

TÍTULO DO TRABALHO:

“ESTUDO DO PAPEL DA QUINASE DE ADESÃO FOCAL A RESPOSTA DE DANO AO DNA EM CARDIOMIÓCITOS SUBMETIDOS A ESTRESSE GENOTÓXICO PELO QUIMIOTERÁPICO DOXORRUBICINA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA DE ILUMINAÇÃO ESTRUTURADA”

1. RESUMO DO TRABALHO

Complicações cardiovasculares das terapias antineoplásicas estão surgindo como um grande problema de saúde pública, considerando que a taxa de sobrevivência ao câncer vem aumentando consideravelmente nos últimos anos. A cardiotoxicidade decorrente da ação de quimioterápicos, como a Doxorubicina (doxo), é uma condição grave, podendo evoluir para cardiomiopatia crônica, insuficiência cardíaca congestiva e morte do paciente. Estudos com foco na sinalização ativada por terapias antineoplásicas vêm demonstrando a importância da proteína quinase de adesão focal (FAK) para a sobrevivência e resistência celular frente a esse tratamento, no entanto, essa sinalização permanece pouco compreendida. O presente trabalho visou caracterizar os efeitos do tratamento com o quimioterápico doxo na redistribuição subcelular da FAK em miócitos cardíacos H9C2. Além disso, foi investigado a interação entre FAK e as proteínas relacionadas à resposta ao dano no DNA (DDR) após o tratamento com doxo, como a DNAPK, XRCC5 e DDX5, as quais foram previamente identificadas em experimentos de co-imunoprecipitação da FAK. Como metodologia, foi promovido os cultivos celulares dos cardiomiócitos, imunomarcados e realizados o tratamento com Doxorubicina, com posterior análise pela Microscopia de Super Resolução. Dentre os principais achados provenientes dos resultados, verifica-se a aparente aproximação entre FAK e as proteínas do DDR durante o estresse genotóxico, indicativo de ação mútua para manutenção da atividade celular. Os achados deste projeto contribuíram para o entendimento dos mecanismos pelos quais FAK promove sobrevivência celular frente ao tratamento com doxo e para o estabelecimento de novas modalidades terapêuticas para o tratamento tumoral com amenização dos efeitos deletérios sobre a função cardíaca.

Palavras – Chave: FAK, Doxorubicina, Cardiotoxicidade

2. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares e o câncer representam a primeira e a segunda causas de morte nos países industrializados, respectivamente. Essas duas condições podem se tornar sinérgicas se considerarmos as complicações cardiovasculares das terapias antineoplásicas

[1,2]. Durante as últimas três décadas, o desenvolvimento de estratégias eficazes de triagem e tratamento para doenças neoplásicas resultou em uma enorme população de sobreviventes em longo prazo. Atualmente estima-se que as taxas de sobrevida até 5 anos após o diagnóstico são de aproximadamente 84% em crianças e 67% na população total diagnosticada com câncer (dados do National Cancer Institute, NIH, 2014). Como para outras condições crônicas, o câncer é considerado uma doença curável, sendo assim, a manutenção da qualidade de vida dos pacientes oncológicos a longo prazo é uma questão emergente [1–3]. Dessa forma, avanços no conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares ativados por quimioterápicos cardiotoxicos poderão permitir o estabelecimento de novas modalidades terapêuticas para reduzir a mortalidade por insuficiência cardíaca associada a terapias antineoplásicas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo Celular

As células foram obtidas comercialmente e cultivadas em meio DMEM acrescido de 2 mM L-glutamine, 1 mM piruvato de sódio, 1500 mg/L bicarbonato de sódio, 1.0 g/L glicose e 10% de soro fetal bovino e antibióticos. Elas foram mantidas à 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Para o desprendimento das células foi utilizada uma solução de Tripsina-EDTA. Em seguida, as células foram cultivadas em placas com fundo de lamínula para os experimentos de imunofluorescência.

3.2 Tratamento com Doxorubicina

Miócitos H9C2 foram cultivados em placas com fundo de lamínula e tratados com Doxorubicina na concentração de 1 µM por 12 horas em análise da proteína de reparo DDX5 e DNA-PK. Em relação a XRCC5 o tempo de exposição do miócito à Doxorubicina foi de 24 horas.

3.3 Imunomarcção

3.3.1 FAK + DDX5

Como anticorpos primários foram usados DDX5 - rabbit (1:200), REF ThermoFisher (MA5-32739-) e FAK - mouse (1:200), REF ThermoFisher (39-6500) - incubação de 30 minutos e 3 lavagens com PBS em agitação branda. Já os anticorpos secundários foram Alexa fluor anti-mouse 488 (1:2000) + anti-rabbit 546 (1:2000).

3.3.2 FAK + XRCC5

Os anticorpos primários usados foram: FAK AHO (mouse 1:200), REF ThermoFisher (39-6500) e XRCC5/KU80 (rabbit 1:200), REF ThermoFisher (PA5-17454). Incubação de 30

minutos, 1 lavagem sem agitação, 3 lavagens com PBS em agitação branda. Já os anticorpos secundários: Alexa fluor anti-rabbit 546 (1:2000), Alexa fluor anti-mouse 488 (1:2000), Incubação de 30 minutos, 1 lavagem sem agitação, 3 lavagens com PBS em agitação branda.

3.3.3 FAK + DNA-PK

Como anticorpos primários foram usados DNA-PK - rabbit (1:200), REF ThermoFisher (MA5-32192), GamaH2AX - mouse (1:200) REF (MA5-27753) e FAK - mouse (1:200), REF (ZF-002) - incubação de 30 minutos e 3 lavagens com PBS em agitação branda. Já os anticorpos secundários foram Alexa fluor anti-mouse 647 (1:2000) + anti-rabbit 546 (1:2000).

