do microscópio confocal Nikon e o tratamento das imagens foi feito com o imageJ e NIS-Elements.

No trabalho de CASAS et al. (2008), onde foram estudadas células LM3 e clones resistentes à PDT, foi possível observar que a camada de actina presente nestas células sofria alterações nas linhagens resistentes a PDT-ALA, demonstrando padrões mais ondulares de actina, além de níveis de organização diferentes, onde as células irradiadas exibiam uma menor organização das fibras de estresse. Como observado nas figuras 12, 13, 14 e 15 após a irradiação, sugerindo uma recuperação gradual e mudança de fenótipo celular após a fotossensibilização.

Em algumas linhagens de melanoma com a presença da curcumina foi possível observar uma menor abundância das fibras de estresse com a maior parte da actina concentrada na borda das células, em relação a queratinócitos e fibroblastos. Quando submetidas a PDT-curcumina gerou a polimerização irregular de actina, além da destruição da estrutura fibrilar, levando as células a um fenótipo mais arredondado (SZLASA et al; 2020).

Ainda em células HeLa, quando expostas a fotossensibilização por ftalocianina de zinco (II) no tempo 0h e no grupo controle não foi possível observar diferenças, entretanto, após 8h e 24h dependendo da concentração, foi possível observar que os filamentos de actina começaram a se aglomerar e gerar um aumento na actina filamentosa, além disso, também foi visto núcleos com fragmentação da cromatina, indicando um possível processo apoptótico, a reversão deste processo demorou de 24 a 48h dependendo da concentração do fotossensibilizador (JUARRANZ et al. 2001).

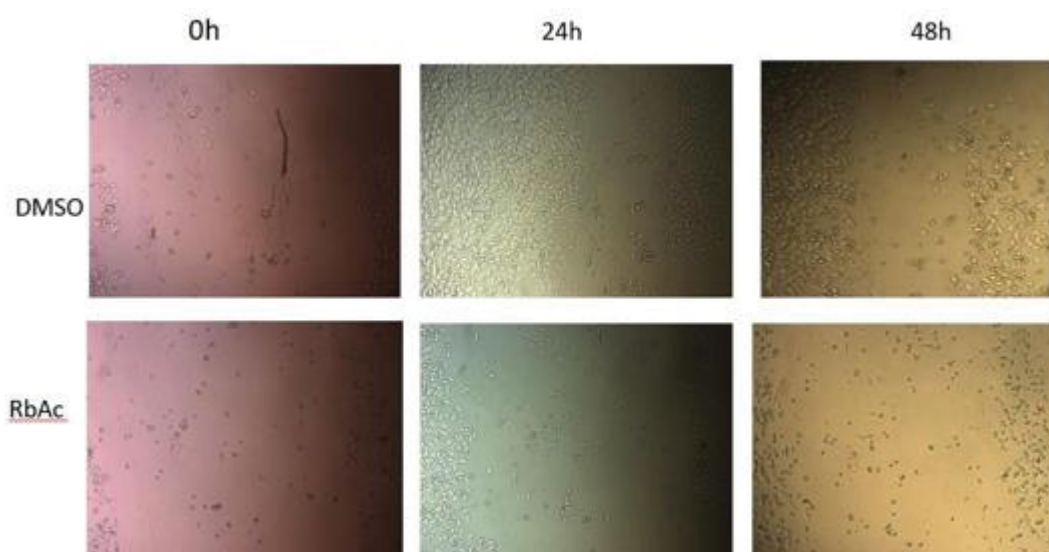
No presente estudo, após o processo de irradiação (grupos claros), é possível observar que além das células concentrarem actina em sua periferia, demonstram também uma mudança morfológica, onde é possível ver uma forma mais arredondada, isto se dá pela reorganização estrutural da actina no citoesqueleto celular.

4.3 ENSAIO DE MIGRAÇÃO

Foi possível observar nas figuras 17, 19, 21 e 23 que, as células dos grupos claros demonstraram um potencial de motilidade até as primeiras 24 horas o que contrasta em relação aos grupos não irradiados, onde há movimentação celular expressiva no tempo de 48 horas, além de uma motilidade maior em relação aos grupos irradiados. Além disso, nas imagens de 48 horas do grupo claro é possível observar a redução da motilidade além de uma mudança nas células para uma forma mais arredondada.

Embora todas as linhagens tenham demonstrado um comportamento parecido em termos de motilidade, a linhagem V14 demonstrou uma aparente reversão do fenótipo mais arredondado para um fenótipo mais espreado novamente.

