

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Espécies reativas de oxigênio derivadas do complexo NADPH-oxidase
alteram a migração celular por modular a dinâmica de adesões em células
CHO.K1**

Maurício Tavares Tamborindeguy

Porto Alegre, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Espécies reativas de oxigênio derivadas do complexo NADPH oxidase
alteram a migração celular por modular a dinâmica de adesões em células
CHO.K1

Aluno Maurício Tavares Tamborindeguy

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
do Centro de Biotecnologia da UFRGS
como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Orientador Prof. Dr. Marcelo Lazzaron Lamers

Porto Alegre, 2018.

Instituições e fontes financeiras

Essa dissertação foi desenvolvida no Núcleo de Pesquisa Básica em Odontologia, situado na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brasil) e no Departamento de Biologia Celular na Faculdade de Medicina da Universidade da Virgínia (Virgínia, EUA). Projeto financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo edital universal número 443699/2014-3 e FIPE-HCPA projeto número 16-0562.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha família e a Deus.

Aos meus pais João Carlos e Laura, e ao meu irmão Vinícius, por todo amor, apoio, paciência, confiança e ensinamentos transmitidos a mim durante toda a minha vida. Devo e dedico cada uma das minhas conquistas a vocês!

Aos meus avós João Carlos, Neici (*in memorian*), Darcy (*in memorian*) e Celi (*in memorian*), pelo amor, atenção, convívio, ensinamentos e apoio dado durante esses anos. Certamente vocês foram essenciais na formação do meu caráter.

Ao meu orientador de mestrado, Prof. Dr. Marcelo Lazzaron Lamers, pela oportunidade, confiança, incentivo e conhecimentos passados a mim durante esse período.

Aos colegas do Laboratório de Migração Celular da Faculdade de Odontologia da UFRGS: Lisiane, Bibiana, Paloma, Leonardo, Luiza Brand, Franciele, Gabrielle, Marcos, Nati Bortoli, Nati Koerich, Silvia, Luiza M., Luise, Carlos, Sérgio, Alessandro e Francisca. Muito obrigado pela amizade, por proporcionar um ambiente de trabalho agradável e pelas contribuições neste trabalho.

À Karoline e a Luisa, pela amizade, companheirismo, parceria e por todo suporte que me deram quando cheguei a Porto Alegre.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM/UFRGS) e do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

À banca por terem aceito o convite.

À UFRGS e órgãos de fomento a pesquisa, que proporcionaram o desenvolvimento deste trabalho.

Meu muito obrigado!

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Migração celular	12
1.1.1 Polaridade.....	14
1.1.2 Protrusões	14
1.1.3 Adesão Celular	15
1.1.4 Proteínas envolvidas no processo de adesão célula-MEC	16
1.1.5 Translocação e retração do corpo celular.....	19
1.1.6 RhoGTPases orquestram a migração celular	19
1.2 Balanço redox da célula.....	21
1.2.1 Sistema antioxidante da célula	21
1.2.2 Estresse oxidativo	22
1.2.3 Espécies Reativas de Oxigênio.....	22
1.2.4 Principais fontes de espécies reativas de oxigênio	24
1.3 Complexo NADPH Oxidase.....	25
1.3.1 Estratégias experimentais em estudos de ERO.....	28
1.3.2 NADPH Oxidase e migração celular	29
1.3.3 NADPH Oxidase e adesão celular	31
2. HIPÓTESE	32
3. OBJETIVO	32
3.1 Objetivos específicos.....	32
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	33
5. DISCUSSÃO	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
7. CURRICULUM VITAE RESUMIDO	73

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT	Catalase
CHO	<i>Chinese hamster ovarian cells</i>
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
DPI	Difenil iodônio
Duox	Dual oxidase
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
GAPs	<i>GTPase-activating proteins</i>
GDP	Guanosina difosfato
GEFs	<i>Guanine nucleotide exchange factors</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona
GTP	Guanosina trifosfato
HCE	<i>Human corneal cells</i>
LMW-PTP	<i>Low molecular weight phosphotyrosine phosphatase</i>
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloprotease de matriz
NAC	N-acetilcisteína
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
Nox	NADPH-oxidase
PAR3	<i>Protease activator receptor 3</i>
PAR6	<i>Proteases activator receptor 6</i>

PKC	Proteína quinase C
SOD	Superóxido dismutase
TIMP	Inibidores de metaloprotease de matriz
TIRF	<i>Total internal reflection fluorescence</i>
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dinâmica de migração celular	13
Figura 2. Dinâmica do processo de adesão celular	18
Figura 3. Ativação de RhoGTPases em fibroblastos de ratos	20
Figura 4. Estrutura das enzimas Nox	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Função das RhoGTPases envolvidas na coordenação da migração celular.....	21
---	-----------

RESUMO

O processo de migração celular envolve a ativação coordenada de moléculas estruturais e de sinalização, como a RhoGTPase Rac1. Sabe-se que a montagem do complexo NADPH oxidase, o qual gera espécies reativas de oxigênio (ERO) na membrana da célula também depende da ativação de Rac1, indicando um possível efeito de ERO durante a migração celular. Nesse trabalho, nós avaliamos os efeitos das ERO no processo de migração celular. Células CHO.K1 foram cultivadas em placas com superfície tratada com fibronectina (2 µg/ml), na presença ou ausência de um antioxidante inespecífico - N-acetil-cisteína (NAC) - ou de inibidores do complexo NADPH oxidase, o di-fenil-iodonio (DPI) ou acetovanilona. Através de vídeos *time-lapse*, observamos que a depleção de ERO causada por NAC (10 mM) induziu uma diminuição de 60% na velocidade de migração e impactou severamente a direcionalidade da migração das células, o que também foi observado quando utilizado o DPI (10 µM). Posteriormente, analisamos os efeitos da NADPH oxidase em três eventos de migração celular: taxa de protrusão, processo de adesão e vias de sinalização relacionadas com adesão celular. Através de vídeos *time-lapse*, observamos que o DPI induziu um aumento de ~3 protrusões/célula, as quais foram duas vezes mais rápidas, porém tiveram uma taxa de retração de ~50%, quando comparado ao controle. Com a finalidade de analisar a dinâmica de adesões, células CHO.K1 foram transfectadas com paxilina-GFP, plaqueadas em condições migratórias e analisadas por microscopia de fluorescência de refletância interna total (TIRF) na presença de DPI. A área de adesão na presença de DPI (5 µM) foi maior quando comparada ao controle. Além disso, por ensaio de *pull down*, não observamos alterações na ativação de Rac1, indicando que os efeitos mediados por ERO estão relacionados com moléculas *downstream* a Rac1, como moléculas relacionadas a adesão. Por fim, observamos a redução nos níveis de FAK-Y397 em células tratadas com NAC e DPI, indicando um aumento no tamanho de adesões focais. Esses resultados nos indicam que a geração local de ERO, principalmente às derivadas do complexo NADPH oxidase, pode modular a migração celular devido a mudanças na dinâmica de adesões a partir de vias de sinalização.

ABSTRACT

Cell migration requires the coordinated activation of structural and signaling molecules, such as the RhoGTPase Rac1. It is known that the NADPH oxidase complex assembly, which generates Reactive Oxygen Species (ROS) at the cell membrane, also relies on Rac1 activation, indicating a possible effect of ROS during cell migration. In this study, we evaluated the effect of NADPH-derived ROS on the migration process. CHO.K1 cells were plated on fibronectin (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) coated dishes in the presence/absence of the unspecific antioxidant N-acetylcysteine (NAC) or the NADPH-oxidase inhibitors Di-phenyl-iodonium (DPI) and Acetovanilone. Using time-lapse videos, we observed that depletion of ROS by NAC (10 mM) induced a 60% decrease in migration speed and severely impacted migration directionality, which was also observed when NADPH oxidase was inhibited by DPI (10 μM). Then, we analyzed the effects of NADPH oxidase on three migratory events: protrusion rate, adhesion process and signaling pathways related to cell migration. By time-lapse movies, we observed that DPI induced an increase of $\sim 3\text{x}$ protrusion/cell, which were twice faster but had a $\sim 50\%$ retraction when compared to control. In order to analyze adhesion dynamics, CHO.K1 cells were transfected with paxillin-GFP, plated on migrating promotion conditions and we analyzed adhesion dynamics with Total Internal Reflectance Fluorescence (TIRF) microscope in the presence of DPI. The adhesion area in the presence of DPI (5 μM) were larger when compared to control. Also, by pull down assay, we observed no changes on Rac1 activation, indicating that ROS-mediated effects were related to downstream molecules, such as adhesion-related molecules. Finally we had a reduction in FAK-Y397 levels in cells treated with NAC and DPI, indicating an increase on focal adhesion size. These results indicate that the local generation of NADPH-derived ROS can modulate cell migration due changes on adhesions dynamics and signaling.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Migração celular

A migração celular é um processo essencial para o desenvolvimento e manutenção da organização de organismos multicelulares (Cheng and Eriksson, 2017). As células migram de acordo com múltiplos estímulos recebidos por elas, os quais podem estar envolvidos em processos fisiológicos como desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas, resposta imune, angiogênese, reparo e regeneração tecidual (Dwyer et al., 2017; Hunter and Fernandez-Gonzalez, 2017; Pandya et al., 2017; Manzanares and Horwitz, 2011; Cheng and Eriksson, 2017). Por outro lado, em algumas condições patológicas a produção de sinais anormais pode induzir o processo de migração descontrolado, como observado na disseminação de células tumorais (Pandya et al., 2017).

Dependendo do contexto e do tipo celular, as células podem migrar de duas maneiras diferentes: migração individual ou migração coletiva. A migração individual basicamente é uma célula que migra individualmente, um exemplo é quando leucócitos são recrutados pela resposta imune. Por sua vez, no desenvolvimento embrionário observamos um exemplo de migração coletiva onde um grupo de células migram coletivamente (Treat et al., 2012).

A dinâmica do processo de migração celular é orquestrada por diferentes moléculas de sinalização intracelular que dão origem a uma sequência de etapas que são denominadas: o ciclo de motilidade celular (Petrie et al., 2009). As RhoGTPases Rac1 e RhoA, são moléculas de sinalização envolvidas na regulação de diferentes eventos necessários à migração celular. Em resumo, a migração é realizada por proteínas como a actina, miosina, integrinas, paxilina e quinase de adesão focais (FAK) (Parsons et al., 2010). Para uma célula migrar com eficiência, ao receber um estímulo, ocorrerá a formação do *lamellipodio*, resultante da formação de uma protrusão no *front* celular, através da polimerização de actina, etapa regulada por Rac1 (Machacek et al., 2009; Parsons et al., 2010). Posteriormente, se formam as adesões nascentes entre célula e matriz extracelular (MEC) mediada por integrinas, proteínas

transmembrana que estão conectadas ao citoesqueleto de actina através da paxilina (Choi et al. 2008; Lauffenburger and Horwitz, 1996). FAK, uma proteína tirosina quinase, atua nesse momento realizando a maturação das adesões nascentes em adesões focais. Essas adesões maduras geram força permitindo a contração do corpo celular através da atividade da miosina não muscular e a formação de fibras de estresse de actina. Assim, as adesões se desconectam do substrato, o corpo celular retrai e a célula consegue se mover com direcionalidade (Ridley et al., 2003).

A dinâmica do processo de migração celular envolve algumas etapas e processos para ocorrer adequadamente, são eles: polaridade da célula, formação de protrusões, adesão celular a MEC, a translocação e retração do corpo celular, além da regulação dessas etapas por diferentes proteínas estruturais e de sinalização (Figura 1).

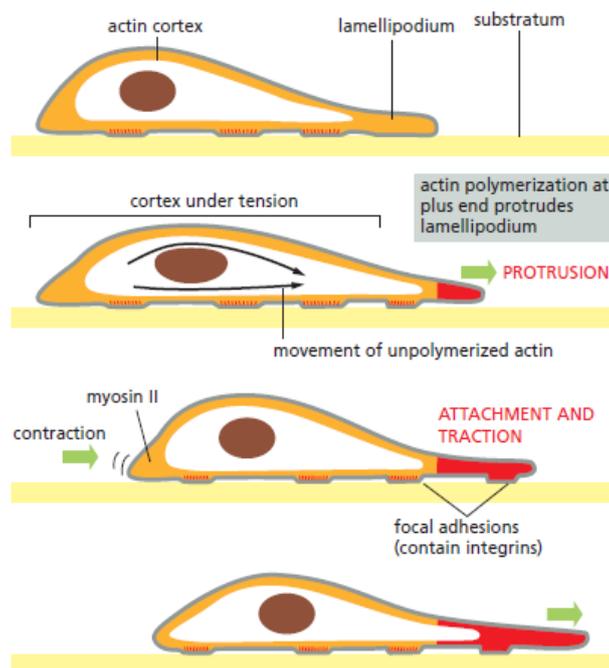


Figura 1. Dinâmica da migração celular. A célula emite uma extensão da membrana em direção a polaridade da célula, formando o lamelípódio. Ocorre polimerização da actina e se formam as adesões nascentes. As adesões nascentes maturam em adesões focais, que geram força tracional e a partir da miosina II ocorre a contração da célula. A célula transloca seu corpo celular e

retrai a traseira, resultando na sua migração. Fonte: Biologia Molecular da Célula, 6ª edição, Alberts. Pág. 952.

1.1.1 Polaridade

A polaridade no processo de migração celular determina qual é o *front* celular, região da direcionalidade que a célula terá em sua migração, e sua região oposta, onde vai ocorrer a retração do corpo celular (Iden e Collard, 2008). Existem duas características que definem polaridade: a primeira é a distribuição assimétrica de moléculas reguladoras de motilidade entre os polos opostos de uma célula; a segunda é a organização orientada dos componentes do citoesqueleto ao longo de seu eixo de polaridade (Li e Gundersen, 2008). Basicamente, dependendo do tipo e da função da célula a polaridade adequa sua morfologia através da ativação de sinais intra ou extracelulares que levam a sua assimetria, adquirindo então polaridade (Parsons et al., 2010). Cdc42 é uma RhoGTPase que controla o recrutamento de moléculas envolvidas na polarização de células (PAR3, PAR6 e PKCs atípicas) e a maquinaria de polimerização de actina no *front* celular do processo de migração. Além disso, Cdc42 participa da orientação do núcleo e da organização do citoesqueleto celular, sendo ela uma importante molécula nessa etapa do processo (Etienne-Manneville e Hall, 2003; Etienne-Manneville, 2004). Quando ativadas, Cdc42 e Rac1 atuam em conjunto promovendo a formação de protrusões, resultando em um lamelipódio no *front* celular em direção ao sentido de migração da célula (Nobes e Hall, 1995).

1.1.2 Protrusões

Uma protrusão é definida como a extensão da membrana celular em direção ao sentido de migração, e a formação dessa extensão necessita da integração de diversos processos celulares (Treat et al., 2012). Para que ocorra a extensão da membrana é necessária uma força tensional que é proveniente do citoesqueleto de actina, que empurra a membrana da célula no sentido da

migração (Manzanares et al., 2005). Nessa etapa, a dinâmica de polimerização de actina tem um papel crucial no processo de migração celular, porque é a polimerização da actina que expande a membrana celular através da tensão, e promove a adesão da protrusão na MEC (Pollard and Borisy, 2003). Os filamentos de actina orientam a protrusão em direção a polaridade de migração da célula, formando o lamelipódio onde se encontram ramificações de filamentos de actina curtos e finos, como uma rede (Alexandrova et al., 2008). Após a formação de protrusões, para essas novas projeções se estabilizarem ocorre a formação de adesões nascentes.

1.1.3 Adesão Celular

A adesão da célula ao seu substrato, no caso a adesão célula-MEC, é essencial para que ocorra a migração celular. Durante o processo de migração as adesões se formam no *front* celular e se desmontam no lado oposto da célula. As primeiras adesões a serem formadas durante o processo de migração são as adesões nascentes, que surgem durante a formação do lamelipódio (Webb, 2004; Vicente-Manzanares et al., 2005). Tendo como características principais, tamanho pequeno e rápida dinâmica de transição, maturando ou se desmontando (Choi et al., 2008; Vicente-Manzanares et al., 2005). As adesões nascentes são conectadas ao citoesqueleto de actina pela talina, vinculina e alfa-actinina, sendo que moléculas sinalizadoras também são recrutadas como FAK e paxilina, completando esse complexo. Essas adesões geram sinais que recrutam e ativam Rac1, que estimula a polimerização da actina e impede a ação da miosina II no lamelipódio. A medida que a célula migra esses sinais também são necessários para a desmontagem de algumas adesões, resultando no *turnover* de adesões (Vicente-Manzanares et al., 2005; Vicente-Manzanares and Horwitz, 2011). A partir deste ponto pode ocorrer a desmontagem ou então a maturação de adesões. Os complexos focais de adesão representam o primeiro passo da maturação, e estes se diferem das adesões nascentes por sua localização, seu tamanho maior e por ser independente de miosina II (Choi et al., 2008). Posteriormente esses complexos focais se tornam adesões focais, caracterizadas

por um tamanho maior, níveis mais baixos de FAK e acompanhada de grandes fibras de estresse de actina, completando o processo de maturação das adesões (Vicente-Manzanares and Horwitz, 2011; Vicente-Manzanares et al., 2011) (Figura 2).

Os mecanismos moleculares pelos quais a dinâmica do *turnover* de adesões é controlada ainda não são bem claros, mas os efetores da família RhoGTPase, como Rac1, tem papel chave nesse processo demonstrando a importância dessas moléculas (Franco et al., 2004; Vicente-Manzanares et al., 2005).

1.1.4 Proteínas envolvidas no processo de adesão célula-MEC

O processo de adesão é coordenado pelo *cross-talking* entre Integrinas, proteínas ligantes a actina, FAK e paxilina.

Integrinas: são proteínas de adesão receptoras heterodiméricas compostas por subunidades alfa e beta, que estão envolvidas no processo de adesão celular por manter uma interação entre célula e MEC. Elas mantem a interação entre o citoesqueleto de actina e proteínas da MEC, adquirindo uma função de remodelar o citoesqueleto de actina mantendo ou não a adesão célula-MEC (Paoli et al., 2013). Essas proteínas tem como função serem receptores regulatórios, uma vez que possuem uma cauda citoplasmática que podem ser moduladas de acordo com os estímulos recebidos. Assim sendo, elas podem emitir sinais intracelulares devido a ligação direta ou indireta de um adaptador ou molécula de sinalização em sua cauda (Carman e Springer, 2008).

