



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica

LETICIA TUZI LEOPOLDO

INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE CENP-A NA FACILITAÇÃO DO
REPARO DE DNA PROMOVIDA PELA HJURP

Araraquara, SP
2024

LETICIA TUZI LEOPOLDO

**INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE CENP-A NA FACILITAÇÃO DO
REPARO DE DNA PROMOVIDA PELA HJURP**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutica Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Valeria Valente
Coorientadora: Dra. Geovana Navegante

Araraquara, SP

2024

L587i

Leopoldo, Leticia Tuzi.

Investigação do envolvimento de CENP-A na facilitação do reparo de DNA promovida pela HJURP / Leticia Tuzi Leopoldo. – Araraquara, 2024.
67 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Farmácia Bioquímica) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Valeria Valente.

Coorientadora: Geovana Navegante.

1. Glioblastoma. 2. HJURP. 3. CENP-A. 4. Reparo de DNA. I. Valente, Valeria, orient. II. Navegante, Geovana, coorient. III. Título.

LETICIA TUZI LEOPOLDO

**INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE CENP-A NA FACILITAÇÃO DO
REPARO DE DNA PROMOVIDA PELA HJURP**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Bacharela em Farmácia.

Data da defesa: 10/12/2024

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Valeria Valente
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Doutoranda Adriana Fernandes de Deus
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Prof. Dr. Carlos Antônio Couto Lima
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, a quem agradeço profundamente por todo o esforço e incentivo ao me mostrarem que o estudo é o caminho por meio do qual realidades são transformadas e sonhos se concretizam. Aprender é um processo contínuo, e com vocês, tenho aprendido a cada dia a ser uma pessoa e profissional melhor. Minha eterna gratidão a vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, reforço minha gratidão aos meus pais que sempre estiveram ao meu lado durante minha trajetória, sempre fazendo o impossível para que meus sonhos fossem possíveis. Os melhores incentivadores e torcedores do meu sucesso, assim como meu principal ponto de apoio e segurança nas fases difíceis. Espero honrá-los e orgulhá-los por toda a minha vida.

Também agradeço profundamente às minhas irmãs, que sempre foram um exemplo para mim. Seja pela garra, criatividade e empatia da minha irmã Leidiany, ou pelo exemplo em seguir a carreira de Farmacêutica pela Michely (ver você de jaleco, contando histórias sobre remédios e coelhos da faculdade me brilhavam aos olhos, obrigada por ser minha inspiração). Nós três fizemos parte da UNESP, e não há orgulho maior de fazer parte deste trio. Amo vocês!

Minha trajetória na UNESP não teria sido a mesma se eu não tivesse os melhores amigos do mundo ao meu lado: Maiara, Mariana, Marcio, Fernando e Juliana. Vocês foram o suspiro em meio ao caos, a minha alegria de todos os dias e os responsáveis por fazer essa jornada ficar gravada em meu coração para sempre. Nunca vou esquecer vocês e mal posso esperar pelas próximas etapas que iremos viver juntos.

Agradeço imensamente a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (professores, alunos e funcionários), encontrei um mundo novo nesse lugar e me apaixonei por cada cantinho dele. É impressionante cada pesquisa e cada vitória que vocês proporcionam à população. Obrigada por serem tão acolhedores e empáticos, realmente comprometidos com a qualidade do ensino e com a formação dos profissionais que nos tornaremos. Sou grata também pelas extensões acadêmicas que me permitiram crescer em áreas que eu jamais imaginaria, mas que fizeram toda a diferença na minha carreira.

Ao laboratório de Biologia Celular da FCFAr, meus sinceros agradecimentos! Tenho profunda admiração pela minha orientadora, Prof. Dra. Valeria Valente, de inteligência e didática ímpar, além de um coração gigante, obrigada por me apresentar ao mundo científico fascinante e torná-lo tão legal para mim. Agradeço também à minha co-

orientadora, que me ensinou absolutamente tudo sobre os experimentos e rotina durante nossa estreita convivência no laboratório. Sua amizade fez toda a diferença na minha trajetória, e sou eternamente grata pelos conselhos e pelas risadas compartilhadas. Vocês estarão sempre no meu coração. Para encerrar, não poderia deixar de agradecer ao Pedro Baracat, também estudante no laboratório, você é incrível e sou grata pela amizade que construímos juntos, seu sucesso é inevitável e espero acompanhá-lo de perto.