3.4 Western Blot

As diferentes amostras obtidas foram aquecidas por 5 min a 95°C. Para a separação das proteínas foi realizada a eletroforese em gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Terminada a corrida, o cassete foi retirado da cuba, o gel delicadamente removido e colocado em contato com a membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, cod. 1620115) no aparato de transferência com tampão apropriado (Tris 25 mM + Glicina 190 mM + Metanol 20% + SDS 0.1% pH 8.3). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com 5% de BSA em TBS-T (25 mM Trizma Base; 125mM NaCl; 0,05% Tween 20; HCl para atingir o pH 8,0), sob agitação leve e continua durante 1 hora. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário específico para a proteína de interesse e, em seguida, com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase, conforme descrito anteriormente [4].

Para a visualização das proteínas de interesse, a membrana foi banhada com a mistura de luminol e peróxido de hidrogênio do kit substrato quimioluminescente (Clarity Max™ Western ECL Substrate da Bio-Rad, cod. 1705062) e, em seguida, exposta para a captação de imagens utilizando câmera CCD do fotodocumentador UVITECH Alliance 6.7.

3.5 Microscopia de super-resolução SIM

As imagens de microscopia confocal SIM foram adquiridas em um microscópio Zeiss Elyra (Carl Zeiss AG, Alemanha). Os sinais de fluorescência podem ser excitados com lasers em 405nm, 488nm, 543nm ou 633nm. A fluorescência foi excitada e coletada por uma objetiva Plan-Apochromat 63x/1,46 Oil DIC M27 Elyra. O próprio software do microscópio fez o processamento das imagens.

3.6 Metodologia para análise das imagens

As análises realizadas foram feitas pelo programa ImageJ, em que os núcleos das células foram selecionados, para que o cálculo de intensidade de fluorescência fosse feito. Foi usado a seguinte equação para encontrar a intensidade de cada núcleo do miócito:

. Cálculo do CTCF: Intden - (Média do Background x Área do Núcleo);

Após realizado os dados matemáticos, slices (Z-Stack) e pranchas foram formuladas para que o impacto do tratamento de doxorubicina pudesse ser explicitado pela organização das imagens presente neste relatório.

4. ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS GARANTIDOS AOS PARTICIPANTES DA PESQUISA;

Este trabalho não necessitou da aprovação do comitê de ética, pois não possui a presença de participantes para o desenvolvimento da pesquisa realizada, visto ser um trabalho puramente laboratorial, celular e microscópico.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliar se ocorre redistribuição subcelular da FAK em miócitos H9C2 após indução de estresse genotóxico pelo tratamento com doxorubicina, por meio de microscopia SR-SIM.

Em primeiro momento, separamos grupos de células controle e tratadas com doxorubicina e delimitamos a área do núcleo através do ImageJ (na seção de 3. Metodologia). Análises de microscopia de super-resolução por iluminação estruturada (SR-SIM 3D) demonstraram que o tratamento com doxo promove alterações na redistribuição de FAK (vide Figura 01A). Nesta mesma imagem, podemos verificar um aumento significativo de intensidade de fluorescência entre grupo controle e o tratado com doxo. Esse aumento também é expressivo e significante quando analisamos a Figura 01B.

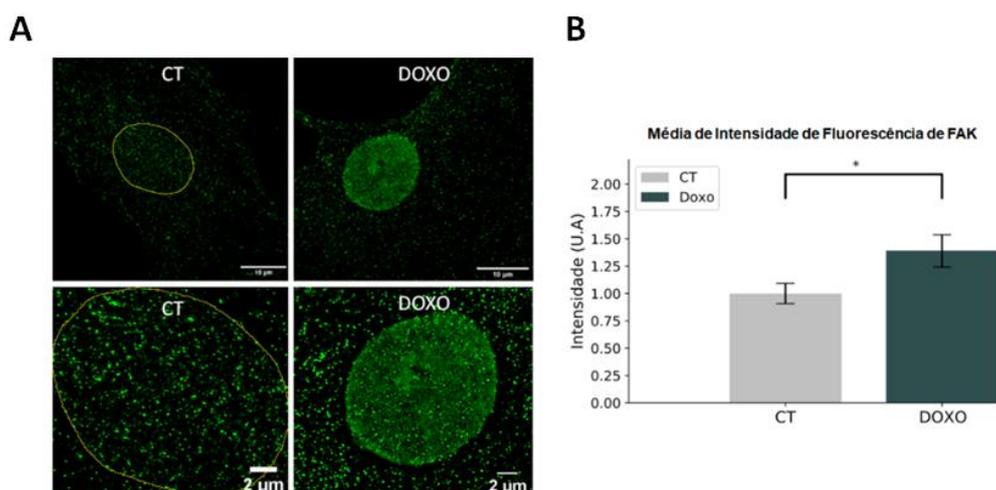


Figura 01. Tratamento com doxo altera distribuição de FAK no núcleo. A região nuclear foi delimitada para quantificação da intensidade de fluorescência da proteína FAK. Abaixo, região nuclear ampliada. **B.** Gráfico em barras representa a quantificação da intensidade fluorescência de FAK nuclear em células controle (CT) e tratadas com doxo. Os resultados foram expressos

como média \pm erro padrão da média. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Em consonância a tal fato, foi demonstrado que o estresse genotóxico promove aumento substancial da fosforilação de FAK no compartimento nuclear, como observado pela marcação com anticorpo específico para a fosforilação do resíduo tirosina 397 da FAK (Figura 02), sabidamente fosforilado no evento de ativação do domínio quinase da proteína [1,2]. FAK ativada, além de ser capaz de fosforilar alvos em tirosina, muda sua conformação e expõem sítios de interação proteína-proteína, antes bloqueados pela conformação fechada, adotada em seu estado inativo [2]. Este dado demonstra que a FAK ativa deve participar da regulação de eventos nucleares ativados durante o estresse genotóxico.