Proteínas ligantes a actina: o acúmulo local de actina nas adesões focais é associado ao recrutamento de proteínas que fazem a conexão direta ou indiretamente da actina com a cauda citoplasmática da integrina, essas proteínas se incluem a talina, vinculina e alfa-actinina (Kanchanawong et al., 2010). Sendo que essa ligação do citoesqueleto de actina à MEC por adesões focais promove uma via física para que as células exerçam a força de tração no substrato durante a migração celular (Hirata et al., 2014).

- Talina – é uma molécula que consiste de um domínio N-terminal (cabeça) globular e um domínio flexível (haste). A talina se liga tanto a integrina quanto à actina, no domínio N-terminal se encontram os sítios de ligação a integrinas, FAK e actina, enquanto que no domínio em forma de haste há um sítio de ligação para integrina e outros dois para ligação de actina (Critchley, 2009). A talina faz a mediação do *link* entre actina e integrina de maneira força independente (Hirata et al., 2014).
- Vinculina – é uma molécula composta de uma porção N-terminal que inclui o domínio de ligação à talina e uma porção C-terminal que é conectada por uma sequência curta de aminoácidos rica em prolina, adotando uma conformação globular (Ziegler et al., 2006). Uma vez que a talina possui onze sítios de ligação para a vinculina em seu domínio flexível, a localização da vinculina nas adesões focais vai depender da ligação com a talina (Carisey et al., 2013). Além disso, diferente da talina, a vinculina se localiza em sítios de adesão focal de maneira força dependente, ou seja, a força exercida pela rede actino-miosina expõe sítios de ligação a vinculina na talina, possibilitando a interação entre essas duas proteínas (Hirata et al., 2014).
- Alfa-actinina – a alfa-actinina é uma proteína que pode se ligar a actina e à integrina de uma forma direta, ou então indireta através da vinculina. É um componente presente nas adesões focais, sendo considerada então como necessária para a maturação de adesões (Roca-Cusachs et al., 2013).

Quinase de adesão focal (FAK): proteína do tipo tirosina quinase cuja estrutura compreende um domínio catalítico central cercado por outros dois domínios não catalíticos, um N-terminal e outro C-terminal. Seu recrutamento ocorre no estágio inicial da adesão a partir da ativação por autofosforilação ou por quinases da família Src. Em conjunto da Src, FAK fosforila outras proteínas de adesão, possivelmente controlando a ativação de RhoA através do estímulo de GEFs (*Guanine Nucleotides Exchange Factors*) e GAPs (*GTP-ase Activating*

Proteins). FAK-Src em conjunto atuam na desmontagem dos complexos de adesão, potencialmente por controlar RhoA (Parsons, 2003).

Paxilina: é uma fosfoproteína que se localiza nas adesões, atuando como um marcador de adesão célula-MEC. Através da fosforilação de seus resíduos Serina/Treonina e Tirosina, a paxilina cria sítios de ligação a outras proteínas de adesão recrutando-as juntamente de reguladores da sinalização, como Rac1 (Hu et al., 2014). A paxilina contribui para o recrutamento de quinases e fosfatases específicas envolvidas em vias de sinalização intracelular, que levam a reorganização do citoesqueleto de actina, formando ou desmontando adesões focais necessárias para a adesão, *spreading* celular e para a migração (López-Colomé et al., 2017). Por consequência, essa fosfoproteína pode exercer um efeito positivo ou negativo no processo de migração da célula (German et al., 2014).

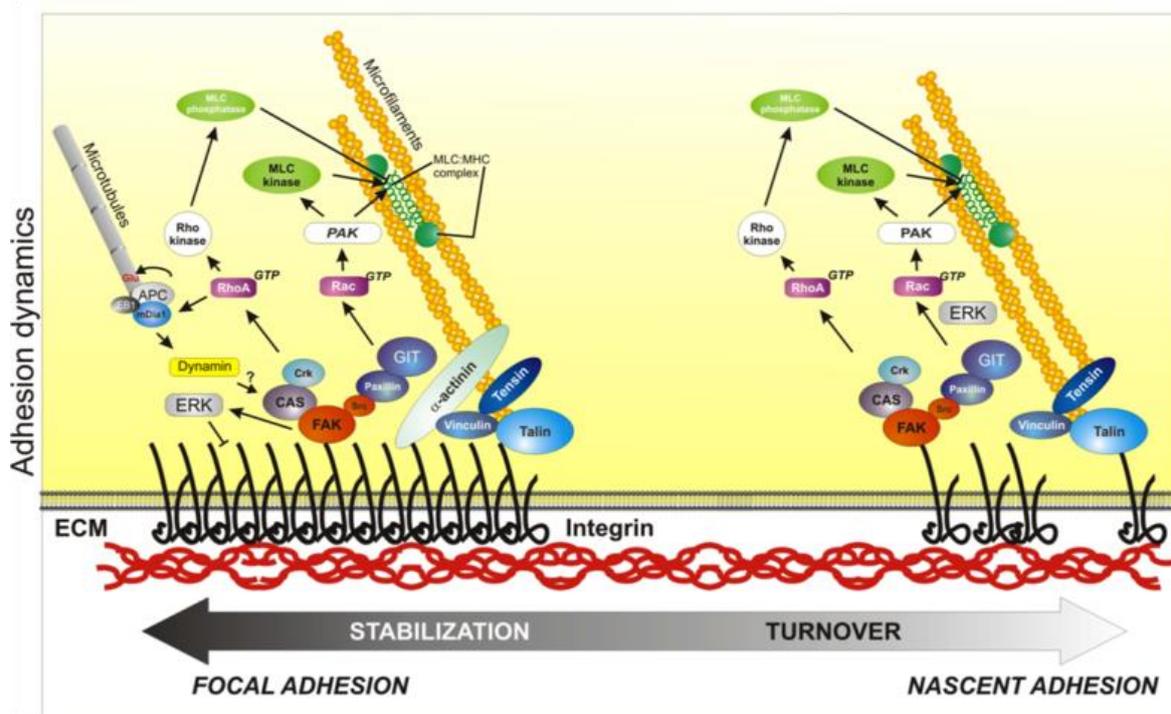


Figura 2. Dinâmica do processo de adesão celular. As adesões nascentes estão conectadas ao citoesqueleto de actina por um complexo que inclui talina, vinculina e α -actinina; outras moléculas de sinalização também são recrutadas a esse complexo, incluindo FAK e paxilina. Essas adesões geram sinais que ativam

Rac, promovendo a polimerização de actina e previne a ação da miosina II no lamelipódio. Esses sinais também são necessários para a dissociação de algumas adesões assim que a célula avança. Algumas adesões se maturam em adesões focais. A ativação de RhoA promove a desmontagem das adesões na traseira da célula. Outros eventos que ocorrem nas adesões é a internalização de integrinas, mediada por dinamina, e atuação de moléculas nos microtúbulos, o que pode contribuir na desmontagem de adesões. Adaptada de Vicente-Manzanares et al., 2005.

1.1.5 Translocação e retração do corpo celular

Para completar o processo de migração de uma célula, ao formar a protrusão no *front* celular, deve ocorrer a translocação do corpo celular seguido da retração do mesmo (Anderson et al., 1999).

A translocação do corpo celular segue a protrusão sendo independente da polimerização da actina, mas coordenado pela contratilidade do citoesqueleto de actinmiosina, dependente de miosina II (Svitkina et al., 1997). Por sua vez, a retração do corpo celular necessita tanto da contratilidade do citoesqueleto de actinmiosina, quanto da desmontagem das adesões na região oposta ao *front* celular. Sendo que, para a retração acontecer mecanismos para desmontagem das adesões precisam atuar em conjunto, são eles: contração do citoesqueleto de actinmiosina, desmontagem das adesões induzidas por microtúbulos, endocitose de receptores de adesão e clivagem proteolítica de proteínas de adesão (Tang e Gerlach, 2017).

1.1.6 RhoGTPases orquestram a migração celular

A extensão das protrusões, a retração da membrana celular e a formação de adesão célula-MEC são processos coordenados por proteínas da família de pequenas RhoGTPases, sendo elas: Rac1, RhoA e Cdc42 (Sadok e Marshall, 2014). Rac1 e RhoA mostram comportamentos opostos, em que Rac1 é ativa no *front* celular promovendo a extensão da membrana e RhoA está ativa na região

oposta ao *front* da célula, regulando a retração celular durante o processo de migração (Nguyen et al., 2016). Já Cdc42 promove a formação do filopodia e estimula a ativação de Rac1 (Nobes e Hall, 1997) (Figura 3; Tabela 1).

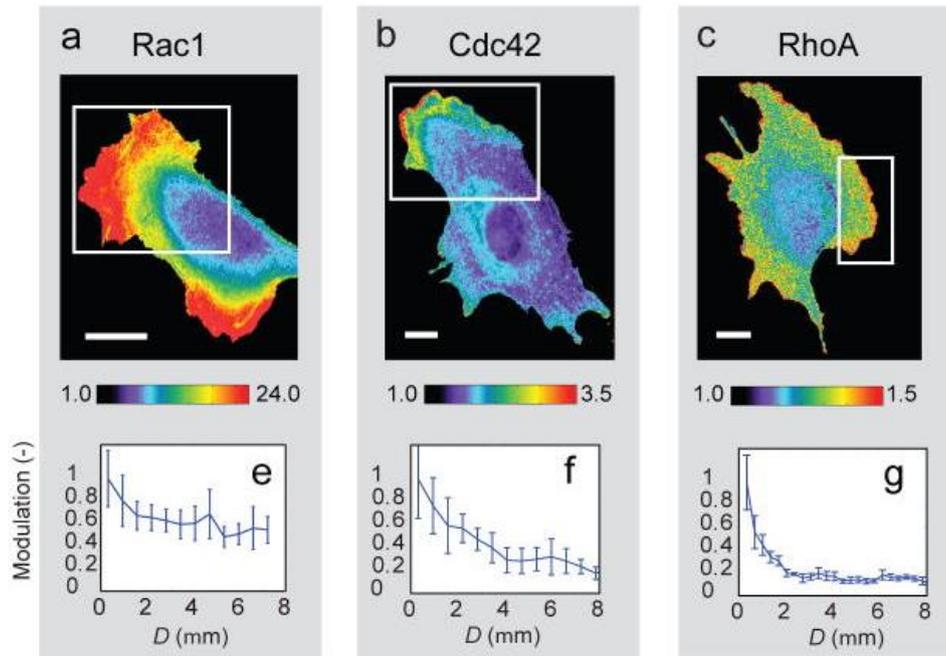


Figura 3. Ativação de RhoGTPases em fibroblastos de ratos. Ativação de (a) Rac1, (b) Cdc42 e (c) RhoA analisada por biosensores. O retângulo branco mostra a região onde essas RhoGTPases estão ativas. Adaptada de Machacek et al., 2009.

A atividade das moléculas sinalizadores da família RhoGTPases é regulada por: fatores de troca do nucleotídeo guanina (GEFs), que ativam as RhoGTPases pela liberação do GDP, permitindo a ligação de uma molécula de GTP; e pelas Proteínas ativadoras de GTPases (GAPs), que inativam as RhoGTPases por estimular a hidrólise de GTP (Bos et al., 2007).

Tabela 1. Função das RhoGTPases envolvidas na coordenação da migração celular (Adaptada de Sadok e Marshall, 2014).

RhoGTPases	Função
Rac1	Promove a formação do lamelipódio
RhoA	Estimula a formação de fibras contráteis de actinmiosina (fibras de estresse); polimerização de actina; geração de força contrátil;
Cdc42	Promove formação do filopódia; ativação de Rac1; regulação da polaridade

1.2 Balanço redox da célula

A homeostase celular é a habilidade que o organismo tem de manter o meio interno em condição de estabilidade, ou equilíbrio constante, para que a célula desempenhe suas funções de maneira adequada. O balanço redox celular se baseia em manter em equilíbrio os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de enzimas do sistema antioxidante da célula. Entretanto, esse balanço não é perfeito e danos realizados por ERO ocorrem continuamente. Porém, quando em estado normal os níveis de ERO e antioxidantes estão aproximadamente em equilíbrio. Quando há um distúrbio no balanço entre os antioxidantes e ERO ocorre a situação de estresse oxidativo (Kalyanaraman, 2013).

1.2.1 Sistema antioxidante da célula

Para manter a homeostase do organismo, a célula possui um sistema antioxidante que neutraliza a produção de ERO quando em excesso, consistindo em enzimas de defesa como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutaciona peroxidase (GPx) (He et al., 2017).

Superóxido dismutase (SOD): É considerada a primeira linha de defesa contra as ERO. Quando há uma situação de estresse oxidativo pode ser rapidamente induzida a catalisar a dismutação do $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 . Apresenta

diferentes isoformas dependendo de sua localização, na mitocôndria está na forma de MnSOD, no citoplasma CuZnSOD e no meio extracelular EC-SOD (He et al., 2016).

Catalase (CAT): A enzima catalase decompõe o H_2O_2 em H_2O e oxigênio molecular, agindo como uma neutralizadora do H_2O_2 (He et al., 2017).

Glutathione peroxidase (GPx): utilizando a GSH, essa enzima reduz H_2O_2 ou hidroperóxidos orgânicos em H_2O ou em seus grupos álcoois correspondentes. As GPxs, assim como SOD, apresentam diferentes formas e tem função antioxidante em diferentes componentes celulares: GPx1 está no citoplasma e na mitocôndria, GPx2 no citoplasma e no núcleo, GPx3 no plasma e GPx4 está associada à membrana (Pisoschi e Pop, 2015).

1.2.2 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e de antioxidantes na célula. Perturbando o balanço redox da célula e causando danos a macromoléculas biológicas como ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas. Dependendo do tipo de célula e do nível do estresse oxidativo, vemos como consequência desse desequilíbrio: proliferação, adaptação, senescência, injúria e, ainda, morte celular (Pisoschi e Pop, 2015).

1.2.3 Espécies Reativas de Oxigênio

As ERO são compostos químicos instáveis extremamente reativos, capazes de transformar outras moléculas oxidando ou reduzindo o oxigênio, também conhecidos como radicais livres (Giannoni et al., 2010).

Existem três principais ERO produzidos pelas células, sendo eles: o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$) (Schröde 2014; Reczek e Chandel, 2015).

Superóxido ($O_2^{\cdot-}$): É o principal radical livre formado e produzido na maioria dos sítios de geração de ERO, sendo resultado da adição de um elétron ao oxigênio (Murphy, 2009). Tem tempo de vida curta, por isso é produzido próximo de suas proteínas alvo para atuar como molécula de sinalização. Por ter característica aniônica sua difusão na célula é restrita e dificilmente atravessa as membranas lipídicas das células (Schröder, 2014). É um agente oxidante fraco, incapaz de causar peroxidação lipídica, sendo assim sua maior toxicidade se encontra na habilidade em produzir outras ERO mais citotóxicas e reativas que o mesmo. O $O_2^{\cdot-}$ citosólico é rapidamente convertido em H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase 1 (SOD1) (Murphy, 2009).

Peróxido de hidrogênio (H_2O_2): Ao contrário do $O_2^{\cdot-}$, o H_2O_2 é capaz de se difundir entre os componentes celulares, possui tempo de meia vida longo e tem como característica conseguir atravessar membranas lipídicas (D'Autréaux e Toledano, 2007). O H_2O_2 atua como molécula sinalizadora oxidando grupos tiol em proteínas e por consequência regulando processos biológicos como adaptação metabólica, diferenciação e proliferação celular (Forman et al., 2004). A produção em excesso de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 resulta em uma cascata de eventos desses radicais causando danos em biomoléculas importantes e o estresse oxidativo. Principalmente por que ao reagir com metais cátions como Ferro (Fe^{2+}) e Cobre (Cu^+) o H_2O_2 gera o radical $\cdot OH$, que causa danos irreversíveis a lipídeos, proteínas e DNA (de Sá Júnior et al., 2017).

Radical hidroxila ($\cdot OH$): O radical $\cdot OH$ é a espécie mais reativa gerada, reatividade essa só limitada pela taxa de difusão, uma vez que não existe nenhum sistema de proteção antioxidante para suprimi-lo (Schröder, 2014). A oxidação de proteínas por esse radical resulta na formação de carbonilas (Forman et al., 2004).

As ERO funcionam como mediadores da sinalização redox e estresse oxidativo, uma vez que atuam como mensageiros secundários devido à sua habilidade em induzir modificações covalentes em macromoléculas biológicas como lipídeos, proteínas e DNA (Diaz e Courtneidge, 2012).

Fisiologicamente, são consideradas moléculas de sinalização intracelular pois iniciam, medeiam e modulam a transdução de sinais e processos vitais para a célula. Esses radicais livres tem papel essencial no sistema imune - por atacar patógenos invasores em células fagocíticas - na proliferação, migração e diferenciação celular, além da expressão gênica (Brown e Griending, 2009). No entanto, quando há um desequilíbrio entre as defesas enzimáticas do nosso organismo e a quantidade de ERO geradas, a homeostase fica comprometida e desencadeia o estresse oxidativo que está associado a algumas desordens e doenças como: câncer, obesidade, diabetes, auto-imunes e neurodegenerativas (de Sá Júnior et al., 2017; He et al., 2017).

1.2.4 Principais fontes de espécies reativas de oxigênio

No nosso organismo a geração intracelular de ERO é estimulada pela radiação ultravioleta (UV), raios gama e X, componentes da dieta e reações inflamatórias durante o metabolismo celular normal (Sá Júnior et al., 2017). Recebendo esses estímulos as células iniciam a produção de ERO em diferentes compartimentos celulares, sendo o principal deles a mitocôndria, além do retículo endoplasmático, peroxissomo e do complexo enzimático NADPH Oxidase (Babior, 2004; Sá Júnior et al., 2017).