Finalmente, agradeço o financiamento do presente trabalho pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), com o processo nº 2020/09013-1.

RESUMO

Os gliomas representam os tumores cerebrais primários mais comuns, sendo que o glioblastoma (GB) é considerado o mais agressivo e letal, caracterizado pela alta resistência das células tumorais aos tratamentos e pela capacidade de recidiva, resultando em uma expectativa de vida média de apenas 14 meses após o diagnóstico. Um fator importante para a gravidade do GB é a expressão elevada da proteína HJURP, anteriormente associada ao pior prognóstico e à resistência à radiação ionizante. HJURP é amplamente reconhecida por sua função como chaperona da variante centromérica da histona H3, CENP-A. HJURP é fundamental para a incorporação de CENP-A nos centrômeros, o que favorece a descompactação da cromatina e contribui para a formação de cinetócoros funcionais. Além disso, estudos recentes indicam que HJURP atua no reparo de quebras de dupla-fita do DNA, facilitando o processo de descompactação da cromatina nas regiões lesionadas. No entanto, o papel da CENP-A nessa resposta permanece incerto. O objetivo deste trabalho foi investigar se a CENP-A é necessária para a função de reparo mediada pela HJURP. Inicialmente, avançamos em várias etapas experimentais essenciais para a investigação dessa questão. Foram definidas e padronizadas as sequências mais adequadas de siRNA para o silenciamento do CENP-A. A eficiência do silenciamento foi verificada por qRT-PCR e *western blot*, confirmando a supressão da proteína CENP-A com a manutenção de altos níveis de HJURP. Em seguida, foi padronizado o uso de bleomicina para induzir quebras de dupla-fita de DNA (DSBs) em níveis adequados e sem causar morte excessiva das células. A padronização bem-sucedida deste sistema experimental viabilizou explorar a participação da CENP-A no reparo de DNA promovido por HJURP. Para isso, foi realizada a cinética de restauração de DSBs induzidas por bleomicina, utilizando o ensaio do cometa. Os resultados indicaram que a superexpressão da HJURP contribui para uma redução significativa nos DSBs, especialmente após 6 horas, demonstrando que a HJURP favorece um reparo mais eficiente do DNA. Curiosamente, o silenciamento de CENP-A não impactou significativamente na porcentagem de DSBs reparados, indicando que CENP-A não é essencial para o processo de reparo facilitado pela HJURP. Essas descobertas foram corroboradas por experimentos de *western blot* que analisaram a fosforilação de H2AX (γ H2AX), um marcador de sinalização de dano ao DNA. Os níveis de γ H2AX foram reduzidos em células superexpressoras de HJURP, confirmando seu papel no processamento das lesões. Importaneamente, os resultados também sugeriram que a presença CENP-A não interfere na capacidade de processamento e reparo de lesões executada pela HJURP, pois células silenciadas ou não para CENP-A não mostraram diferenças na quantidade de γ H2AX. Além disso, foi observada uma indução inesperada na expressão de HJURP em algumas condições experimentais, o que pode estar relacionado ao silenciamento de CENP-A e ao insulto com bleomicina, um achado que merece investigação adicional. Concluindo, os resultados sugerem que a HJURP desempenha um papel central no reparo de DSBs em GB, enquanto a CENP-A parece não ser necessária para essa função. Esses dados avançam no entendimento da dinâmica entre HJURP e CENP-A, com implicações potenciais para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas voltadas para a sensibilidade das células de GB à radioterapia.

Palavras-chave: glioblastoma; HJURP; CENP-A; reparo de DNA.

ABSTRACT

Gliomas represent the most common primary brain tumors, with glioblastoma (GB) considered the most aggressive and lethal, characterized by high resistance of tumor cells to treatments and a tendency to recur, resulting in an average life expectancy of only 14 months after diagnosis. An important factor contributing to the severity of GB is the elevated expression of the HJURP protein, previously associated with a poorer prognosis and resistance to ionizing radiation. HJURP is widely recognized for its role as a chaperone of the centromeric histone H3 variant, CENP-A. HJURP is crucial for the incorporation of CENP-A into centromeres, promoting chromatin decompaction and contributing to the formation of functional kinetochores. Additionally, recent studies indicate that HJURP plays a role in repairing DNA double-strand breaks (DSBs), facilitating chromatin decompaction in damaged regions. However, the role of CENP-A in this response remains unclear. This study aimed to investigate whether CENP-A is required for HJURP-mediated repair function.