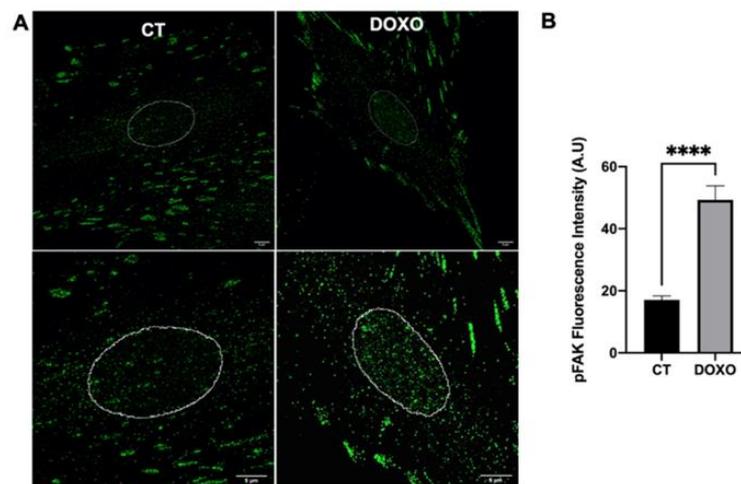


Figura 02. Tratamento com doxo promove aumento de FAK ativada no compartimento nuclear. **A.** Imagens representativas de microscopia SR-SIM, geradas pela sobreposição de planos nos quais havia a presença do compartimento nuclear. A região nuclear foi delimitada para quantificação da intensidade de fluorescência de FAK fosforilada no resíduo tirosina 397 (pFAK). Abaixo, região nuclear ampliada. **B.** Gráfico em barras representa a quantificação de fluorescência de pFAK nuclear em células controle (CT) e tratadas com doxo. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Na Figura 03 podemos ver os dados de Western Blot (WB) para a expressão de FAK total e FAK Fosforilada. No caso de FAK é possível observar que não houve alteração significativa da sua expressão após tratamento com DOXO. Para a pFAK, os dados do *Blot* indicam uma não aumento de fosforilação após o tratamento com o quimioterápico. Desse modo, apesar do aumento das intensidades de fluorescência verificados na Figura 01A e 02, o

WB tanto da Figura 03A quanto da 03B mostram a não alteração de expressão e fosforilação ao se comparar grupos controles e tratados.

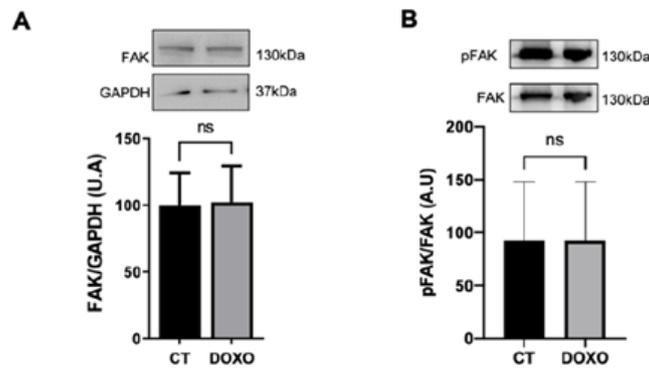


Figura 03. Tratamento com doxo não altera expressão ou fosforilação de FAK em extratos totais de células H9C2. **A.** Imagens representativas obtidas por western blottings e gráfico em barras correspondente a quantificação da expressão de FAK normalizada por GAPDH em extratos totais de células controle (CT) e tratadas com doxorubicina (DOXO). **B.** Imagens representativas obtidas por western blottings e gráfico em barras correspondente a quantificação da fosforilação de FAK no resíduo tirosina 397, normalizada por FAK total em extratos totais de células controle (CT) e tratadas com doxo. N=3 grupos experimentais. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5.2 Verificar se FAK colocaliza com DDX5 em células controle e tratadas com doxorubicina, por microscopia SR-SIM

Após os resultados obtidos do primeiro objetivo, demos sequência ao trabalho, verificando se o tratamento com doxorubicina poderia promover uma co-localização entre FAK e DDX5.

Na Figura 04 selecionamos uma célula controle do nosso espaço amostral, na qual observamos a distribuição subcelular e subnuclear das proteínas FAK e DDX5. Após o tratamento com o quimioterápico, produziu-se a Figura 05 de uma célula representativa. Vale ressaltar, que em ambas as imagens abaixo, foram selecionadas duas áreas retangulares na região nuclear (podendo ser visualizadas nas figuras sobrepostas pela cor branca).

Podemos observar nessas imagens que a DDX5 está presente apenas no núcleo enquanto a FAK se distribui tanto no citoplasma quanto no núcleo.

