

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUIZA CHEROBINI PEREIRA

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA CÉLULA COM
MÚLTIPLAS FLUORESCÊNCIAS

Porto Alegre,

2019

Luiza Cherobini Pereira

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA CÉLULA COM MÚLTIPLAS
FLUORESCÊNCIAS

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao Instituto de Biociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
como requisito parcial para a obtenção do título
de Bacharel em Biotecnologia.

Área de habilitação: Biotecnologia Molecular

Orientador: Professor Dr. Guido Lenz

Coorientadora: Me. Luana Suéling Lenz

Porto Alegre,

2019

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo incentivo e apoio necessários ao longo de todos os meus anos de vida.

Aos meus amigos de longa data e especialmente aos que fiz durante os anos de graduação por estarem presentes e me trazendo bons momentos.

Aos alunos do LabSinal por serem ótimas companhias, por todas as ajudas nos experimentos e análises e por fazerem meus dias de lab ainda mais divertidos. Um agradecimento especial aos que me orientaram e me ensinaram a fazer ciência desde o início, Gio e Marcos, que sempre estiveram muito dispostos a me ensinar e foram sempre muito pacientes e atenciosos. Agradeço de coração.

Ao meu orientador Guido, que é um professor, orientador e pessoa sensacional que tenho como exemplo a ser seguido. Sou extremamente grata por todos os ensinamentos.

À minha coorientadora Luana, que além de ter sido extremamente importante para a execução deste trabalho, aguentou meus dramas e foi uma ótima companhia. Agradeço de coração pela paciência e pela orientação.

Muito obrigada!

RESUMO

A resistência de células tumorais à terapia consiste na principal causa de falha terapêutica no tratamento de câncer e está diretamente relacionada à heterogeneidade tumoral. Estudos populacionais falham em demonstrar as particularidades de cada célula em uma massa tumoral e, com isso, técnicas de análises de células únicas emergiram para o auxílio da compreensão da biologia tumoral. Entretanto, essas análises são ainda muito incipientes e dependem de pessoas altamente capacitadas e equipamentos e reagente de alto valor monetário e baixa disponibilidade nos centros de pesquisa. Tendo isso em vista, foi construída uma célula com marcação genômica de fluorescência de processos celulares importantes (quebra de fita duplas no DNA, apoptose e autofagia) para o estudo de células individuais vivas. Estas marcações foram, respectivamente: 53BP1 (vermelho), IMS simulando DIABLO (vermelho) e LC3B (ciano). Também foi desenvolvida uma ferramenta personalizada para análise automatizada de foci de dano ao DNA. Apesar de algumas alterações nas marcações celulares serem necessárias, foi possível mostrar que o sistema de tripla marcação é eficiente para o estudo de células únicas e não interfere o funcionamento celular de maneira a atrapalhar análises posteriores.

Palavras chave: células individuais, câncer, autofagia, apoptose, dano ao DNA, marcações por fluorescência.

ABSTRACT

Therapy resistance is one of the main causes of therapeutic failures in cancer treatment and it is directly related to tumoral heterogeneity. Populational studies fail in demonstrate the particularities of single cells in a tumor, and so single cell analysis techniques emerged to assist in the tumoral biology comprehension. However, these analyses are still incipient and demand highly skilled persons and high cost of reagent and equipment, not always available in all research centers. Thereby a cell transduced with three sensors for important processes in cancer biology (DNA damage, autophagy and apoptosis) was constructed for single-cell studies. We also developed a personalized tool for automated analysis of DNA damage foci. Despite the need of some changes in the chosen vectors, it was possible to show that a triple staining system is efficient for single-cell studies and it does not interfere in the cell function.

Keywords: single-cell, cancer, autophagy, apoptosis, DNA damage, fluorescence sensors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O papel de 53BP1 na resposta ao dano no DNA.....	17
Figura 2. Rotas intrínseca e extrínseca de ativação da apoptose.....	19
Figura 3. Transduções celulares.....	27
Figura 4. Imagem representativa de LC3B fusionada às diferentes proteínas.....	28
Figura 5. Comparação da área relativa dos pontos de células A172 L, A172 PDL e A172 mCGL. P=0,16.	29
Figura 6. Indução de autofagia em células A172 L	30
Figura 7. LC3B murquoise2 em diferentes filtros.....	31
Figura 8. Esquema representativo do funcionamento do macro.....	33
Figura 9. Correlação entre aferições manuais e aferições realizadas pelo macro.....	34
Figura 10. Caracterização de células transduzidas com 53BP1.....	35
Figura 11. Apoptose aferida em células A172 D.....	36
Figura 12. Diferenças de exposição e photoblanching.....	37
Figura 13. Ativação de apoptose em células A172 V selecionadas com puromicina.....	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 RESISTÊNCIA TUMORAL	8
1.2 HETEROGENEIDADE TUMORAL	8
1.3 CÉLULAS ÚNICAS E CÂNCER	9
1.3.1 Metodologias para análise de células únicas	10
1.3.1.1 Obtenção de células únicas	10
1.3.1.2 Técnicas Genômicas	12
1.3.1.3 Transcriptômicas	12
1.3.1.4 Proteômica	13
1.3.1.4.1 <i>scWestern Blot</i>	13
1.3.1.4.2 <i>Microengraving</i>	13
1.3.1.4.3 Citometrias	13
I) Citometria de Fluxo	13
II) FACS	13
III) Citometria de Massas (CyTOF)	13
IV) Citometria de imagem	14
1.3.1.4.4 Técnicas de Microscopia	14
I) Corantes Fluorescêntes	14
II) Imunocitoquímica	14
III) Marcações Genômicas	14
1.4 PROCESSOS IMPORTANTES NO ESTUDO DA BIOLOGIA TUMORAL	15
1.4.1 Dano e reparo do DNA	15
1.4.1.1 Visualização de dano	17
1.4.2 Apoptose	17
1.4.2.1 Visualização de Apoptose	19
1.4.3 Autofagia	20
1.4.3.1 Visualização de Autofagia	21
2. OBJETIVOS	21

2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3. JUSTIFICATIVA	22
4. METODOLOGIA	22
4.1 CULTIVO CELULAR	22
4.2 OBTENÇÃO DOS PLASMÍDEOS	23
4.3 TRANSFORMAÇÕES	23
4.4 PRODUÇÃO VIRAL	24
4.4.1 Produção Lentiviral	24
4.4.2 Produção Retroviral	24
4.5 TRANSDUÇÕES	24
4.6 FÁRMACOS	25
4.7 AQUISIÇÃO DE IMAGENS	25
4.8 ANÁLISE DAS IMAGENS E ESTATÍSTICAS	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 TRANSDUÇÕES CELULARES	25
5.2 AUTOFAGIA.....	27
5.3 DANO AO DNA	31
5.3.1 Ferramenta para automatização da medida de Foci de 53BP1	31
5.3.2 Caracterização	34
5.4 APOPTOSE	35
5.4.1 DIABLO	35
5.4.2 Caspase	37
6. CONCLUSÕES	39
7. PERSPECTIVAS	40
8. REFERÊNCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

1.1 RESISTÊNCIA TUMORAL

Um dos principais desafios no tratamento de câncer consiste na resistência à terapia, onde uma célula ou grupo de células possui previamente ou adquire fenótipos que facilitarão sua sobrevivência, levando ao repovoamento do tumor e consequente agravamento no tratamento e na sobrevida média dos pacientes ^{1; 2; 3; 4; 5}. Estudos mostram que cerca de 50% de todos os pacientes de câncer já possuem células resistentes antes do início do tratamento ⁶ e 90% de todas as falhas na quimioterapia ocorrem durante a invasão e metástase de tumores resistentes⁷.

Os principais recursos empregados pelas células tumorais que geram resistência são transporte do fármaco para o meio extracelular, redução da absorção de fármacos, compartimentalização do fármaco, alterações nas rotas de metabolismo do fármaco, modificações no alvo ou nos níveis desse, aumento de reparo ao dano no DNA, evasão da apoptose, entre outros ⁷, e tais mecanismos podem ser adquiridos ou intrínsecos.

Mecanismos intrínsecos já estavam presentes na massa tumoral antes do início do tratamento, sendo somente selecionados com este. Por outro lado, mecanismos adquiridos são obtidos durante a terapia através da seleção de clones capazes de atenuar o efeito do fármaco ou que possuem mutações favoráveis à manutenção do crescimento celular ^{1; 2}. Com isso, a resistência ao tratamento está diretamente relacionada com heterogeneidade tumoral ², na qual as células de um tumor possuem assinaturas moleculares diferentes entre si.

1.2 HETEROGENEIDADE TUMORAL

A heterogeneidade tumoral pode ocorrer de maneira intertumoral, que se refere a tumores de mesma origem histológica em diferentes pacientes, e intratumoral, na qual células tumorais de um mesmo paciente são diferentes espacial e temporalmente. A heterogeneidade espacial se refere a distribuição desigual de subpopulações

geneticamente diversas dentro de um mesmo tumor ou em sítios secundários, e a temporal trata de diferenças entre as células de uma mesma massa tumoral ao longo do tempo ⁸.

A heterogeneidade intratumoral pode ser explicada por três teorias: a teoria da evolução clonal, a teoria das células tronco tumorais e a teoria da plasticidade ^{9; 10; 11}. No modelo de evolução clonal, uma célula adquire mutações estocásticas e as propaga para suas filhas, que serão selecionadas por pressões seletivas do microambiente e da terapia, de acordo com a seleção natural ¹². Por outro lado, o modelo das células tronco tumorais propõe que existem células com características tronco na massa tumoral, as quais são responsáveis por se dividir e gerar novas células, que irão se diferenciar em uma variedade de tipos celulares não tumorigênicos, com diferentes fenótipos ^{10;11}. Em contrapartida, a do modelo da plasticidade surge para unir as teorias anteriores e sugere que o estado indiferenciado de células tronco tumorais não é estável, podendo ser revertido. Do mesmo modo, diferentes pressões seletivas podem fazer com que uma célula não tronco adquira características de célula tronco tumoral ¹¹.

Sob condições de pressão seletiva proporcionada pela terapia, algumas populações celulares já presentes na massa tumoral podem ser selecionadas ou favorecidas, sendo resistentes ou tolerantes ao tratamento ^{7;2;8}. Essas células posteriormente irão se multiplicar, repovoando o tumor e levando à reincidência, que pode variar de cerca de 8 a 20% em alguns tipos tumorais, como osteosarcomas e câncer colorretal, respectivamente, e chega a atingir valores de até 100% em glioblastoma e sarcoma de partes moles avançado^{13; 14; 15}.

A reincidência e a heterogeneidade tumoral são extremamente relacionadas e juntas explicam as falhas terapêuticas na clínica ². Ambas constituem o maior desafio para a oncologia de precisão e têm ganhado cada vez mais destaque e compreensão com o surgimento das tecnologias de análise de células únicas.

1.3 CÉLULAS ÚNICAS E CÂNCER

Análises tumorais a nível de células únicas têm sido de extrema importância no entendimento da heterogeneidade, progressão tumoral, invasão e metástase ¹⁶, fazendo um contraponto às análises populacionais, nas quais uma pequena porção de indivíduos pode alterar drasticamente as médias aferidas e esconder comportamentos relevantes para a progressão da doença ⁷⁷. Em Psico *et al.*, o uso de estudos de células únicas possibilitou a compreensão do fenótipo de resistência à quimioterapia, mostrando que este segue um princípio Lamarckista, o que não é possível visualizar em estudos populacionais. Outro exemplo onde estudos de células únicas apresentaram desfecho diferente do aferido em análises populacionais é descrito por Filippi-Chiela *et al.* onde foi mostrado que, após dano ao DNA, autofagia e senescência estavam presentes em subpopulações celulares diferentes, ao contrário do esperado onde dano provocaria uma indução de autofagia seguido por senescência⁷⁸.

Além dos exemplos mencionados, ensaios com células únicas possibilitaram entendimento de como mutações são propagadas entre células, como diferentes citocinas e quimiocinas influenciam uma célula, como células únicas respondem a inibidores ou hipóxia, e como células conseguem influenciar umas às outras ¹⁷. Essas análises estão abrindo portas para a busca de novos tratamentos, focando em características singulares e evidenciando particularidades de cada tipo tumoral.

Metodologias como sequenciamento, hibridização *in situ* por fluorescência, proteômica, ensaios de microscopia e citometrias emergiram como grandes aliadas ao estudo de células únicas, entretanto ainda existem diversos desafios devido ao complexo preparo das amostras, pouca disponibilidade de equipamentos e ferramentas de análises, necessidade de habilidades específicas e grupos multidisciplinares, uso de reagentes de alto custo monetário e altas taxas de erros associadas ^{17; 18; 19; 20}.

1.3.1 Metodologias para análises de células únicas

1.3.1.1 Obtenção de células únicas

Existem diversas metodologias para a separação de células únicas, e sua performance é caracterizada pela eficiência, pureza e recuperação da amostra ao final

do processo ²¹. Os métodos mais comumente utilizados para a separação de células únicas, bem como suas vantagens e desvantagens estão listados no quadro 1.