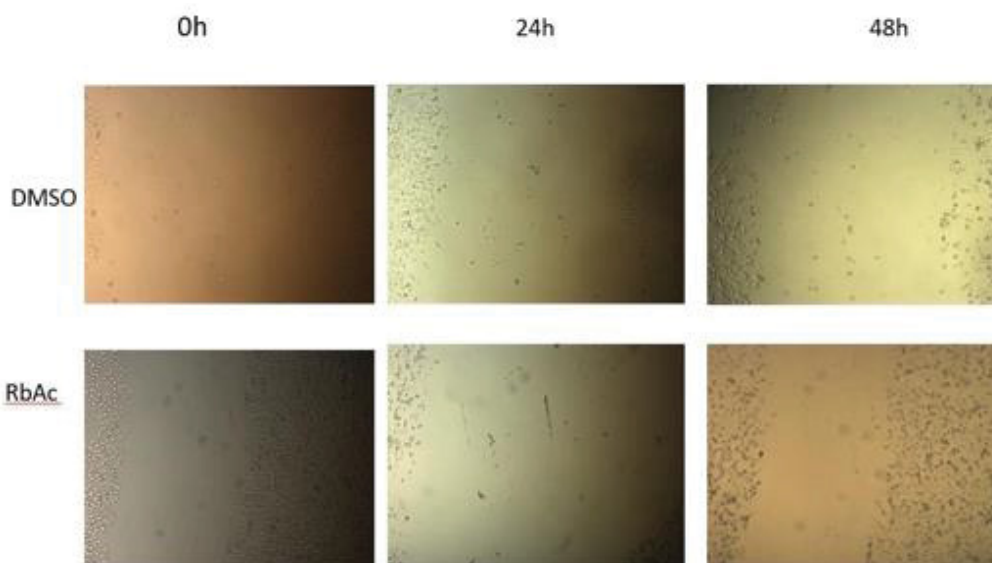
Figura 16. Ensaio de migração da linhagem Parental (Escuro).



FONTE: O autor, 2021.

NOTA: As imagens obtidas foram de um experimento, tratamento da linhagem Parental grupo Escuro conforme descrito no tópico 3.2, o protocolo usado para geração do risco está no tópico 3.5.

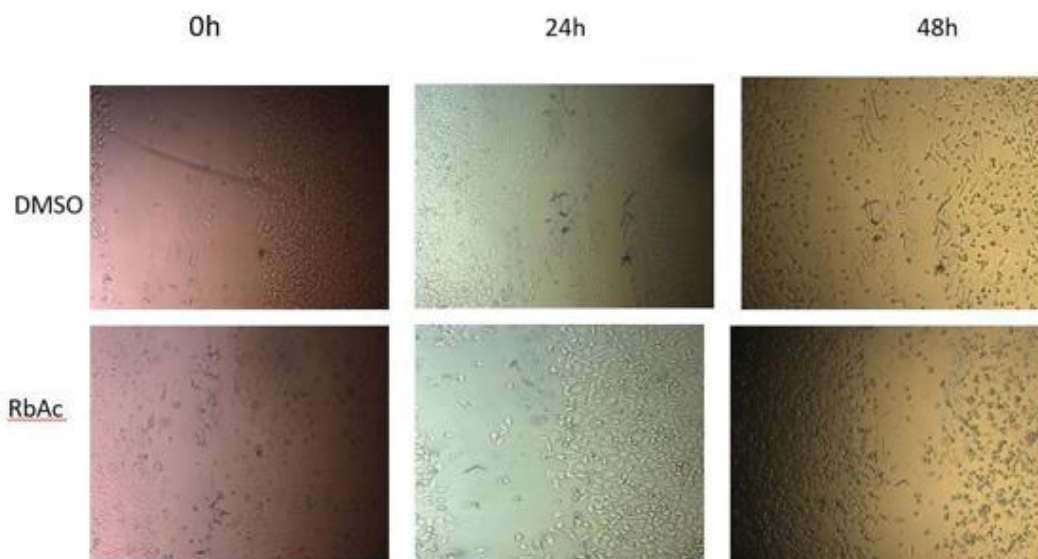
Figura 17. Ensaio de migração da linhagem Parental (Claro).



FONTE: O autor, 2021.

NOTA: As imagens obtidas foram de um experimento, tratamento da linhagem Parental grupo Claro conforme descrito no tópico 3.2, o protocolo usado para geração do risco está no tópico 3.5.

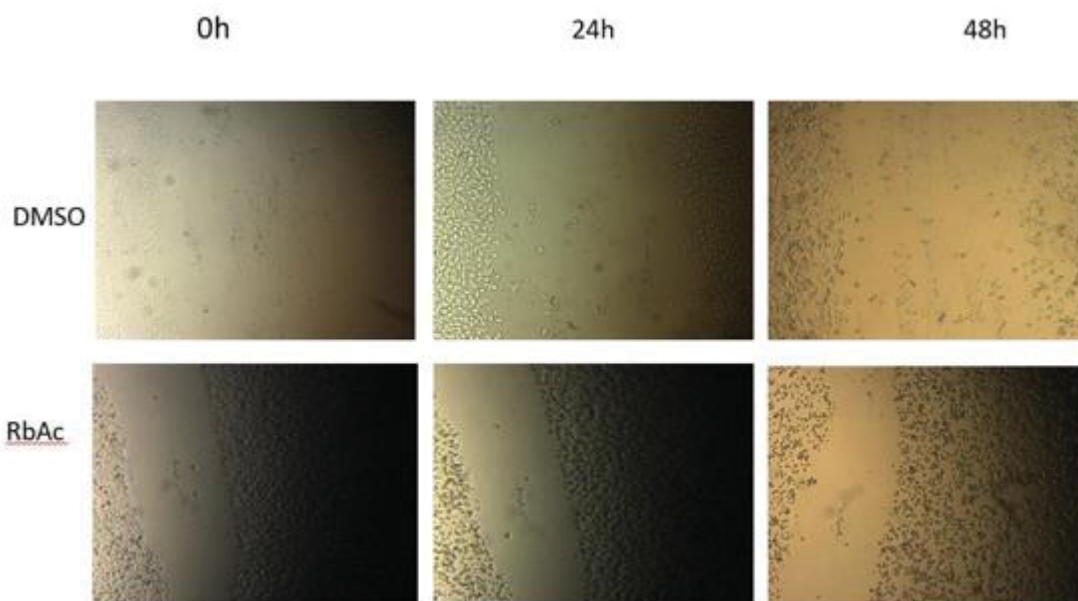
Figura 18. Ensaio de migração da linhagem Vetor (Escuro).