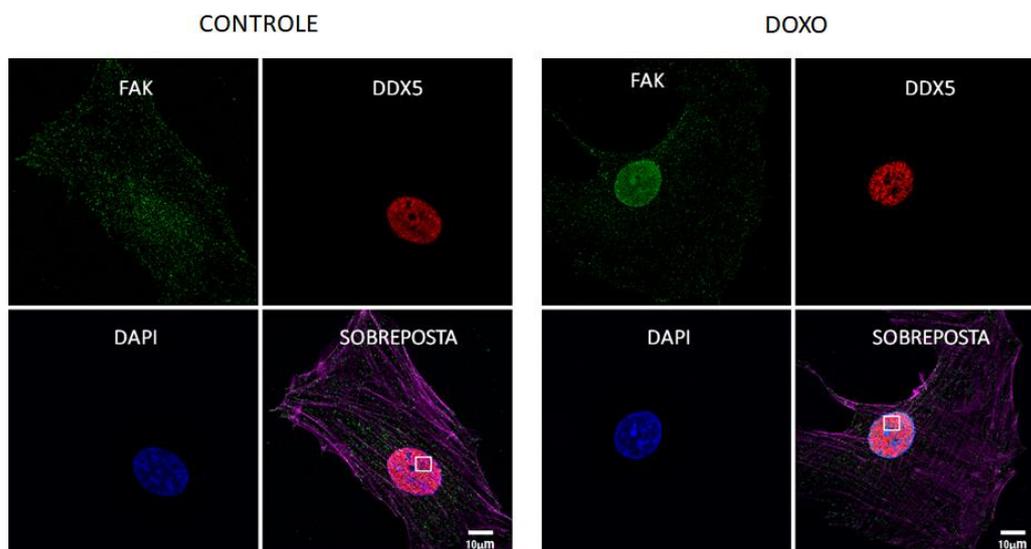


Figura 04. Célula H9C2 controle e tratada com doxorubicina. Imagens representativas de microscopia SR-SIM, geradas pela sobreposição de planos. Nas imagens representativas, FAK está marcada em verde (canal 488 nm), o DNA em azul (canal 405nm), DDX5 em vermelho (546nm) e o citoesqueleto de actina em magenta (647 nm).

Foram selecionados os núcleos de duas células de cada grupo para uma melhor visualização da distribuição nuclear dessas proteínas (Figura 05):

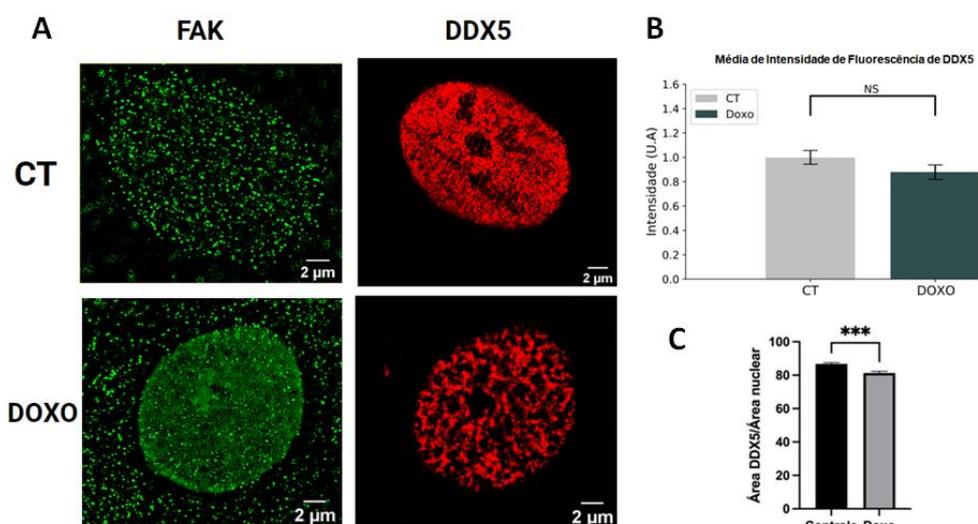


Figura 05. A. Núcleos de células H9C2 controle e tratadas com doxorubicina. Imagens representativas de microscopia SR-SIM, geradas pela sobreposição de planos. Nota-se o aumento de intensidade de fluorescência de FAK quando tratada com doxo e redistribuição subnuclear de DDX5 após estresse genotóxico. B. Gráfico em barras representa a quantificação de DDX5 nuclear em células controle (CT) e tratadas com doxo. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. C. Porcentagem de ocupação de DDX5 no núcleo de células controle e tratadas

com doxorrubicina. Gráfico da área de DDX5 sobre a área nuclear das células controle e tratadas com doxo.

Após as análises de imagem realizadas, iniciamos uma interpretação estatística com um número de 10 células controle e 9 células tratadas com doxo. De acordo com a Figura 05 B, ao analisar a intensidade de fluorescência média de DDX5 no núcleo, não houve diferença estatística entre ambos os grupos levantados. Assim como no caso da FAK, esses dados fornecem evidências que não haja um aumento na expressão de DDX5, mas sim sua redistribuição subnuclear para as áreas de dano no DNA.

Dando sequência às análises sobre a DDX5, foi feita uma interpretação estatística sobre essa redistribuição subnuclear e possível retração proteica, podendo ser visto na Figura 05 C. Nota-se que após o tratamento de Doxo a área coberta por DDX5 na região nuclear é menor que área coberta no núcleo das células controle, corroborando a ideia já trazida anteriormente sobre sua realocação para regiões do DNA em estresse genotóxico.

Para dar embasamento aos objetivos, selecionamos uma pequena região nuclear nas imagens sobrepostas da Figuras 04 (áreas de 2.5 X 2.5 microns), e projetamos todas as fatias tanto da célula controle quanto tratada (Figura 06). Desse modo conseguimos verificar que a realocação da DDX5 é acompanhada pela FAK de maneira global, um importante indício de co-localização e possível atuação conjunta para manter a célula saudável.

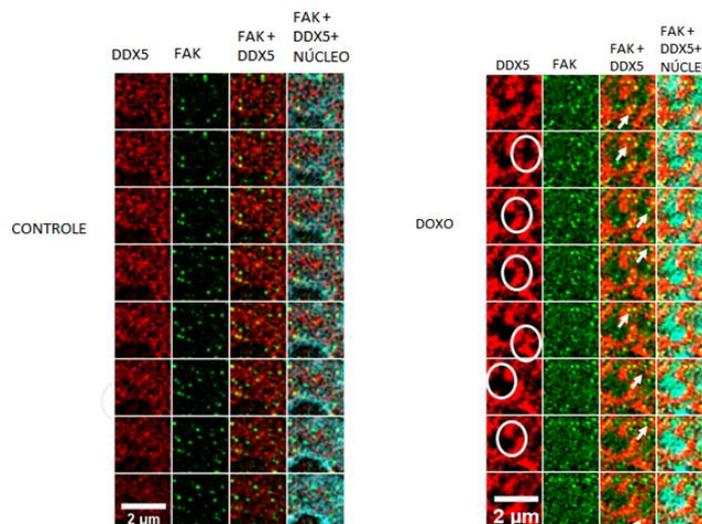


Figura 06. Planos Z Stack da célula controle e tratado com Doxo. Nota-se nos círculos a redistribuição nuclear e nas pontas das setas uma aparente aproximação entre as proteínas, denotando atividade conjunta de FAK e DDX5 para sobrevivência celular.