Quadro1. Técnicas para a separação de células únicas

Técnica	Descrição	Vantagens	Desvantagens	Custo
Diluição seriada ^{22;} ²³	Consiste na diluição de células.	Não há grande necessidade de qualificação técnica. Não necessita marcação celular.	Alta probabilidade de células múltiplas ou nenhuma célula nos poços, uma vez que a amostragem é estatística.	\$
Micromanipulação ²³	Isolamento de células únicas com uso de micropipetas ou micropipetas robotizadas	Alta precisão. Não necessita marcação celular.	Baixa eficiência	\$\$
Separador celular ativado por fluorescência (FACS) ^{21; 23}	Separa células de acordo com marcações de fluorescência. As células são submetidas a uma citometria de fluxo e a seleção de células é realizada de acordo com diferentes características.	Alta eficiência e precisão.	Necessita de grandes populações iniciais, pode provocar danos às células devido ao alto fluxo e demanda profissionais altamente qualificados	\$\$\$\$
<i>Immunopanning</i> (PAN) ²⁴	Consiste na transferência de uma suspensão de células para diferentes superfícies contendo anticorpos, que se ligarão aos tipos celulares indesejados, removendo-os.	Alta eficiência. Não agride tanto as células quando em comparação ao FACS	Demanda tempo e não pode ser utilizado para células que não expressam marcadores específicos.	\$\$\$\$
Separador celular ativado por ímã (MACS) ^{21; 24}	Depende de marcadores celulares de superfície conjugados a ímãs. A população celular é submetida a um campo magnético, que separará as células entre marcadas e não marcadas.	Não demanda alta capacidade técnica. Mais rápida que outras técnicas similares, como FACS e PAN. Possui alta eficiência.	Isola células baseado somente em seleção positiva e negativa, sem considerar níveis de expressão. Captura células inespecificamente.	\$\$\$
Microdissecação à laser ^{21; 24}	Consiste na escolha de células únicas através da visualização sobre microscópio invertido e corte realizado com laser para o isolamento da célula desejada.	Alta precisão. Não necessita marcação por anticorpos. Permite a extração de células de tecidos intactos. Melhor opção para análises de tumores sólidos	Demanda alta capacidade técnica, possui baixa eficiência e altas probabilidades de contaminação celular. Gera dano ao material genético.	\$\$
Microfluídica ^{21; 22; 24}	Separação de células utilizando equipamentos que suportam o aporte de pequeno volume e	Alta eficiência Não necessita marcação celular. Baixo	Métodos extremamente complexos com	\$\$

	diferenciam células de acordo com mecanismos ativos, utilizando eletrodos e ímãs, e mecanismos passivos, dependendo propriedades físicas da célula, como tamanho, deformabilidade e densidade.	consumo de amostra.	necessidade de alta capacidade técnica	
--	--	---------------------	--	--

1.3.1.2 Técnicas Genômicas

Análises genômicas de células únicas necessitam de uma etapa previa de amplificação do material genético e para isso diversas técnicas baseadas no PCR tradicional foram desenvolvidas, a exemplo do *linker-adapter PCR* (LA-PCR) ²⁵, PCR de sequências repetitivas interespaçadas (IRS-PCR) ²⁶, PCR de pré-amplificação da extensão do primer (PEP-PCR) ²⁷ e o PCR de oligonucleotídeo degenerado (DOP-PCR) ²⁸. Entretanto essas metodologias possuem muitas limitações, como baixa cobertura e perda de alelos ^{21; 24}. Em contrapartida, outras técnicas desenvolvidas possuem maior confiabilidade em comparação com as metodologias baseadas em PCR, como a amplificação de deslocamento múltiplo (MDA) ²⁹, vários ciclos de anelamento e amplificação baseada em loop (MALBAC) ³⁰ e amplificação linear via inserção por transposon (LIANTI) ³¹, mas ainda precisam aumentar a fidelidade e cobertura do genoma e diminuir a amplificação de erros.

Após amplificação, o genoma pode ser avaliado através de diversas técnicas, como microarranjos de DNA, arranjos de polimorfismos de nucleotídeo único e sequenciamento de nova geração. Entretanto essas técnicas podem reproduzir os erros e mutações geradas na amplificação e ruídos adicionais advindos do isolamento de células únicas.

1.3.1.3 Transcriptômicas

Para análises transcriptômicas, o RNA deve ser primeiramente convertido em cDNA para depois poder passar por etapas posteriores de amplificação, que são semelhantes às aplicadas ao DNA, podendo se basear em PCR, microfluídica e

barcoding molecular^{32; 33}. Entretanto essas técnicas são muito incipientes e enfrentam problemas na manutenção da proporção inicial dos transcritos e gerar amplificação de contaminantes^{17; 32}.

Ao final do processo de amplificação o transcriptoma pode ser analisado por RNA-seq e outras tecnologias que surgiram recentemente, como CytoSeq, que é baseado em microchips e InDrop e DropSeq, baseados em nanolitros de solução^{34; 35}. Contudo, essas tecnologias também reproduzem os erros de amplificação e isolamento e carecem de pipelines e ferramentas de processamento dos dados obtidos, o que torna a análise difícil e trabalhosa²².

1.3.1.4 Proteômica

1.3.1.4.1 scWestern Blot

Baseia-se na técnica clássica de Western Blot, porém utiliza microchips que permitem a corrida de uma célula por poço. Essa metodologia possibilita a quantificação relativa dos níveis de proteína e permite o uso de marcador de peso das proteínas, mas só admite o uso de pequenas quantidades de amostra – em torno de 100 a 1000 células – e, como toda técnica baseada em anticorpos, depende da especificidade dos anticorpos e disponibilidade comercial dos mesmos^{17;36}.

1.3.1.4.2 *Microengraving*

Técnica que consiste no uso de microchips com poços cobertos por anticorpos, que irão se ligar às proteínas secretadas pela célula, ou às proteínas celulares liberadas pós lise celular. Permite análise de mais de 10.000 células simultaneamente e possibilita uma análise cinética da secreção proteica. Assim como o scWestern Blot, depende da especificidade e disponibilidade dos anticorpos^{17;37}.

1.3.1.4.3 Citometrias

I) Citometria de Fluxo: consiste na passagem de uma suspensão de células por laser, e a luz espalhada é medida em detectores. Essa técnica é amplamente utilizada, muito bem estabelecida e permite a análise multiparamétrica de células únicas. Entretanto, o preparo da amostra é manual, requer grande quantidade de amostra,

apresenta sobreposição de espectro quando vários marcadores são analisados e não permite analisar a localização subcelular da fluorescência. ²¹.

II) FACS: permite as mesmas análises da citometria de fluxo com a possibilidade de separação de células com o uso de eletroímãs. Além das dificuldades da citometria convencional, exige alta capacitação técnica e equipamento de maior custo ¹⁷.

III) Citometria de Massas (CyTOF): utiliza anticorpos conjugados à metais raros que não são encontrados em sistemas biológicos. As células são ligadas a esses anticorpos e injetadas no equipamento, que os aquece e ioniza, formando uma nuvem de íons. O tempo de retenção dos íons dos metais conjugados em um espectrômetro de massas é aferido. Apesar de permitir a análise de mais de 35 marcadores simultâneos, a citometria de massas destrói as células, tem um baixo rendimento e baixa velocidade de análise, demanda preparo de amostra extremamente dispendioso, exige alta capacidade técnica e poucos equipamentos estão atualmente disponíveis no mundo ^{17;38}.

IV) Citometria de imagem: células são marcadas com anticorpos e injetadas em um citômetro de fluxo que possui um sistema de detecção acoplado a uma ou mais objetivas de microscópio. Essa técnica permite a visualização de eventos e suas localizações através de imagens. Entretanto é uma técnica lenta, o sinal exibido pode ser muito fraco para detecção e demanda equipamentos que não estão disponíveis em larga escala ^{17;38}.

1.3.1.3.4 Técnicas de microscopia

I) Corantes fluorescentes: são utilizados para marcar processos ou porções celulares, permitindo sua visualização por microscopia. Apesar de ser uma técnica populacional, permite a visualização de células únicas e, em alguns casos, acompanhamento de sua dinâmica ao longo do tempo. Contudo, as interações do corante com a superfície celular podem alterar suas propriedades, não há a possibilidade do uso de vários marcadores ao mesmo tempo e o custo de alguns marcadores pode ser alto ³⁹.

II) Imunocitoquímica: baseia-se na marcação de células com anticorpos ligados à moléculas fluorescentes, permitindo a visualização de organelas, proteínas e

peptídeos ⁴⁰. A imunocitoquímica exige a fixação celular, não permitindo o acompanhamento das características fenotípicas ao longo do tempo. Essa metodologia também emprega o uso de anticorpos, que vão apresentar diferentes especificidades e marcadores, dependendo da disponibilidade comercial dos mesmos. Outras desvantagens do método são o preparo trabalhoso da amostra, baixa eficiência e alto custo da preparação.

III) Marcações genômicas: dependem da inserção de material genético exógeno para o interior da célula. Pode ser feito de maneira transiente, com transfecções, ou de maneira estável, com o uso de transposons, Crispr-Cas9 e sistemas virais ^{41; 42}. Embora não possibilite o uso de diversas marcações simultâneas e envolver alta capacidade técnica para a produção de uma célula, após a expressão estável a ferramenta se torna acessível e pode ser utilizada sem necessidade de reagentes dispendiosos, preparo de amostra e isolamento de células únicas. E, a despeito da baixa velocidade de obtenção dos dados e pouca automatização na análise, essa técnica permite o acompanhamento da cinética de processos celulares e requer apenas um microscópio de fluorescência, se destacando como uma ferramenta simples e barata de análises de células únicas ⁴³.

1.4 PROCESSOS IMPORTANTES NO ESTUDO DA BIOLOGIA TUMORAL

1.4.1 Dano e reparo do DNA

O dano ao DNA pode ser provocado por radiações ionizantes, exposição à químicos ou radiação e produtos do metabolismo celular, como espécies reativas de oxigênio, e leva ao surgimento de mutações que também podem surgir de maneira espontânea devido às falhas nos mecanismos de replicação e reparo do DNA ⁴⁴. Mutações podem ativar oncogenes, inativar genes supressores tumorais e causar instabilidades genômicas e rearranjos estruturais do mesmo, levando ao surgimento de tumores ⁴⁵. Por outro lado, a capacidade de reparo do DNA pode ser um grande obstáculo durante a quimio e radioterapia, que em sua maioria têm como alvo gerar quebras na fita de DNA e desencadear a morte celular^{46; 47}.

A resposta ao dano no DNA ocorre através de diversos mecanismos, como a excisão de base, reparo de bases mal pareadas, síntese translesão, reparo por excisão de nucleotídeos, recombinação homóloga (HR) e junção de extremidades (NHEJ) não homólogas⁴⁷, dos quais os dois últimos dizem respeito ao reparo de quebras da dupla fita do DNA. As quebras de dupla fita são de extrema importância para a terapia, pois enquanto células podem se adaptar a alguns níveis de dano irreparável, uma simples quebra na dupla fita do DNA não reparada pode ser suficiente para desencadear a apoptose e eliminar a célula em questão⁴⁸.

O reparo de quebra de fitas dupla por HR ocorre somente durante as fases S e G2 do ciclo celular, pois é dependente do uso da cromátide irmã como molde para substituição do DNA que flanqueia o sítio de quebra. Em mamíferos, é majoritariamente empregado durante quebras envolvendo o colapso da forquilha de replicação durante a fase S⁴⁶. De outra forma, o reparo por NHEJ, que é predominante em células de mamíferos, ocorre durante todas as fases do ciclo celular e, apesar de apresentar a possibilidade da inserção de erros, é uma alternativa veloz para o reparo de quebras de fita dupla⁴⁹. Quebras duplas de DNA levam à formação de um complexo proteico contendo a 53BP1. Que por sua vez recruta proteínas de reparo, promove sinalização de *checkpoint* e atua como regulador positivo de NHEJ^{50;2}.

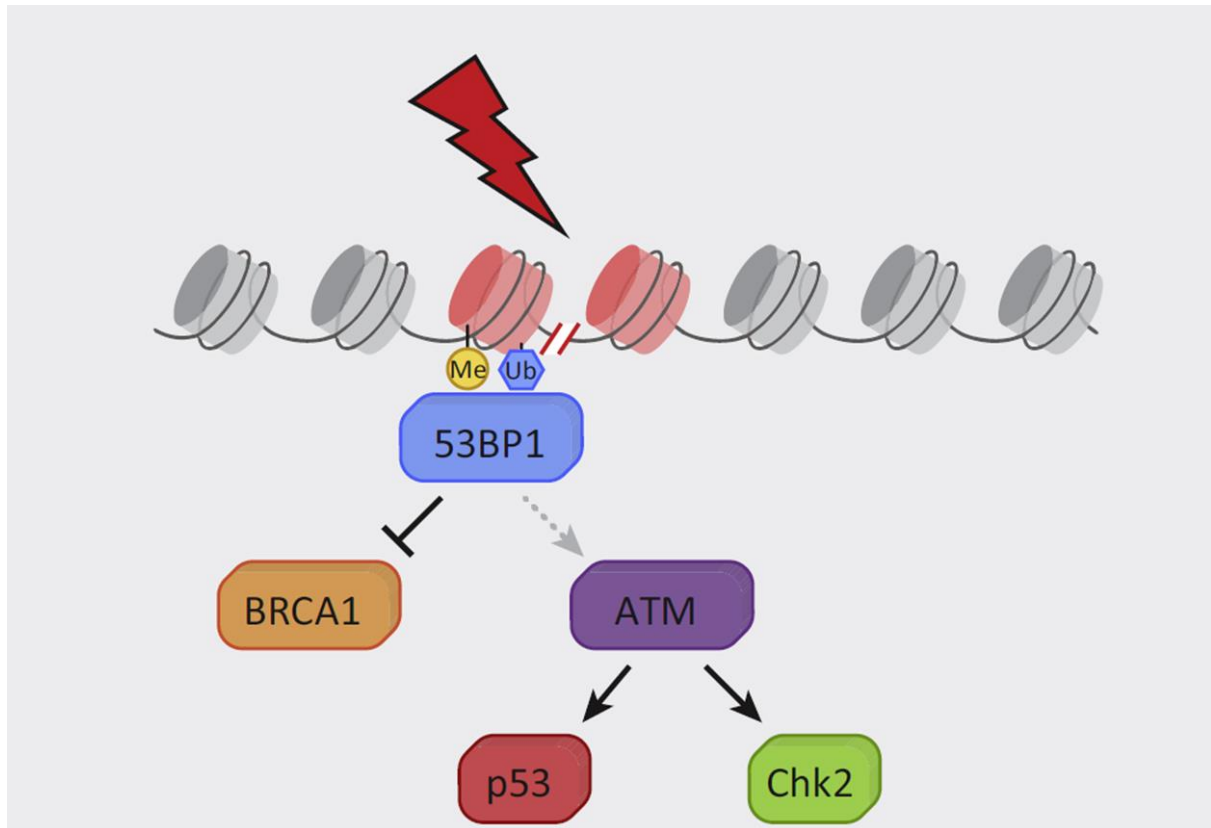


Figura 1. O papel de 53BP1 na resposta ao dano no DNA. Em sítios de quebra da dupla fita do DNA a variante de histona H2A, γ H2A.X, é fosforilada. Esse evento possibilita sua ubiquitinação na lisina 13 ou 15, que é necessária para o recrutamento de 53BP1 ao sítio de quebra dupla. A proteína 53BP1 também é responsável por amplificar a atividade de ATM, que promove a sinalização de *checkpoint*, e controlar negativamente BRCA1, envolvida em HR. Adaptado de Lambrus G. *et al.*, 2017.