FONTE: O autor, 2021.

NOTA: As imagens obtidas foram de um experimento, tratamento da linhagem Vetor grupo Escuro conforme descrito no tópico 3.2, o protocolo usado para geração do risco está no tópico 3.5.

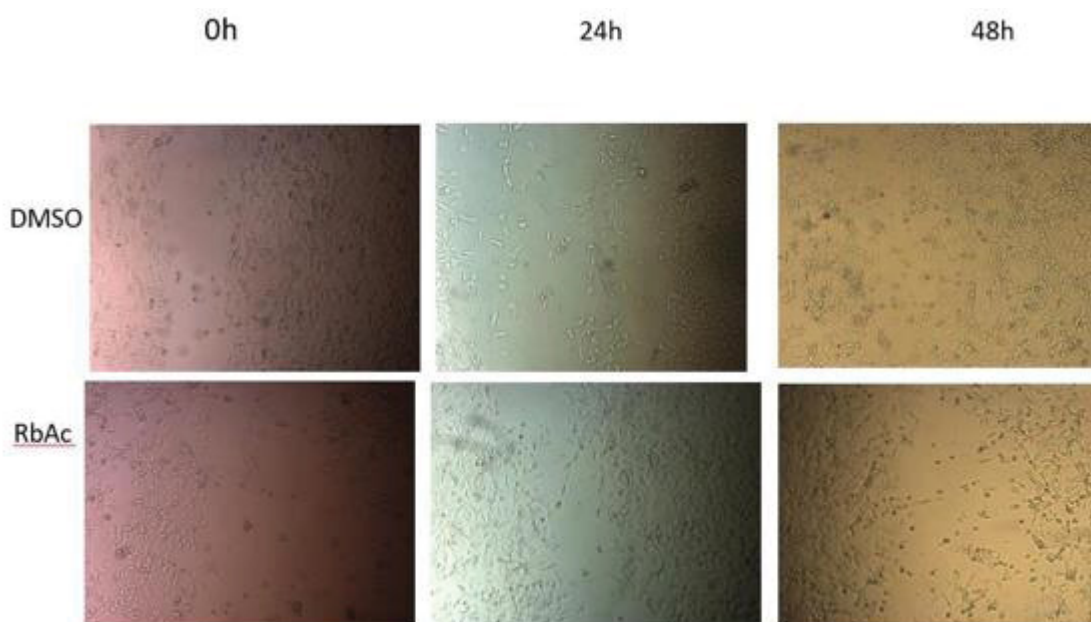
Figura 19. Ensaio de migração da linhagem Vetor (Claro).



FONTE: O autor, 2021.

NOTA: As imagens obtidas foram de um experimento, tratamento da linhagem Vetor grupo Claroconforme descrito no tópico 3.2, o protocolo usado para geração do risco está no tópico 3.5.

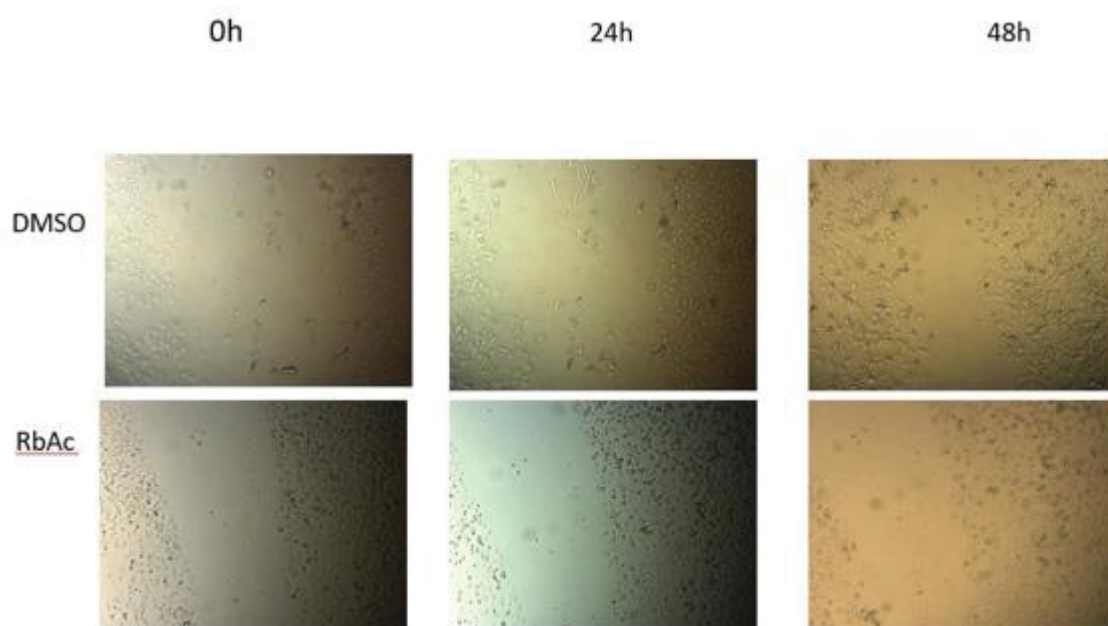
Figura 20. Ensaio de migração da linhagem V14 (Escuro).