A maior fonte responsável pela produção de ERO é a mitocôndria. Acredita-se que a maioria das ERO são derivadas da cadeia transportadora de elétrons (CTE), especialmente dos complexos I e III. Além desses sistemas de geração, outras proteínas contribuem para a geração de ERO mitocondriais como a NADH desidrogenase, prolina desidrogenase, citocromo b5 redutase e monoamina oxidase (Holzerová e Prokisch, 2015). Contudo, não é apenas a mitocôndria que atua produzindo ERO. No citoplasma existem outras proteínas contribuintes à geração de radicais livres, como o complexo enzimático NADPH Oxidase, que tem papel importante para defesa do hospedeiro frente a patógenos e durante a fagocitose (Schröder, 2014). Em condições específicas, ocorre também a produção de ERO em outras organelas da célula. Por exemplo, o retículo endoplasmático produz ERO durante o *foldi*ng de proteínas em resposta a

proteínas mal dobradas; e nos peroxissomos, onde ocorre a geração de ERO devido a oxidação de ácidos graxos de cadeia longa (Holmstrom e Finkel, 2014).

No entanto, no aspecto do processo de migração celular, as ERO que atuam como moléculas de sinalização intracelular são geradas pelo complexo NADPH oxidase, devido a sinalização de proteínas RhoGTPases (Stanley et al., 2014).

1.3 Complexo NADPH-oxidase

Durante a sinalização redox ocorre a produção de ERO, regulada enzimaticamente, e essas ERO derivadas de sistemas enzimáticos é que atuam como mensageiros secundários em processos biológicos necessários a célula como a migração e a adesão celular (Hurd et al., 2012).

A família de enzimas do complexo NADPH oxidase produtoras de ERO são as mais estudadas e melhor caracterizadas em relação à sinalização celular. O complexo NADPH-oxidase (Nox) faz parte de um grupo de sete enzimas: Nox-1, Nox-2, Nox-3, Nox-4, Nox-5, Duox-1 e Duox-2 (Figura 4). São proteínas transmembrana, com um domínio intracelular, porção transmembrana e um domínio extracelular. Algumas das Nox podem ser encontradas em membranas de compartimentos celulares, incluindo o retículo endoplasmático e vesículas intracelulares (Kalyanaraman, 2013).

A NADPH oxidase funciona como uma cadeia transportadora de elétrons: o complexo enzimático produz ânion superóxido através da redução de uma molécula de oxigênio, utilizando uma molécula de NADPH como doadora de elétrons (Schröder, 2014). Em fagócitos, os radicais superóxido gerados pela NADPH oxidase são liberados em seu interior durante o processo de fagocitose e, se presente em grandes quantidades promove toxicidade resultando no ataque a patógenos invasores. O ânion superóxido gerado pela NADPH oxidase não é permeável a membrana, diferente de seu produto H_2O_2 , cuja conversão é realizada pela enzima SOD, que atravessa a membrana celular e atua localmente em seus alvos (Schröder, 2014). Portanto, é importante destacar que o complexo

NADPH oxidase produz apenas ânion superóxido e que esse superóxido é convertido em H₂O₂.

Embora esse complexo seja classicamente descrito em células fagocitárias como neutrófilos e macrófagos, as enzimas Nox não são exclusivas dessas células. Já foi demonstrado que a presença desse complexo em outros tipos de células também é responsável pela produção de EROs (Lambeth, 2002). Em células não fagocitárias a produção de EROs derivadas de Nox possui função mediando sinais celulares em processos como angiogênese, resposta imune, hipóxia, migração e adesão celular por exemplo (Dworakowski et al., 2006).

Além de papéis diferentes dependendo do tipo celular onde essas enzimas oxidases são expressas, outro ponto discriminante é seu modo de ativação e montagem, podendo ser classificadas em três grupos (Schröder, 2014).

Nox-1, Nox-2 e Nox-3 (grupo 1)

Esse grupo é ativado por subunidades citosólicas que interagem com essas enzimas, a mais caracterizada é a Nox-2, mas Nox-1 e -3 seguem o mesmo modelo de ativação e montagem que é o detalhado a seguir (Lee et al., 2011; Schröder, 2014):

- (1) o complexo Nox-2 consiste da Nox-2 e da subunidade p22phox na membrana da célula;
- (2) ao receber um estímulo de uma quinase, como a proteína quinase C (PKC), ocorre a fosforilação da subunidade citosólica p47phox em seus múltiplos resíduos de serina;
- (3) a fosforilação faz com que a p47phox interaja com a membrana plasmática da célula e a proteína transmembrana;
- (4) p47phox se associa com outra subunidade citosólica, a p67phox, sendo que a atividade de p67phox é dependente da sinalização da RhoGTPase Rac1;
- (5) p47phox, p67phox e Rac1 se associam as subunidades Nox-2 e p22phox e tornam o complexo ativo.

Nox-5, Duox-1 e Duox-2 (grupo 2)

Diferente do grupo 1, o processo de ativação e montagem dessas enzimas não necessitam da ativação por Rac1 e p47phox. A ativação de Nox-5, Duox-1 e -2 são dependentes da ligação de Cálcio (Ca^{2+}) (Bedard e Krause, 2007).

A ativação de Nox-5 acontece pelo aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} . O Nox-5 tem um domínio EF-hand⁺ que se liga ao Ca^{2+} intracelular e ativa o complexo, ou seja, não requer atividade de p22phox e nem organizadores ou subunidades citosólicas (Bonfi et al., 2000; Bonfi et al., 2004). O membro Nox-5 é menos estudado mas tem sido relatado sua presença em células endoteliais, macrófagos e espermatozoides, em que contribui para a motilidade de sua cauda (Bonfi et al., 2004).

Duox-1 e Duox-2 também não necessitam de subunidades citosólicas ativadoras ou organizadoras, uma vez que possuem o domínio de ligação ao Ca^{2+} . Essas duas enzimas são expressas em células epiteliais do pulmão e da glândula tireoide, entretanto, em algumas desordens Duox-1 e -2 podem ser induzidas em outros tipos celulares. Na glândula tireoide produzem H_2O_2 necessária para mediar a oxidação do iodo utilizado para formar os hormônios tri-iodo-tiroxina (T3) e tiroxina 4 (T4) (Bedard e Krause, 2007; Armeziane-El-Hassani et al., 2005).

Nox-4 (grupo 3)

A Nox-4 é a única enzima da família Nox que é ativa constitutivamente. Estudos não identificaram proteínas de interação citosólica ou outros mecanismos que sejam necessários para sua ativação. Nox-4 está associada com a gp22phox, porém de maneira diferente de Nox-1, Nox-2 e Nox-3. Dessa forma, a produção de EROs por essa enzima é constitutiva, ainda assim, por meio da ligação de moléculas como Poldip2 a subunidade p22phox no complexo Nox-4, a geração de EROs pode ser potencializada (Von et al., 2010; Schröder, 2014).

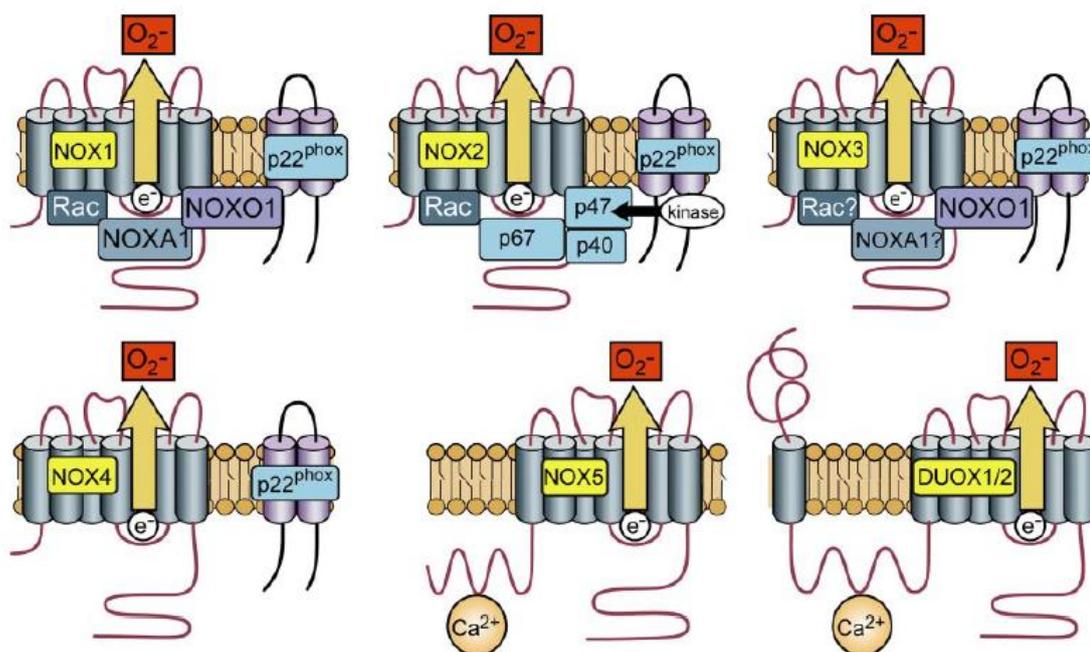


Figura 4. Estrutura das enzimas Nox. Diferentes formas de ativação das isoformas das enzimas do complexo NADPH oxidase. Adaptada de Bedard e Krause, 2007.

1.3.1 Estratégias experimentais em estudos de ERO

Existem diversos ensaios que podem ser realizados para se estudar as EROs. Através de ensaios bioquímicos, é possível mensurar os níveis de enzimas antioxidantes no sangue, por exemplo. Em células, uma das possibilidades é a quantificação das EROs produzidas, a partir do uso de sondas como a DCF-DA, através de citometria de fluxo. Assim como pode se utilizar estratégias de silenciamento de genes relacionados a produção de EROs na célula, para avaliar o funcionamento de complexo enzimático. Por sua vez, nesse trabalho utilizamos compostos farmacológicos inibidores (DPI e acetovanilona) e antioxidantes (NAC) para avaliar a produção de EROs na célula.

N-acetilcisteína (NAC): A NAC é capaz de estimular a proteção da célula em resposta ao estresse oxidativo. Esse composto atua como um *scavenger* de radicais livres inespecífico e é o principal composto que mantém os níveis de glutathiona reduzida (GSH) na célula, uma vez que é um precursor do antioxidante GSH (Shahripour et al., 2014). Além disso, é uma fonte de grupos sulfidrilas,

interagindo com o radical livre $\cdot\text{OH}$ e com o H_2O_2 , minimizando o efeito dessas ERO, por manter os níveis de GSH na célula estáveis (Kerksick e Willoughby, 2005).

Di-fenil iodônio (DPI): o DPI é um potente inibidor da montagem do Complexo NADPH-oxidase, e ele atua inibindo a ligação de flavoproteínas contendo as subunidades do complexo NADPH-oxidase na membrana da célula (Cross e Jones, 1986).

Acetovanilona: ou apocinina, é um composto natural isolado da planta *Picrorhiza kurroa* (Stolk et al., 1994). Esse composto inibe a ativação do complexo NADPH oxidase por impedir a translocação da subunidade $\text{p}47^{\text{phox}}$, assim inibindo a montagem do complexo enzimático em células como neutrófilos, macrófagos e células endoteliais. É um inibidor seletivo da NADPH-oxidase permeável (Choi et al., 2015).

1.3.2 NADPH Oxidase e migração celular

A produção de ERO derivadas do complexo NADPH oxidase afeta processos biológicos como a migração celular, via sinalização intracelular (Hurd et al., 2012).

Sabe-se que as proteínas Rac1, da família RhoGTPases, controlam a produção de ERO via NADPH-oxidase, um efeito indireto de Rac1 pode ser observado onde modificações redox tem efeito de maneira direta na actina. Sendo assim, Rac1 não controla apenas a função de proteínas ligantes a actina, mas também é responsável pela reorganização do citoesqueleto de actina através de ERO derivadas do Nox (Stanley et al., 2014). Os componentes citosólicos regulatórios do NADPH-oxidase (Rac, $\text{p}67^{\text{phox}}$, $\text{p}47^{\text{phox}}$ e $\text{p}40^{\text{phox}}$) estão associados ao citoesqueleto de actina, o que auxilia a translocação desses componentes para a montagem do Nox, conseqüentemente levando a ativação e produção de ERO. Havendo a interação do citoesqueleto de actina com componentes do Nox, facilitando a translocação de subunidades para

consequente ativação de Nox, é definido que a actina tem um papel no controle da atividade do NADPH-oxidase e implica no processo de migração celular (Li e Shah, 2002; Stanley et al., 2014).

A atividade da quinase Src promove a formação do lamelipódio, primeiro evento de migração realizado pela célula, sendo que o lamelipódio necessita da inativação da peroxirredoxina-1 para ser formado. Tem sido relatado que a Src facilita o aumento da concentração local de H_2O_2 por fosforilar e consequentemente inativar a peroxirredoxina-1 ligada a membrana plasmática. Dessa maneira, H_2O_2 atua como sinalizador para a inativação da peroxirredoxina-1 e estimular a formação do lamelipódio (Gianni et al., 2010).

Em células endoteliais, a geração local de ERO derivadas do NADPH-oxidase contribuem para a sinalização redox regulando a direção da migração da célula. Isto é observado quando há o acúmulo local de ERO em *membrane ruffles*. Para estabelecer a polarização da célula que orienta a direção da migração é necessário a reorganização do citoesqueleto de actina, que como citado anteriormente também é regulado pelas ERO. Isso acontece por causa do acúmulo local de Rac ativa no *front* celular, Rac vai ativar Nox e gerar ERO, contribuindo para a consequente polimerização de actina na região da célula onde a protrusão vai se formar e indicar a direcionalidade/polaridade da célula (Hunter et al., 2017; Reczek e Chandel, 2015).

A expressão gênica de metaloproteinases (MMP) também é regulada pela sinalização de EROs derivadas de Nox. Para que a migração ocorra, a MEC precisa ser degradada e as proteínas responsáveis por essa etapa são as MMP's. Os inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) também regulam a expressão das MMP's. As EROs acabam por afetar a migração celular quando estão em grande concentração e esse aumento na produção de EROs leva a degradação da matriz, facilitando a motilidade celular (Grote et al., 2003).

1.3.3 NADPH Oxidase e adesão celular

O processo de adesão celular exerce função na manutenção da integridade do tecido, no desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, inflamação e no desenvolvimento de metástase tumoral (Schröder, 2014). A produção de ERO derivadas do complexo NADPH-oxidase é uma consequência do processo de adesão, uma vez que, é ativada uma cascata de transmissão de sinais, que devido ao Nox, altera expressão gênica, a conformação do citoesqueleto da célula e ativa proteases (Giannoni et al., 2010). Outra consequência das ERO derivadas do NADPH-oxidase, é a expressão de moléculas de adesões, uma vez que são reguladas por meio de reações redox sensíveis e do modo que o estímulo aplicado controla a Nox. A expressão de moléculas de adesão dependente de Nox é frequentemente associada à inflamação (Cook-Mills et al., 2011).

2. HIPÓTESE

As espécies reativas de oxigênio derivadas do complexo NADPH-oxidase podem influenciar o processo de migração celular por modular a dinâmica de formação do lamelipódio e o *turnover* de adesões.

3. OBJETIVO

Analisar eventos e moléculas envolvidas na migração celular na ausência ou presença de espécies reativas de oxigênio derivadas do complexo NADPH-oxidase.

3.1 Objetivos específicos

- Analisar a velocidade e direcionalidade de migração celular em células CHO.K1 na ausência ou presença de espécies reativas de oxigênio derivadas do complexo NADPH oxidase.

- Analisar a velocidade, número e taxa de retração de projeções de membrana celular em células CHO.K1 na ausência ou presença de espécies reativas de oxigênio derivadas do complexo NADPH oxidase.

- Verificar a ativação de Rac1 em células CHO.K1 na ausência ou presença de espécies reativas de oxigênio derivadas do complexo NADPH oxidase.

- Analisar a expressão proteica de FAK-Y397 de células CHO.K1 na ausência ou presença de espécies reativas de oxigênio derivadas do complexo NADPH oxidase.

- Analisar o *turnover* de adesões em células CHO.K1-paxilina-GFP na ausência ou presença de espécies reativas de oxigênio derivadas do complexo NADPH oxidase.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados obtidos durante o período de mestrado acadêmico foram agrupados em um artigo científico intitulado “**NADPH-oxidase derived ROS alters cell migration by modulating adhesion dynamics**” submetido ao periódico *Biology Of The Cell* (Fator de impacto 2016 = 2.649) no formato de *research article*. Minha participação foi tanto na escrita do artigo, quanto na execução de experimentos e análise de dados obtidos.

NADPH-oxidase derived ROS alters cell migration by modulating adhesions dynamics

Maurício Tavares Tamborindeguy^{1,2}, Bibiana Franzen Matte¹, Grasieli de Oliveira Ramos^{1,3}, Alessandro Menna Alves^{1,4}, Lisiane Bernardi¹, Marcelo Lazzaron Lamers^{1,2,5}.

¹Basic Research Center in Dentistry, Dentistry School, Federal University of Rio Grande of Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil,

²Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

³School of Dentistry, University of Oeste de Santa Catarina, Joaçaba, SC, Brazil.

⁴School of Dentistry, University Center Univates, Lajeado, RS, Brazil

⁵Department of Morphological Sciences, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding Author:

Marcelo Lazzaron Lamers

Address: Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2492, sala 503, CEP 90035-003, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, Telefone +55 51 33085011; Fax +55 51 33085003, e-mail: marcelo.lamers@ufrgs.br

Running title: NADPH-oxidase derived ROS affects cell adhesion

Keywords: diphenylene iodonium sulfate, reactive oxygen species, Focal Adhesion Kinase, NADPH Oxidase, Rac1

ABSTRACT

Background information: Cell migration requires the coordinated activation of structural and signaling molecules, such as the RhoGTPase Rac1. It is known that the NADPH oxidase complex assembly, which generates Reactive Oxygen Species (ROS) at the cell membrane, also relies on Rac1 activation, indicating a possible effect of ROS during cell migration. In this study, we evaluated the effect of NADPH-derived ROS on the migration process.