1.4.1.1 Visualização de dano ao DNA

Uma maneira de avaliar o processo de dano ao DNA é através da marcação estável com fluorescência, utilizando-se o plasmídeo Apple 53bp1-trunc, que expressa, de maneira constitutiva, a proteína 53BP1 fusionada à proteína fluorescente vermelha mApple, permitindo sua visualização no núcleo das células transduzidas⁵⁷. A leitura da quantidade de sítios de quebra se dá pela contagem de pontos no núcleo.

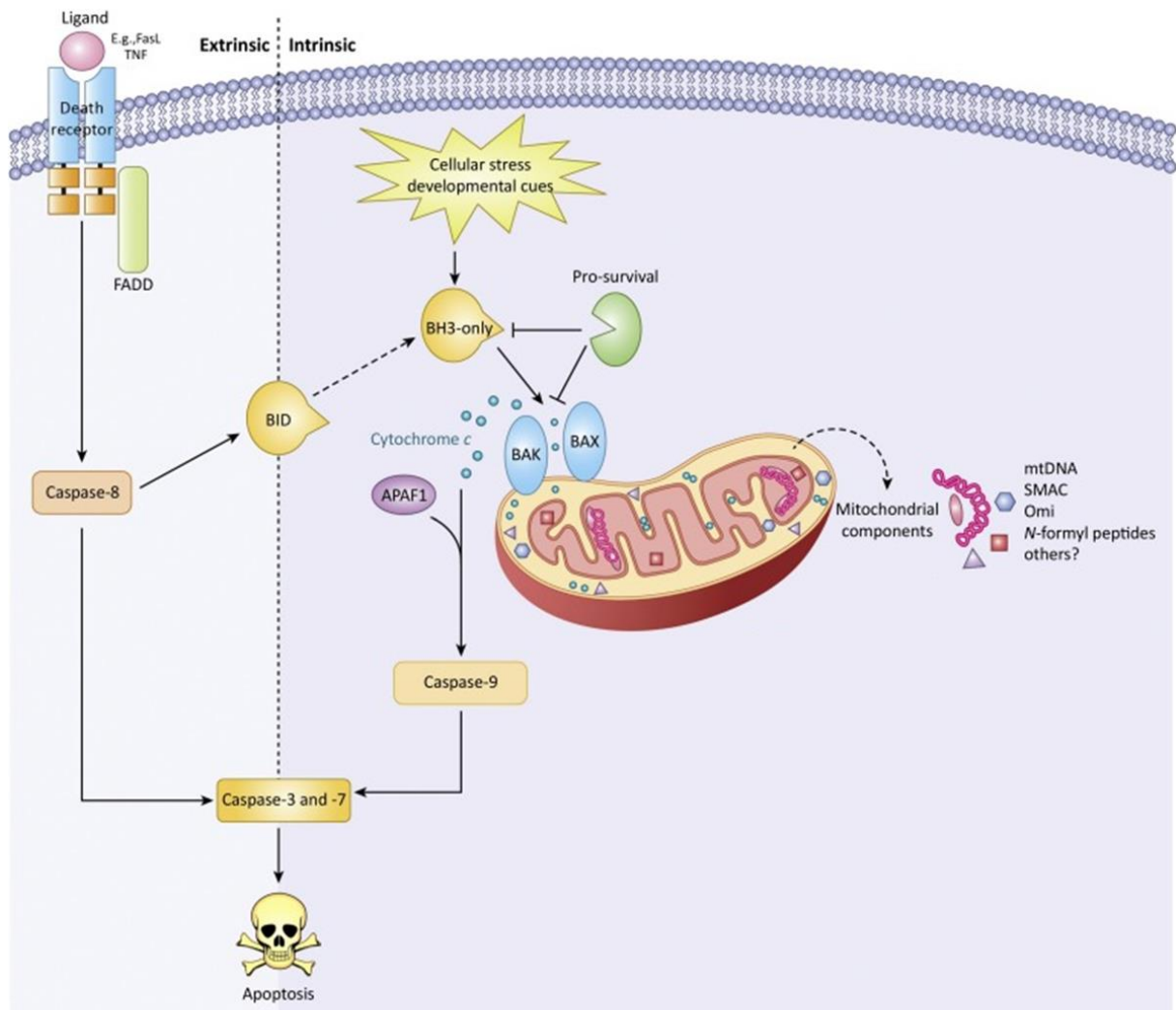
1.4.2 Apoptose

Apoptose é o processo de morte celular programada que possui um papel extremamente importante no controle do crescimento celular e pode se dar de maneira

extrínseca e intrínseca. Na via extrínseca a apoptose é ativada por mecanismos externos à célula através da ativação de receptores de morte, sendo os mais comuns o receptor de fator de necrose tumoral 1 (TNFR1) e a proteína Fas (CD95). No interior da célula, essas proteínas levam a formação do complexo de sinalização indutor de morte (DISC), que é responsável pela ativação da caspase 8, que é uma caspase iniciadora, sendo responsável pela clivagem e consequente ativação de outras caspases executoras⁵⁸.

A via intrínseca, por sua vez, ocorre através de estímulos internos como dano no DNA, hipóxia, stress oxidativo e depleção de fatores de crescimento. Esses estímulos resultam na mudança conformacional de duas proteínas da família Bcl-2, BAX e BAK, que migram para a membrana da mitocôndria formando poros e gerando a permeabilização da mesma. Com a permeabilização da membrana mitocondrial a proteína citocromo C é liberada, formando um complexo com as proteínas Apaf-1 e caspase 9, que também é iniciadora. Nesse processo também são liberadas do espaço inter-membrana outras proteínas apoptóticas, como o fator indutor de apoptose (AIF) e inibidores de proteínas da família das IAPs (proteínas inibidoras de apoptose), como SMAC/DIABLO.

A partir desse momento, ambas as rotas convergem na clivagem da caspase 3, responsável pela apoptose nuclear, e de outras caspases que clivarão proteínas do citoesqueleto, cinases, proteínas de reparo ao dano no DNA, entre outras, levando à morte celular^{51; 52}. Defeitos que geram atenuação nesse processo, como disrupção do balanço de proteínas pró e anti-apoptóticas e redução da função de caspases ou de receptores de morte, são extremamente importantes para a carcinogênese, uma vez que células tumorais possuem capacidade de evadir a morte celular apoptótica.



Trends in Cell Biology

Figura 2. Rotas intrínseca e extrínseca de ativação da apoptose. Ativação de receptores de morte ou estresse celular levam à permeabilização da membrana mitocondrial, permitindo o extravasamento de proteínas intermembrana, e à ativação das caspases efetoras 3 e 7, que levarão à morte celular. Adaptado de McArthur, K. *et al.*, 2018.

1.4.2.1 Visualização de Apoptose

A morte apoptótica pode ser visualizada com o uso de diferentes marcadores intracelulares, como pBabe-puro-IMS-RP e pCDH-puro-CMV-VC3AI. O primeiro consiste na fusão de uma proteína do espaço intermembranas da mitocôndria com a proteína vermelha mRFP1. Em situações de apoptose essa será liberada ao citoplasma e sua dinâmica de liberação simula a proteína DIABLO. O segundo consiste na marcação da proteína Vênus de uma sequência peptídica que é clivada

por caspase-3 e similares. A clivagem desse peptídeo permite com que a proteína Vênus forme sua estrutura tridimensional capaz de emitir fluorescência^{59; 60}.

1.4.3 Autofagia

Autofagia é um processo celular fisiológico de degradação e reciclagem de proteínas e organelas disfuncionais ou desnecessárias e é fundamental para a manutenção da homeostase do metabolismo celular ^{53;61}.

Em situações de estresse celular, como privação de nutrientes e dano a organelas, a proteína alvo de rapamicina (mTOR) é inibida, possibilitando a ativação do complexo de ULK1, que ativa uma PI3K de classe III que, por sua vez, forma um complexo com Beclina-1. A formação desse complexo é essencial para o recrutamento de outras proteínas da família atg que serão críticas para a formação do autofagossomo, que é gerado a partir de uma dupla membrana lipídica. Durante esse processo, diferentes proteínas da família atg adicionam um grupamento lipídico à forma citosólica da proteína LC3 gerando sua forma capaz de se ligar às membranas, LC3II, que é recrutada à membrana do autofagossomo. Então essa proteína liga-se à proteína sequestrossomo 1 (p62), responsável por facilitar a degradação de agregados proteicos ubiquitinados.

Após a formação do autofagossomo, ocorre sua fusão aos lisossomos, dando origem aos autolisossomos, nos quais as organelas e proteínas contidas em seu interior serão degradados gerando nutrientes que serão reutilizados no metabolismo celular ^{53; 54}. Em condições de estresse celular, a autofagia pode ser modulada para providenciar nutrientes necessários ou degradar componentes defeituosos com maior eficácia. Em células tumorais, essa modulação da autofagia pode ser utilizada para suprir demandas metabólicas e energéticas das células, bem como deficiências do microambiente, especialmente no interior de tumores sólidos ⁵³.

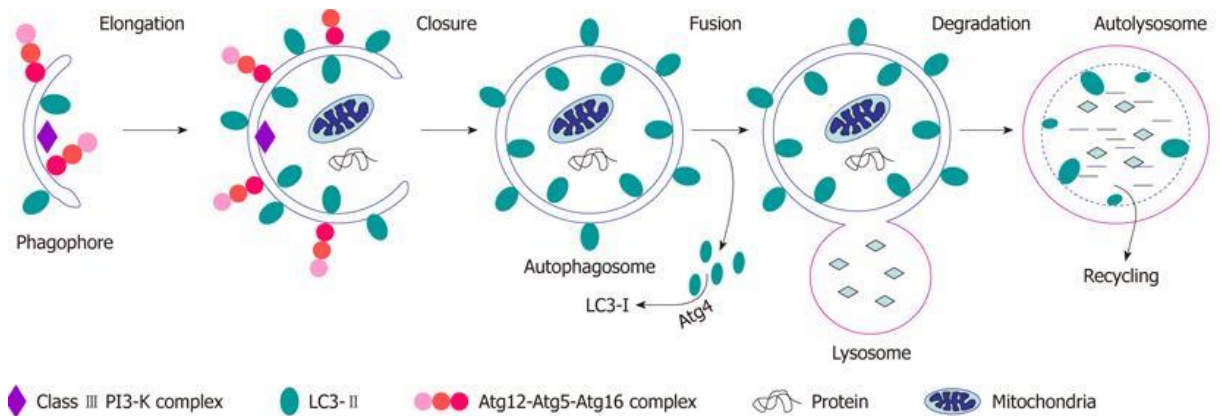


Figura 3. O processo de autofagia. Abounit K. *et al.*,2012.

1.4.3.1 Visualização da autofagia

As principais proteínas utilizadas como descritoras de autofagia são LC3 e p62 e ambas podem ser fusionadas a proteínas fluorescentes para visualização. Dois sistemas para marcação de LC3 consistem nos plasmídeos pBABE-puro mTurquoise2 LC3B e pBABE-puro mCherry-EGFP-LC3B. O primeiro consiste na fusão de LC3II à proteína ciano mTurquoise2. Em organelas da autofagia essa proteína é acumulada formando pontos luminosos no citoplasma que podem ser visualizados por microscopia⁶². Do mesmo modo, o pBABE-puro mCherry-EGFP-LC3B consiste na fusão de LC3 às proteínas EGFP e mCherry, que formarão pontos mais fluorescentes que o basal no citoplasma da célula. Entretanto, esse sistema é seletivo em relação à autophagossomo e autolisossomos, uma vez que nas condições de pH ácido do segundo a proteína EGFP perde sua fluorescência, fazendo com que somente a fluorescência vermelha seja observada⁶³.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETVO GERAL

Construção de uma célula com marcação genômica de fluorescência dos processos de autofagia, apoptose e dano ao DNA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produção de células mono e multi-fluorescentes;
- Caracterização da funcionalidade de células com marcação individual e múltiplas marcações;
- Caracterização do uso da mesma cor de proteína em sublocalizações celulares diferentes;
- Desenvolvimento de uma ferramenta personalizada para automatizar a avaliação de foci de dano ao DNA.

3. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que o estudo de células únicas é extremamente importante na compreensão da heterogeneidade tumoral, que por sua vez está fortemente correlacionada com a resistência à terapia, principal causa da reincidência tumoral, novos instrumentos para essa finalidade se fazem necessários. Assim, a criação e validação de uma célula com diferentes marcações genômicas por fluorescência gera uma ferramenta simples e barata para estudos de células únicas vivas, permitindo o acompanhamento de fenótipos celulares ao longo do tempo e possibilitando correlações de diferentes características entre si e com o destino da célula. Essa ferramenta também abrirá portas para uma melhor compreensão da heterogeneidade tumoral e mecanismos de sobrevivência e resistência de células únicas, trazendo novos *insights* para a biologia tumoral básica e para a clínica, podendo ser utilizada também para a triagem de novos fármacos. Ainda, uma ferramenta de baixo custo e fácil manuseio contribui para uma maior universalização da ciência, especialmente entre países subdesenvolvidos, que carecem de estrutura e investimentos nesse campo.

4. METODOLOGIA

4.1 CULTIVO CELULAR

Células da linhagem de glioblastoma A172 e HEK 293T provenientes da ATCC® (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EUA) foram cultivadas em meio DMEM *Low glucose* e *High glucose* (Dulbecco's Modified Eagle's

Medium) (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY, EUA), respectivamente. O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO) e as células foram mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. A tripsinização foi feita uma ou duas vezes na semana, com tripsina suína (GIBCO).

4.2 OBTENÇÃO DE PLASMÍDEOS

Os plasmídeos pBabe-puro-IMS-RP (#24535), Apple 53bp1-trunc (#69531), CDH-puro-CMV-VC3AI (#78907) e pBABEpuro mTurquoise2 LC3B (#78518) foram adquiridos da Addgene® e recebidos em bactérias transformadas.

Para extração dos plasmídeos foram realizados minipreps e midiprep com kits PureLink™ (Invitrogen™, K210010 e K210004) de acordo com protocolo recomendado pelo fornecedor.

4.3 TRANSFECCÕES

As transfecções foram realizadas com o polímero catiônico Polyethylenimine (Polysciences Inc #23966) ou com o reagente de transfecção Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen™, L3000001).

Para transfecções com PEI, células foram plaqueadas e um mix contendo o DNA de interesse e PEI 1:3 em DMEM Low não suplementado foi gotejado às células. Após 16h o meio foi trocado. As células foram visualizadas 24 e 72h após transfecção.

As transfecções com lipofectamina foram realizadas de acordo com o protocolo descrito pelo fornecedor.

4.4 PRODUÇÃO VIRAL

4.4.1 Produção Lentiviral

Para a produção viral dos plasmídeos Apple 53bp1-trunc e pCDH-puro-CMV-VC3AI foi utilizado um sistema lentiviral de terceira geração. Para isso, células da linhagem HEK 293T foram transfectadas com plasmídeos responsáveis pela produção

viral, REV, RRE e VSV-G, e o DNA de interesse nas proporções 4:2:1,5:4, respectivamente, e PEI na proporção 1:3. Após 16 h o meio foi trocado e as coletas virais ocorreram 48 e 72 h após. O sobrenadante viral foi filtrado com filtros de 0,45 µm (Millipore Millex-LCR) e estocado em ultra freezer a -80°C até o momento do uso.

4.4.2 Produção retroviral

Para a produção viral dos plasmídeos pBabe-puro-IMS-RP e pBABEpuro mTurquoise2 LC3B foi utilizado um sistema retroviral. Para isso, células da linhagem HEK 293T foram transfectadas com plasmídeos responsáveis pela produção viral, VSV-G e GAG-Pol, e o DNA de interesse nas proporções 4:1,5:3, respectivamente, e PEI na proporção 1:3. Após 16 h o meio foi trocado e as coletas virais ocorreram 48 e 72 h após. O sobrenadante viral foi filtrado com filtros de 0,45 µm (Millipore Millex-LCR) e estocado em ultra freezer a -80°C até o momento do uso.

4.5 TRANSDUÇÕES

Para as transduções, tanto lentivirais quanto retrovirais, o sobrenadante viral foi adicionado à células da linhagem A172 com adição de Polybrene 8µg/µl. As células foram centrifugadas por 45 min a 700 g e 25°C e mantidas em incubadora à 37°C e 5% de CO₂. Todos os procedimentos envolvendo retrovírus ou lentivírus foram realizados em uma sala de cultura com biossegurança NB2 e com proteção pessoal de duas luvas, óculos de segurança, máscara facial, touca e um jaleco descartável. Todos os materiais em contatos com vírus foram lavados com SDS 1% e depois autoclavados antes do descarte.

4.6 FÁRMACOS

Para o cultivo bacteriano, foi utilizada Ampicilina 100µg/ml.

Para seleção de células transduzidas foi utilizada puomicina 1 µM.

Para fins de validação, células foram tratadas com cisplatina 16 µM ou 100 µM, rotenona 1, 3 ou 5 µM, rapamicina 200nM e Bafilomicina A1 100 nM em diferentes intervalos de tempo.

4.7 AQUISIÇÃO DE IMAGENS

As imagens foram adquiridas nos seguintes equipamentos:

- Microscópio invertido de fluorescência Zeiss AxioVert 200;
- Sistema de imageamento de fluorescência EVOS M7000 Thermo Fisher Scientific;
- IN Cell Analyzer 2200, Ge Healthcare Lifesciences;
- Microscópio Confocal Espectral FluoView™ FV 1000, Olympus.

4.8 ANÁLISE DE IMAGENS E ESTATÍSTICAS

A análise das imagens foi realizada utilizando o software Image-J.

A análise estatística foi realizada no software Graph Pad Prism 6 com o uso de teste t, ANOVA e correlação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TRANSDUÇÕES CELULARES

Células da linhagem A172 foram transduzidas com os vírus contendo a sequência de Apple 53bp1-trunc, referenciado aqui como “P”, pBABEpuro mTurquoise2 LC3B, referenciado com “L”, pBabe-puro-IMS-RP, referenciado como “D” e pCDH-puro-CMV-VC3AI, nomeado “V”, de maneira individual e em duplas e triplas transduções. As células A172 P foram previamente transduzidas e selecionadas com puromicina em nosso laboratório e as transduções seguintes foram feitas sobre essa. As células A172 V também foram selecionadas com puromicina. A Tabela 1 apresenta a lista das células produzidas, sua nomenclatura e eficiências de transdução.

Tabela 1. Eficiência das transduções e nomenclatura das linhagens produzidas.

Transduções	Processos avaliados	Nomenclatura	Eficiência
Apple 53bp1-trunc	Dano	A172 P	~100%
pBABEpuro mTurquoise2 LC3B	Autofagia	A172 L	44,30%
pBabe-puro-IMS-RP	Apoptose	A172 D	26%
pBabe-puro-IMS-RP + pBabe-puro-IMS-RP	Apoptose	A172 DD	25,48%
pCDH-puro-CMV-VC3AI	Apoptose	A172 V	~100%
Apple 53bp1-trunc + pBabe-puro-IMS-RP	Dano e Apoptose	A172 PD	14%
Apple 53bp1-trunc + pBABEpuro mTurquoise2 LC3B	Dano e Autofagia	A172 PL	15%
Apple 53bp1-trunc + pCDH-puro-CMV-VC3AI	Dano e Apoptose	A172 PV	-
pBabe-puro-IMS-RP + pBABEpuro mTurquoise2 LC3B	Apoptose e Autofagia	A172 DL	-
Apple 53bp1-trunc + pBabe-puro-IMS-RP + pBABEpuro mTurquoise2 LC3B	Dano, Apotose e Autofagia	A172 PDL	14%

As características das células transduzidas, bem como os espectros de emissão e excitação das proteínas fluorescentes utilizadas para marcação, podem ser observadas na imagem a seguir.

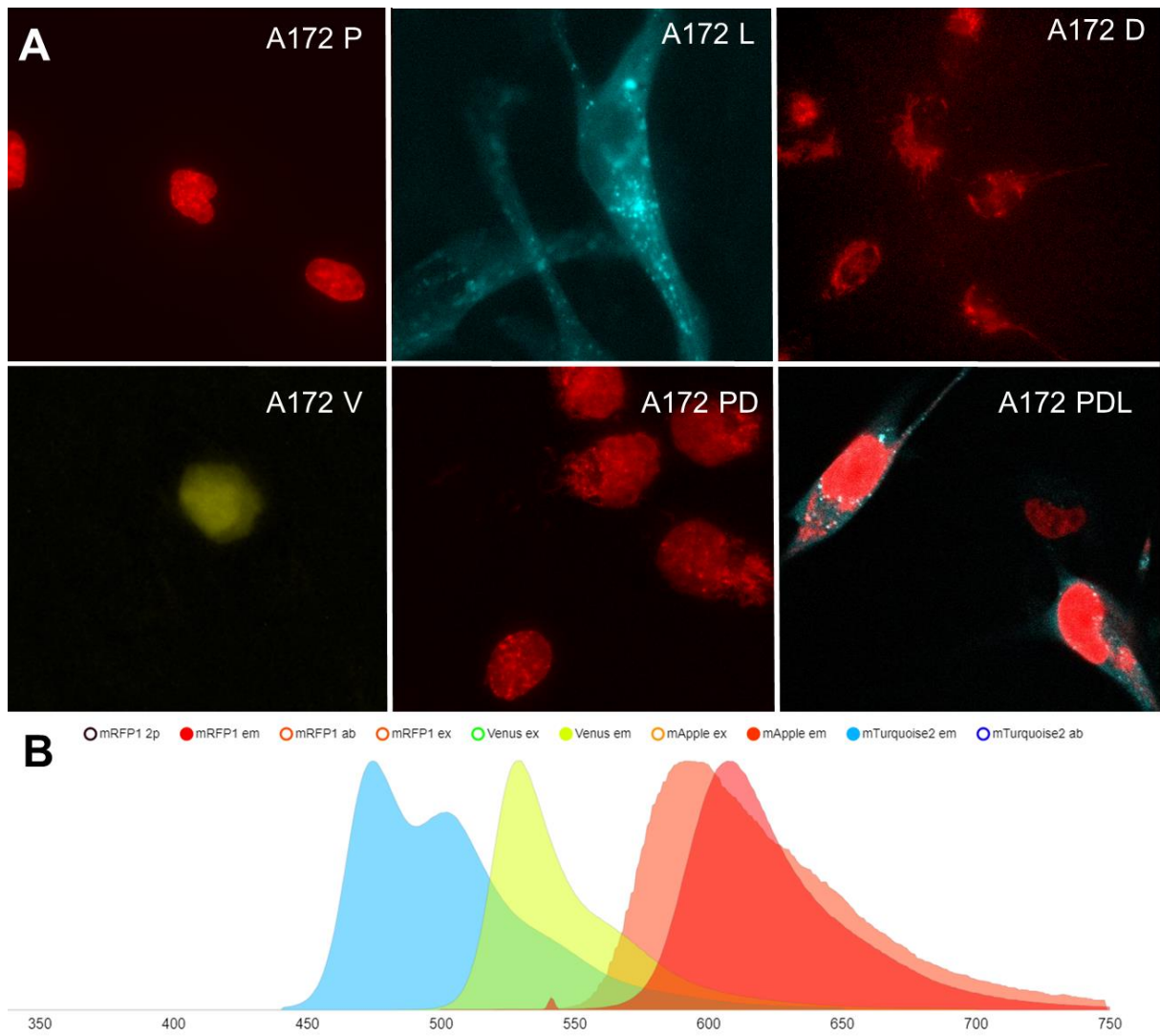


Figura 3. Transduções celulares. **A)** Imagem representativa das diferentes linhagens. **B)** Espectro de emissão das proteínas utilizadas.

5.2 AUTOFAGIA

Células A172 L e A172 PDL foram validadas através da comparação com células A172 mCGL, que é uma linhagem bem estabelecida e utilizada pelo grupo. Como mencionado anteriormente, as células mCGL possuem fluorescências nas cores vermelha, que permanece fluorescente durante todo o fluxo autofágico, e verde, que devido ao seu alto pKa, perde a fluorescência no interior dos autolisossomos. Visto que o pKa da proteína mTurquoise2 é de 4,5 e esse é idêntico ao da proteína mCherry, a análise da área dos pontos das células L e PDL foram comparadas aos pontos vermelhos das células mCGL ^{64,65}.