Initially, we advanced through several experimental steps essential to investigate this question. The most suitable siRNA sequences for CENP-A silencing were identified and standardized. Silencing efficiency was verified by qRT-PCR and western blot, confirming CENP-A protein suppression while maintaining high HJURP levels. Next, the use of bleomycin was standardized to induce DNA double-strand breaks at appropriate levels without causing excessive cell death. The successful standardization of this experimental system enabled exploration of CENP-A's involvement in HJURP-promoted DNA repair. To this end, we performed a kinetic analysis of bleomycin-induced DSB restoration using the comet assay.

Results indicated that HJURP overexpression contributes to a significant reduction in DSBs, particularly after 6 hours, demonstrating that HJURP facilitates more efficient DNA repair. Interestingly, CENP-A silencing did not significantly impact the percentage of repaired DSBs, suggesting that CENP-A is not essential for HJURP-facilitated repair. These findings were corroborated by western blot experiments analyzing H2AX phosphorylation (γ H2AX), a marker of DNA damage signaling. γ H2AX levels were reduced in HJURP-overexpressing cells, confirming its role in processing lesions. Importantly, the results also suggested that the presence of CENP-A does not interfere with HJURP's processing and repair capabilities, as cells with or without CENP-A silencing showed no differences in γ H2AX levels. Furthermore, an unexpected increase in HJURP expression was observed under certain experimental conditions, potentially related to CENP-A silencing and bleomycin insult, a finding that warrants further investigation.

In conclusion, the results suggest that HJURP plays a central role in DSB repair in GB, while CENP-A appears to be unnecessary for this function. These data advance our understanding of the dynamics between HJURP and CENP-A, with potential implications for the development of new therapeutic strategies aimed at increasing GB cell sensitivity to radiotherapy.