Results: Using time-lapse videos of CHO.K1 cells plated on fibronectin (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), we observed that depletion of ROS by N-acetyl-cysteine (NAC, 10 mM), an unspecific antioxidant, or Di-phenil-iodonium (DPI, 10 μM), a NADPH-oxidase inhibitor, induced a 60% decrease in migration speed and severely impacted migration directionality. Then, we analyzed the effects of NADPH oxidase on three migratory events: protrusion rate, adhesion process and signaling pathways related to cell migration. DPI induced an increase of ~ 3 protrusion/cell, which were 2x faster but had a $\sim 50\%$ retraction when compared to control. By pull down assay, we observed no changes on Rac1 activation, indicating that ROS-mediated effects were related to downstream molecules, such as adhesion-related molecules. It was observed a reduction of the adhesion marker FAK-Y397 levels in cells treated with DPI. In order to analyze adhesion dynamics, CHO.K1 cells transfected with paxillin-GFP analyzed with Total Internal Reflectance Fluorescence (TIRF) indicated that DPI (5 μM) induced larger adhesions when compared to control.

Conclusion: These results indicate that the local generation of NADPH-derived ROS can modulate cell migration due to changes on adhesion dynamics and signaling.

Significance: This study highlights the physiological requirement of ROS for cell migration and the potential use of these molecules as targets to modulate the cell migration process at different diseases.

BACKGROUND

Cell migration is a dynamic process involved in biological events as embryonic development, wound healing and tissue repair and regeneration. However, it plays an important role in pathological conditions such as cancer cell dissemination (Dwyer et al., 2017; Hunter and Fernandez-Gonzalez, 2017; Pandya et al., 2017; Manzanares and Horwitz, 2011). The process of cell migration is orchestrated by signaling molecules, including the RhoGTPases Rac1 and RhoA, and performed by different proteins such as actin, myosin, paxillin and focal adhesion kinase (FAK) (Parsons et al., 2010). In summary, cell migration starts with the lamellipodia formation, which is formed by the cell membrane protrusion at the leading edge through actin polymerization regulated by Rac1 (Machacek et al., 2009; Parsons et al., 2010.). Next, nascent adhesions are formed with the cell substrate mediated by integrins, which are connected to actin cytoskeleton through adaptor proteins, such as paxillin (Choi et al., 2008). These nascent adhesions turn into mature adhesion, by the hierarchically translocation of adaptors and signaling molecules such as FAK, a tyrosine kinase. Then, mature adhesion enables the cell body contraction via non-muscle myosin activity and formation of actin stress fibers. Eventually, the cell body retracts and the adhesion disassembles from the substrate mediated by RhoA (Ridley et al., 2003). Besides those factors, other elements influence cell migration, such as the reactive oxygen species (ROS). For example, ROS is necessary to enable cellular adhesion through oxidation of low molecular weight protein tyrosine phosphatases (LMW-PTP) that allow FAK activation (Chiarugi, 2003).

Generation of ROS also has important roles on physiological and pathological conditions. Although ROS are frequently related with oxidative stress, inducing cell damage associated to diseases, it has been demonstrated that these products are also involved in biological processes as signaling molecules (Schieber and Chandel, 2014; Reczek & Chandel, 2015). ROS are produced by different mechanisms, for example, by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-(NADPH) oxidase. NADPH-oxidase is an enzyme complex and consists of a family of seven proteins, Nox 1-5, Duox1 and Duox2 (Teixeira et al., 2016). The activation of NADPH-oxidase depends on the assembly of different subunits in the cytosol and in the membrane. Rac1 is one of the subunits necessary to activate NADPH-oxidase and, consequently, the local formation of superoxides in the extracellular environment (Cheng et al., 2006).

Since both NADPH-oxidase complex assembly and membrane protrusion during cell migration rely on Rac1 activity, we hypothesized that local NADPH-oxidase derived ROS

might influence the dynamic of lamellipodia formation and adhesion turnover. In this study, it was used an unspecific antioxidant and a specific NADPH-oxidase complex inhibitor to analyze the influence of ROS during cell migration. Depletion of ROS decreased migration velocity and directionality, and altered the dynamics of membrane protrusions, adhesion maturation and levels of signaling molecules such as FAK in CHO.K1 cell line, indicating that NADPH-oxidase derived ROS is necessary for cell migration.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

CHO.K1 cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) low glucose containing 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin and 1% non-essential amino acids (NEAA) at 37 °C, 5% CO₂. For imaging, cells were plated with the serum free media CCM1 (Hyclone, Thermo Scientific). For Rac1 activation assays, cells were cultured for 12 h in medium with 0.5% of FBS and then plated with CCM1 media. For the transfection of the CHO.K1 cells with paxillin-GFP plasmid, it was used Lipofectamine (Invitrogen, Eugene, OR) according to the manufacturer's instructions. CHO.K1 cell cultures were treated with Di-phenil-iodonium (DPI), which inhibits the NADPH oxidase through flavoenzymes (Cross and Jones, 1986); Acetovanilone which inhibits NADPH oxidase assembly (Stolk, 1994). It was also used N-acetyl-cysteine (NAC), which is an unspecific antioxidant that acts as a scavenger through replenishment of reduced glutathione (Gibson, 2009) and acts regardless of NADPH oxidase. Otherwise stated, all chemicals and reagents for cell culture were purchased from Sigma (St Louis, MO) and Gibco (Invitrogen, Eugene, OR), respectively.

Microscopy and image processing

Cells were plated on glass-bottomed dishes covered with fibronectin (2 µg/ml for CHO.K1) and maintained at 37° C at pH 7.4 in CCM1 medium for 1 h (migration promoting conditions). For long-term migration, time-lapses images were captured in a microscopy at 10 min intervals (0.25 NA CFI Achrom DL10x Nikon objective) with a charge-coupled device camera (Orca II; Hamamatsu Photonics, Iwata-City, Japan) attached to an inverted microscope (TE-300; Nikon, Tokyo, Japan) with heat-control (37 °C) using Metamorph software (Universal Imaging Corp., Downingtown, PA). Migrating cells were tracked using the software ImageJ updated with the plugin Manual Tracking. From this data, it was calculated the migration velocity as total distance of migration (µm) per hour. For the

directionality analysis, a polar plot graph was constructed, which represents the spatial trajectory developed by each migratory cell, where the X and Y coordinates of each cell trajectory were normalized to start at a virtual ($X = 0$ and $Y = 0$) position. Also, it was analyzed the directionality index which is the result of the relative distance that the cell traveled divided by the total distance traveled. A directionality index close to 1 indicates that the cell had a highly directional movement (close to a straight line), whereas directionality index close to 0 reflects a low directionality movement.

For protrusion analysis (kymography), time-lapse images were captured every 5 s for 30 min (0.65 NA CFI Achromatic DL 40x Nikon objective). A line (5 pixels-wide) was drawn along regions oriented in the protrusion direction and perpendicular to the lamellipodial edge. Protrusion parameters were quantified by kymography (Hinz et al., 1999), using ImageJ software. Results were plotted in a graph where the Y axis is the distance reached by the lamellipodium along that line, and the X axis is the time.

For confocal images, it was used an Olympus FluoView 300 system (1.45 NA oil PlanApo 60x TIRFM objective). GFP was excited using the 488 nm laser line of an Argon laser (Melles Griot, Albuquerque, NM). A Q500LP dichroic mirror (Chroma Technology Corp. Rockingham, VT) and a HQ525/50 emission filter was used for GFP labeled cells. Fluorescence images were acquired using FluoView software (Olympus, Tokyo, Japan).

TIRF images were acquired in an Olympus IX70, inverted microscope (1.45 NA oil Olympus PlanApo x60 TIRFM objective) fitted with a Ludl modular automation controller (Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY) and controlled by Metamorph (Molecular Devices). GFP was excited using the 488 nm laser line of an Ar ion laser (Melles Griot). Also, a dichroic mirror (HQ485/30) and a HQ525/50 emission filter were used. All images were acquired with a charge-coupled device camera (Retiga Exi; Qimaging, Surrey, Canada) and analyzed using ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij>).

Pull down assay (Rac activation assay)

Rac1 activation was analyzed by pull-down assay (Glaven et al., 1999). Cells were incubated overnight with medium containing 0.5% FBS, and then trypsinized and plated in migration promoting conditions in the presence/absence of NAC (10 mM) or DPI (10 μ M) for 1h. Then, cells were washed in cold PBS and lysed in CRIB buffer (1% NP-40, 50 mM Tris pH 7.4, 10% glycerol, 100 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$), containing a protease inhibitor cocktail (Sigma P8340). After centrifugation (12,000 rpm, 4 °C, 20 min), cell lysate was incubated with 20 μ g of glutathione-agarose beads (Pharmacia, Stockholm, Sweden)

tagged with recombinant PBD (Pak Binding Domain) for 30 min at 4 °C, washed with lysis buffer and eluted with SDS sample buffer. Rac1 activation was analyzed by Western blotting. Total lysate was used to verify the presence of Rac1 for normalization.

Western blotting

For adhesion signaling analysis, cells were plated in migration promoting conditions for 1 h with the presence or absence of NAC (10 mM) or DPI (1, 5, 10 μ M). Cells were washed with cold PBS and scrapped in RIPA buffer containing protease and phosphatase inhibitors cocktail (Sigma). After centrifugation (12.000 rpm, 4 °C, 20 min), supernatant was collected and protein was quantified with Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Samples were incubated with Laemlli buffer, boiled (95 °C, 5 min) and stored (-20 °C) until use.

Samples obtained from Rac1 pull down or adhesion signaling assay were submitted to SDS-PAGE with 4-20% gradient gels (BIO-RAD) and transferred to a PDVF membrane. Deffated milk (Rac1 and FAK) or 5% BSA (FAK-Y397) in PBS/0.5% Tween20 were used for blocking during 45 min at room temperature. Incubation with the primary antibodies (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) for Rac1 (1:1000), FAK (1:1000) or phosphoFAK-Y397 (1:1000) was performed overnight at 4 °C. After washing, membranes were incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody (Amersham Pharmacia Biotech., Chalfont St. Gilles, United Kingdom), and the reaction was detected by chemiluminescence (Pierce, Thermo, Rockford, IL).

Immunofluorescence

For immunofluorescence staining, CHO.K1 cells were plated in cover-slips covered with fibronectin and treated with ROS inhibitors. After 1 hour, cells were washed (PBS) and fixed (formaldehyde, 4%, 10 min, RT). Fixed cells were permeabilized (Triton X-100 0.3%, RT 10 min), blocked (10% normal goat serum, RT, 1 h), incubated with FAK y-397 antibody (ON, 4 °C), washed (PBS) and incubated (2 h, RT) with the corresponding secondary antibody containing Alexa488 dye (Molecular Probes, Oregon, USA). Actin filaments were stained with phalloidin toxin conjugated to rhodamine (Molecular Probes, Oregon, USA) for 2 h (RT). Samples were washed (PBS) and mounted with antifade medium (Vectashield, VectorLab, Burlingame, CA). Images were obtained in confocal microscope (Olympus Fluoview 1000, Tokyo, Japan) with a 63x objective (UPlanSApo

x63, 1.20 NA, oil immersion objective) using FV-1000 ASW Fluoview software (Olympus, Tokyo, Japan). Alexa488 was excited with the 488 nm laser line of an Argon ion laser (Melles Griot, Albuquerque, NM), while rhodamine with the 543 nm laser line of a Helium-Neon laser (Melles Griot, Albuquerque, NM).

Statistical analysis

For the statistical analysis, Student t-test and one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test were performed. Statistically significant differences were considered when $p \leq 0.05$.

RESULTS

Inhibition of NADPH-oxidase derived ROS decreases migration speed and directionality

In order to analyze possible roles of ROS on cell migration events, we plated CHO.K1 cells in migrating promoting conditions and performed time-lapse videos (10 min/ 24 h) in the presence/absence of a high dose (10 mM) of a ROS scavenger (NAC). Migratory cells were tracked and migration speed and directionality was measured. It was observed that depletion of ROS by NAC induced a 60% decrease in migration speed (Figure 1A, Supplementary Movie 1) and severely impacted migration directionality (Figure 1B). Since NAC is an unspecific antioxidant, we asked whether NADPH oxidase-derived ROS would contribute to the migration process. Therefore, a NADPH-oxidase specific inhibitor, DPI, was also tested in the same migration conditions with three increasing doses (1 μM , 5 μM or 10 μM). It was observed that all DPI concentrations impaired migration speed by ~50%, while DPI at 10 μM impaired migration directionality as observed in NAC treatment. When we correlated migration speed and migration directionality index, the inhibition of overall ROS or NADPH-oxidase derived ROS resulted in an association of decreased migration speed and impaired directionality (Figure 1C). These results suggest that ROS is necessary for migration performance, more specifically those generated by the NADPH-oxidase complex.

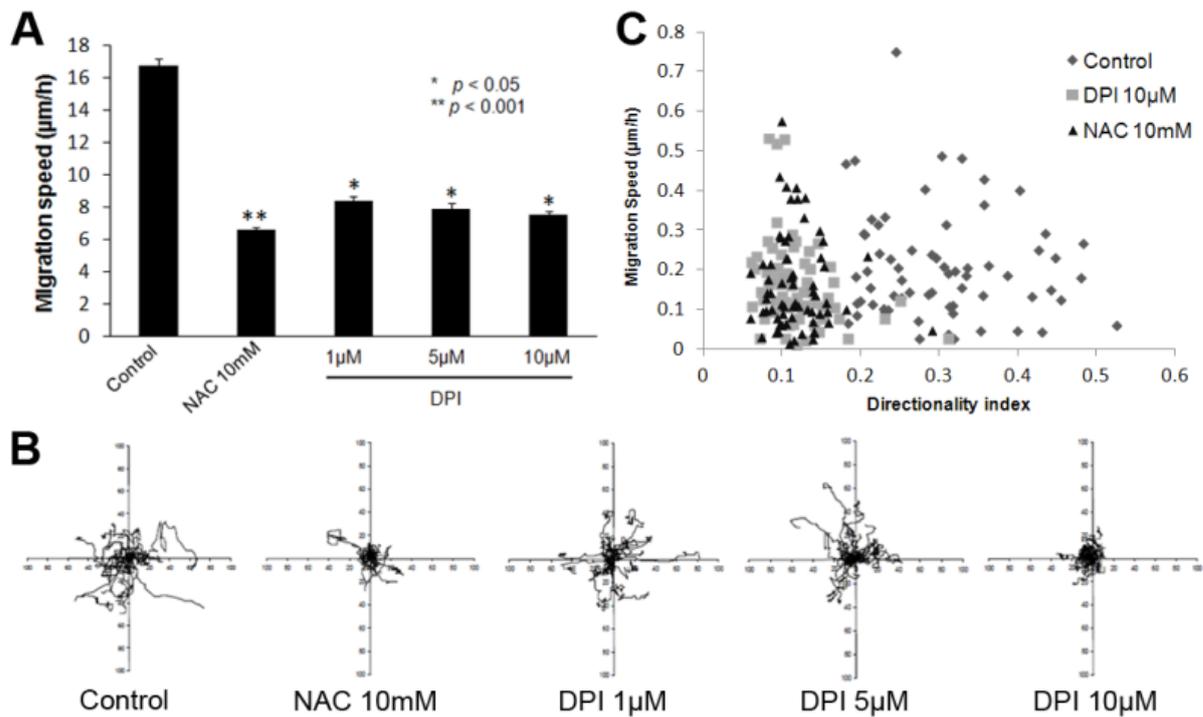


Figure 1. Directionality and migration velocity relies on ROS presence. (a) Analysis of migration speed of the CHO.K1 cell line in the presence of diphenylene iodonium sulfate (DPI 1, 5 or 10 µM) or the antioxidant n-acetylcisteyne (NAC 10 mM). It was observed that treatment with DPI or NAC decreased migration speed of CHO.K1 cells. (b) Polar plot graphs of the CHO.K1 cells in the presence of NAC or DPI. Each line represents one migratory cell. The treatment with NAC or DPI reduced directionality of CHO.K1 cells. (c) Scatter-plot analysis correlating CHO.K1 migration speed and directionality index when exposed to NAC or DPI. Student t-test, * = $p < 0.05$ ** = $p < 0.001$, $n = 4$.

Inhibition of NADPH-oxidase derived ROS affects protrusion dynamics

An efficient migration process relies on cell membrane protrusion followed by adhesion stabilization to the extracellular matrix proteins (ECM) in order to allow cell body contraction (Case; Waterman, 2015). Since ROS inhibitors impaired cell migration, we investigated the possible effects on protrusion dynamics. CHO.K1 cells were treated during 1 h with the unspecific antioxidant (NAC) or the NADPH oxidase inhibitors, DPI or acetovanilone. Then, cells were plated in migrating promoting conditions for 1 h, imaged for 30 min and protrusion speed, number of protrusions per cell and the percentage of

retrusion were measured. It was observed that both, antioxidant and NADPH-oxidase inhibitors, increased protrusion speed, which were 2x faster (0.10 $\mu\text{m}/\text{min}$) than control (Figure 2A). Also, all treatments induced an increase in the number of protrusions per cell (Figure 2B and D). However, these protrusions were unstable, since the inhibition of overall ROS (NAC) or NADPH oxidase-derived ROS (DPI, acetovanilone) showed an approximate 50% retraction of the protrusions compared to 0% of control (Figure 2C and D). Taken together, this data shows that total ROS inhibition or the blockage of NADPH oxidase complex results in the induction of non-productive protrusions that assemble faster but are unstable and retract.