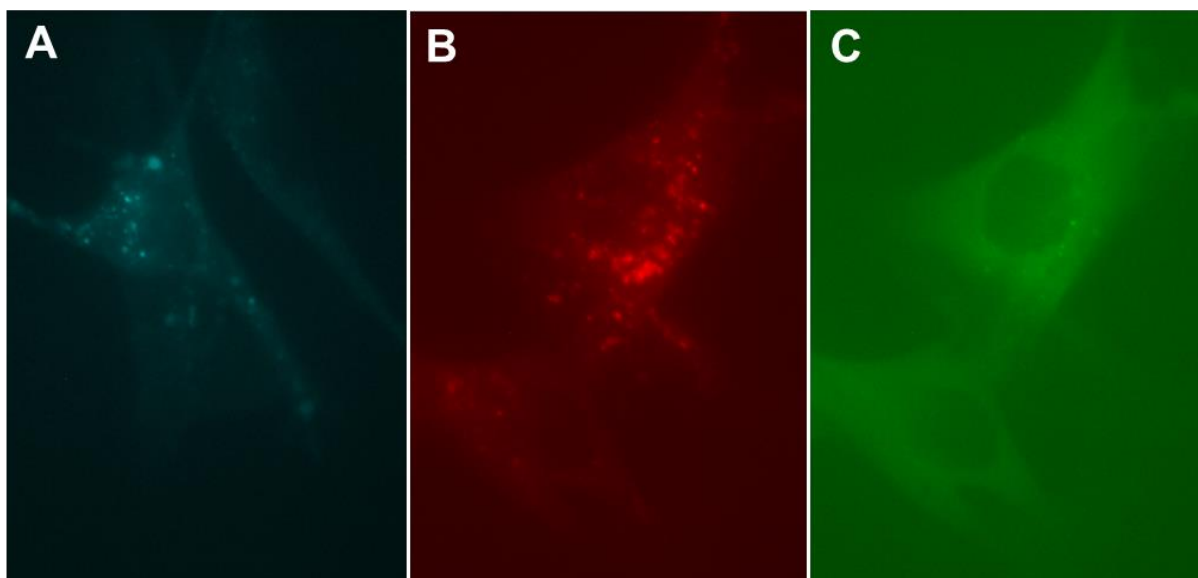


Figura 4. Imagem representativa de LC3B fusionada às diferentes proteínas. A) mTurquoise2. B) mCherry. C) eGFP.

Imagens das células com magnificação de 100x foram obtidas e a medida da área dos pontos de LC3 em relação à área das células foi aferida. Como é possível observar na figura 5, não existe diferença significativa entre a área relativa dos pontos entre as células L e PDL em comparação à mCGL. Esse dado evidencia que a marcação de LC3B com mTurquoise2 se comporta de maneira similar à marcação de mCherry em células mCGL e a tripla marcação não influenciou na formação de pontos.

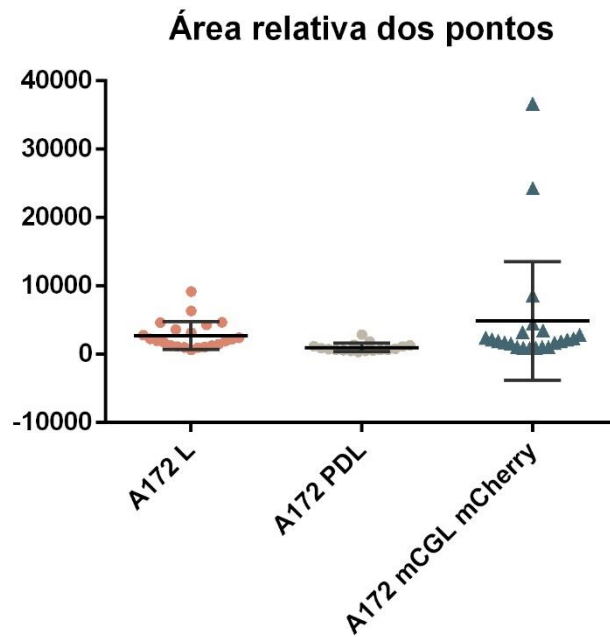


Figura 5. Comparação da área relativa dos pontos de células A172 L, A172 PDL e A172 mCGL. P=0,16.

Para aferir se existem alterações no fluxo autofágico dessas células, foi realizada a indução da autofagia com tratamento de 24h com rapamicina 200nM seguido por bloqueio da degradação autofágica através do impedimento da acidificação dos lisossomos com Bafilomicina A1 100nM por 2h. Esse regime de tratamentos acarreta um aumento das organelas da autofagia, que foram medidas através da contagem de pontos no interior das células.

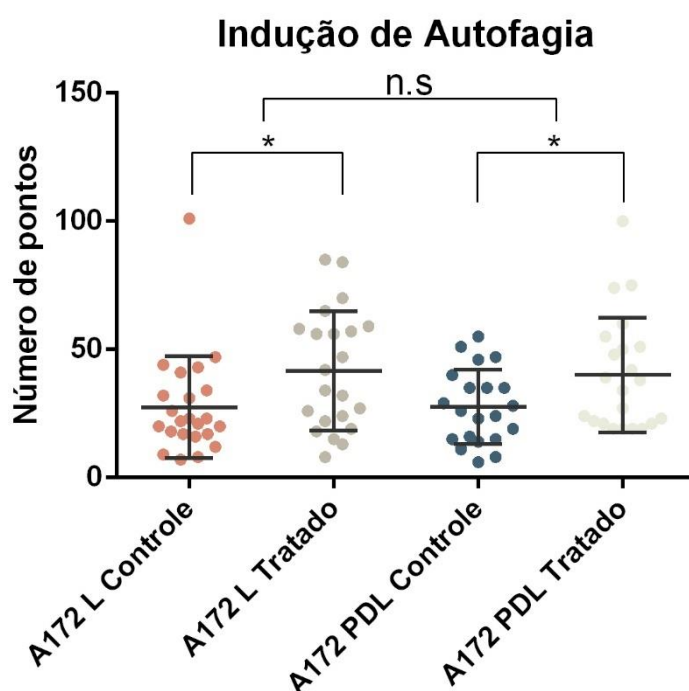


Figura 6. Indução de autofagia em células A172 L ($p=0,03$) e A172 PDL ($p= 0,04$).

Na figura, é possível observar que há um aumento no número de pontos aferidos nas condições de tratamento mostrando que é possível medir alterações na autofagia em células transduzidas com pBABEpuro mTurquoise2 LC3B e que o uso de 3 marcações simultâneas não afetou o processo de autofagia dessas células.

Também foi possível observar que as células apresentaram elevadas taxas de autofagia mesmo em situações controle, fato que também foi observado para células mCGL. Uma vez que a autofagia é aumentada em situações de estresse celular, como depleção de nutrientes e infecção por patógenos, as células foram testadas para a presença de contaminação com micoplasma, uma bactéria comumente encontrada na cultura celular e apontada como promotora de alterações na autofagia^{66;67}, mas o resultado foi negativo. Com isso, suspeitas quanto às condições de cultivo foram levantadas, mas mais investigações se fazem necessárias.

Outro problema encontrado durante essa análise consiste no amplo espectro da proteína mTurquoise2, como observado na figura 3, que varia de comprimentos no espectro do azul (450nm) ao verde (510nm) com pico máximo em 475nm. Isso traz diversas complicações durante a análise, uma vez que a maioria dos equipamentos disponíveis não apresenta filtro específico para a mesma e seu amplo espectro

interfere a visualização de outras fluorescências, sendo um impeditivo para posterior adição de mais proteínas marcadas, como mostrado na figura 7.

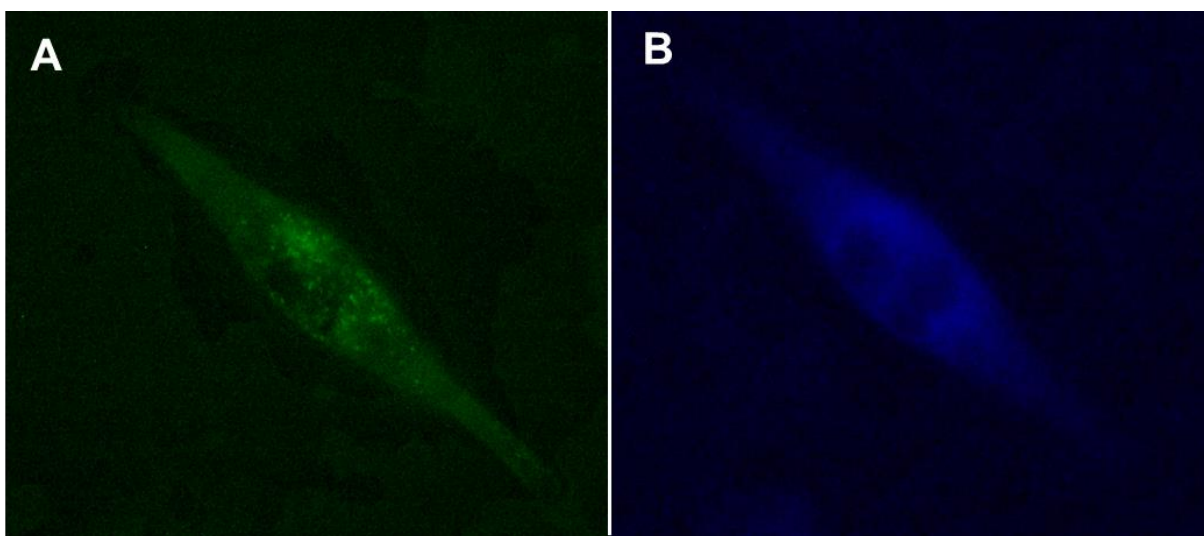


Figura 7. LC3B mTurquoise2 em diferentes filtros. A) 515-565 nm. B) 445-450 nm.

5.3 DANO AO DNA

5.3.1 Ferramenta para automatização da medida de foci de 53BP1

O método mais utilizado para aferir a marcação de dano ao DNA por 53BP1 é através da contagem dos pontos visualizados, mas diversos autores também utilizam estratégias de medida de área e intensidade da fluorescência detectada, não havendo um consenso determinado⁶⁸. Nesse contexto, a análise manual dos pontos geralmente é trabalhosa, imprecisa e gera dados pouco reproduzíveis. Ainda, foi mostrado por Feng et al, 2017, que a contagem dos pontos apresenta limitações referentes a imagens com foci densos e sobrepostos. Isso expõe a necessidade de ferramentas para a análise em larga escala de imagens de foci de 53BP1 que aumentem a precisão do método e garantam a reprodutibilidade dos dados.

Ferramentas para essa finalidade já foram desenvolvidas e utilizadas em diversos trabalhos^{57; 69; 70; 79}, mas essas medidas dependem de equipamentos específicos, coleta de vários campos de profundidade do núcleo, uso de programas de computador pagos ou emprego de etapas semi-manuais. Com isso, torna-se evidente a necessidade de uma ferramenta personalizada para análise dos pontos, que permita

o uso de apenas um campo e faça análises não somente de número, mas de área e intensidade integrada dos pontos também.

Utilizando a linguagem de macros do software livre imageJ, foi desenvolvido um código capaz de medir o número, área e intensidade dos foci de 53BP1 em cada núcleo. Para isso, o macro utiliza funções disponíveis no programa para remover a fluorescência de fundo das imagens e selecionar núcleos individuais. A partir desses núcleos individuais é feita uma primeira aferição das intensidades máxima e mínima de fluorescência para que núcleos com uma diferença pequena entre esses valores sejam considerados como não possuindo foci. Depois, é feita uma normalização da fluorescência de 0 a 255 e definiu-se um limiar que melhor se ajustava aos foci das imagens para delimitar regiões que serão consideradas. Após isso, um limiar de tamanho é aplicado para eliminar quaisquer erros e os foci são selecionados. Essa seleção é então aplicada aos núcleos originais, que serão aferidos, gerando uma tabela no formato csv com os dados gerados. A figura 8 mostra um esquema representativo do funcionamento do macro. A organização dos arquivos csv em uma nova tabela e separação da medida dos núcleos e pontos é feita de maneira manual.

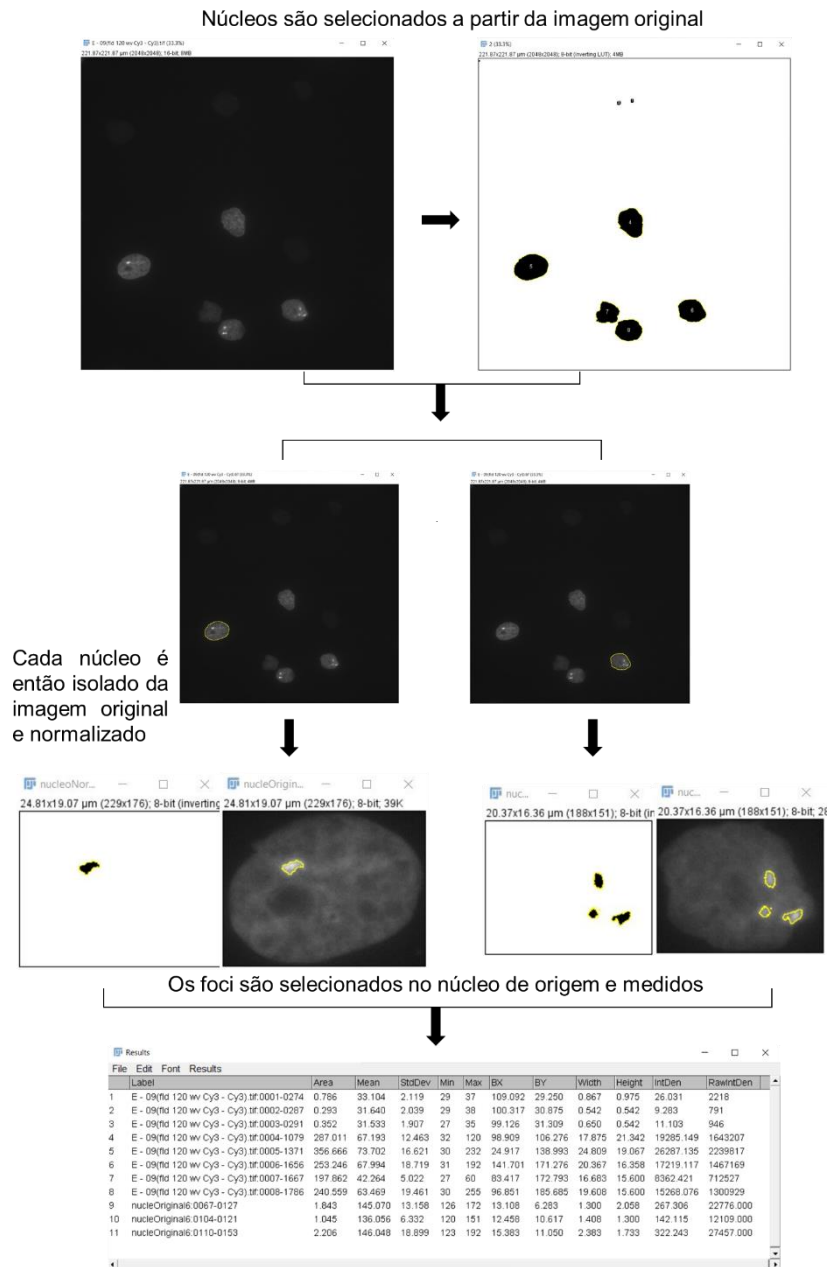


Figura 8. Esquema representativo do funcionamento do macro.