FONTE: O autor, 2021.

NOTA: As imagens obtidas foram de um experimento, tratamento da linhagem V14 grupo Escuroconforme descrito no tópico 3.2, o protocolo usado para geração do risco está no tópico 3.5.

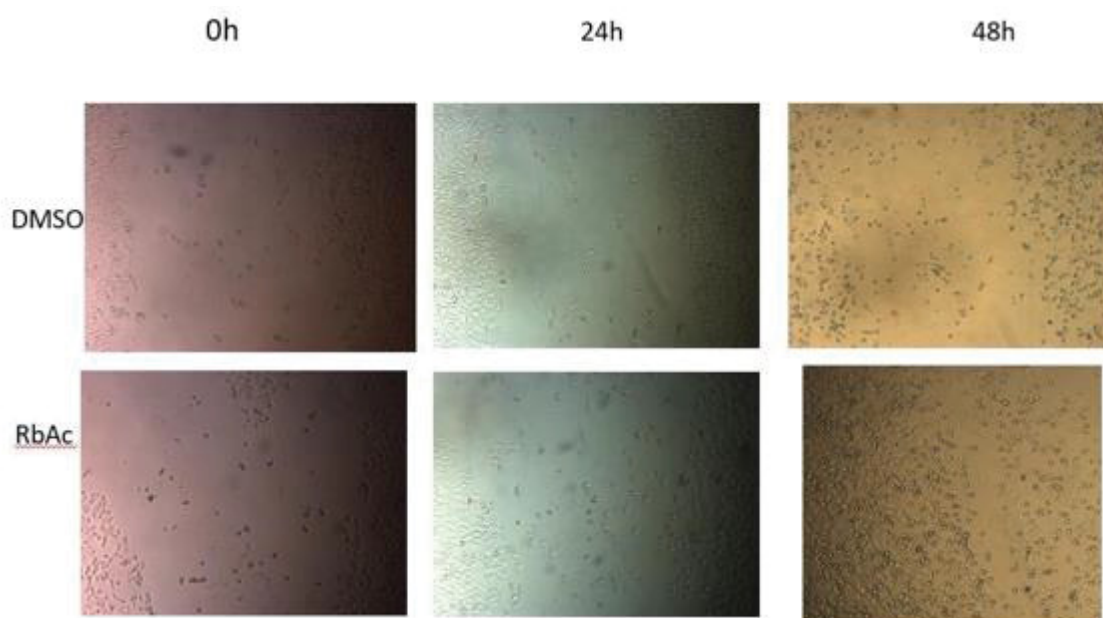
Figura 21. Ensaio de migração da linhagem V14 (Claro).



FONTE: O autor, 2021.

NOTA: As imagens obtidas foram de um experimento, tratamento da linhagem V14 grupo Claroconforme descrito no tópico 3.2, o protocolo usado para geração do risco está no tópico 3.5.

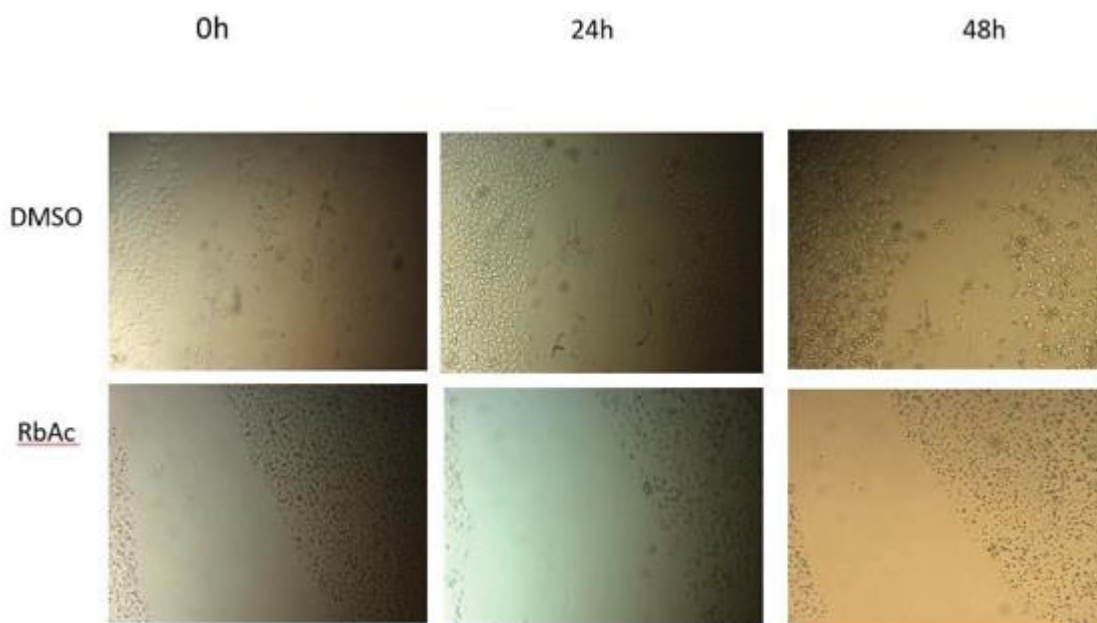
Figura 22. Ensaio de migração da linhagem N19 (Escuro).