Keywords: glioblastoma; HJURP; CENP-A; DNA repair.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Recrutamento de HJURP e CENP-A em regiões de quebras de dupla fita de DNA induzidas por radiação ionizante ou enzimaticamente.....	18
Figura 2 – Investigação do papel de HJURP e CENP-A na sinalização de danos ao DNA em células T98G.....	20
Figura 3 – Curva padrão das reações de verificação de eficiência de amplificação do primer para CENP-A.....	30
Figura 4 – Primeira tentativa de silenciamento de CENP-A na linhagem celular T98G.....	33
Figura 5 – Segunda tentativa de silenciamento de CENP-A na linhagem celular T98G.....	35
Figura 6 – Terceira tentativa de silenciamento de CENP-A na linhagem celular T98G.....	37
Figura 7 – A expressão de HJURP na linhagem T98G após o silenciamento.....	39
Figura 8 – A expressão de CENP-A e HJURP na linhagem T98G após o silenciamento.....	40
Figura 9 – A expressão de CENP-A e HJURP na linhagem T98G após o silenciamento.....	41
Figura 10 – A expressão de HJURP e CENP-A na linhagem T98G-TP e T98G-HJ após o silenciamento.....	45
Figura 11 – A expressão de HJURP e γ H2AX nas linhagens T98G-TP e T98G-HJ após tratamento com bleomicina.....	47
Figura 12 – A fragmentação de DNA nas linhagens T98G-TP e T98G-HJ após tratamento com bleomicina.....	49
Figura 13 – Análise da expressão de CENP-A na linhagem T98G-HJ no período de recuperação de 6 horas.....	50
Figura 14 – Avaliação da fragmentação de DNA nas linhagens T98G-TP e T98G-HJ após o silenciamento de CENP-A e tratamento com bleomicina.....	52
Figura 15 – Análise da expressão de HJURP e γ H2AX nas linhagens T98G-TP e T98G-HJ após silenciamento de CENP-A e tratamento com bleomicina.....	55
Figura 16 – Formação de focos de 53BP1 e γ H2AX na linhagem T98G-HJ após tratamento com bleomicina.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Protocolo de amplificação por RT-PCR quantitativo para detecção de CENP-A, HJURP e HPRT.....	25
Tabela 2 – Padronização da concentração ótima dos <i>primers</i> para CENP-A.....	29
Tabela 3 – Sequências de siRNA direcionadas ao CENP-A.....	31
Tabela 4 – Dados do cálculo das quantidades relativas da primeira tentativa de silenciamento pelo método do 2- $\Delta\Delta$ Ct (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).....	33
Tabela 5 – Eficiências obtidas na primeira tentativa de silenciamento.....	34
Tabela 6 – Dados do cálculo das quantidades relativas da segunda tentativa de silenciamento pelo método do 2- $\Delta\Delta$ Ct (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).....	35
Tabela 7 – Eficiências obtidas na segunda tentativa de silenciamento.....	35
Tabela 8 – Dados do cálculo das quantidades relativas da terceira tentativa de silenciamento pelo método do 2- $\Delta\Delta$ Ct (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).....	37
Tabela 9 – Eficiências obtidas na terceira tentativa de silenciamento.....	38
Tabela 10 – Dados do cálculo das quantidades relativas de CENP-A pelo método do 2- $\Delta\Delta$ Ct (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).....	42
Tabela 11 – Dados do cálculo das quantidades relativas de HJURP pelo método do 2- $\Delta\Delta$ Ct (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).....	43
Tabela 12 – Eficiências obtidas no silenciamento de CENP-A.....	43
Tabela 13 – Expressão de HJURP nas linhagens T98G-TP e T98G-HJ após silenciamento de CENP-A.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATRX	Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked
CDKN1A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1 ^a
CENP-A	Centromere Protein A
CtIP	C-terminal binding protein interacting protein
DAXX	Death-domain associated protein
EMT	epithelial-to-mesenchymal transition
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
H3K4me2	Histone 3, lysine 4, dimethylated
H3K9me3	Histone 3, lysine 9, trimethylated
HCC	Hepatocellular Carcinoma
HJURP	Holliday Junction Recognition Protein
hMSH5	Human MutS Homolog 5
HP1	heterochromatin protein 1
IDH	Isocitrato Desidrogenase
MGMT	O-6-metilguanina-DNA metiltransferase
MRN	MRE11-RAD50-NBS1
NBS1	Nijmegen Breakage Syndrome 1
NHEJ	Non-Homologous End Joining
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
OMS	Organização Mundial da Saúde
p53	tumor protein 53
PARP1	Poly (ADP-ribose) polymerase 1
<i>qRT-PCR</i>	quantitative real-time polymerase chain reaction
RAD51	Radical-Independent 51
RI	radiação ionizante
siRNA	small interfering RNA
TMZ	Temozolomida
TNBC	triple-negative breast câncer
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USP11	Ubiquitin-specific peptidase 11
YAP1	Yes-associated protein 1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVO	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1. Cultura de Células.....	23
4.2. Silenciamento de CENP-A através de transfecção com siRNAs	23
4.2.1 Transfecção convencional.....	23
4.2.2 Transfecção reversa.....	24
4.3. Extração de RNA	24
4.4. RT-PCR quantitativo	25
4.5. Tratamento com bleomicina	26
4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e western blot.....	26
4.7. Ensaio do cometa	27
4.8. Avaliação de focos de proteína envolvida em reparo de DNA através de imunofluorescência	28
5. RESULTADOS.....	28
5.1. Padronização das condições ideais para realização de qRT-PCR com os primers de CENP-A.....	28
5.1.1 Definição da concentração ótima dos <i>primers</i> a ser utilizada.....	28
5.1.2 Avaliação da eficiência de amplificação dos primers	29
5.2. Padronização do silenciamento de CENP-A utilizando RNA de interferência.....	31
5.2.1 Primeira tentativa de silenciamento.....	31
5.2.2 Segunda tentativa de silenciamento	34
5.2.3 Terceira tentativa de silenciamento	36
5.3. Averiguação do silenciamento de CENP-A por western blot na linhagem T98G	38
5.3.1 Primeira tentativa.....	38