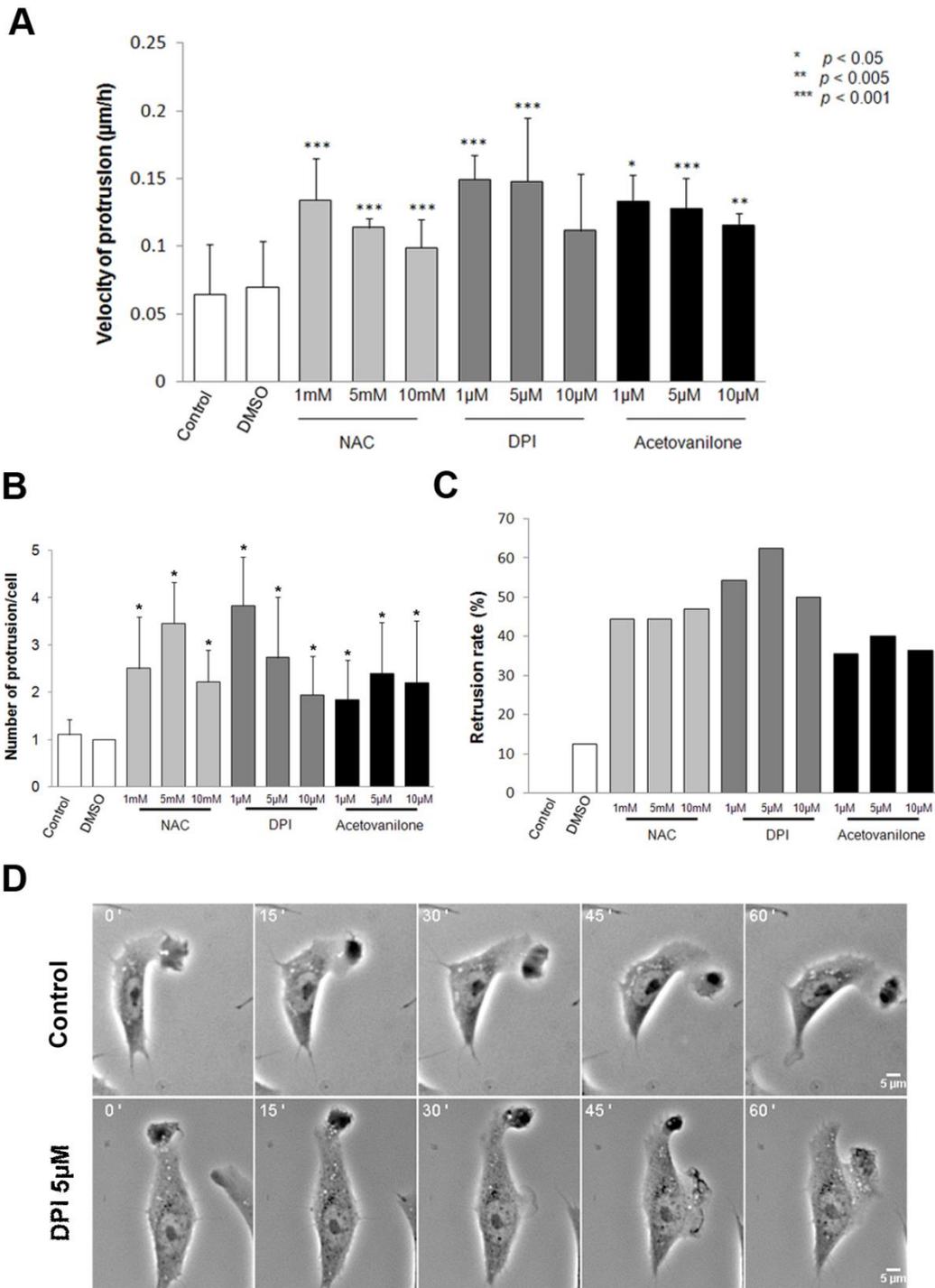


Figure 2. ROS inhibition results in unstable protrusion. (a) CHO.K1 histogram of control and treated cells with 1, 5 and 10 μM of DPI and acetovanilone; 1, 5 and 10 mM of NAC. Protrusion velocity increases after treatment when compared to control. (b) CHO.K1 histogram for number of protrusions/cell of control and treated cells with 1, 5 and 10 μM of DPI and acetovanilone; 1, 5 and 10 mM of NAC The number of protrusions/cell increases after the treatment when compared to control, especially with NAC 5 mM treatment. (c)

CHO.K1 histogram for percentage of retractions of control and treated cells with 1, 5 and 10 μ M of DPI and acetovanilone; 1, 5 and 10 mM of NAC. The percentage of retraction increases after the treatment when compared to control. (d) Photomicrographs show changes in CHO.K1 cell protrusions within 0, 15, 30, 45 and 60 minutes in cells cultured under control (above) and ROS depletion (below) conditions. White arrows indicate new protrusions, black arrows retraction. Student t-test, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.005$, *** = $p < 0.001$, $n = 3$.

ROS inhibition reduces FAK phosphorylation during cell migration

Since protrusion dynamics is regulated by the RhoGTPase Rac1 (Ridley et al., 1992), we analyzed if the changes on protrusion velocity and stability caused by ROS inhibition involved Rac1 activation. Cells were plated in migration promoting conditions in the presence/absence of NAC (10 mM) or the NADPH-oxidase inhibitor (DPI, 10 μ M) and Rac1 activation was tested by pull down assay. It was observed no difference on Rac1 activation levels after ROS inhibition dependent or not of NADPH oxidase (Figure 3A). This data indicates that the increase on protrusion speed and protrusion instability mediated by NADPH oxidase does not involve Rac1 activation, suggesting a direct effect of ROS levels in downstream events, such as the adhesion molecules.

Another possible mechanism of regulation of cell migration is through cell adhesion signaling. FAK is a key regulator of focal adhesion dynamics and regulates cytoskeleton organization through integrins activation (Schaller et al., 1993; Hidelbrand et al., 1995). When FAK receives stimuli through integrins, an autophosphorylation occurs at Y-397 residue, which creates a Src binding sites and results in subsequent activation (Webb et al. 2004). We analyzed total FAK and FAK-Y397 phosphorylation (pFAK-Y397) levels by western blot. ROS inhibition, through NAC or DPI, led to reduction of pFAK-Y397 levels with a more intense decrease with DPI inhibitor (Figure 3B). To confirm this finding, CHO.K1 cells, exposed or not to ROS scavengers or NADPH oxidase inhibitors, were plated in migration promoting conditions, fixed and stained for actin and pFAK-Y397. We observed pFAK-Y397 in large adhesions in the cell lamellipodium of control cells. When cells were exposed to ROS or NADPH-oxidase inhibitors, there was a decrease on adhesions stained by FAK (Figure 3C). Altogether, it was demonstrated that absence of ROS affects the adhesion signaling process as represented by reduced pFAK-Y397 levels.

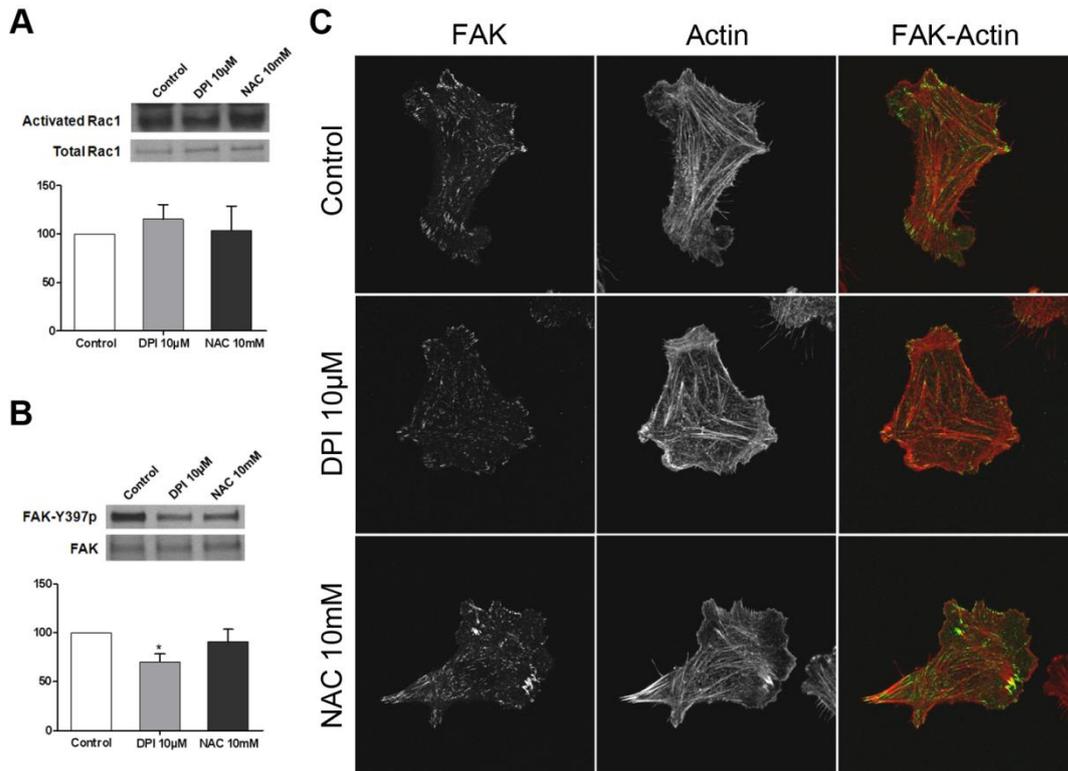


Figure 3. ROS inhibition alters adhesion signaling but not alter Rac1 activation. (a) Rac1 activated levels measured by Western blot (b) FAK Y397 levels measured by Western blot (c) FAK and actin Immunostaining. CHO.K1 control (first line); CHO.K1 treated with DPI 10 µM (second line); CHO.K1 treated with NAC 10 mM (last line). Student t-test, * = $p < 0.05$, $n = 3$.

ROS depletion increases adhesion area

As observed that total or NADPH-oxidase-derived ROS induced unstable protrusion and decreased the levels pFAK-Y397 involved in adhesion turnover and maturation, we asked what was the effect of NADPH-oxidase derived ROS during the adhesion process. Cells were transfected with the nascent adhesion marker Paxillin tagged with GFP (Webb et al., 2004), plated on migrating promotion conditions in the presence of increasing concentrations of DPI (1, 5, 10 µM) and analyzed with TIRF microscope. The adhesion area was larger in cells treated with 5 and 10 µM of DPI, when compared to control (Figure 4A and B, Supplementary Movie 2). Taken together, these results suggest that NADPH oxidase-derived ROS modulates cell adhesion dynamics and signaling, which results in unstable protrusion and ineffective cell migration.

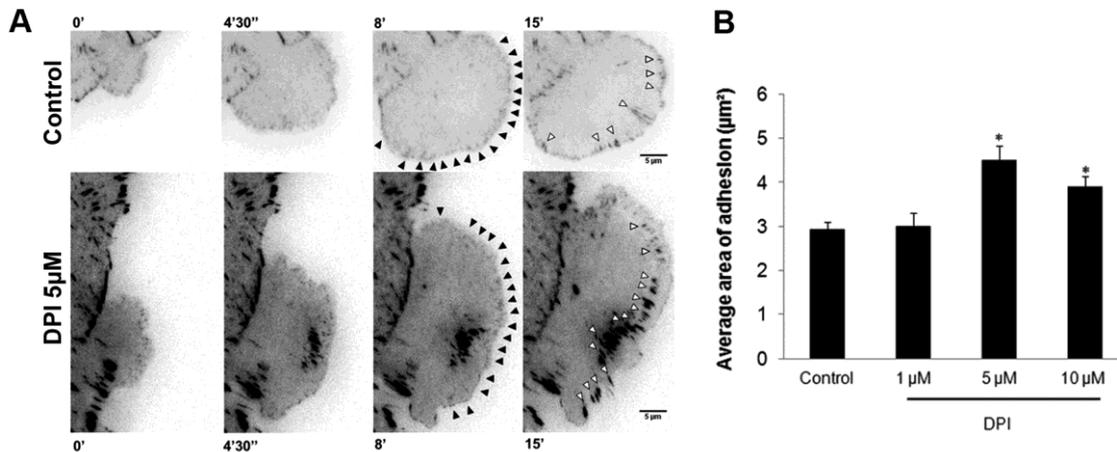


Figure 4. ROS inhibition alters adhesion dynamics. (a) Analysis of CHO.K1 adhesions. In order to analyze adhesion dynamics, CHO.K1 cells were transfected with the adhesion marker paxillin-GFP and imaged in the presence/absence of DPI. It was observed that adhesions in DPI-treated groups were larger than control group. (b) DPI induces an increase in adhesion area. Average area of adhesions in CHO.K1 cells exposed to increasing DPI doses (1, 5 and 10 μM) with a significant increase on 5 and 10 μM doses. Student t-test, * = $p < 0.05$, $n = 3$.

DISCUSSION

Cell migration process is dependent on signaling and adhesion molecules such as Rac1, paxillin and FAK. However, there are several other evidences that ROS may also play a role during cell migration. Herein, we demonstrated that, more specifically, NADPH-oxidase derived ROS affects migration speed, probably by modulating cell adhesion (Figure 5).

Reactive oxygen species (ROS) are commonly associated to disorders and diseases, however, it plays a crucial role in some biological processes. We can observe three mainly forms of ROS at cell: superoxide ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl free radicals ($\cdot OH$) (Chen et al., 2008). In animal cells, these species are produced mainly by the electron transport chain at mitochondria, but also produced by enzymatic sources, such as dual oxidases, nitric oxide synthases and NADPH oxidase complex (Munro and Treberg, 2017; Ushio-Fukai, 2006). These compounds have high reactivity suggesting that ROS can be used to regulate specific signaling pathways at specific cells regions, for example, in events associated with cell migration (Zorov et al.,

2014). Since NADPH-oxidase derived ROS relies on Rac1 activation, this indicates a possible effect of ROS in cell migration.

There are different NADPH-oxidase enzyme isoforms that are synthesized and regulated by different regulatory pathways. For example, NOX 1 and NOX 2 are regulated by post-translational mechanisms, as phosphorylation of regulatory subunits. Meanwhile, NOX 4 activity is dependent of gene transcription and protein expression levels, indicating that ROS production is also inducible by gene expression (Giannoni et al., 2010). NOX 1 has a critical role on ROS production, indeed, when we used different doses of DPI, a NADPH-oxidase inhibitor, we observed a decrease at migration speed and impaired directionality of CHO.K1 cells, indicating that NADPH-oxidase derived ROS are required to cell migration. Melanoma cell lines treated with DPI had a significantly decrease in their migration profile as a result of reduced NOX 1 levels by DPI (Prasad et al., 2016). Similarly, ROS inhibition by DPI treatment in human breast cancer cell line, also impaired cell migration and invasion, even in the presence of deferoxamine (DFO), a substance that induces hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) expression, playing a critical role in promoting tumor metastasis (Liu et al., 2014).

N-acetylcysteine (NAC) is an antioxidant, that precedes the formation of glutathione (GSH) and it acts reducing general ROS production (Gibson, 2009). In a human skin fibroblast cell line, NAC treatment increases GSH levels attenuating ROS generation effects (Tsai et al., 2014). Herein, we demonstrated that the global reduction of ROS by NAC compared to ROS inhibition by targeting NADPH-oxidase via DPI generated differences in the migration velocity reduction. NAC treatment led to a further decrease in cell migration and directionality impairment compared to cells treated with DPI, demonstrating that migration process depends on the presence of ROS, but not only ROS produced by NADPH-oxidase. Ramaesh et al. (2012) showed that NAC reduced cell migration rates of human corneal epithelial cells (HCE) and this was associated with matrix metalloproteinase-9 reduction. Moreover, melanoma cells also had their migration inhibited by treatment with NAC, DPI and ERK inhibitor (Im et al., 2012). Since ROS is a modulator of cell migration, it would be an interesting therapeutic target for metastasis (Im et al., 2012).

Once demonstrated that NADPH-derived ROS are required to cell migration, we investigated the protrusion dynamic of these cells. It was observed that the lower doses of NAC, DPI and acetovanilone increased the velocity of protrusion and the number of protrusions, mainly when cells were exposed to NAC. Physiologically, Rac1 leads to actin

polymerization at the leading edge generating protrusions. Then, nascent adhesions are formed between cell surface and the ECM mediated by integrins and these nascent adhesions turn into mature adhesion. As a consequence, cell body contracts via myosin and, eventually, cell rear retracts as the adhesion disassembles from the substrate. Cells exposed to ROS inhibitors had an increase in velocity and number of protrusions. However, there was also an increase in the rate of lamellipodia retrusions, which indicates instability on protrusion formation. This instability may cause the impairment in directionality and the decrease of migration velocity that we observed. Our data indicates that ROS depletion by specific NADPH-oxidase inhibitor interferes mainly in the initial steps of migration that is the formation and stabilization of cell protrusion.

The small RhoGTPase Rac1 exerce a pivotal role at initial steps of cell migration and it is also involved in NADPH-oxidase assembly (Cheng et al., 2006; Machacek et al., 2009). However, Rac1 activation levels did not change after ROS depletion with DPI treatment. This result corroborate with existing literature that integrins activate Rho GTPases to induce ROS production (Werner, 2002). Also, Radisky et al. (2005), showed that, in breast tumors, presence of MMP-3 activate an alternative spliced isoform of Rac1 that stimulate ROS production and epithelial-mesenchymal transition process consequently. Therefore, ROS depletion altered cell protrusion during migration movement through other mechanisms rather probably due to alterations of focal adhesions between the cell and the ECM.

Focal adhesion maturation consists in the turnover of focal complex formation to provide a stable cell-ECM connection, cell body stability and to allow traction forces and movement. FAK is a non-receptor tyrosine kinase activated by integrins and modulates adhesion turnover (Webb, 2004). Treatment with NADPH-oxidase inhibitor leads to a reduced FAK phosphorylation, which indicated that ROS act as a biological messenger to activate adhesion turn over. As shown previously by Chiarugi et al (2003), ROS inhibits low-molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase (LMW-PTP) to allow FAK activation. In pathological situations, as in melanoma, inhibition of NADPH-oxidase also caused FAK-levels reduction (Ribeiro-Pereira, 2014). Therefore, ROS is required to allow focal adhesion maturation in order to have a stable cell-ECM adhesion and cell body contraction.