FONTE: O autor, 2021.

NOTA: As imagens obtidas foram de um experimento, tratamento da linhagem N19 grupo Escuroconforme descrito no tópico 3.2, o protocolo usado para geração do risco está no tópico 3.5.

Figura 23. Ensaio de migração da linhagem N19 (Claro).



FONTE: O autor, 2021.

NOTA: As imagens obtidas foram de um experimento, tratamento da linhagem N19 grupo Claro conforme descrito no tópico 3.2, o protocolo usado para geração do risco está no tópico 3.5.

Como visto no trabalho de ESPINHA et al. (2016), foi possível observar um comportamento semelhante até o tempo de 24h onde é possível ver o maior período de deslocamento.

No trabalho de SZLASA et al. (2020) foi demonstrado que as células irradiadas com a presença das curcuminas apresentaram uma motilidade muito menor em relação aos grupos controle, além disso houve algumas linhagens que não conseguiram fechar a cisão no período de 24h. Além disso, algumas linhagens com a presença de apenas a curcumina (sem a irradiação) também não foram capazes de migrar de forma efetiva, também não fechando a ferida no período de 24h.

Como demonstrado em estudo com células de câncer de pulmão A549, quando submetidas a fotossensibilização com o composto SBOP-Lyso, um fotossensibilizante que possui como alvo os lisossomos. No grupo não irradiado, a ferida se encontrou quase fechada após o período de 48h, entretanto, o grupo irradiado demonstrou uma motilidade claramente menor em relação ao controle, visto que não demonstrou quase nenhum deslocamento celular (BAI, ZHANG, QIAN, 2021).

Esses resultados corroboram os resultados obtidos, uma vez que, os grupos não irradiados (Escuro) demonstrados nas figuras 16, 18, 20 e 22 conseguiram cobrir uma área maior da ferida em relação aos grupos irradiados (Claro), como observado nas figuras 17, 19, 21 e 23. Além disso, também é possível observar que apenas a dose de radiação sem o sensibilizador (DMSO Claro) foi capaz de causar impacto na motilidade celular, porém, o efeito é muito mais evidente quando em presença do fotossensibilizador (RbAc Claro).

Quando analisado a motilidade entre as linhagens em relação a RhoA, não foi possível observar uma aparente diminuição da motilidade entre a linhagem V14 e N19. Estes resultados não eram esperados, visto que ESPINHA et al. (2016) observou diferenças de motilidade entre as duas linhagens quando expostas a UVA, UVB e UVC, sendo mais marcante na radiação mais energética do UVC. Isto pode ser analisado em relação a taxa de geração de 1O_2 da radiação UVA em relação ao fotossensibilizante RbAc, onde a geração além de mais intensa também é mais localizada.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho se propôs a investigar um possível papel de RhoA em condições de aumento dos níveis de 8-oxoGua como resultado da geração de $^1\text{O}_2$ pela fotossensibilização com Rosa Bengala, visando um melhor entendimento da resistência de melanomas à terapia fotodinâmica. Com relação à viabilidade celular, não foi possível observar grandes diferenças nos experimentos em relação às linhagens com distintos níveis de RhoA, além disso, o comportamento da linhagem vetor se mostrou consideravelmente diferente em relação à parental, dando indícios que o vetor de transfecção pode estar afetando a resposta celular da linhagem.

O comportamento das células fotossensibilizadas em relação às fibras de estresse parece estar de acordo com a literatura, indicando uma tendência de fenótipo similar a células resistentes a PDT quando a atividade de RhoA é reduzida. Assim como, em relação à motilidade, houve uma aparente diminuição após a fototerapia, sendo mais perceptível na condição de supressão de RhoA.

REFERÊNCIA

ALLEN, Mary Tedd et al. A wavelength dependent mechanism for rose bengal- sensitized photoinhibition of red cell acetylcholinesterase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1075, n. 1, p. 42-49, 1991.

ALLGAYER, Julia et al. Widespread transcriptional gene inactivation initiated by a repair intermediate of 8-oxoguanine. *Nucleic acids research*, v. 44, n. 15, p. 7267-7280, 2016.

ANDRADE, E. R. et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.

BAI, Jin; ZHANG, Lei; QIAN, Ying. A near-infrared and lysosomal targeting thiophene-BODIPY photosensitizer: Synthesis and its imaging guided photodynamic therapy of cancer cells. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 252, p. 119512, 2021.

BALDEA, I.; FILIP, A. G. Photodynamic therapy in melanoma—an update. *Journal of Physiology and pharmacology*, v. 63, n. 2, p. 109, 2012.

BOLDOGH, Istvan et al. Activation of ras signaling pathway by 8-oxoguanine DNA glycosylase bound to its excision product, 8-oxoguanine. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 25, p. 20769-20773, 2012.

BOTTIROLI, G. et al. Enzyme-assisted cell photosensitization: a proposal for an efficient approach to tumor therapy and diagnosis. The rose bengal fluorogenic substrate. *Photochemistry and photobiology*, v. 66, n. 3, p. 374-383, 1997.

BROZYNA, Anna et al. Mechanism of UV-related carcinogenesis and its contribution to nevi/melanoma. *Expert review of dermatology*, v. 2, n. 4, p. 451- 469, 2007.