5.3.2	Segunda tentativa.....	39
5.3.3	Terceira tentativa.....	40
5.4.	Averiguação do silenciamento de CENP-A por RT-PCR quantitativo nas linhagens T98G-TP e T98G-HJURP	41
5.5.	Averiguação do silenciamento de CENP-A por western blot nas linhagens T98G-TP e T98G-HJURP	43
5.6.	Padronização das condições de tratamento com bleomicina requeridas para a geração de quebras de dupla-fita de DNA.....	45
5.6.1	Análise da fosforilação de H2AX nas linhagens T98G-TP e T98G-HJ após o tratamento com bleomicina	45
5.7.	Ensaio do COMETA nas linhagens T98G-TP e T98G-HJURP após silenciamento de CENP-A e tratamento com bleomicina.....	49
5.8.	Análise da fosforilação de H2AX nas linhagens T98G-TP e T98G-HJURP após o silenciamento de CENP-A e tratamento com bleomicina	54
5.9.	Avaliação da formação de focos de proteínas envolvidas em reparo de DNA através de microscopia de fluorescência	57
6.	DISCUSSÃO	58
7.	CONCLUSÃO	60
8.	REFERÊNCIAS.....	61

1. INTRODUÇÃO

Os astrocitomas são tumores cerebrais que apresentam características morfológicas e imunohistoquímicas que evidenciam diferenciação astrocítica e, portanto, se originam de células progenitoras de astrócitos ou da dediferenciação dos mesmos. Estas células acumulam alterações genéticas que conferem capacidade de proliferação descontrolada e assim permitem o desenvolvimento tumoral. Astrócitos são células do parênquima cerebral que têm funções importantes para manutenção dos neurônios, como: ajustar a concentração de neurotransmissores e íons, oferecer sustentação e nutrição aos neurônios, além de preencher espaços entre as células nervosas. De acordo com as últimas recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2021, os astrocitomas são definidos pela presença de mutação no gene que codifica a proteína IDH (*isocitrate dehydrogenase*), além da ausência de codeleção dos cromossomos 1p/19q. Esses tumores são classificados com base em suas características histológicas e genéticas. Astrocitomas de grau 2, considerados de baixo grau, apresentam uma baixa taxa de divisão mitótica, são bem diferenciados e possuem bordas claramente delimitadas. Em contraste, os tumores de grau 3 ou 4, de alto grau, exibem maior atividade mitótica, anaplasia, regiões de acúmulo celular e células multinucleadas (Whitfield; Huse, 2022). Com a nova classificação, o glioblastoma (GB), anteriormente denominado como astrocitoma de grau IV, agora se refere a tumores com IDH selvagem. Esses tumores se caracterizam por uma elevada taxa mitótica, angiogênese, áreas de necrose e ausência de diferenciação celular.

O GB é considerado o tipo mais frequente, agressivo e letal (Lathia *et al.*, 2015; Stupp *et al.*, 2009) e, geralmente, leva o paciente à óbito em aproximadamente 14 meses após o diagnóstico (Van Meir *et al.*, 2010). O diagnóstico é feito quando pacientes desenvolvem o seguinte quadro clínico: ocorrência de dores de cabeça, convulsões, náuseas, vômitos, distúrbios visuais, sonolência e disfunções cognitivas. Tais sintomas são acarretados pelo aumento de pressão intracraniana (Ricard *et al.*, 2012). Para o tratamento deste tipo de tumor efetua-se a ressecção cirúrgica com a maior extensão possível, seguida de radioterapia e uso de agentes alquilantes. A temozolomida (TMZ), padrão na quimioterapia para astrocitomas e glioblastomas desde 2005, atravessa a barreira hematoencefálica e atua como agente alquilante, metilando purinas e induzindo apoptose. Sua eficácia está relacionada a níveis

reduzidos da proteína MGMT, que reverte o dano causado pela droga (Villalva *et al.*, 2012). Mais recentemente, novas técnicas cirúrgicas, como a neuroendoscopia e a ressecção guiada por fluorescência vêm sendo aplicadas (Van Meir *et al.*, 2010). Contudo, mesmo combinando cirurgia seguida de radioterapia e quimioterapia disponíveis no momento, os tratamentos ainda são paliativos (Ricard *et al.*, 2012). Este quadro deve-se à alta resistência das células tumorais e rápido crescimento de nova massa tumoral, que pode voltar ao tamanho inicial em até 30 dias (Meir *et al.*, 2010).