As observed the reduced FAK levels after ROS depletion, it was analyzed the behavior of focal adhesions with a CHO.K1-GFP-paxillin transfection during lamellipodia formation with a time-lapse video. Since paxillin is a protein expressed in focal adhesion,

this dynamic assay allowed the observation of the number and how focal adhesion matures after DPI treatment. Interestingly, NADPH-oxidase inhibition showed an increase in the number and area of focal adhesion formation. This can be explained since FAK is necessary to focal adhesion disassembly altogether with ERK (Flinder et al, 2011). We can hypothesize that NADPH-oxidase inhibition lead to a decrease on FAK-levels, which then cannot participate with focal adhesion maturation and disassembly. Without FAK, there is an increase on focal adhesion area, but these adhesions are not stable. As a consequence, there is protrusion retraction and an impaired migratory movement. It has been shown previously that FAK-deficient mice have a reduced migratory rate with increased focal adhesion formations (Ilic et al, 1995; Webb, 2004). Therefore, this demonstrates that ROS production through NADPH-oxidase interferes on focal adhesion formation.

Herein, it was demonstrated that ROS depletion reduces migration velocity and impairs directionality and, in some extent, this is due to NADPH-oxidase. This migration impairment is due to unstable protrusions caused by reduced FAK-levels. These data correlates with reports that ROS acts as a biological messenger in physiological conditions and its balance is important to maintain tissue homeostasis (Schieber and Chandel, 2014).

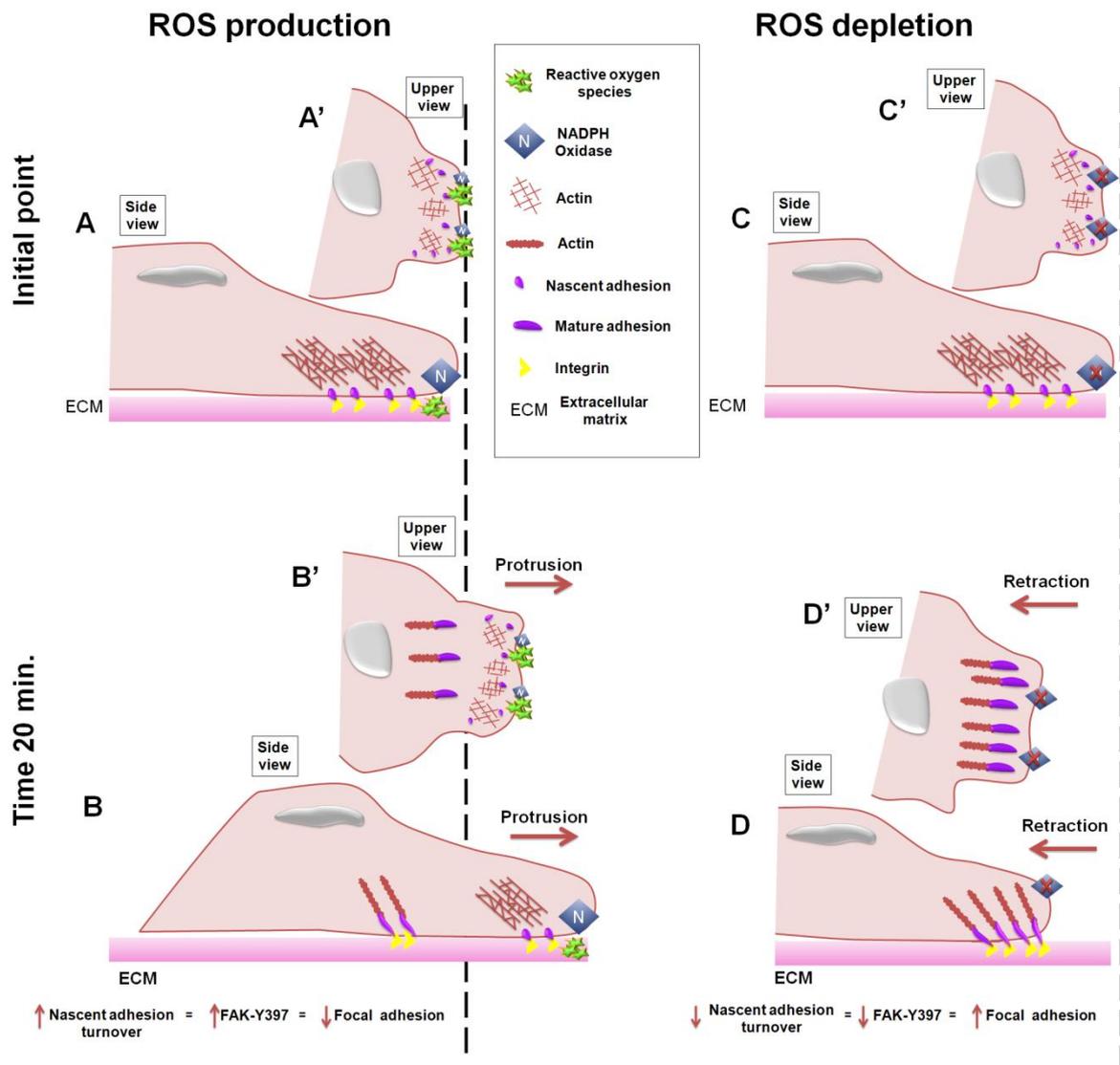


Figure 5. Reactive Oxygen Species as modulator of adhesion dynamics. The cartoon represents the side (A, B, C, D) and upper (A', B', C', D') view of a migratory cell at time zero (A, A', C, C') and the resulting phenotype after 20 minutes of migration (B, B', D, D') of a cell adhering to the Extracellular Matrix through integrins (yellow triangles). The dotted line indicates a spatial reference for the migration. In a physiological situation of ROS production (A, A', B, B'), free radicals (green), derived from the NADPH oxidase complex (blue diamond), increases the turnover of nascent adhesions (violet circles) which generates lower levels of matured adhesions (violet ellipses) and stress fibers (red line), resulting in membrane stability and persistent protrusion (B, B'). In a situation where ROS production is blocked (C, C', D, D'), the adhesion turnover is impaired, which favors the formation of larger focal adhesions (violet ellipses) and high levels of stress fibers (red line), resulting in cell membrane retraction and unstable protrusions (D, D').

ABBREVIATION LIST

ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovine Serum Albumin
CHO	Chinese Hamster Ovarian Cells
DFO	Deferoxamine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPI	Di-phenil-iodonium
ECM	Extracellular Matrix
ERK	Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase
FAK	Focal Adhesion Kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
GFP	Green Fluorescent Protein
GSH	Glutathione
HCE	Human Corneal Epithelial Cells
LMW-PTP	Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatases
MMP-9	Matrix Metalloprotease-9
NAC	N-acetyl-cystein
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NEAA	Non Essential Aminoacids
ON	Overnight
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDB	Pak Binding Domain
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay Buffer
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Room Temperature
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate

Author Contribution

M. T. T. and B. F. M. were involved in study design, acquisition and analyses of data. M. L. L. was involved in acquisition of data. A. M. A., G. O. R. and L. B. were involved in interpretation of data. M. L. L. (correspondent author) was involved in study conception and design. All authors were involved in manuscript preparation and approved the final version to be published.

Funding

This work was supported by CNPq (#443649/2014-3). And M. T. T. was the recipient of a scholarship from CAPES. The funding agencies had no involvement on experimental design.

Acknowledgments

We are grateful to Alan Rick Horwitz (University of Virginia, USA) for the experiments of adhesion dynamics and Marinilce Fagundes dos Santos (University of São Paulo, Brazil) for discussion of results.

Conflict of interest statement

All authors declare no conflicts of interest

REFERENCES

- Bedard, K. and Krause, K. H. (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87, 245-313.
- Case, L. B. and Waterman, C. M. (2015) Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch. *Nat Cell Biol* 17, 955-963.
- Chen, K., Kirber, M. T., Xiao, H., Yang, Y. and Keaney, J. F. Jr. (2008) Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. *J Cell Biol* 181, 1129-1139.

Cheng, G., Diebold, B. A., Hughes, Y. and Lambeth, J. D. (2006) Nox1-dependent reactive oxygen generation is regulated by Rac1. *J Biol Chem* 281, 17718-17726.

Chiarugi, P. (2003) Reactive oxygen species as mediators of cell adhesion. *Ital J Biochem* 52, 28-32.

Choi, C. K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L. A., Mogilner, A. and Horwitz, A. R. (2008) Actin and α -actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesion in a myosin II motor-independent manner. *Nat Cell Biol* 10, 1039-1050.

Cross, A. R. and Jones, O. T. G. (1986) The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. *Biochem J* 237, 111-116.

Diaz, B. and Courtneidge, S. A. (2012) Redox signaling at invasive microdomains in cancer cells. *Free Radic Biol Med* 52, 247-256.

Dwyer, A. R., Greenland, E. L. and Pixley, F. J. (2017) Promotion of tumor invasion by tumor-associated macrophages: the role of CSF-1-activated phosphatidylinositol 3 kinase and src family kinase motility signaling. *Cancers* 9, 1-15.

Flinder, L. I., Timofeeva, O. A., Rosseland, C. M., Wierod, L., Huitfeldt, H. S. and Skarpen, E. (2011) EGF-induced ERK-activation downstream of FAK requires rac1-NADPH oxidase. *J Cell Physiol* 226, 2267-2278.

Franchini, A. M., Hunt, D., Melendez, J. A. and Drake, J. R. (2013) FcyR-driven release of IL-6 by macrophages requires NOX2-dependent production of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 288, 25098-25108.

Gauron, C., Rampon, C., Bouzaffour, M., Ipendey, E., Teillon, J. Volovitch, M. and Vriza, S. (2013) Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed. *Sci Rep* 3, 2084.

Giannoni, E., Taddei, M. L. and Chiarugi, P. (2010) Src redox regulation: again in the front line. *Free Radic Biol Med* 49, 516-527.

Gibson, K. R., Neilson, I. L., Barret, F., Winterburn, T. J., Sharma, S., MacRury, S. M. and Megson, I. L. (2009) Evaluation of the antioxidant properties of N-acetylcysteine in human platelets: prerequisite for bioconversion to glutathione for antioxidant and antiplatelet activity. *J Cardiovasc Pharmacol* 54, 319-326.

Glaven, J. A., Whitehead, I., Bagrodia, S., Kay, R. and Cerione, R. A. (1999) The Dbl-related protein, Lcf, localizes to microtubules and mediates the activation of Rac signaling pathways in cells. *The Jour of Biol Chem* 274, 2279-2285.

Hidelbrand, J. D., Schaller, M. D. and Parsons, J. T. (1995) Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domains of focal adhesion kinase. *Mol Biol Cell* 6, 637-647.

Hinz, B., Alt, W., Johnen, C., Herzog, V. and Kaiser, H. W. (1999) Quantifying lamella dynamics of cultured cells by SACED, a new computer-assisted motion analysis. *Exp Cell Res* 251, 234-243.

Hunter, M. V. and Fernandez-Gonzalez, R. (2017) Coordinating cell movements in vivo: junctional and cytoskeletal dynamics lead the way. *Curr Opin Cell Biol* 48, 54-62.

Ilic, D., Furuta, Y., Suda, T., Atsumi, T., Fujimoto, J., Ikawa, Y., Yamamoto, T. and Aizawa, S. (1995) Focal adhesion kinase is not essential for in vitro and in vivo differentiation of ES cells. *Biochem Biophys Res Commun* 209, 300-309.

Im, Y. S., Ryu, Y. K. and Moon, E. Y. (2012) Mouse melanoma cell migration is dependent on production of reactive oxygen species under normoxia condition. *Biomol Ther* 20, 165-170.

Ji, L. L. (2015) Redox signaling in skeletal muscle: role of aging and exercise. *Adv Physiol Educ* 39, 352-359.

Kim, H. S., Ullevig, S. L., Zamora, D., Lee, C. F. and Asmis, R. (2012) Redox regulation of MAPK phosphatase 1 controls monocyte migration and macrophage recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 2803-2812.

Liu, Y., Cui, Y., Shi, M., Zhang, Q., Wang, Q. and Chen, X. (2014) Deferoxamine promotes MDA-MB-231 cell migration and invasion through increased ROS-dependent HIF-1a accumulation. *Cell Physiol Biochem* 33, 1036-1046.

Machacek, M., Hodgson, L., Welch, C., Elliot, H., Pertz, O., Nalbant, P., Abell, A., Johnson, G. L., Hahn, K. M. and Danuser G. (2009) Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* 461, 99-103.

Munro, D. and Treberg, J. R. (2017) A radical shift in perspective: mitochondria as regulators of reactive oxygen species. *J Exp Biol* 220, 1170-1180.

- Nisimoto, T., Djebold, B. A., Consentino-Gomes, D. and Lambeth, J. D. (2014) Nox4: a hydrogen peroxide-generating oxygen sensor. *Biochemistry* 53, 5111-5120.
- Panday, A., Sahoo, M. K., Osorio, D. and Batra, S. (2015) NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell Mol Immunol* 12, 5-23.
- Pandya, P., Orgaz, J. L. and Sanz-Moreno, V. (2017) Modes of invasion during tumour dissemination. *Mol Oncol* 11, 5-27.
- Parsons, J. T., Horwitz, A. R. and Schwartz, M. A. (2010) Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 633-643.
- Radisky, D. C., Levy, D. D., Littlepage, L. E., Liu, H., Nelson, C. M., Fata, J. E., Leake, D., Godden, E. L., Albertson, D. G., Nieto, M. A., Werb, Z. and Bissell, M. J. (2005) Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* 436, 123-127.
- Ramaesh, T., Ramaesh, K., Riley, S. C., West, J. D. and Dhillon, B. (2012) Effects of N-acetylcysteine on matrix metalloproteinase-9 secretion and cell migration of human corneal epithelial cells. *Eye (Lond.)* 26, 1138-1144.
- Reczek, C. R. and Chandel, N. S. (2015) ROS-dependent signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 33, 8-13.
- Ribeiro-Pereira, C., Moraes, J. A., Souza, M. de J., Laurindo, F. R., Arruda, M. A. and Barja-Fidalgo, C. (2014) Redox modulation of FAK controls melanoma survival-role of NOX4. *PLoS One* 9, e99481.
- 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.
- Schaller, M. D. and Parsons, J. T. (1993) Focal adhesion kinase: an integrin-linked protein tyrosine kinase. *Trends Cell Biol* 3, 258-262.
- Schieber, M. and Chandel, N. S. (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol* 24, 453-462.

Stolk, J., Hiltermann, T. J. N., Dijkman, J. H. and Verhoeven, A. J. (1994) Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11, 95-102.

Teixeira, G., Szyndralewicz, C., Molango, S., Carnesecchi, S., Heitz, F., Wiesel, P. and Wood, J. M. (2016) Therapeutic potential of NADPH oxidase 1/4 inhibitors. *Br J Pharmacol* 174, 1647-1669.

Tsai, M. H., Lin, Z. C., Liang, C. J., Yen, F. L., Chiang, Y. C. and Lee, C. W. (2014) Eupafolin inhibits PGE₂ production and COX2 expression in LPS-stimulated human dermal fibroblasts by blocking JNK/AP-1 and Nox2/p47 (phox) pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 279, 240-251.

Ushio-Fukai, M. (2006) Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *Sci STKE* 22, 349.

Vicente-Manzanares, M. and Horwitz, A. R. (2011) Adhesion dynamics at a glance. *J Cell Sci* 124, 3923-3927.

Webb, D. J., Donais, K., Whitmore, L. A., Thomas, S. M., Turner, C. E., Parsons, J. T. and Horwitz, A. F. (2004) FAK-Src signaling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* 6, 154-161.

Werner, E. and Werb, Z. (2002) Integrins engage mitochondrial function for signal transduction by a mechanism dependent on Rho GTPases. *J Cell Biol* 158, 357-368.

Zorov, D. B., Juhaszova, M. and Sollott, S. J. (2014) Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*, 94, 909-950.

5. DISCUSSÃO

O processo de migração celular é dependente de moléculas de sinalização (Rac1) e de adesão (paxilina e FAK). Em situação fisiológica, as células migram de acordo com diversos estímulos por elas recebidos, envolvidos em processos como desenvolvimento embrionário, cicatrização, angiogênese e resposta imune, por exemplo (Dwyer et al., 2017; Hunter and Fernandez-Gonzalez, 2017; Pandya et al., 2017; Manzanares and Horwitz, 2011; Cheng and Eriksson, 2017). O passo-a-passo da migração se baseia em: (1) a célula adquirir polaridade; (2) a formação de protrusões; (3) protrusões estáveis formarem adesões na MEC; (4) movimento do corpo celular para que ocorra uma translocação e assim a retração do corpo celular da célula promove a migração (Vicente-Manzanares e Horwitz, 2011). Entretanto, não são apenas moléculas de adesão e de sinalização que atuam na migração da célula. Existem diversas evidências que as ERO também podem exercer um papel crucial durante a migração celular (Hurd et al., 2012). Neste trabalho, demonstramos que mais especificamente, as ERO derivadas do complexo NADPH-oxidase alteram a velocidade de migração, provavelmente por modular a dinâmica de adesão celular.

As ERO são comumente associadas ao desenvolvimento de estresse oxidativo, situação em que ocorre um desequilíbrio entre as proporções de antioxidantes e ERO na célula (Kalyanaraman, 2013). Por isso, as ERO são frequentemente relacionadas a algumas desordens e doenças, como o câncer, diabetes *mellitus*, arteriosclerose, entre outras (Diaz e Coutneidge, 2012; Sifuentes-Franco et al., 2017; Yu e Bennett, 2016). Entretanto, as ERO exercem funções e são necessárias em alguns processos biológicos. Existem três principais formas de ERO na célula: o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical livre hidroxila ($\cdot OH$) (Chen et al., 2008). Estes compostos tem alta reatividade, sugerindo que eles podem ser usados para regular vias de sinalização específicas em determinadas regiões da célula, por exemplo, em eventos associados com migração celular (Zorov et al., 2014).

Em células animais, essas espécies reativas são produzidas principalmente na mitocôndria, porém outros compartimentos celulares como o retículo

endoplasmático e peroxissomo também são fontes de ERO, além de fontes enzimáticas (Sá Júnior, 2017). Na mitoncôndria as ERO são derivadas da cadeia transportadora de elétrons (CTE), NADH desidrogenase, prolina desidrogenase, citocromo b5 redutase e monoamina oxidase (Holzerová e Prokisch, 2015). As dual oxidases, sintases de óxido nítrico e o complexo NADPH-oxidase são fontes enzimáticas de ERO (Munro and Treberg, 2017; Ushio-Fukai, 2006). Em células CHO.K1, foi demonstrado que a montagem do complexo NADPH-oxidase é dependente da ativação de Rac1 (Cheng et al., 2006), molécula que é a principal reguladora da migração celular. Assim sendo, nós avaliamos o papel das ERO derivadas do NADPH-oxidase durante a migração de células CHO.K1.