CADET, Jean; DOUKI, Thierry. Oxidatively generated damage to DNA by UVA radiation in cells and human skin. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 131, n. 5, p. 1005-1007, 2011.

CASAS, Adriana et al. Disorganisation of cytoskeleton in cells resistant to photodynamic treatment with decreased metastatic phenotype. *Cancer letters*, v. 270, n. 1, p. 56-65, 2008.

CHAN, Chia-Hsin et al. Deciphering the transcriptional complex critical for RhoA gene expression and cancer metastasis. *Nature cell biology*, v. 12, n. 5, p. 457-467, 2010.

CHEN, I.-Peng et al. UVA-induced epigenetic regulation of P16 INK4a in human epidermal keratinocytes and skin tumor derived cells. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 11, n. 1, p. 180-190, 2002.

COIT, Daniel G. et al. Melanoma. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, v. 7, n. 3, p. 250-275, 2009.

DI VENOSA, G. et al. Changes in actin and E-cadherin expression induced by 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in normal and Ras-transfected human mammary cell lines. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 106, p. 47-52, 2012.

DI VENOSA, Gabriela et al. The role of cytoskeleton and adhesion proteins in the resistance to photodynamic therapy. Possible therapeutic interventions. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 14, n. 8, p. 1451- 1464, 2015.

ESPINHA, Gisele et al. Inhibition of the RhoA GTPase activity increases sensitivity of melanoma cells to UV radiation effects. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2016, 2016.

ETIENNE-MANNEVILLE, Sandrine; HALL, Alan. Rho GTPases in cell biology. *Nature*, v. 420, n. 6916, p. 629-635, 2002.

GALLARDO-VILLAGRÁN, Manuel et al. Photosensitizers used in the photodynamic therapy of rheumatoid arthritis. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n. 13, p. 3339, 2019.

GERMAN, Peter et al. Activation of cellular signaling by 8-oxoguanine DNA glycosylase-1-initiated DNA base excision repair. *DNA repair*, v. 12, n. 10, p. 856-863, 2013.

GOITRE, Luca et al. The Ras superfamily of small GTPases: the unlocked secrets. *Ras signaling*, p. 1-18, 2014.

HAJAS, Gyorgy et al. 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1 links DNA repair to cellular signaling via the activation of the small GTPase Rac1. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 61, p. 384-394, 2013.

HEO, Jongyun et al. Redox regulation of RhoA. *Biochemistry*, v. 45, n. 48, p.14481-14489, 2006.

HODIS, Eran et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*, v. 150, n. 2, p. 251-263, 2012.

INCA. Câncer de Pele - Melanoma. 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>>. Acesso em: 02 fev, 2020.

JUARRANZ, Angeles et al. Photodamage Induced by Zinc (II)-phthalocyanine to Microtubules, Actin, α -Actinin and Keratin of HeLa Cells¶. *Photochemistry and Photobiology*, v. 73, n. 3, p. 283-289, 2001.

KAMENISCH, York et al. UVA, metabolism and melanoma: UVA makes melanoma hungry for metastasis. *Experimental dermatology*, v. 27, n. 9, p. 941- 949, 2018.

KANG, Won Ki; LEE, Inkyoung; PARK, Chaehwa. Characterization of RhoA-mediated chemoresistance in gastric cancer cells. *Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association*, v. 37, n. 4, p. 251, 2005.

KIM, Youngmi et al. CD44-epidermal growth factor receptor interaction mediates hyaluronic acid-promoted cell motility by activating protein kinase C signaling involving Akt, Rac1, Phox, reactive oxygen species, focal adhesion kinase, and MMP-2. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 33, p. 22513-22528, 2008.

LESSEY, Elizabeth C.; GUILLUY, Christophe; BURRIDGE, Keith. From mechanical force to RhoA activation. *Biochemistry*, v. 51, n. 38, p. 7420-7432, 2012.

LI, Gang; HERLYN, Meenhard. Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Molecular medicine today*, v. 6, n. 4, p. 163-169, 2000.

LI, Xin-Ying et al. Susceptibility and resistance mechanisms during photodynamic therapy of melanoma. *Frontiers in Oncology*, v. 10, 2020.

LIU-SMITH, Feng; DELLINGER, Ryan; MEYSKENS JR, Frank L. Updates of reactive oxygen species in melanoma etiology and progression. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 563, p. 51-55, 2014.

LUO, Jixian et al. 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1-mediated DNA repair is associated with Rho GTPase activation and α -smooth muscle actin polymerization. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 73, p. 430-438, 2014.

MIYAMOTO, Sayuri et al. Singlet molecular oxygen generated from lipid hydroperoxides by the Russell mechanism: studies using ^{18}O -labeled linoleic acid hydroperoxide and monomol light emission measurements. *Journal of the American Chemical Society*, v. 125, n. 20, p. 6172-6179, 2003.

PANZARINI, E.; INGUSCIO, V.; DINI, L. Timing the multiple cell death pathways initiated by Rose Bengal acetate photodynamic therapy. *Cell death & disease*, v. 2, n. 6, p. e169-e169, 2011.

PANZARINI, Elisa et al. Apoptosis induction and mitochondria alteration in human HeLa tumour cells by photoproducts of Rose Bengal acetate. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 83, n. 1, p. 39-47, 2006.

PANZARINI, Elisa et al. In vitro and in vivo clearance of Rose Bengal Acetate- PhotoDynamic Therapy-induced autophagic and apoptotic cells. *Experimental Biology and Medicine*, v. 238, n. 7, p. 765-778, 2013.