A caracterização molecular dos tumores vem sendo explorada com o objetivo de aprimorar o diagnóstico e produzir subsídios para a melhor compreensão da biologia tumoral (Jansen; Yip; Louis, 2010). Neste contexto, uma alteração molecular identificada pelo nosso grupo foi a expressão elevada da proteína HJURP (*Holliday junction-recognizing protein*) em astrocitomas de diferentes graus e GB (Valente *et al.*, 2009), que também foi detectada como aumentada em outros tipos de tumores, como pulmão, mama, cérebro, ovário, pâncreas, fígado, bexiga, próstata e colorretal (Cao *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2020; Kato *et al.*, 2007; Lai *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2018; Valente *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2020; Wei *et al.*, 2019). Observamos ainda que os altos níveis de HJURP em astrocitoma estão correlacionados com a menor expectativa de vida dos pacientes, e que a manutenção de sua expressão é essencial para viabilidade de linhagens tumorais (Valente *et al.*, 2013). A HJURP foi originalmente descrita como envolvida em reparo de DNA, devido à detecção de interação com as proteínas hMSH5 e NBS1, que são integrantes do complexo MRN e estão relacionadas ao reparo de quebras de fita dupla no DNA. Além disso, foi constatado que sua supressão induz instabilidade cromossômica e senescência nas células tumorais, e que o tratamento com agentes que causam dano em DNA promove um aumento significativo no seu nível de expressão (Kato *et al.*, 2007). Mais recentemente, um estudo avaliou a relação entre a integridade centromérica e o processo de segregação cromossômica de maneira adequada durante a divisão celular. Sucintamente, o grupo demonstrou que as quebras de DNA na região centromérica durante G1 recrutam a maquinaria de recombinação homóloga. Foi observado que HJURP e CENP-A são recrutadas para os locais de dano e permitem uma sucessão de eventos que proporcionam o licenciamento da recombinação homóloga em G1 com o objetivo de prevenir o disparo da instabilidade centromérica (Yilmaz *et al.*, 2021). Foi visto ainda que a marca epigenética H3K4me2,

caracterizada como marcador de cromatina ativa e importante para a estabilidade do genoma (House; Koch; Freudenreich, 2014), é essencial para este processo (Yilmaz *et al.*, 2021).

Além disso, outros estudos destacaram HJURP como um importante fator no processo de oncogênese em diferentes tipos de tumor. No contexto do câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), foi demonstrado que a maior expressão de HJURP está relacionada aos estágios mais avançados do tumor, além do pior prognóstico e metástase à distância (Wei *et al.*, 2019). Por outro lado, a redução da expressão de HJURP, suprimiu a proliferação, migração, o progresso da transição epitelial-mesenquimal (EMT) e induziu a apoptose celular (Wei *et al.*, 2019). A EMT é um importante mecanismo envolvido no desenvolvimento embrionário e na reparação de tecidos, desempenhando um papel fundamental no processo inicial de metástase das células cancerígenas (Singh *et al.*, 2018). Esses comportamentos decorrem do fato de que a HJURP é necessária para a expressão de β -catenina, ciclina D1, c-myc, vimentina e N-caderina e sugerem o papel promotor de HJURP na progressão de tumores em NSCLC (Wei *et al.*, 2019). Já no carcinoma hepatocelular (HCC), foi demonstrado que altos níveis de HJURP podem modular o ciclo celular ao reduzir a expressão de p21 por meio da ubiquitinação, facilitando assim a progressão do ciclo celular (Chen *et al.*, 2018). Em câncer de mama triplo-negativo (TNBC), HJURP inibe a ubiquitinação de YAP1 (Mao *et al.*, 2022), sendo que esta proteína é um importante regulador transcricional e participa de importantes processos biológicos dos tumores (Jiang K, 2020), como consequência HJURP/YAP1 promovem a proliferação celular e sensibilidade à quimioterapia (Mao *et al.*, 2022). Além disso, em câncer de próstata foi evidenciado que HJURP pode ativar a degradação proteossomal dependente de ubiquitina da proteína CDKN1A (Lai *et al.*, 2021), que é um fator crítico para a transição de fase G1/S (Abbas; Dutta, 2009) e promove a proliferação de células do câncer de próstata (Lai *et al.*, 2021). Esses dados indicam que HJURP tem funções potenciais no processo oncogênico e no reparo de DNA. No entanto, o entendimento dos mecanismos pelos quais HJURP atua na resposta ao dano ao DNA, no reparo e na progressão do câncer ainda é limitado.