O complexo NADPH-oxidase é constituído por uma família de sete enzimas, Nox-1 a Nox-5, Duox-1 e Duox-2 (Teixeira et al., 2016). Tem mecanismo de ação como uma CTE e produz especificamente o radical livre ânion superóxido, e este é posteriormente convertido em H_2O_2 pela enzima SOD (Schröder, 2014). Essas diferentes isoformas são reguladas por diferentes vias regulatórias. Por exemplo, Nox-1 e Nox-2 são reguladas por mecanismos pós-traducionais como a fosforilação de suas subunidades. Enquanto que, a atividade de Nox-4 é dependente de transcrição gênica e níveis de expressão de proteínas, indicando que a produção de ERO também é induzida pela expressão gênica (Giannoni et al., 2010).

Nesse estudo, nós usamos a N-acetilcisteína (NAC) um antioxidante inespecífico para o *scaveging* total de ERO, uma vez que NAC atua aumentando a formação de glutatona reduzida, assim reduzindo as ERO (Tsai et al., 2014). Com a finalidade de diminuir as ERO derivadas do complexo NADPH-oxidase, nós usamos o DPI, o qual compete com centro redox no NADPH (O'Donnell, 1993) e/ou a acetovanilona que inibe a ativação do complexo NADPH-oxidase por impedir a translocação da subunidade $p47^{phox}$ no momento da montagem do complexo.

De fato, Nox-1 tem um papel fundamental na produção de ERO, pois quando usado diferentes doses de tratamento com DPI, o inibidor do complexo NADPH oxidase, foi observado uma diminuição de aproximadamente 50% na

velocidade de migração, além da falta de direcionalidade das células CHO.K1, indicando que as ERO derivadas do NADPH-oxidase são necessárias para a migração celular. Em linhagem celular de melanoma tratadas com DPI se observa uma diminuição significativa no seu perfil de migração, assim como se observa uma diminuição dos níveis de Nox-1 (Prasad et al., 2016), o que vai de encontro como observado no nosso estudo com as células CHO.K1. De maneira similar, a inibição de ERO pelo tratamento com DPI em uma linhagem celular de câncer de mama, foi observado migração e invasão celular prejudicada, mesmo na presença da deferroxamina (DFO), uma substância que promove a metástase do tumor (Liu et al., 2014).

Nós demonstramos também que a redução total das ERO pelo tratamento com NAC, comparado com a inibição de ERO bloqueando o NADPH-oxidase via DPI gerou diferenças a redução da velocidade de migração. O tratamento com NAC levou a uma maior diminuição da velocidade de migração (60%) e maior efeito prejudicial da direcionalidade das células, quando em comparação com as células CHO.K1 tratadas com DPI. Esses dados nos indicam que o processo de migração celular depende da presença de ERO, mas não somente das ERO derivadas do complexo NADPH-oxidase. Em acordo com nossos resultados, Ramaesh et al. (2012) demonstrou que em células epiteliais de córnea humana (HCE) que foram tratadas com NAC houve redução na migração celular e essa redução foi associada com a diminuição nos níveis de metaloprotease de matriz-9 (MMP-9) (Ramaesh et al., 2012). As MMPs são proteínas que degradam a matriz extracelular permitindo a migração e invasão das células (Hsiao et al., 2013). Em doenças como o câncer, elas estão relacionadas com a indução de metástase das células tumorais por causa da degradação da MEC (Singh et al., 2018). Além de diminuir os níveis de MMP-9, foi visto que NAC também foi usado como tratamento em células de melanoma, em estudo realizado por Im et al., 2012. Juntamente de NAC, o DPI e um inibidor da ERK, também foram utilizados nesse tipo celular, como resultado se demonstrou que as células de melanoma tiveram sua migração inibida quando tratadas com essas substâncias (Im et al., 2012). Consequentemente, as ERO são vistas como moduladoras da migração celular e

usá-las como alvos em estudos pode ser uma opção terapêutica interessante como estratégia no desenvolvimento de terapia anti-metastática (Im et al., 2012).

Uma vez que a montagem do complexo NADPH-oxidase depende da ativação de Rac1 (Cheng et al., 2006), a nossa hipótese foi que os baixos níveis de ERO locais poderiam afetar os eventos relacionados a migração celular, como formação de protrusões e adesão celular. Então, em um primeiro momento foi investigado como era a dinâmica de protrusões nas células CHO.K1 na presença ou ausência de ERO. Nós demonstramos que baixas doses de NAC, DPI e acetovanilona aumentaram o número e a velocidade de formação de protrusões, principalmente quando as células CHO.K1 são expostas ao NAC. De maneira fisiológica, as ERO derivadas do NADPH oxidase levam a formação de protrusões de membrana no *front* celular através da polimerização da actina, em etapa regulada por Rac1. Posteriormente, integrinas suportam as adesões nascentes formadas entre superfície da célula e MEC, que maturam em adesões focais. Concomitantemente, a miosina age contraindo o corpo celular, provocando a translocação e a retração da célula, como consequência, as adesões da região traseira da célula se desmontam do substrato de uma forma regulada (Vicente-Manzanares e Horwitz, 2011). Nossos dados indicam, que depleção de EROs pelos inibidores específicos de NADPH-oxidase interferem na estabilização das protrusões, etapa inicial da migração. Por cimografia analisou-se a dinâmica na formação do lamelipódio, em que células expostas aos tratamentos com NAC, DPI e acetovanilona dobram a velocidade da formação de protrusões e se observou um aumento de aproximadamente 2x no número dessas protrusões. E ao contrário do esperado nessa situação, essas células tem uma migração prejudicada, o que pode ser explicado na análise dos dados de taxa de retração de protrusões (NAC = 45%; DPI = 55-65%; e acetovanilona = 35-40%). Esse conjunto de dados nos mostra que há uma instabilidade na formação de protrusões em situação de depleção de ERO, porque se observa maior número de protrusões, que se formam de maneira mais rápida, porém acabam retraindo. Esse efeito poderia estar sendo causado por Rac, uma vez que ela exerce um papel fundamental no início da migração celular e ativa a montagem do NADPH oxidase na membrana da célula. Entretanto, os níveis de Rac1 ativada, que foram

avaliados por ensaio de *pull down*, permaneceram inalterados depois do tratamento com DPI. Em 2005, Radisky et al. demonstrou em células de tumor de mama, que a presença da MMP-3 ativa uma isoforma de Rac1, alterada por splicing alternativo, que estimula a produção de EROs e conseqüentemente o processo de transição epitélio-mesênquima (Radisky et al., 2005). Esse estudo corrobora com os dados referentes a Rac1 estimular a produção de ERO. Uma vez que os níveis de Rac1 permanecem inalterados com o tratamento por DPI, provavelmente outro mecanismo deve estar alterando a formação das protrusões.

Levando em consideração que a formação de adesões no *front* celular de células migratórias estabilizam as protrusões do lamelipódio (Laufenburger e Horwitz, 1996), nossa hipótese foi que poderia existir uma relação dessa instabilidade com a dinâmica do *turnover* de adesões. A instabilidade características das protrusões em nossas amostras em depleção de ERO ocorre provavelmente devido a alterações na dinâmica de adesões entre a célula e a MEC. Uma proteína que atua na maturação de adesões nascentes em adesões focais é a FAK, uma proteína tirosina quinase ativada por integrinas e moduladora do *turnover* de adesões (Webb, 2004). O tratamento com DPI leva a uma redução nos níveis de FAK-Y397, o que nos indica que as ERO derivadas do NADPH-oxidase atuam como um sinalizador que ativa a fosforilação de FAK e promove o *turnover* de adesões. Chiarugi et al. (2003) demonstrou que as ERO inibem a proteína de baixo peso molecular fosfotirosina fosfatase (LMW-PTP), para permitir a ativação de FAK (Chiarugi et al., 2003). Sendo assim, os nossos resultados indicam que com a inibição do complexo NADPH-oxidase, provavelmente a LMW-PTP não é inibida e impede a ativação de FAK. Shen et al. (2012) utilizou um inibidor de FAK em células endoteliais vasculares para analisar se FAK era essencial para a formação de protrusões em diferentes substratos que variavam de um perfil mais hidrofílico para um perfil mais hidrofóbico. Foi observado que o lamelipódio da célula quase desaparece e se nota que o inibidor de FAK restringe a motilidade da célula em diferentes substratos analisados por ensaio de cicatrização de feridas (Shen et al., 2012). Em condições patológicas, como no melanoma, a inibição do complexo NADPH-oxidase pelo DPI diminui a produção intracelular de ERO, além de causar redução nos níveis de FAK-Y397 em células

MV3 (melanoma altamente agressivo), assim como mostramos nos nossos resultados com as células CHO.K1 (Ribeiro-Pereira et al., 2014). Através de ensaio de imunofluorescência, o mesmo estudo mostrou a co-localização de FAK na borda das células tratadas com DPI, conferindo adesão celular e estabilidade, resultados que corroboram com nossos dados de co-localização de FAK em CHO.K1 nos tratamentos com DPI e NAC (Figura 3C). Sendo assim, ERO são necessárias para permitir a maturação de adesões, mantendo a adesão célula-MEC estável assim como promovendo a contração do corpo celular.

Devido a redução dos níveis de FAK-Y397 quando há a depleção de ERO, se analisou o comportamento da dinâmica de adesões focais em células CHO.K1 transfectadas com paxilina-GFP, durante a formação do lamelipódio através de vídeos *time lapse* adquiridos em microscopia do tipo TIRF. A paxilina é um marcador de adesão focal, permitindo assim a análise do número, da área e como as adesões atuam após o tratamento com DPI. Nossos dados mostram que há um aumento no número e na área de formação dessas adesões quando o NADPH-oxidase é inibido. Isso pode ser explicado por que FAK é necessário para a desmontagem das adesões da MEC, juntamente de ERK (Flinder et al., 2011). Portanto, nossa hipótese é que a inibição do NADPH-oxidase leva a redução dos níveis de FAK-Y397, que não participa do processo de maturação e desmontagem de adesões focais. Levando-nos ao perfil que observamos durante o estudo: baixos níveis de FAK que levam a um aumento da área de adesão, que são instáveis e como consequência ocorre a retração da protrusão de membrana, prejudicando a migração das células. Foi previamente demonstrado que células de camundongos FAK-deficiente tiveram sua taxa de migração reduzida mesmo tendo o aumento no número de adesões focais (Ilic et al., 1995; Webb, 2004), o que nos mostra que NADPH-oxidase interfere na formação de adesões focais.

Em suma, foi demonstrado que a depleção de ERO reduz a velocidade de migração e prejudica a direcionalidade celular devido ao complexo NADPH oxidase. A redução da migração é provocada pela formação de protrusões de membrana no lamelipódio que acabam por ser instáveis, o que é causado pela diminuição dos níveis de FAK. Esses dados se correlacionam com estudos que

mostram as ERO como mensageiros biológicos em condições fisiológicas e que seu balanço é importante para manter a homeostase celular (Schieber e Chandel, 2014).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMEZIANE-EL-HASSANI, R.; MORAND, S.; BOUCHER, J. L.; FRAPART, Y. M.; APOSTOLON, D.; AGNANDJI, D.; GNIDEHOU, S.; OHAYON, R.; NOEL-HUDSON, M. S.; FRANCON, J.; LALAOU, K.; VIRION, A. & DUPUY, C. Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca(2+)-dependent H₂O₂-generating activity. *J Biol Chem*, 280 (34): 30046-54, 2005.

ANDERSON, K. I.; WANG, Y. L. & SMALL, J. V. Coordination of protrusion and translocation of the keratocyte involves rolling of the cell body. *J Cell Biol*, 134 (5): 1209-1218, 1996.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase. *Curr Opin in Immunology*, 16(1); 42-47, 2004.

BANFI, B.; MOLNAR, G.; MATURANA, A.; STEGER, K.; HEGEDUS, B.; DEMAUREX, N. & KRAUSE, K. H. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, lymphnodes. *J Biol Chem*, 276 (40): 37594-37601, 2001.

BANFI, B.; TIRONE, F.; DURUSSEL, I.; KNISZ, J.; MOSKWA, P.; MOLNAR, G. Z.; KRAUSE, K. H. & COX, J. A. Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX-5). *J Biol Chem*, 279 (18): 18583-18591, 2004.

BEDARD, K. & KRAUSE, H. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87 (1): 245-313, 2007.

BOS, J. L.; REHMANN, H. & WITTINGHOFER, A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*, 129 (5): 865-877, 2007.

BROWN, D. I. & GRIENGLING, K. K. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med*, 47 (9): 1239-1253, 2009.

CARISEY, A.; TSANG, R.; GREINER, A. M.; NIJENHUIS, N.; HEALTH, N.; NAZGIEWICZ, A.; KEMKEMER, R.; DERBY, B.; SPATZ, J. & BALLESTREM, C. Vinculin regulates the recruitment and release of core focal adhesion proteins in a force-dependent manner. *Curr Biol*, 23 (4): 271-281, 2013.

CARMAN, C. V. & SPRINGER, T. A. Trans-cellular migration: cell-cell contacts get intimate. *Curr Opin Cell Biol*, 20 (5): 533-540, 2008.

CHENG, F. & ERIKSSON, J. E. Intermediate filaments and the regulation of cell motility during regeneration and wound healing. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9 (9): 22046, 2017.

CHIARUGI, P. Reactive oxygen species as mediators of cell adhesion. *Ital J Biochem*, 52(1); 28-32, 2003.

CHOI, B. Y.; KIM, J. H.; KHO, A. R.; KIM, I. Y.; LEE, S. H.; LEE, B. E.; CHOI, E. & SOHN, M. Inhibition of NADPH oxidase activation reduces EAE-induced white matter damage in mice. *Journal of Neuroinflammation*, 12: 104-119, 2015.

CHOI, C. K., VICENTE-MANZANARES, M., ZARENO, J., WHITMORE, L. A., MOGILNER, A. & HORWITZ, A. R. Actin and α -actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesion in a myosin II motor-independent manner. *Nat Cell Biol*, 10 (9): 1039-1050, 2008.

CLARK, A. G. & VIGNJEVIC, D. M. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Curr Opin Cell Biol*, 36: 13-22, 2015.

COOK-MILLS, J. M.; MARCHESE, M. E. & ABDALA-VALENCIA, H. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid Redox Signal*, 15(6); 1607-1638, 2011.

CRITCHLEY, D. R. Biochemical and structural properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin. *Annu Rev Biophys*, 38: 235-254, 2009.

CROSS, A. R. & JONES, O. T. G. The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. *Biochem J*, 237 (1): 111-116, 1986.

D'AUTRÉAUX, B. & TOLEDANO, M. B. ROS as signaling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (10): 813-824, 2007.

D'AUTRÉAUX, B. & TOLEDANO, M. B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (10): 813-824, 2007.

DE SÁ JÚNIOR, P. L.; CÂMARA, D. A. D.; PORCACCHIA, A. S.; FONSECA, P. M. M.; JORGE, S. D.; ARALDI, R. P. & FERREIRA, A. K. The role of ROS in cancer heterogeneity and therapy. *Oxid Med Cell Longev*, doi: 10.1155/2017/2467940, 2017.

DIAZ, B. & COURTNEIDGE, S. A. Redox signaling at invasive microdomains in cancer cells. *Free Radic Biol Med*, 52 (2): 247-256, 2012.

DWORAKOWSKI, R.; ANILKUMAR, N.; ZHANG, M. & SHAH, A. M. Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans*, 34 (Pt. 5): 960-964, 2006.

DWYER, A. R., GREENLAND, E. L. & PIXLEY, F. J. Promotion of tumor invasion by tumor-associated macrophages: the role of CSF-1-activated phosphatidylinositol 3 kinase and src family kinase motility signaling. *Cancers*, 9 (6): 1-15, 2017.

ETIENNE-MANNEVILLE, S. & HALL, A. Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk. *Curr Opin Cell Biol*. 15 (1): 67-72, 2003.

ETIENNE-MANNEVILLE, S. Actin and microtubules in cell motility: which one is in control? *Traffic*, 5 (7): 470-477, 2004.

FLINDER, L. I.; TIMOFEEVA, O. A.; ROSSELAND, C. M.; WIEROD, L.; HUITFELDT, H. S. & SHARPEN, E. EGF-induced ERK-activation downstream of FAK requires rac1-NADPH oxidase. *J Cell Physiol*, 226 (9): 2267-2278, 2011.

FORMAN, H. J.; FUKUTO, J. M. & TORRES, M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen species and nitrogen species can act as second messengers. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287 (2): 246-256, 2004.

FRIEDL, P. & WOLF, K. Plasticity of cell migration: a multiscale turning model. *J Cell Biol*, 188 (1): 11-19, 2010.

GERMAN, A. E.; MAMMOTO, T.; JIANG, E.; INGBER, D. E. & MAMMOTO, A. Paxillin controls endothelial cell migration and tumor angiogenesis by altering neuropilin 2 expression. *J Cell Sci*, 127 (Pt 8): 1672-1683, 2014.

GIAMPIERI, S.; MANNING, C.; HOOPER, S.; JONES, L.; HILL, C. S. & SAHAI, E. Localized and reversible TGFbeta signaling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat Cell Biol*, 11 (11): 1287-1296, 2010.

GIANNI, D.; TAULET, N.; DERMARDIROSSIAN, C. & BOKOCH, G. M. c-Src-mediated phosphorylation of NoxA1 and Tks4 induces the reactive oxygen species (ROS)-dependent formation of functional invadopodia in human colon cancer cells. *Mol Biol Cell*, 21(23):4287-4298, 2010.

GIANNONI, E., TADDEI, M. L. & CHIARUGI, P. Src redox regulation: again in the front line. *Free Radic Biol Med*, 49 (4): 516-527, 2010.