PANZARINI, Elisa; INGUSCIO, Valentina; DINI, Luciana. Overview of cell death mechanisms induced by rose bengal acetate-photodynamic therapy. *International Journal of Photoenergy*, v. 2011, 2011.

PIBIRI, Ivana et al. Photochemically Produced Singlet Oxygen: Applications and Perspectives. *ChemPhotoChem*, v. 2, n. 7, p. 535-547, 2018.

RAVANAT, Jean-Luc et al. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 51, p. 40601-40604, 2000.

RIBEIRO, Sonia Machado Rocha et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience journal*, v. 21, n. 3, 2005.

RIDLEY, Anne J. Rho GTPases and cell migration. *Journal of cell science*, v.114, n. 15, p. 2713-2722, 2001.

SAHAI, Erik; MARSHALL, Christopher J. RHO-GTPases and cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 2, n. 2, p. 133-142, 2002.

SCHADENDORF, Dirk et al. Melanoma. *Nature Reviews Disease Primers*, v.1, n. 1, p. 1-20, 2015.

SCHADENDORF, Dirk et al. Melanoma. *The Lancet*, v. 392, n. 10151, p. 971- 984, 2018.

SIES, Helmut; BERNDT, Carsten; JONES, Dean P. Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, v. 86, p. 715-748, 2017.

SIMÕES, MC Filipe; SOUSA, JJ Simões; PAIS, AAC Canelas. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. *Cancer letters*, v. 357, n. 1, p. 8-42, 2015.

SOLDANI, C. et al. Apoptosis in tumour cells photosensitized with Rose Bengal acetate is induced by multiple organelle photodamage. *Histochemistry and cell biology*, v. 128, n. 5, p. 485-495, 2007.

SUDHAKAR, Akulapalli. History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal of cancer science & therapy*, v. 1, n. 2, p. 1, 2009.

SUZUKAWA, Andréia Akemi et al. Novel properties of melanins include promotion of DNA strand breaks, impairment of repair, and reduced ability to damage DNA after quenching of singlet oxygen. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 52, n. 9, p. 1945-1953, 2012.

SWALWELL, Helen et al. Investigating the role of melanin in UVA/UVB-and hydrogen peroxide-induced cellular and mitochondrial ROS production and mitochondrial DNA damage in human melanoma cells. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 52, n. 3, p. 626-634, 2012.

SZLASA, Wojciech et al. Effects of curcumin based PDT on the viability and the organization of actin in melanotic (A375) and amelanotic melanoma (C32)–in vitro studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 132, p. 110883, 2020.

TURAN, Ilke Simsek et al. A bifunctional photosensitizer for enhanced fractional photodynamic therapy: Singlet oxygen generation in the presence and absence of light. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 55, n. 8, p. 2875-2878, 2016.

VAN MEERLOO, Johan; KASPERS, Gertjan JL; CLOOS, Jacqueline. Cell sensitivity assays: the MTT assay. In: *Cancer cell culture*. Humana Press, 2011. p. 237-245.

VASCONCELOS, Sandra Mary Lima et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química nova*, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

WAINSTEIN, Alberto JA; BELFORT, Francisco A. Conduta para o melanoma cutâneo. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 31, n. 3, p. 204-214, 2018.

WENNERBERG, Krister; ROSSMAN, Kent L.; DER, Channing J. The Ras superfamily at a glance. *J cell Sci*, v. 118, n. 5, p. 843-846, 2005.

ZHOU, Bo et al. Tom20 senses iron-activated ROS signaling to promote melanoma cell pyroptosis. *Cell research*, v. 28, n. 12, p. 1171-1185, 2018.

ANEXO I – AUTORIZAÇÃO DO USO DE IMAGEM DA FIGURA 2.

29/07/2021

RightsLink Printable License

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jul 29, 2021

This Agreement between Glauca R Martinez ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number 5118320770881

License date Jul 29, 2021

Licensed Content
Publisher ElsevierLicensed Content
Publication Archives of Biochemistry and Biophysics

Licensed Content Title Updates of reactive oxygen species in melanoma etiology and progression

Licensed Content Author Feng Liu-Smith,Ryan Dellinger, Frank L. Meyskens

Licensed Content Date Dec 1, 2014

Licensed Content Volume 563

<https://e100.copyright.com/AppDispatchServlet>

1/10

29/07/2021

RightsLink Printable License

Licensed Content Issue n/a

Licensed Content Pages 5

Start Page 51

End Page 55

Type of Use reuse in a thesis/dissertation

Portion figures/tables/illustrations

Number of
figures/tables/illustrations 1

Format both print and electronic

Are you the author of this
Elsevier article? No

Will you be translating? No

Title EFEITOS DA FOTOTERAPIA COM ROSA BENGALA EM
CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO COM DIFERENTES
NÍVEIS DE ATIVIDADE DA GTPase RhoA

Institution name UFPR

<https://e100.copyright.com/AppDispatchServlet>

2/10

29/07/2021

RightsLink Printable License

Expected presentation date	Jul 2021
Portions	figure 1
Requestor Location	Glaucia R Martinez CP 19046 sala 231 Curitiba, PR 81531980 Brazil Attn: Glaucia R Martinez
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 USD