Essa proteína possui ainda outra função, que está mais consolidada na literatura, atuando como chaperona de CENP-A, uma variante de histona H3 que determina epigeneticamente a região centromérica (Barnhart *et al.*, 2011; Dunleavy *et al.*, 2009; Foltz *et al.*, 2009). Isto significa que a HJURP é um fator fundamental para a deposição

e manutenção de CENP-A em centrômeros (Dunleavy *et al.*, 2009; Ohzeki *et al.*, 2016; Foltz *et al.*, 2009), sendo esta incorporação finamente regulada através do ciclo celular (Foltz *et al.*, 2009; Müller *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2015). Durante a fase S do ciclo celular, CENP-A é igualmente distribuída entre as cromátides irmãs, resultando em uma redução pela metade da capacidade de ocupação em cada cromátide. No início da fase G1, essa quantidade é restaurada, com CENP-A sendo incorporada novamente aos nucleossomos centroméricos (Dunleavy *et al.*, 2009; Foltz *et al.*, 2009). A deposição de CENP-A mediada por HJURP é regulada através de fosforilação promovida pelas CDKs 1/2. Quando ativas, essas quinases fosforilam CENP-A e HJURP, impedindo sua interação (Müller *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2015). No entanto, ao final da mitose, a atividade de CDK é reduzida, permitindo a desfosforilação de CENP-A e HJURP. Com isso, as proteínas voltam a interagir, resultando no carregamento de CENP-A na cromatina centromérica, um processo mediado por HJURP (Müller *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2015).