Pelas imagens da Figura 06 é possível observar que FAK e DDX5 possuem pontos de co-localização no núcleo em qualquer *slice* analisado, tanto em células controles quanto

tratadas com DOXO. Contudo, nas células tratadas com DOXO, a DDX5 apresenta uma distribuição mais concentrada em pontos distintos, não observados nas células controle (Círculos da Figura 06). Esse dado é um indício que a DDX5 e a FAK estão participando ativamente da atividade de reparo ao dano no DNA.

5.3 Segundo Objetivo: Verificar se FAK colocaliza com XRCC5 em células controle e tratadas com doxorrubicina, por microscopia SR-SIM

Como segunda proteína de reparo ao dano, XRCC5, demos sequência ao projeto desenvolvido. Mantivemos os parâmetros com exceção do tempo de exposição da doxorrubicina: de 12 horas da DDX5 para 24 horas da XRCC5. Foram utilizadas 12 células controle e 9 tratadas com o quimioterápico, sendo selecionada 1 célula de cada grupo, respectivamente, evidenciada pela Figura 07.

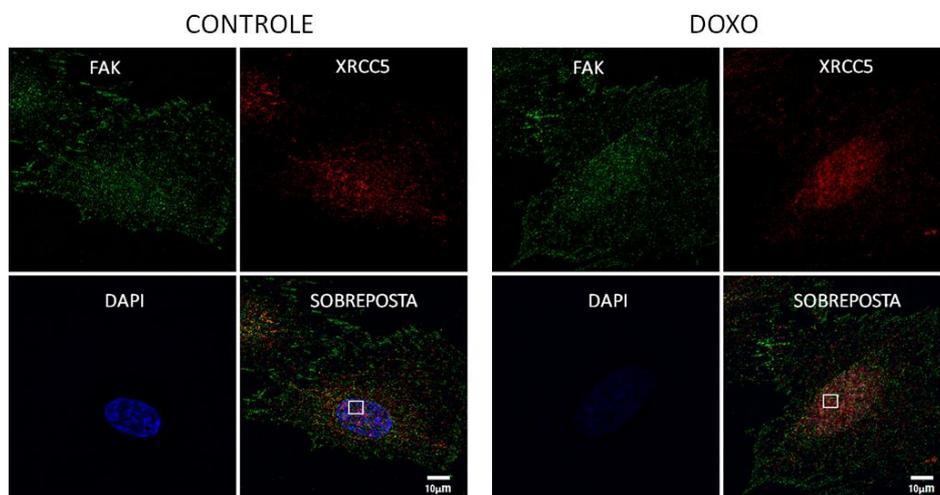


Figura 07. Células H9C2 controle e tratada. Imagens representativas de microscopia SR-SIM, geradas pela sobreposição de planos. Nas imagens representativas, FAK está marcada em verde (canal 488 nm), o DNA em azul (canal 405nm) e XRCC5 em vermelho (546nm).

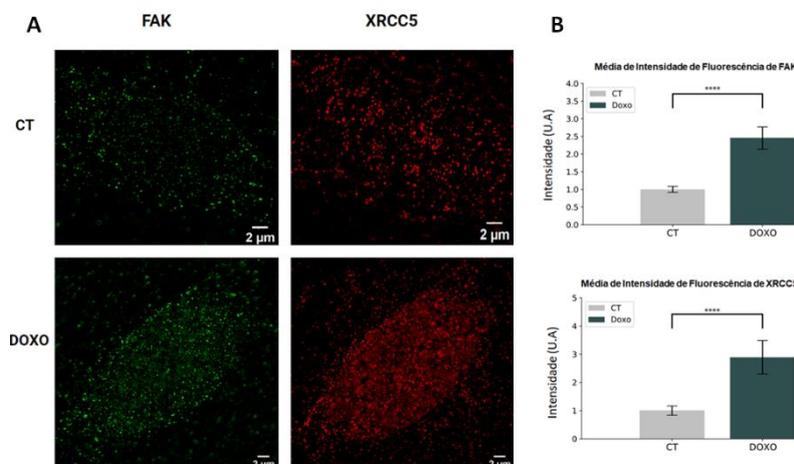


Figura 08. A. Núcleos de células H9C2 controle e tratadas com doxorrubicina. Nota-se o aumento de intensidade de fluorescência de FAK e XRCC5 quando tratada com doxo. B.

Gráfico em barras representa a quantificação de FAK e XRCC5 nuclear em células controle (CT) e tratadas com doxo. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Após aproximação do núcleo de ambas as células, Figura 08 A, nota-se um aumento significativo de intensidade de fluorescência tanto pelo canal da FAK quanto pela XRCC5, após estresse genotóxico pela doxorubicina.

Pela análise estatística conjunta, demonstrada na Figura 08 B, fica evidenciado que a intensidade que ocorre no canal da XRCC5 apresenta significância. Fato esse corrobora a ideia de que o estresse induz um aumento da redistribuição dessa proteína, com aumento de concentração de XRCC5, podendo ser visualizadas pela Figura 09, feita após aproximação nuclear visualizado pela Figura sobreposta 07, possivelmente com atuação em regiões de sofrimento decorrente da doxorubicina. Outro fato que merece destaque é que as áreas de maior concentração de XRCC5 são acompanhadas pela distribuição aparentemente próxima de FAK nos slices apresentados, indicativo e preditor de atuação conjunta para sobrevivência celular.