Para validação, 42 células foram aferidas manualmente e comparadas às aferições realizadas pelo macro, tanto para área dos núcleos como para área dos pontos. Como é possível observar na figura 9, existe forte correlação para a medida de área dos núcleos, evidenciando que o macro é capaz de identificar e avaliar corretamente os núcleos presentes nas imagens. Para a área dos pontos por núcleo, foi encontrada uma correlação com índice ρ de Pearson de 0,67, semelhante ao encontrado na literatura para medidas de foci de γ H2AX² e que, apesar de fraca, pode ser utilizada para mostrar diferenças entre situações controle e tratamentos.

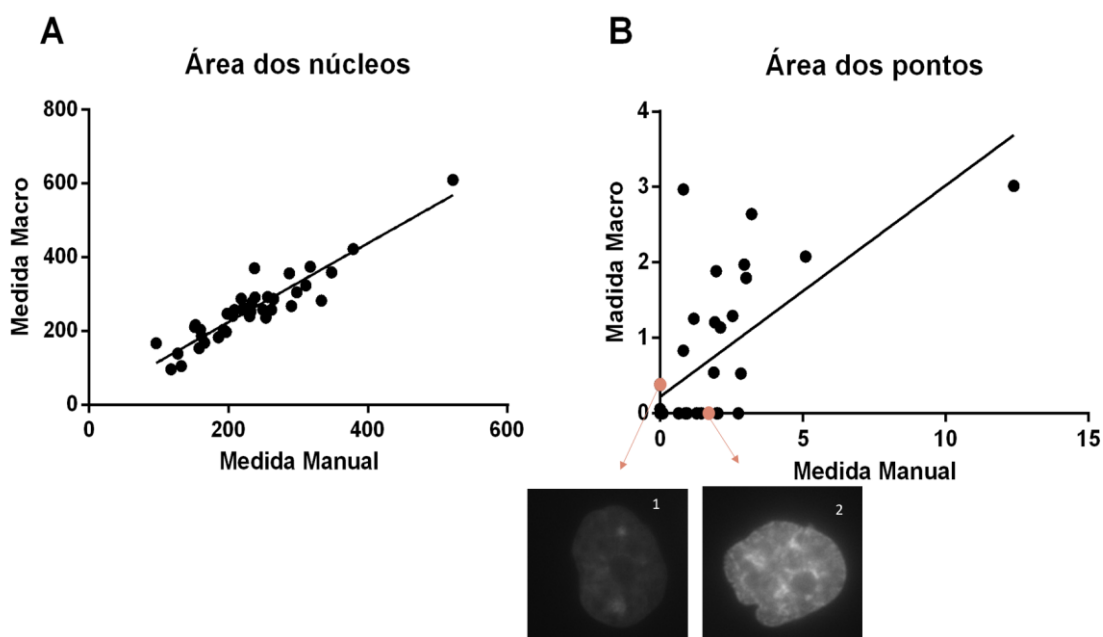


Figura 9. Correlação entre aferições manuais e aferições realizadas pelo macro. A) Correlação da medida da área dos núcleos; $\rho=0,89$; $R^2= 0,86$. **B)** Correlação da medida da área dos foci de dano; $\rho=0,67$; $R^2= 0,44$.

Uma vez que a etapa inicial de seleção de núcleos com e sem foci depende da diferença de intensidade entre o pixel mais intenso em relação ao menos intenso no interior de um núcleo, algumas células acabam ficando fora dos limites de detecção do macro, como exemplificadas na figura 9. Para o núcleo 1, a baixa intensidade geral da imagem, que pode ser causada tanto por diferenças no foco e iluminação como pelo número de cópias do gene inseridas no genoma, faz com que a diferença entre os pixels mais e menos intensos fique fora do limiar determinado. Já no caso do núcleo 2, as irregularidades da fluorescência podem estar ocorrendo devido diferenças no foco, podendo representar pontos que não são estimados pelo olho humano, mas com diferentes intensidades de fluorescência que são aferidas pelo macro. Uma solução para que ocorra uma aferição mais acurada consiste na modificação do macro para exclusão dos núcleos que ficam fora do limiar de detecção.

5.3.2 Caracterização

Para caracterização de células A172 P e A172 PDL, células foram tratadas com cisplatina (CDDP) 100 μ M e rotenona (ROT) 5 μ M durante 15h. As imagens foram analisadas com o macro desenvolvido nesse trabalho.

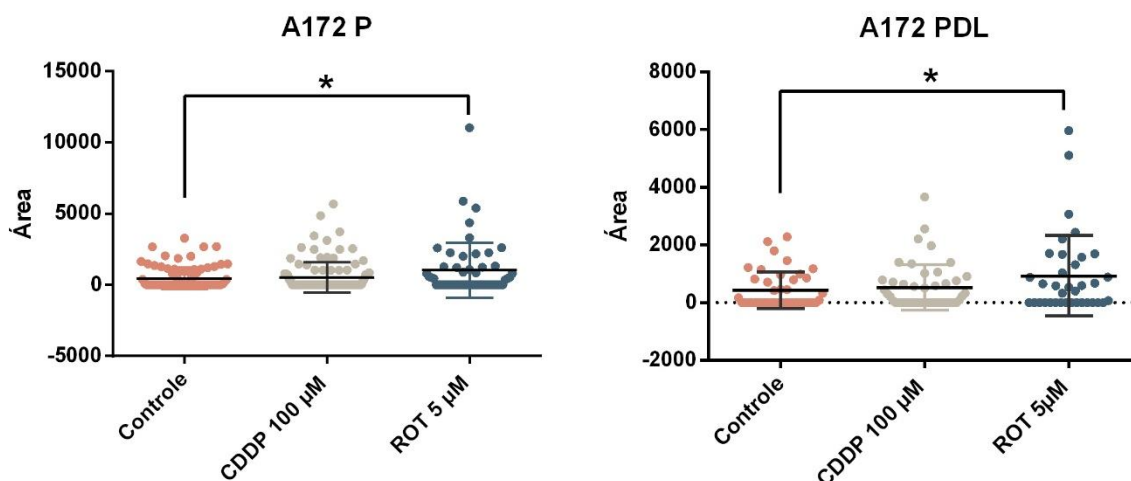


Figura 10. Caracterização de células transduzidas com 53BP1. A) Células A172 P. **B)** Células A172 PDL.

É possível observar que há a formação de pontos no núcleo após tratamento e que células triplamente transduzidas respondem de maneira igual a indução de dano ao DNA do que células transduzidas apenas com o marcador de 53BP1. Entretanto, é possível observar que o macro utilizado para avaliação não possui sensibilidade suficiente para aferir pequenas mudanças na área dos pontos no interior dos núcleos, sendo sensível somente a mudanças mais drásticas, como observado para o tratamento com rotenona. Com isso, fica evidente a necessidade de se efetuar melhorias no macro a fim de que esse se torne uma ferramenta mais acurada para análise de dano no DNA.

5.4 APOPTOSE

5.4.1 DIABLO

Para a caracterização de células transduzidas com pBabe-puro-IMS-RP, as células A172 D e A172 PDL foram tratadas com rotenona 5 μ M durante 19 horas e acompanhadas por imagens a cada 30 minutos. A rotenona é um fármaco inibidor do

complexo 1 da mitocôndria e já foi apontada como indutora de apoptose⁷¹. Para análise, a variação da densidade integrada da fluorescência foi medida em células com morfologia apoptótica e em células que não apresentam tal morfologia ao final do tratamento.

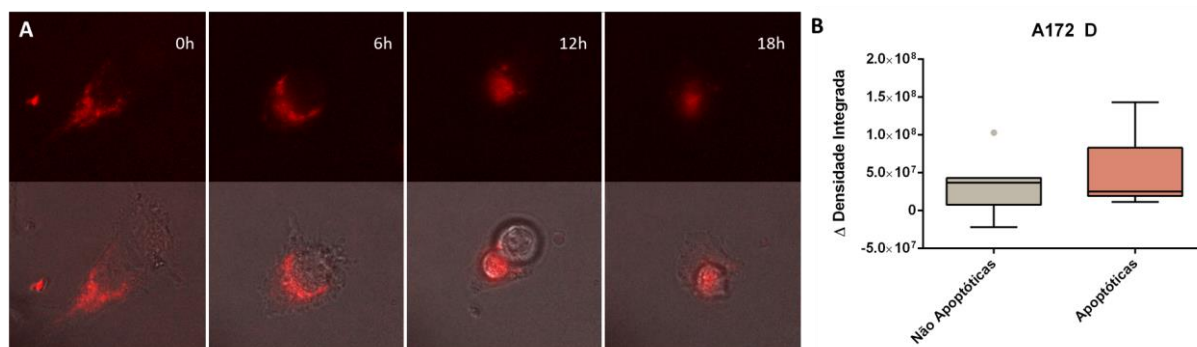


Figura 11. Apoptose aferida em células A172 D. A) Visualização de células ao longo do tempo. **B)** Quantificação da variação de da densidade integrada da fluorescência de diablo em células com morfologia apoptótica e não apoptótica após tratamento.

Como é possível observar, existe uma tendência na redução da densidade integrada da fluorescência em células com morfologia apoptótica, sinalizando que a fluorescência não se encontra concentrada no interior da mitocôndria, e sim dispersa no citoplasma da célula.

Contudo, não foi possível realizar a aferição da densidade integrada em células co-marcadas com 53BP1, pois foi observada uma grande diferença de detecção entre ambas as fluorescências, como observado na figura 13. Isso se deve ao fato que, apesar de ambas as proteínas apresentarem promotores constitutivos e níveis similares de expressão, o brilho da proteína mApple, que é utilizada para marcar 53BP1, é 2,94 vezes mais intenso que o da proteína mRFP1, usada na marcação do DIABLO^{72; 73}, fazendo com que o tempo de exposição para análise de DIABLO seja estendido.

Visando aumentar a intensidade de fluorescência e proporção de células A172 D, foi realizada uma segunda transdução com o mesmo plasmídeo, porém essa não foi capaz de gerar os efeitos desejados e foi descartada das análises posteriores.

Isso indica que, apesar de ser possível o uso de duas proteínas de mesma cor em sublocalizações celulares diferentes, o brilho dessa proteína deve ser levado em

consideração, elegendo-se proteínas fluorescentes de brilho maior para marcação de proteínas com menores níveis de expressão ⁷⁴. Ainda, maiores tempos de exposição à luz utilizada para excitação das proteínas fluorescentes gera o efeito de *photobleaching*, que consiste na perda de fluorescência de fluoróforos expostos à luz sendo irreversível. No caso de proteínas fluorescentes, quando o *photobleaching* ocorre, novas proteínas devem ser sintetizadas para que a fluorescência volte a aparecer.

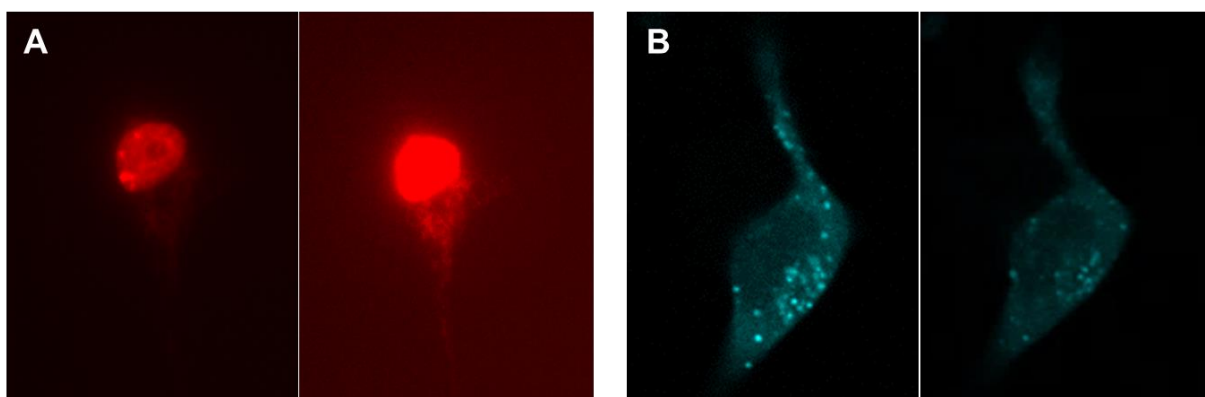


Figura 12. Diferenças de exposição e *photobleaching*. A) A172 PD com baixo e alto tempo de exposição. B) *Photobleaching* observado no mTurquoise2 de células A172 PDL após alto tempo de exposição.