GROTE, K.; FLACH, I.; LUCHTEFELD, M.; AKIN, E.; HOLLAND, S. M.; DREXLER, H. & SCHIEFFER, B. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Circ Res*, 92(11): 80-86, 2003.

HE, L.; HE, T.; FARRAR, S.; JI, L.; LIU, T. & MA, X. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cell Physiol Biochem*, 44 (2): 532-553, 2017.

HIRATA, H.; SOKABE, M. & LIM, C. T. Molecular mechanisms underlying the force-dependent regulation of actin-to-ECM linkage at the focal adhesion. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 126: 135-154, 2014.

HOLMSTRÖM, K. M. & FINKEL, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15 (6): 411-421, 2014.

HOLZEROVÁ, E. & PROKISCH, H. Mitochondria: Much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production? *Int J Biochem Cell Biol*, 63: 16-20, 2015.

HSIAO, K.; SHIH, N.; FANG, H.; HUANG, T.; KUO, C.; CHU, P.; HUNG, Y.; CHOU, S.; YANG, Y.; CHANG, G. & LIU, K. Surface alpha-enolase promotes extracellular matrix degradation and tumor metastasis and represents a new therapeutic target. *PLoS One*, 8(7); e69354, 2013.

HU, Y.; LU, S.; SZETO, K. W.; SUN, J.; WANG, Y.; LASHERAS, J. C. & CHIEN, S. FAK and paxillin dynamics at focal adhesion in the protrusions of migrating cells. *Sci Rep*, 4: 6024, 2014.

HUNTER, M. V. & FERNANDEZ-GONZALEZ, R. Coordinating cell movements in vivo: junctional and cytoskeletal dynamics lead the way. *Curr Opin Cell Biol*, 48: 54-62, 2017.

HURD, T. R.; DEGENNARO, M. & LEHMANN, R. Redox regulation of cell migration and adhesion. *Trends Cell Biol*, 22(2); 107-115, 2012.

IDEN, S. & COLLARD, J. G. Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9 (11): 846-859, 2008.

ILIC, D.; FURUTA, Y.; SUDA, T.; ATSUMI, T.; FUJIMOTO, J.; IKAWA, Y.; YAMAMOTO, T.; & AIZAWA, S. Focal adhesion kinase is not essential for in vitro and in vivo differentiation of ES cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 209 (1); 300-309, 1995.

IM, Y. S.; RYU, Y. K. & MOON, E. Y. Mouse melanoma cell migration is dependent on production of reactive oxygen species under normoxia condition. *Biomol Ther* 20 (2); 165-170, 2012.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol*, 1(1); 244-257, 2013.

KANCHANAWONG, P.; SHTENGEL, G.; PASAPERA, A. M.; RAMKO, E. B.; DAVIDSON, M. W.; HESS, H. F. & WATERMAN, C. M. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature*, 468 (7323): 580-584, 2010.

KERKSICK, C. & WILLOUGHBY, D. The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *J Int Soc Sports Nutr*, 2: 38-44, 2005.

LAMBETH, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*, 4 (3); 181-189, 2004.

LAUFFENBURGER, D. A. & HORWITZ, A. F. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 84 (3): 359-369, 1996.

LEE, C. W.; LIN, C. C.; LEE, H. C. & YANG, C. M. Activation and induction of cytosolic phospholipase A2 by TNF-alpha mediated through Nox2, MAPKs, NF-kappaB, and p300 in human tracheal smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, 226 (8); 2103-2114, 2011.

LI, J. M. & SHAH, A. M. Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *J Biol Chem*, 277(22); 19952-19960, 2002.

LI, R. & GUNDERSEN, G. G. Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9 (11): 860-873, 2008.

LÓPEZ-COLOMÉ, A. M.; LEE-RIVERA, I.; BENAVIDES-HIDALGO, R. & LÓPEZ, E. Paxillin: a crossroad in pathological cell migration. *J Hematol Oncol*, 10(1); 1-15, 2017.

MACHACEK, M., HODGSON, L., WELCH, C., ELLIOT, H., PERTZ, O., NALBANT, P., ABELL, A., JOHNSON, G. L., HAHN, K. M. & DANUSER G. Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature*, 461 (7260): 99-103, 2009.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, 417 (1): 1-13, 2009.

NGUYEN, L. K.; KHOLODENKO, B. N. & VON KRIEGSHEIM, A. Rac1 and RhoA: networks, loops and bistability, *Small GTPases*, doi: 10.1080/21541248.2016.1224399, 2016.

NOBES, C. D. & HALL, A. Rho, rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81(1): 53-62, 1995.

PANDYA, P., ORGAZ, J. L. & SANZ-MORENO, V. Modes of invasion during tumour dissemination. *Mol Oncol*, 11 (1): 5-27, 2017.

PARSONS, J. T. Focal adhesion kinase: the first ten years. *Jour of Cell Sci*, 116 (Pt 8):1409-1416, 2003.

PARSONS, J. T.; HORWITZ, A. R. & SCHWARTZ, M. A. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11 (9): 633-643, 2010.

PIETRE, R. J.; DOYLE, A. D. & YAMADA, K. M. Random versus directionally persistent cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10 (8): 538-549, 2009.

PISOSCHI, A. M. & POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *Eur J Med Chem*, 97 (5): 55-74, 2015.

POLLARD, T. D. & BORISY, G. G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112 (4):453-465, 2003.

RADISKY, D. C.; LEVY, D. D.; LITTLEPAGE, L. E.; LIU, H.; NELSON, C. M.; FATA, J. E.; LEAKE, D.; GODDEN, E. L.; ALBERTSON, D. G.; NIETO, M. A.;

WERB, Z. & BISSEL, M. Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature*, 436 (7047); 123-127, 2005.

RAMAESH, T.; RAMAESH, K.; RILEY, S. C.; WEST, J. D. & DHILLON, B. Effects of N-acetylcysteine on matrix metalloproteinase-9 secretion and cell migration of human corneal epithelial cells. *Eye (Lond.)*, 26 (8); 1138-1144, 2012.

RECZEK, C. R. & CHANDEL, N. S. ROS-dependent signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*, 33:8-13, 2015.

RIBEIRO-PEREIRA, C.; MORAES, J. A.; SOUZA, M de J.; LAURINDO, F. R.; ARRUDA, M. A. & BARJA-FIDALGO, C. Redox modulation of FAK controls melanoma survival-role of NOX4. *PLoS One*, 9, e99481.

RIDLEY, A. J.; SCHWARTZ, M. A.; BURRIDGE, K.; FIRTEL, R. A.; GINSBERG, M. H.; BORISY, G.; PARSONS, J. T. & HORWITZ, A. R. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 302 (5651): 1704-1709, 2003.

ROCA-CUSACHS, P.; DEL RIO, A.; PUKLIN-FAUCHER, E.; GAUTHIER, N. C.; BIAIS, N. & SHEETZ, M. P. Integrin-dependent force transmission to the extracellular matrix by alpha-actinin triggers adhesion maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 (15): E1361-1370, 2013.

SADOK, A. & MARSHALL, C. J. Rho GTPases: masters of cell migration. *Small GTPases*, 5: e29710, 2014.

SCHIEBER, M. & CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*, 24 (10); 453-462, 2014.

SCHRÖDER, K. NADPH oxidases in redox regulation of cell adhesion and migration. *Antioxid Redox Signal*, 20 (13): 2043-2058, 2014.

SHAHRIPOUR, R. B.; HARRIGAN, M. R. & ALEXANDROV, A. V. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain and Behavior*, 4 (2): 108-122, 2014.

SHEN, Y.; WANG, G.; HUANG, X.; ZHANG, Q.; WU, J.; TANQ, C.; YU, Q. & LIU, X. Surface wettability of plasma SiO_x:H nanocoating-induced endothelial cells' migration and the associated FAK-RhoGTPases signalling pathways. *J R Soc Interface*, 9(67); 313-327, 2012.

SIFUENTES-FRANCO, S.; PACHECO-MOISÉS, F. P.; RODRÍGUEZ-CARRIZALEZ, A. D. & MIRANDA-DIAZ, A.G. The role of oxidative stress, mitochondrial function, and autophagy in diabetic polyneuropathy. *J Diabetes Res*, doi: 10.1155/2017/1673081. 2017.

SINGH, R.; MANDHANI, A.; AGRAWAL, V. & GARG, M. Positive correlation between matrix metalloproteinases and epithelial-to-mesenchymal transition and its association with clinical outcome in bladder câncer patients. *Cancer Microenviron*, doi: 10.1007/s12307-017-0199-4, 2018.

STANLEY, A.; THOMPSON, K.; HYNES, A.; BRAKEBUSCH, C. & QUONDAMATTEO, F. NADPH oxidase complex-derived reactive oxygen species, the actin cytoskeleton, and Rho GTPases in cell migration. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(20); 2026-2942, 2014.

STOLK, J., HILTERMANN, T. J. N., DIJKMAN, J. H. & VERHOEVEN, A. J. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 11 (1): 95-102, 1994.

TANG, D. D. & GERLACH, B. D. The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration. *Respir Res*, 18 (1): 54, 2017.

TEIXEIRA, G.; SZYNDRALEWIEZ, C.; MOLANGO, S.; CARNESECCHI, S.; HEITZ, F.; WIESEL, P. & WOOD, J. M. Therapeutic potential of NADPH oxidase ¼ inhibitors. *Br J Pharmacol* 174 (12); 1647-1669, 2016.

TREPAT, X.; CHEN, Z. & JACOBSON, K. Cell migration. *Compr Physiol*, 2 (4): 2369-2392, 2012.

VICENTE-MANZANARES, M. & HORWITZ, A. R. Adhesion dynamics at a glance. *J Cell Sci*, 124 (Pt 23):3923-3927, 2011.

VICENTE-MANZANARES, M. & HORWITZ, A. R. Cell migration: an overview. *Methods Mol Biol*, 769:1-24, 2011.

VICENTE-MANZANARES, M.; WEBB, D. J. & HORWITZ, A. R. Cell migration at a glance. *J Cell Sci*, 118 (Pt 21): 4917-4919, 2005.

VON, L. K.; NOACK, D.; WOOD, M. R.; FRIEDMAN, J. S. & KNAUS, U. G. Structural insights into Nox4 and Nox2: motifs involved in function and cellular localization. *Mol Cell Biol*, 30 (4); 961-975, 2010.

WEBB, D. J., DONAIS, K., WHITMORE, L. A., THOMAS, S. M., TURNER, C. E., PARSONS, J. T. & HORWITZ, A. F. FAK-Src signaling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol*, 6 (2): 154-161, 2004.

YU, E. P. & BENNETT, M. R. The role of mitochondrial DNA damage in the development of atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*, 100; 223-230, 2016.

ZIEGLER, W. H.; LIDDINGTON, R. C. & CRITCHLEY, D. R. The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol*, 16 (9): 453-460, 2006.

7. CURRICULUM VITAE RESUMIDO

TAMBORINDEGUY, M. T.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Maurício Tavares Tamborindeguy

Local e data de nascimento: Santana do Livramento, Rio Grande do Sul, Brasil,
15 de agosto de 1993.

Endereço profissional:

Núcleo de Pesquisa Básica em Odontologia
Faculdade de Odontologia, UFRGS
Rua Ramiro Barcelos, 2492 (Campus Saúde) – 5º andar, sala 503

Telefone profissional: +55 51 33085011

E-mail: mauriciotamborindeguy@gmail.com

2. FORMAÇÃO

Bacharel em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (2012-2015).

3. ESTÁGIOS

2013 – 2015: Bolsista de Iniciação Científica (CNPq e FAPERGS) no Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas. Orientado pelo Dr. Alan John Alexander McBride. Durante o período teve experiência na área de expressão de proteínas recombinantes para uso na formulação de vacinas e como alvos para diagnóstico de leptospirose humana e animal. Teve experiência em: expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*; cultivo celular bacteriano de *Leptospira interrogans*; PCR convencional; SDS-PAGE; quantificação de proteínas; experimentação animal; e testes de diagnósticos baseados em princípio de imunologia como, teste de microaglutinação, ELISA, *Western blot* e *dot blot*.

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

2016: Menção Honrosa na categoria Mestrado no “XVIII Congress of the Brazilian Society for Cell Biology” da Sociedade Brasileira de Biologia Celular com o trabalho “*Cell contractility modulates migratory behavior in oral squamous cell carcinoma*”.

5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

RAMOS, G. ; **TAMBORINDEGUY, Maurício T.**; SANTANA FILHO, M. ; NEWELL-LITWA, K. ; HORWITZ, A. R. ; LAMERS, M. L. . Cell contractility modulates migratory behavior in oral squamous cell carcinoma. In: XVIII Congress of the Brazilian Society for Cell Biology, 2016, São Paulo. XVIII Congress of the Brazilian Society for Cell Biology, 2016. p. 31-31.

TAMBORINDEGUY, Maurício T.; GONCALVES, C. A. S. ; SANTOS, J. C. ; MENDONCA, K. S. ; MCBRIDE, A. J. A. Seleção de antígenos recombinantes para teste de diagnóstico para leptospirose canina. In: XXIV Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas, 2015, Pelotas. Anais do XXIV Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas, 2015.

TAMBORINDEGUY, Maurício T.; SANTOS, J. C. ; XAVIER, R. G. ; LEON, P. M. M. ; OLIVEIRA, P. D. . Avaliação de minicursos ministrados durante o 'III Simpósio de Biotecnologia: da pesquisa à aplicação'. In: I Congresso de Ensino de Graduação da Universidade Federal de Pelotas, 2015, Pelotas. Anais do I Congresso de Ensino de Graduação da Universidade Federal de Pelotas, 2015.

SANTOS, J. C. ; **TAMBORINDEGUY, M. T.** ; KREMER, F. S. ; GRASSMANN, A. A. ; MCBRIDE, A. J. A. Genoma mining de novos candidatos vacinais contra leptospirose. In: II Curso de Verão de Biotecnologia da UFOP, 2015, Ouro Preto, MG. II Curso de Verão de Biotecnologia da UFOP, 2015.

TAMBORINDEGUY, Maurício T.; GONCALVES, C. A. S. ; SANTOS, J. C. ; CONRAD, N. L. ; MENDONCA, K. S. ; MCBRIDE, A. J. A. . Padronização de ELISA indireto para a isotipagem de anticorpos buscando avaliar a modulação da resposta imune humoral gerada por uma vacina recombinante contra a leptospirose.. In: II Curso de Verão em Biotecnologia da UFOP, 2015, Ouro Preto, MG. Anais do II Curso de Verão em Biotecnologia da UFOP, 2015.

GONCALVES, C. A. S. ; **TAMBORINDEGUY, Maurício T.** ; SANTOS, J. C. ; CONRAD, N. L. ; MENDONCA, K. S. ; MCBRIDE, A. J. A. . Padronização de teste imunoenzimático (ELISA) utilizando anticorpos IgM e IgG para o diagnóstico de leptospirose humana. In: XVII Encontro de Pós-graduação da Universidade Federal de Pelotas, 2015, Pelotas. Anais do XVII Encontro de Pós-graduação da Universidade Federal de Pelotas, 2015.

CONRAD, N. L. ; SILVEIRA, M. M. ; SOUZA, J. D. ; **TAMBORINDEGUY, M. T.** ; BARBOSA, L. N. ; GONCALVES, C. A. S. ; MCBRIDE, A. J. A. . Vacina recombinante contra leptospirose induz imunidade protetora e esterilizante em hamsters. In: XVII Encontro de Pós-graduação da Universidade Federal de Pelotas, 2015, Pelotas. Anais do XVII Encontro de Pós-graduação da Universidade Federal de Pelotas, 2015.

SANTOS, J. C. ; GRASSMANN, A. A. ; **TAMBORINDEGUY, Maurício T.** ; GONCALVES, C. A. S. ; KREMER, F. S. ; MCBRIDE, A. J. A. . Proteínas de superfície de *Leptospira interrogans* identificadas por ferramentas in silico. In: XXIV Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas, 2015, Pelotas. Anais do XXIV Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas, 2015.

TAMBORINDEGUY, Maurício T.; GONCALVES, C. A. S. ; CONRAD, N. L. ; MENDONCA, K. S. ; MCBRIDE, A. J. A. . Avaliação da resposta imune humoral contra a leptospirose através de teste imunoenzimático. In: XXIII Congresso de

Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas, 2014, Pelotas. XXIII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas, 2014.

GONCALVES, C. A. S. ; OLIVEIRA, A. S. L. E. ; **TAMBORINDEGUY, Maurício T.** ; CONRAD, N. L. ; MENDONCA, K. S. ; MCBRIDE, A. J. A. . Padronização de teste imunoenzimático (ELISA) para o diagnóstico da leptospirose humana. In: XXIII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas, 2014, Pelotas. XXIII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas, 2014.

BARBOSA, L. N. ; CONRAD, N. L. ; SOUZA, J. D. ; **TAMBORINDEGUY, Maurício T.** ; SILVEIRA, M. M. ; MCBRIDE, A. J. A. . Avaliação da resposta imune humoral em hamsters vacinados com proteína recombinante LigBrep e desafiados com *L. interrogans* sorovar *copenhageni*. In: XXIII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas, 2014, Pelotas. XXIII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas, 2014.

CONRAD, N. L. ; SOUZA, J. D. ; **TAMBORINDEGUY, Maurício T.** ; SILVEIRA, M. M. ; FELIX, S. R. ; MCBRIDE, A. J. A. . A proteína recombinante LigBrep induz proteção contra leptospirose em hamsters. In: XVI Encontro de Pós-Graduação da Universidade Federal de Pelotas, 2014, Pelotas. XVI Encontro de Pós-Graduação da Universidade Federal de Pelotas, 2014.

CONRAD, N. L. ; **TAMBORINDEGUY, Maurício T.** ; GONCALVES, C. A. S. ; PEREIRA, W. M. ; FABRES, M. F. ; MCBRIDE, A. J. A. . Expressão da proteína rLigBrep na forma solúvel e caracterização com soro humano. In: XV Encontro de Pós-Graduação da Universidade Federal de Pelotas, 2013, Pelotas. XV Encontro de Pós-Graduação da Universidade Federal de Pelotas, 2013.