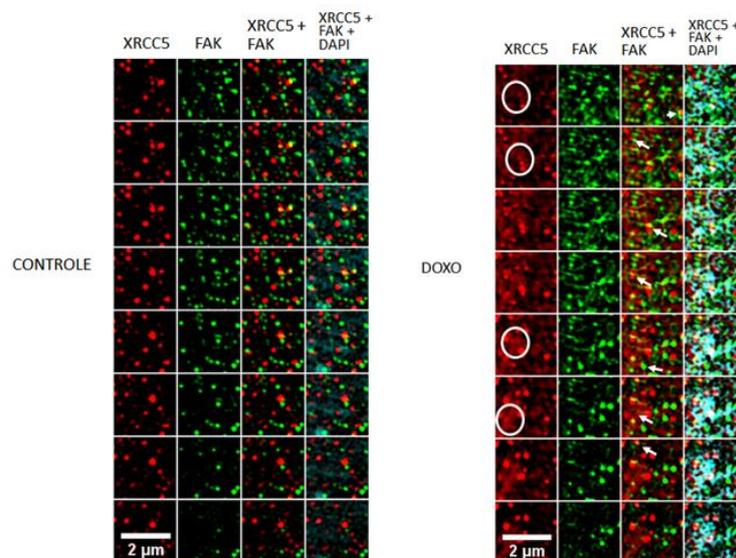


Figura 09. Projeções das fatias nucleares de célula controle e tratado com Doxo. Nota-se nos círculos o aumento de concentração de XRCC5 e nas pontas das setas uma aparente aproximação entre as proteínas, denotando atividade conjunta de FAK e XRCC5 para sobrevivência

Ao se aproximar uma fatia de cada grupo da Figura 09 em que há sobreposição dos canais de FAK e XRCC5 nota-se pelas setas direcionadas na Figura 10 a seguir uma aproximação significativa entre ambas as proteínas quando comparadas com a célula controle,

demonstrando uma atuação simultânea após estresse genotóxico, provavelmente promovendo a sobrevivência celular.

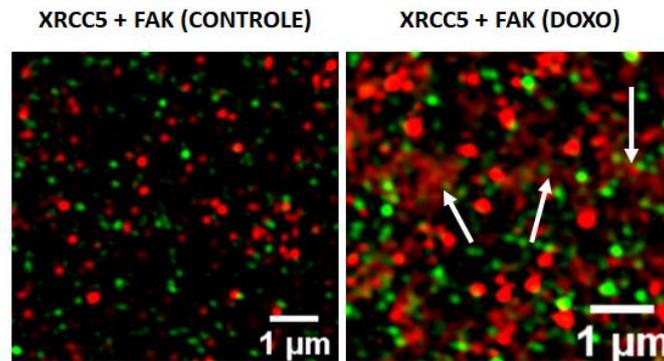


Figura 10. Região nuclear com sobreposição entre os canais FAK e XRCC5 em células controle e tratadas. Nas pontas das setas é possível visualizar possível interação e atuação conjunta das proteínas.

5.4 Verificar se FAK colocaliza com DNA-PK em células controle e tratadas com doxorubicina, por microscopia SR-SIM

Como terceira e última proteína de reparo ao dano analisada nesse projeto, DNA-PK, demos sequência ao trabalho desenvolvido. Utilizamos como parâmetros o tempo de exposição da doxorubicina de 12 horas. Foram utilizadas 14 células controle e 15 tratadas com o quimioterápico, sendo selecionada 1 célula de cada grupo, respectivamente, evidenciada pela Figura 11.

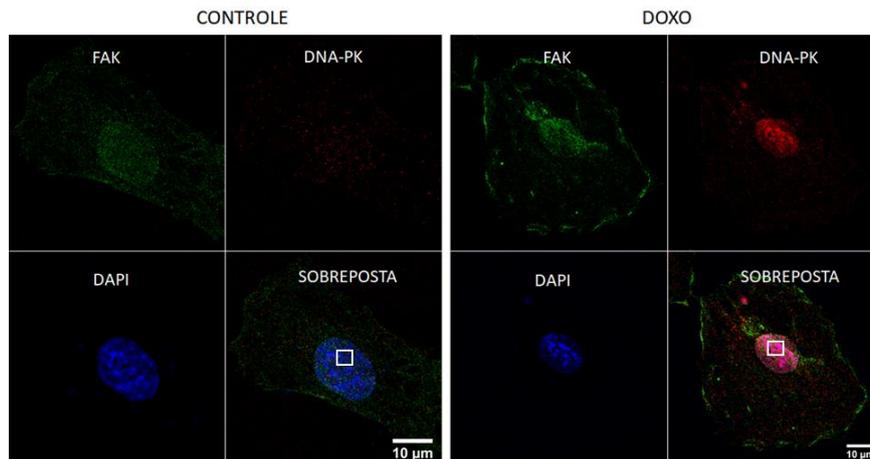


Figura 11. Célula H9C2 controle e tratada com doxorubicina. Imagens representativas de microscopia SR-SIM, geradas pela sobreposição de planos. Nas imagens representativas, FAK está marcada em verde (canal 488 nm), o DNA em azul (canal 405nm) e DNA-PK em vermelho (546nm).

Após aproximação do núcleo de ambas as células, Figura 12 A, nota-se um aumento significativo de intensidade de fluorescência apenas no canal de DNA-PK, após estresse genotóxico pela doxorubicina. Nesta, o ganho de intensidade nuclear fica evidenciado pelas nuvens proteicas sobre o material genético lesado pelo quimioterápico. Pela análise estatística conjunta, demonstrada na Figura 12 B, fica evidenciado que a intensidade que ocorre no canal da DNA-PK apresenta significância. Por outro lado, houve uma leve diminuição da intensidade de FAK, neste caso, porém sem significância estatística entre os dados.