Devido à baixa diferença entre células apoptóticas e não apoptóticas e aos problemas relacionados ao brilho da proteína mRFP1, a marcação de apoptose por DIABLO não se mostrou efetiva para um sistema de célula com múltiplas marcações. Portanto, novas alternativas foram buscadas.

5.4.2 Caspase

Como o processo de apoptose possui alta relevância no estudo da biologia tumoral, uma nova abordagem foi adotada com a transdução de células A172 e A172 P com o plasmídeo pCDH-puro-CMV-VC3I. A marcação de LC3B foi excluída dessa nova construção celular devido ao seu amplo espectro de fluorescência.

As células A172 V foram selecionadas com puromicina e para testar a marcação de apoptose, células foram tratadas com rotenona 1 μ M durante 24 horas. Na figura 14 pode-se observar que houve indução de apoptose, porém, mesmo após seleção, poucas células foram capazes de expressar o marcador e houve baixa capacidade de

detecção de imagem, visto que os filtros dos microscópios utilizados são otimizados para fluorescências verdes, e não amarelas.



Figura 13. Ativação de apoptose em células A172 V selecionadas com puromicina e tratadas com rotenona 1 μ M.

5.5 LIMITAÇÕES DA METODOLOGIA

Apesar de marcação genômica por fluorescência consistir em uma alternativa simples e barata, alguns cuidados devem ser tomados durante a construção das células. Como já mencionado, amplos espectros de fluorescência e diferenças no brilho da proteína fluorescente devem ser considerados no momento da escolha da mesma. Ainda, fatores como força do promotor e taxas de degradação da proteína fusionada à proteína fluorescente também devem ser levados em conta, de modo que proteínas menos abundantes sejam marcadas com fluorescências de maior brilho⁷⁵.

Além disso, o compartimento celular onde a proteína fluorescente estará localizada pode afetar a análise, uma vez que cada proteína possui um determinado pKa e alterações drásticas no pH do meio onde essa está inserida podem levar à uma perda de conformação e, conseqüentemente, de fluorescência^{74; 75}.

A escolha da proteína de fluorescência também deve levar em conta a conformação das subunidades e possibilidade de formação de agregados.

Atualmente, existem disponíveis diversas proteínas em sua forma monomérica, com diversas otimizações para a não formação de agregados proteicos, reduzindo as interferências na análise^{73; 76}.

Outro fator de extrema importância no uso de proteínas fluorescentes é a formação de espécies reativas de oxigênio durante a absorção de luz. Quanto mais abundante a proteína marcada e maior o número de marcações, maior é a produção de ROS associada. Também, quanto maior o tempo de exposição dessas proteínas à fonte de luz, maior será a geração de ROS e maiores serão os efeitos do *photobleaching*^{74;77}.

6. CONCLUSÕES

Nesse trabalho foi possível o desenvolvimento de uma célula com tripla marcação genômica de fluorescência para três processos celulares importantes na biologia tumoral. A célula foi caracterizada para as marcações individuais e triplas, e com isso foi decidido pela retirada da marcação pBABE puro IMS-RP devido seu baixo brilho em comparação à proteína nuclear. Ainda durante a caracterização foi possível observar que o amplo espectro de emissão de algumas proteínas pode interferir nas demais marcações, fazendo com que estas não sejam boas alternativas em sistemas de co-marcação.

Também foi possível o desenvolvimento de uma ferramenta personalizada para análise de foci nuclear, que foi sensível a alterações na área dos pontos nucleares durante tratamentos intensivos.

Apesar de existirem diversos desafios no emprego de proteínas fluorescentes para marcação celular, um bom planejamento e posterior caracterização da célula construída e cuidados com tempos de exposição à luz são suficientes para eliminar quase completamente essas barreiras.

7. PERSPECTIVAS

- a) Caracterizar a marcação com o plasmídeo pCDH-puro-CMV-VC3I;
- b) Modificar a proteína fusionada à LC3B, a fim de garantir um menor espectro de fluorescência;
- c) Aperfeiçoar o macro de contagem de foci a fim de garantir uma maior sensibilidade na alteração da área dos pontos;
- d) Automatizar a organização dos arquivos csv gerados pelo macro utilizado para a análise dos foci de 53BP1, para que se obtenha uma análise completamente automatizada;
- e) Correlacionar os processos de autofagia, dano ao DNA e apoptose entre si e com o desfecho celular;
- f) Adicionar marcações para mais proteínas importantes na biologia tumoral, para que mais fenótipos possam ser avaliados simultaneamente.

8. REFERÊNCIAS

- 1 NIKOLAOU, M. et al. The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. **Clin Exp Metastasis**, v. 35, n. 4, p. 309-318, 04 2018. ISSN 1573-7276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29799080> >.
- 2 ZUGAZAGOITIA, J. et al. Current Challenges in Cancer Treatment. **Clin Ther**, v. 38, n. 7, p. 1551-66, Jul 2016. ISSN 1879-114X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27158009> >.
- 3 GOTTESMAN, M. M. Mechanisms of cancer drug resistance. **Annu Rev Med**, v. 53, p. 615-27, 2002. ISSN 0066-4219. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11818492> >.
- 4 LIPPERT, T. H.; RUOFF, H. J.; VOLM, M. Intrinsic and acquired drug resistance in malignant tumors. The main reason for therapeutic failure. **Arzneimittelforschung**, v. 58, n. 6, p. 261-4, 2008. ISSN 0004-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18677966> >.
- 5 CHAKRABORTY, S.; RAHMAN, T. The difficulties in cancer treatment. **Ecancermedicalscience**, v. 6, p. ed16, 2012. ISSN 1754-6605. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24883085> >.

- 6 HMW, V.; PINEDO; HM. Clinical Implications of drug resistance. In: PINEDO, H. M. (Ed.). **Drug Resistance in the Treatment of Cancer**. 1. Cambridge: Cambridge University Press, Cambridge University, v.1, 1998. cap. 6, p.339.
- 7 MANSOORI, B. et al. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. **Adv Pharm Bull**, v. 7, n. 3, p. 339-348, Sep 2017. ISSN 2228-5881. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29071215> >.
- 8 DAGOGO-JACK, I.; SHAW, A. T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 15, n. 2, p. 81-94, 02 2018. ISSN 1759-4782. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29115304> >.
- 9 FISHER, R.; PUSZTAI, L.; SWANTON, C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. **Br J Cancer**, v. 108, n. 3, p. 479-85, Feb 2013. ISSN 1532-1827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23299535> >.
- 10 PRASETYANTI, P. R.; MEDEMA, J. P. Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. **Mol Cancer**, v. 16, n. 1, p. 41, 02 2017. ISSN 1476-4598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28209166> >.
- 11 RICH, J. N. Cancer stem cells: understanding tumor hierarchy and heterogeneity. **Medicine (Baltimore)**, v. 95, n. 1 Suppl 1, p. S2-7, Sep 2016. ISSN 1536-5964. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27611934> >.
- 12 NOWELL, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science**, v. 194, n. 4260, p. 23-8, Oct 1976. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/959840> >.
- 13 CORRADO, G. et al. Optimizing treatment in recurrent epithelial ovarian cancer. **Expert Rev Anticancer Ther**, v. 17, n. 12, p. 1147-1158, 12 2017. ISSN 1744-8328. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29086618> >.
- 14 KLEIHUES, P.; SOBIN, L. H. World Health Organization classification of tumors. **Cancer**, v. 88, n. 12, p. 2887, Jun 2000. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10870076> >.
- 15 ROCKBERG, J. et al. Epidemiology of cutaneous melanoma in Sweden- Stage-specific survival and rate of recurrence. **Int J Cancer**, v. 139, n. 12, p.

- 2722-2729, Dec 2016. ISSN 1097-0215. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27563839> >.
- 16 SHI, X.; CHAKRABORTY, P.; CHAUDHURI, A. Unmasking tumor heterogeneity and clonal evolution by single-cell analysis. **J Cancer Metastasis Treat** v. 4, 2018. Disponível em: <
<https://jcmtjournal.com/article/view/2770> >.
- 17 HEATH, J. R.; RIBAS, A.; MISCHER, P. S. Single-cell analysis tools for drug discovery and development. **Nat Rev Drug Discov**, v. 15, n. 3, p. 204-16, Mar 2016. ISSN 1474-1784. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26669673> >.
- 18 NAVIN, N. E. The first five years of single-cell cancer genomics and beyond. **Genome Res**, v. 25, n. 10, p. 1499-507, Oct 2015. ISSN 1549-5469. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26430160> >.
- 19 GOLDMAN, S. L. et al. The Impact of Heterogeneity on Single-Cell Sequencing. **Front Genet**, v. 10, p. 8, 2019. ISSN 1664-8021. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30881372> >.
- 20 SINGER, J. et al. Single-cell mutation identification via phylogenetic inference. **Nat Commun**, v. 9, n. 1, p. 5144, 12 2018. ISSN 2041-1723. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30514897> >.
- 21 HU, P. et al. Single Cell Isolation and Analysis. **Front Cell Dev Biol**, v. 4, p. 116, 2016. ISSN 2296-634X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27826548> >.
- 22 HWANG, B.; LEE, J. H.; BANG, D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. **Exp Mol Med**, v. 50, n. 8, p. 96, 08 2018. ISSN 2092-6413. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30089861> >.
- 23 WANG, Y.; NAVIN, N. E. Advances and applications of single-cell sequencing technologies. **Mol Cell**, v. 58, n. 4, p. 598-609, May 2015. ISSN 1097-4164. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26000845> >.
- 24 BARH, D.; AZEVEDO, V. **Single-Cell Omics: Volume 1: Technological Advances and Applications**. 1. Academic Press, 2019. 490
- 25 KLEIN, C. A. et al. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96,

- n. 8, p. 4494-9, Apr 1999. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10200290> >.
- 26 HIMMELBAUER, H.; SCHALKWYK, L. C.; LEHRACH, H. Interspersed repetitive sequence (IRS)-PCR for typing of whole genome radiation hybrid panels. **Nucleic Acids Res**, v. 28, n. 2, p. e7, Jan 2000. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10606675> >.
- 27 HUBERT, R. et al. A new source of polymorphic DNA markers for sperm typing: analysis of microsatellite repeats in single cells. **Am J Hum Genet**, v. 51, n. 5, p. 985-91, Nov 1992. ISSN 0002-9297. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1415267> >.
- 28 TELENIUS, H. et al. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. **Genomics**, v. 13, n. 3, p. 718-25, Jul 1992. ISSN 0888-7543. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1639399> >.
- 29 DEAN, F. B. et al. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 8, p. 5261-6, Apr 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11959976> >.
- 30 ZONG, C. et al. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. **Science**, v. 338, n. 6114, p. 1622-6, Dec 2012. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23258894> >.
- 31 CHEN, C. et al. Single-cell whole-genome analyses by Linear Amplification via Transposon Insertion (LIANTI). **Science**, v. 356, n. 6334, p. 189-194, 04 2017. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28408603> >.
- 32 WU, A. R. et al. Quantitative assessment of single-cell RNA-sequencing methods. **Nat Methods**, v. 11, n. 1, p. 41-6, Jan 2014. ISSN 1548-7105. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24141493> >.
- 33 ISLAM, S. et al. Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers. **Nat Methods**, v. 11, n. 2, p. 163-6, Feb 2014. ISSN 1548-7105. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24363023> >.
- 34 FAN, H. C.; FU, G. K.; FODOR, S. P. Expression profiling. Combinatorial labeling of single cells for gene expression cytometry. **Science**, v. 347, n. 6222, p. 1258367, Feb 2015. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25657253> >.

- 35 KLEIN, A. M. et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. **Cell**, v. 161, n. 5, p. 1187-1201, May 2015. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26000487> >.
- 36 HUGHES, A. J. et al. Single-cell western blotting. **Nat Methods**, v. 11, n. 7, p. 749-55, Jul 2014. ISSN 1548-7105. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24880876> >.
- 37 LOVE, J. C. et al. A microengraving method for rapid selection of single cells producing antigen-specific antibodies. **Nat Biotechnol**, v. 24, n. 6, p. 703-7, Jun 2006. ISSN 1087-0156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16699501> >.
- 38 DOAN, H.; CHINN, G. M.; JAHAN-TIGH, R. R. Flow Cytometry II: Mass and Imaging Cytometry. **J Invest Dermatol**, v. 135, n. 9, p. 1-4, Sep 2015. ISSN 1523-1747. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26269409> >.
- 39 KRÄMER, C. E.; WIECHERT, W.; KOHLHEYER, D. Time-resolved, single-cell analysis of induced and programmed cell death via non-invasive propidium iodide and counterstain perfusion. **Sci Rep**, v. 6, p. 32104, 09 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27580964> >.
- 40 MATOS, L. L. et al. Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. **Biomark Insights**, v. 5, p. 9-20, Feb 2010. ISSN 1177-2719. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20212918> >.
- 41 DICARLO, J. E.; DEECONDA, A.; TSANG, S. H. Viral Vectors, Engineered Cells and the CRISPR Revolution. **Adv Exp Med Biol**, v. 1016, p. 3-27, 2017. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29130151> >.
- 42 HEW, B. E. et al. RNA-guided. **Synth Biol (Oxf)**, v. 4, n. 1, p. ysz018, 2019. ISSN 2397-7000. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31355344> >.
- 43 SNAPP, E. L. Fluorescent proteins: a cell biologist's user guide. **Trends Cell Biol**, v. 19, n. 11, p. 649-55, Nov 2009. ISSN 1879-3088. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19819147> >.
- 44 MENCK, C. F.; MUNFORD, V. DNA repair diseases: what do they tell us about cancer and aging? **Genet. Mol. Biol.**, v. 37, n. 1, 2014. Disponível

em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572014000200008 >.