ANEXO II – AUTORIZAÇÃO DE USO DE IMAGEM DA FIGURA 5 e 7

29/07/2021

Rightslink® by Copyright Clearance Center



[Home](#) |
 [Help](#) |
 [Live Chat](#) |
 Glauca Martinez ▾

From Mechanical Force to RhoA Activation



ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Author: Elizabeth C. Lessey, Christophe Guilluy, Keith Burridge

Publication: Biochemistry

Publisher: American Chemical Society

Date: Sep 1, 2012

Copyright © 2012, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

[BACK](#)

[CLOSE WINDOW](#)

© 2021 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | [Privacy statement](#) | [Terms and Conditions](#)

<https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet#formTop>

1/2

ANEXO III – AUTORIZAÇÃO DE USO DE IMAGEM DA FIGURA 6

29/07/2021

<https://marketplace.copyright.com/rs-uf-web/mp/checkout/confirmation-details/c4c84bc2-05e3-4508-9eb1-59b2cb498c69>

CCC Marketplace™

Order Confirmation

Thank you, your order has been placed. An email confirmation has been sent to you. Your order license details and printable licenses will be available within 24 hours. Please access Manage Account for final order details.

This is not an invoice. Please go to manage account to access your order history and invoices.

CUSTOMER INFORMATION

Payment by invoice: You can cancel your order until the invoice is generated by contacting customer service.

Billing Address

Prof Glaucia Martinez
CP 19046 sala 231
Curitiba, PR 81531980
Brazil
+55 (41)33611664
grmartinez@ufpr.br

Customer Location

Prof Glaucia Martinez
CP 19046 sala 231
Curitiba, PR 81531980
Brazil

PO Number (optional)

N/A

Payment options

Invoice

PENDING ORDER CONFIRMATION

Confirmation Number: Pending

Order Date: 29-Jul-2021

<https://marketplace.copyright.com/rs-uf-web/mp/checkout/confirmation-details/c4c84bc2-05e3-4508-9eb1-59b2cb498c69>

1/3

29/07/2021

<https://marketplace.copyright.com/rs-uf-web/mp/checkout/confirmation-details/c4c84bc2-05e3-4508-9eb1-59b2cb498c69>

0.00 USD

1. Journal of cell science

Article: Rho GTPases and cell migration.

Order License ID	Pending	Publisher	COMPANY OF BIOLOGISTS LTD.
ISSN	1477-9137	Portion	Image/photo/illustration
Type of Use	Republish in a thesis/dissertation		

LICENSED CONTENT

Publication Title	Journal of cell science	Publication Type	e-Journal
Article Title	Rho GTPases and cell migration.	Start Page	2713
Author/Editor	Company of Biologists.	End Page	2722
Date	01/01/1966	Issue	Pt 15
Language	English	Volume	114
Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland	URL	http://jcs.biologists.org/
Rightsholder	The Company of Biologists Ltd.		

REQUEST DETAILS

Portion Type	Image/photo/illustration	Distribution	Worldwide
Number of images / photos / illustrations	1	Translation	Original language plus one translation
Format (select all that apply)	Print, Electronic	Copies for the disabled?	No
Who will republish the content?	Academic institution	Minor editing privileges?	No
Duration of Use	Life of current and all future editions	Incidental promotional use?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	USD
Rights Requested	Main product		

NEW WORK DETAILS

<https://marketplace.copyright.com/rs-uf-web/mp/checkout/confirmation-details/c4c84bc2-05e3-4508-9eb1-59b2cb498c69>

2/3

29/07/2021

<https://marketplace.copyright.com/rs-ii-web/mp/checkout/confirmation-details/c4c84bc2-05e3-4508-9eb1-59b2cb498c69>

Title	EFEITOS DA FOTOTERAPIA COM ROSA BÉNGALA EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO COM DIFERENTES NÍVEIS DE ATIVIDADE DA GTPase RhoA	Institution name	Universidade Federal do Paraná
Instructor name	Gláucia Regina Martinez	Expected presentation date	2021-07-30

ADDITIONAL DETAILS

Order reference number	N/A	The requesting person / organization to appear on the license	LUIZ CARLOS RAMOS GARCIA JUNIOR / UFPR
-------------------------------	-----	--	--

REUSE CONTENT DETAILS

Title, description or numeric reference of the portion(s)	figure 2	Title of the article/chapter the portion is from	Rho GTPases and cell migration.
Editor of portion(s)	Ridley, A J	Author of portion(s)	Ridley, A J
Volume of serial or monograph	114	Issue, if republishing an article from a serial	Pt 15
Page or page range of portion	2713-2722	Publication date of portion	2001-08-01

RIGHTSHOLDER TERMS AND CONDITIONS

The acknowledgement should state "Reproduced / adapted with permission" and give the source journal name. The acknowledgement should either provide full citation details or refer to the relevant citation in the article reference list. The full citation details should include authors, journal, year, volume, issue and page citation. Where appearing online or in other electronic media, a link should be provided to the original article (e.g. via DOI): Development: dev.biologists.org Disease Models & Mechanisms: dmm.biologists.org Journal of Cell Science: jcs.biologists.org The Journal of Experimental Biology: jeb.biologists.org

Total Items: 1
Total Due: 0.00 USD

Accepted: All Publisher and CCC Terms and Conditions

<https://marketplace.copyright.com/rs-ii-web/mp/checkout/confirmation-details/c4c84bc2-05e3-4508-9eb1-59b2cb498c69>

3/3