Adiante, ao serem analisados os *slices* da área sobreposta da Figura 11, as pranchas Controle e Doxo, demonstradas na Figura 13, mostram um ganho significativo de intensidade de DNA-PK em todas as fatias no grupo tratado. Além disso, a formação de regiões de aumento de concentração de DNA-PK é acompanhada pela distribuição aparentemente próxima de FAK nos *slices* apresentados, importante fator que denota um possível trabalho conjunto das proteínas.

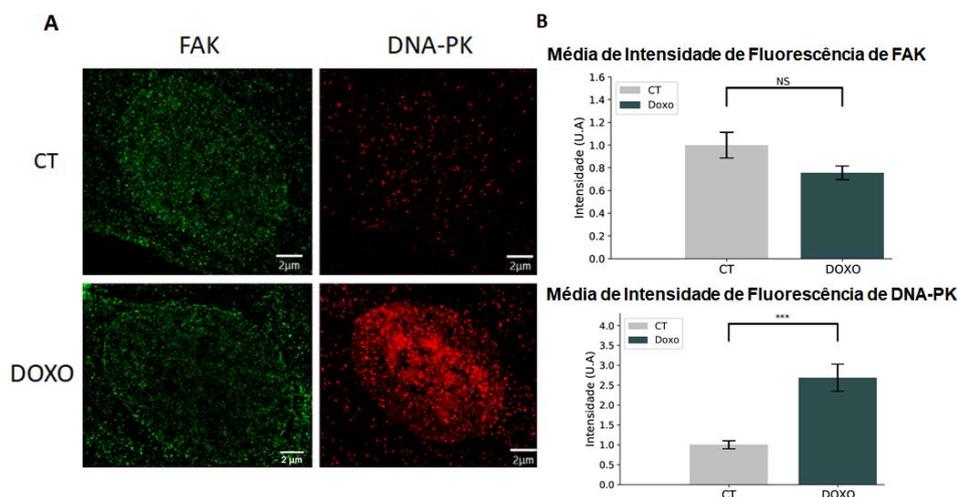


Figura 12. A. Núcleos de células H9C2 controle e tratadas com doxorubicina. Imagens representativas de microscopia SR-SIM, geradas pela sobreposição de planos. Nota-se o aumento de intensidade de fluorescência de DNA-PK quando tratada com doxo. B. Gráfico em barras representa a quantificação de FAK e DNA-PK nuclear em células controle (CT) e tratadas com doxo. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

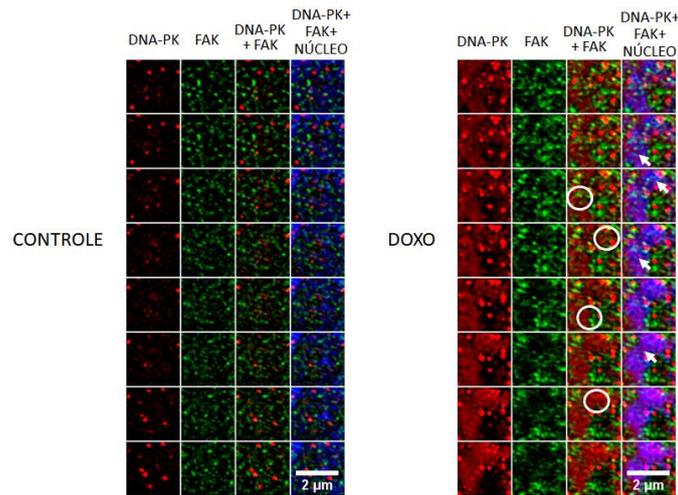


Figura 13. Projeções das fatias nucleares de célula controle e tratado com Doxo. Nota-se nos círculos as regiões de aproximação entre as proteínas e nas setas a atuação das proteínas sobre o DNA agredido pelo quimioterápico, importante evidência de atividade conjunta de FAK e DNA-PK para sobrevivência celular.

Quando se aproxima uma área nuclear dos miócitos controle e tratado com Doxo, como feito na Figura 14. É possível verificar que diferentemente das imagens do grupo controle (D,E e F) a imagem A apresenta uma aproximação entre DNA-PK (vermelho) e FAK (verde) que é aparente e visível. De modo consonante, a imagem B revela DNA-PK distribuída sobre o material genético (azul). Por fim a sobreposição de todos os canais, exemplificados na imagem C, sugerem uma ação simultânea das proteínas sobre o DNA.

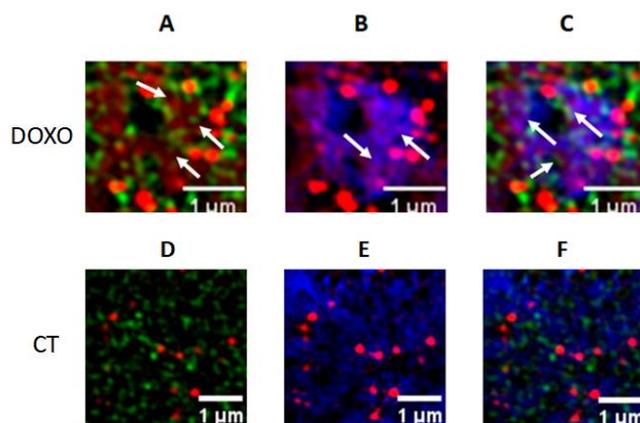


Figura 14. Áreas nucleares de célula controle e tratado com Doxo. Nota-se pelas setas, áreas de atuação conjunta de FAK e DNA-PK sobre o material genético lesado.