- 45 BERNSTEIN, C. et al. DNA Damage, DNA Repair and Cancer. In: CHEN, C. (Ed.). **New Research Directions in DNA Repair**. University of California, San Diego, United States of America, v.1, 2013.
- 46 GOLDSTEIN, M.; KASTAN, M. B. The DNA damage response: implications for tumor responses to radiation and chemotherapy. **Annu Rev Med**, v. 66, p. 129-43, 2015. ISSN 1545-326X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25423595> >.
- 47 TIAN, H. et al. DNA damage response--a double-edged sword in cancer prevention and cancer therapy. **Cancer Lett**, v. 358, n. 1, p. 8-16, Mar 2015. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25528631> >.
- 48 KHANNA, K. K.; JACKSON, S. P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. **Nat Genet**, v. 27, n. 3, p. 247-54, Mar 2001. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11242102> >.
- 49 MIRZA-AGHAZADEH-ATTARI, M. et al. 53BP1: A key player of DNA damage response with critical functions in cancer. **DNA Repair (Amst)**, v. 73, p. 110-119, 01 2019. ISSN 1568-7856. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30497961> >.
- 50 PANIER, S.; BOULTON, S. J. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 1, p. 7-18, Jan 2014. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24326623> >.
- 51 WONG, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 30, p. 87, Sep 2011. ISSN 1756-9966. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21943236> >.
- 52 KOFF, J. L.; RAMACHANDIRAN, S.; BERNAL-MIZRACHI, L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 2, p. 2942-55, Jan 2015. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25636036> >.
- 53 YUN, C. W.; LEE, S. H. The Roles of Autophagy in Cancer. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 11, Nov 2018. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30400561> >.

- 54 RABINOWITZ, J. D.; WHITE, E. Autophagy and metabolism. **Science**, v. 330, n. 6009, p. 1344-8, Dec 2010. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21127245> >.
- 55 PISCO, A. O. et al. Non-Darwinian dynamics in therapy-induced cancer drug resistance. **Nat Commun**, v. 4, p. 2467, 2013. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24045430> >.
- 56 LAMBRUS, B. G.; HOLLAND, A. J. A New Mode of Mitotic Surveillance. **Trends Cell Biol**, v. 27, n. 5, p. 314-321, 05 2017. ISSN 1879-3088. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28188027> >.
- 57 YANG, K. S. et al. Single cell resolution in vivo imaging of DNA damage following PARP inhibition. **Sci Rep**, v. 5, p. 10129, May 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25984718> >.
- 58 MCARTHUR, K.; KILE, B. T. Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? **Trends Cell Biol**, v. 28, n. 6, p. 475-493, 06 2018. ISSN 1879-3088. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29551258> >.
- 59 ZHANG, J. et al. Visualization of caspase-3-like activity in cells using a genetically encoded fluorescent biosensor activated by protein cleavage. **Nat Commun**, v. 4, p. 2157, 2013. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23857461> >.
- 60 ALBECK, J. G. et al. Modeling a snap-action, variable-delay switch controlling extrinsic cell death. **PLoS Biol**, v. 6, n. 12, p. 2831-52, Dec 2008. ISSN 1545-7885. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19053173> >.
- 61 ABOUNIT, K.; SCARABELLI, T. M.; MCCAULEY, R. B. Autophagy in mammalian cells. **World J Biol Chem**, v. 3, n. 1, p. 1-6, Jan 2012. ISSN 1949-8454. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22312452> >.
- 62 ROJANSKY, R.; CHA, M. Y.; CHAN, D. C. Elimination of paternal mitochondria in mouse embryos occurs through autophagic degradation dependent on PARKIN and MUL1. **Elife**, v. 5, 11 2016. ISSN 2050-084X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27852436> >.
- 63 N'DIAYE, E. N. et al. PLIC proteins or ubiquilins regulate autophagy-dependent cell survival during nutrient starvation. **EMBO Rep**, v. 10, n. 2, p. 173-9, Feb 2009. ISSN 1469-3178. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19148225> >.

- 64 MARKWARDT, M. L. et al. An improved cerulean fluorescent protein with enhanced brightness and reduced reversible photoswitching. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e17896, Mar 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21479270> >.
- 65 COSTANTINI, L. M. et al. A palette of fluorescent proteins optimized for diverse cellular environments. **Nat Commun**, v. 6, p. 7670, Jul 2015. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26158227> >.
- 66 DREXLER, H. G.; UPHOFF, C. C. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. **Cytotechnology**, v. 39, n. 2, p. 75-90, Jul 2002. ISSN 0920-9069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003295> >.
- 67 HU, X. et al. Synergism between upregulation of Rab7 and inhibition of autophagic degradation caused by mycoplasma facilitates intracellular mycoplasma infection. **Mol Med Rep**, v. 9, n. 3, p. 793-800, Mar 2014. ISSN 1791-3004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24452847> >.
- 68 FENG, J. et al. A novel automatic quantification method for high-content screening analysis of DNA double strand-break response. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 9581, 08 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28852024> >.
- 69 SOMSEDIKOVA, A. et al. Constitutive 53BP1/γH2AX foci are increased in cells of ALL patients dependent on BCR-ABL and TEL-AML1 preleukemic gene fusions. **Neoplasma**, v. 61, n. 5, p. 617-25, 2014. ISSN 0028-2685. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25244981> >.
- 70 RASCHE, L. et al. Analysis of Lymphocytic DNA Damage in Early Multiple Sclerosis by Automated Gamma-H2AX and 53BP1 Foci Detection: A Case Control Study. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. e0147968, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26820970> >.
- 71 WOLVETANG, E. J. et al. Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis. **FEBS Lett**, v. 339, n. 1-2, p. 40-4, Feb 1994. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8313978> >.
- 72 SHANER, N. C. et al. Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. **Nat Methods**, v. 5, n. 6, p. 545-51, Jun 2008. ISSN 1548-7105. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18454154> >.

- 73 CAMPBELL, R. E. et al. A monomeric red fluorescent protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 12, p. 7877-82, Jun 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12060735> >.
- 74 SNAPP, E. L. Fluorescent proteins: a cell biologist's user guide. **Trends Cell Biol**, v. 19, n. 11, p. 649-55, Nov 2009. ISSN 1879-3088. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19819147> >.
- 75 SHANER, N. C.; STEINBACH, P. A.; TSIEN, R. Y. A guide to choosing fluorescent proteins. **Nat Methods**, v. 2, n. 12, p. 905-9, Dec 2005. ISSN 1548-7091. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16299475> >.
- 76 SHANER, N. C. et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. **Nat Biotechnol**, v. 22, n. 12, p. 1567-72, Dec 2004. ISSN 1087-0156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15558047> >.
- 77 ONUKWUFOR, J. O. et al. Quantification of reactive oxygen species production by the red fluorescent proteins KillerRed, SuperNova and mCherry. 2019. Disponível em: < <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/777417v1.full> >.
- 78 FILIPPI-CHIELA, E. C. et al. Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. **Autophagy**, v. 11, n. 7, p. 1099-113, 2015. ISSN 1554-8635. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25701485> >.
- 79 LENGERT, N. et al. AutoFoci, an automated high-throughput foci detection approach for analyzing low-dose DNA double-strand break repair. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 17282, 11 2018. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30470760> >.

APÊNDICE A: CÓDIGO DO MACRO PARA ANÁLISE DE FOCI NUCLEAR NA LINGUAGEM MACRO IMAGEJ

```
input = getDirectory("Choose input directory");
output = getDirectory("Choose where to save");

files = getFileList(input);
for (i=0; i<files.length; i++)
    apply_function(input, output, files[i]);

function apply_function(input, output, file){
    open(input + file);
    selectWindow(file);
    run("Duplicate...", " ");
    rename("2");
    run("Subtract Background...", "rolling=100");
    setAutoThreshold("Triangle dark no-reset");
    setOption("BlackBackground", false);
    run("Convert to Mask");
    run("Options...", "iterations=20 count=1 do=[Fill Holes]");
    run("Options...", "iterations=2 count=1 do=Erode");
    run("Options...", "iterations=2 count=1 do=Dilate");
    run("Analyze Particles...", "exclude add");
    if (roiManager("count") == 0){
        selectWindow(file);
        run ("Close");
        selectWindow("2");
        run ("Close");
    }
    else{
        roiManager("Select", 0);
        if (Roi.getType == "composite") {
            roiManager("Split");
        }
    }
}
```

```

    }
    setBackgroundColor(0, 0, 0);
    //roiManager("Delete");
        close();
    selectWindow(file);
    run("8-bit");
    run("Set Measurements...", "area mean standard min bounding shape
integrated display redirect=None decimal=3");
        size = roiManager("count");
    setOption("ExpandableArrays", true);
    array = newArray;
    for (i=0; i<size; i++)
        array[i] = i;
    medidas_no_resultado = getValue("results.count");
    roiManager("deselect");
    roiManager("measure");
    nucleos_do_roi = roiManager("count");

    for (i=0; i<array.length; i++)
        if (i < array.length) {
            area = getResult("Area", i);
            if (area > 30) {
                select(i, file);
            }
        }
    Table.deleteRows (medidas_no_resultado, medidas_no_resultado +
nucleos_do_roi-1);
    selectWindow("ROI Manager");
    run("Close");
    selectWindow (file);
    run ("Close");
}}

```

```

function select(i, file) {

```

```

selectWindow(file);
nRoiBefore = roiManager("count");
roiManager("select", i);
run("Duplicate...", "title=nucleOriginal" + i+1);
run("Duplicate...", "title=nucleoNormalizado" + i+1);
run("Clear Outside");
isDot (i);
}

```

```

function splitRoi (i) {
    roiManager ("Select", nRoiBefore);
    if (Roi.getType == "composite") {
        roiManager("Split");
        roiManager("Select", nRoiBefore);
        roiManager("delete");
    }
}

```

```

function filter (i) {
    for (i=nRoiBefore; i<=nRoiAfter-1; i++)
        MeasureRoi (i);

    for (i=nRoiAfter-1; i>=nRoiBefore; i--)
        del (i);

    Table.deleteRows(nRoiBefore,(nRoiAfter-1));
}

```

```

function MeasureRoi (i){
    roiManager ("Select", i);
    run ("Measure");
}

```

```

function del (i) {
    if (getResult("Area", i) < 0.05) {

```

```

        roiManager("select", i);
        roiManager("delete");
        Table.deleteRows(i, i);
    }

    else if (getResult("Circ.", i) < 0.35) {
        roiManager("select", i);
        roiManager("delete");
        Table.deleteRows(i, i);
    }

    else if (getResult("Area", i) > 6.0) {
        roiManager("select", i);
        roiManager("delete");
        Table.deleteRows(i, i);
    }
}

function makeMeasures (i){
    nRoiFiltered = roiManager("Count");
    for (i=nRoiBefore; i<=nRoiFiltered-1; i++)
        MeasureRoi (i);
}

function deleteExtraRoi (i){
    roiManager("select", i);
    roiManager("delete");
}

function isDot (i) {
    difference = Table.get( "Max", i) - Table.get("Min", i);
    if (difference > 120) {
        dotmax (i);
    }
}

```

```

else {
    selectWindow ("nucleOriginal" + i+1);
    close ();
    selectWindow ("nucleoNormalizado" + i+1);
    close();
}}

```

```

function dotmax (i) {
    run("Find Maxima...", "prominence=30 output=Count");
    if ((getResult("Count", (nResults-1))) == 0) {
        waitForUser(" nothing hereee");
        Table.deleteRows((nResults-1), (nResults-1));
        waitForUser("confere");
        selectWindow ("nucleOriginal" + i+1);
        close ();
        waitForUser("fechou?");
        selectWindow ("nucleoNormalizado" + i+1);
        close();
    }

    else {
        Table.deleteRows((nResults-1), (nResults-1));
        contin (i);
    }}

```

```

function contin (i) {
    run("Enhance Contrast...", "saturated=0 normalize");
    setThreshold(180, 255);
    //setThreshold(180, 255);
    setOption("BlackBackground", false);
    run("Convert to Mask");
    run("Fill Holes");
    run("Create Selection");
    roiManager("add");
}

```

```
splitRoi (i);
nRoiAfter = roiManager("count");
filter(i);
selectWindow("nucleoNormalizado"+i+1);
run ("Close");
selectWindow("nucleOriginal"+i+1);
makeMeasures (i);
FinalCount = roiManager("Count");
selectWindow("nucleOriginal" +i+1);
run("Close");
imageName= File.getName(file);
Table.save(output + " Results" + imageName + (i+1));
Table.deleteRows(nRoiBefore, FinalCount);
selectWindow("ROI Manager");
for (i=FinalCount-1; i>=nRoiBefore; i--)
    deleteExtraRoi (i);
}}
```