6. DISCUSSÃO

6.1 Redistribuição de FAK e pFAK após estresse genotóxico com Doxorubicina

Nos últimos anos, diversos estudos vêm destacando a importância da FAK diante a sobrevivência de miócitos cardíacos. Desse modo, uma compreensão profunda e minuciosa

desta quinase e dos seus mecanismos moleculares são fundamentais para obtenção de um melhor entendimento do processo de estresse sofrido pela célula. Através do presente trabalho, foi demonstrado que FAK e pFAK após tratamento da célula com doxorubicina, estas aumentam sua redistribuição dentro do núcleo. Além disso, esse fato também é corroborado pela análise estatística confirmatória desse acréscimo. Esses dados sugerem uma atuação dessa quinase diante o sofrimento celular gerado pelo tratamento com o quimioterápico. Além disso, ao analisar as imagens anteriores juntamente com dados de *Western Blot* (WB) do nosso laboratório (Figura 03), chegamos a conclusão que não há aumento de expressão de FAK e de fosforilação pFAK, mas sim aumento da redistribuição de ambas no núcleo de células tratadas com doxo.

6.2 Interação FAK/ DDX5 promove redistribuição subnuclear da proteína de resposta ao dano do DNA e possível co-localização

Experimentos realizados no presente estudo, analisaram uma possível interação entre FAK e as proteínas de resposta ao dano do DNA. O tratamento de doxorubicina provocou um aumento de redistribuição de FAK, entretanto não houve diferença de intensidade de fluorescência significativa de DDX5 entre células controle e DOXO, mas apenas uma redistribuição subnuclear dessa proteína. Desse modo, conseguimos medir que houve uma retração, onde acreditamos que sejam os sítios de dano no DNA. Com essa realocação proteica, acredita-se que esse efeito possa estar relacionado aos focos de DNA com maior sobrecarga genotóxica. Interessante que quando as regiões nucleares foram aproximadas, nota-se um nítido e relevante acompanhamento de FAK sobre as aglomerações de DDX5. Tal fato, delata uma possível co-localização e ação conjunta sobre o dano nuclear causado pela doxorubicina.

Por fim, ao analisarmos do ponto de vista estatístico essa redistribuição de DDX5 e a sua retração sobre a área nuclear após o uso de doxorubicina, nota-se a significativa alteração entre o grupo controle e tratado. Desse modo, nota-se que o processo de redistribuição tem atuação na sobrevivência celular e funcional do miócito

6.3 Interação FAK/ XRCC5 promove aumento da fluorescência da proteína de resposta ao dano do DNA e possível co-localização

Como segunda proteína de resposta ao dano do DNA analisada neste trabalho, a XRCC5 apresentou comportamento distinto da DDX5. Quando submetida ao estresse com DOXO, observou-se um aumento da concentração dessa proteína no núcleo, confirmado pela análise estatística. Neste trabalho foi notado que nas células tratadas houve a formação de áreas de maior concentração de XRCC5 em que é visualizado aproximação significativa com FAK,

demonstrando uma possível atuação simultânea durante o reparo ao dano do DNA, em prol da sobrevivência celular.

6.4 Interação de FAK/ DNA-PK e aparente aproximação ocorre após estresse genotóxico com Doxorrubicina

Ao ser analisada a última proteína de reparo, a DNA-PK apresentou aumento de intensidade de fluorescência em torno de 250% do grupo tratado em comparação ao controle. Além disso, uma possível co-localização entre FAK e DNA-PK pode ser visualizada sobre o material genético do miócito tratado com Doxo, demonstrando atuação mútua contra a genotoxicidade do quimioterápico.

7. CONCLUSÃO

A tirosina quinase de adesão focal (FAK) é sensível ao estresse genotóxico com Doxorrubicina. A interação FAK/Proteínas de reparo ao dano do DNA mostrou um indicativo de atuação conjunta sobre a sobrevivência celular do miócito cardíaco. Além disso, foi verificado que houve situações de aparente aproximação entre essas proteínas, sugestivo de co-localização.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] D. Cappetta, A. De Angelis, L. Sapio, L. Prezioso, M. Illiano, F. Quaini, F. Rossi, L. Berrino, S. Naviglio, and K. Urbanek, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017, 1 (2017).
- [2] S. H. Armenian, C. Lacchetti, A. Barac, J. Carver, L. S. Constine, N. Denduluri, S. Dent, P. S. Douglas, J.-B. Durand, M. Ewer, C. Fabian, M. Hudson, M. Jessup, L. W. Jones, B. Ky, E. L. Mayer, J. Moslehi, K. Oeffinger, K. Ray, K. Ruddy, and D. Lenihan, *Journal of Clinical Oncology* 35, 893 (2017).
- [3] J. L. Zamorano, P. Lancellotti, D. Rodriguez Muñoz, V. Aboyans, R. Asteggiano, M. Galderisi, G. Habib, D. J. Lenihan, G. Y. H. Lip, A. R. Lyon, T. Lopez Fernandez, D. Mohty, M. F. Piepoli, J. Tamargo, A. Torbicki, and T. M. Suter, *European Heart Journal* 37, 2768 (2016).
- [4] A. M. Santos et al., "FERM domain interaction with myosin negatively regulates FAK in cardiomyocyte hypertrophy," (in eng), *Nat Chem Biol*, vol. 8, no. 1, pp. 102-110, Jan 2012, doi: 10.1038/nchembio.717.
- [5] Ceccarelli, D.F., Song, H.K., Poy, F., Schaller, M.D., and Eck, M.J. (2006). Crystal structure of the FERM domain of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 281, 252-259.
- [6] Lietha, D., Cai, X., Ceccarelli, D.F., Li, Y., Schaller, M.D., and Eck, M.J. (2007). Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase. *Cell* 129, 1177-1187.