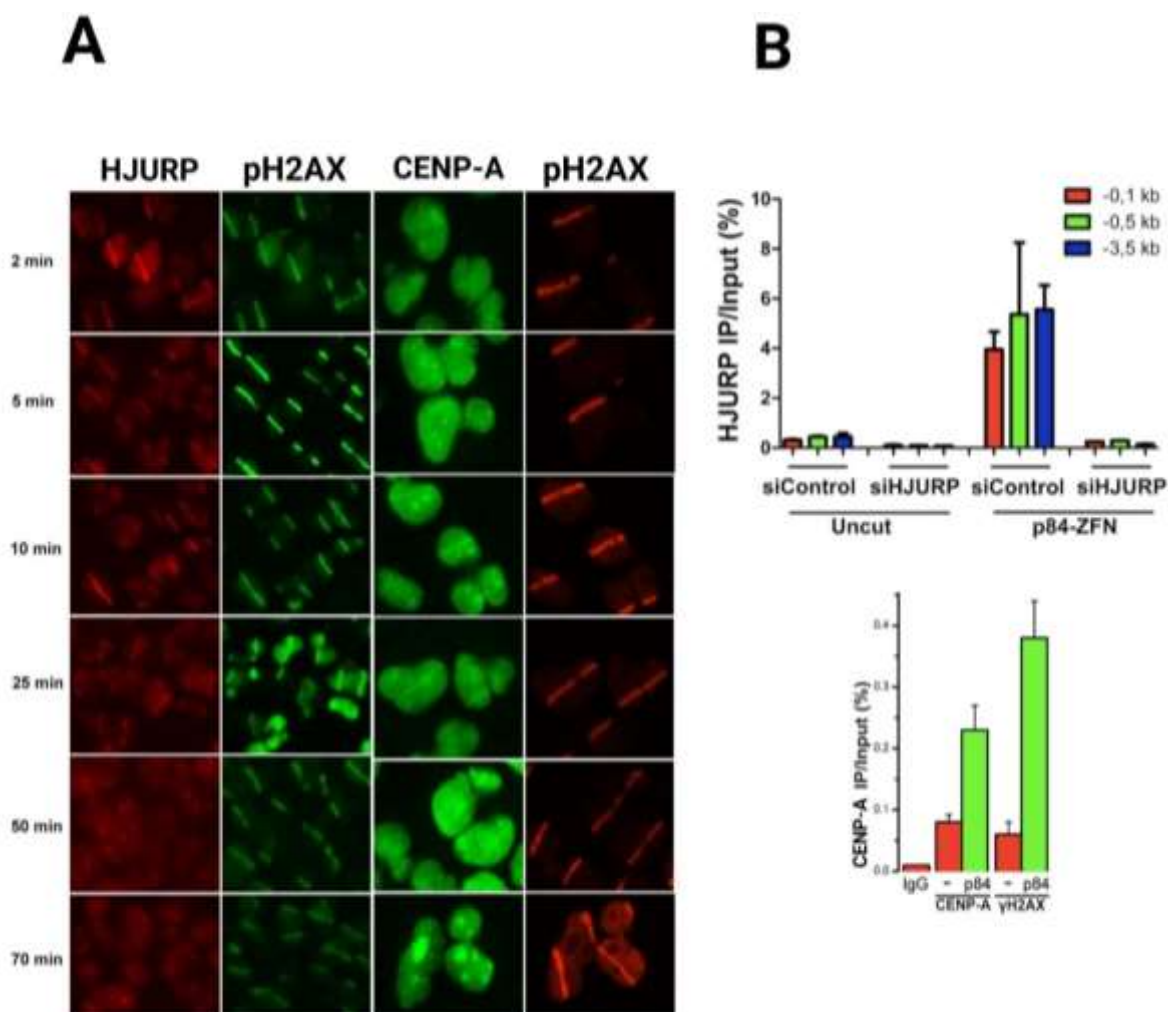
Após sua incorporação, CENP-A proporciona o ancoramento das proteínas do cinetócoro. Tal estrutura medeia a ligação com os microtúbulos e segregação das cromátides irmãs, exercendo papel importante no ciclo celular (Allshire; Karpen, 2008; Cleveland; Mao; Sullivan, 2003). Segundo vários trabalhos, após a manipulação da proteína HJURP, há ocorrência de má segregação, formação de cinetócoros ectópicos e instabilidade cromossômica (Barnhart *et al.*, 2011; Kato *et al.*, 2007; Mishra *et al.*, 2011; Perpelescu *et al.*, 2015). Assim, a integridade do centrômero é crucial para a viabilidade celular, uma vez que a instabilidade centromérica pode resultar em características associadas a anormalidades congênitas, envelhecimento precoce e câncer (Barra; Fachinetti, 2018).

Visando confirmar e melhor caracterizar o papel da proteína HJURP no processo de reparo de DNA, foi conduzido o trabalho de doutorado do estudante Rodolfo Bortolozo Serafim com a posterior publicação do artigo científico, que se dedicou a investigar a função desta proteína nos eventos relacionados à resposta celular à indução de quebras de dupla-fita de DNA. Neste projeto foi investigada a presença de HJURP nos locais de dano, além da cinética de reparo, a sinalização de danos e a radioresistência das células após a modulação da expressão de HJURP. Inicialmente, foi demonstrado que as proteínas HJURP e CENP-A são recrutadas para os locais de quebra de dupla fita de DNA, induzidas através de RI (Figura 1A) ou enzimaticamente (Figura 1B), sendo localizadas nas lesões desde os momentos iniciais desta resposta

(Figura 1A). Observamos também que a superexpressão de HJURP favorece a descompactação da cromatina no entorno da quebra, facilitando toda a sinalização de dano e o processamento das lesões (Serafim *et al.*, 2024). Adicionalmente, foi demonstrado que o recrutamento de HJURP depende da atividade de PARP1 (Serafim *et al.*, 2024), uma enzima nuclear responsável por iniciar a maioria dos eventos de remodelamento de cromatina após a ocorrência de lesão em DNA (Malanga; Althaus, 2005). Vimos ainda que, quando HJURP foi silenciada ocorreram falhas na liberação da proteína HP1 (Heterochromatin Protein 1) e na remoção da marca epigenética que promove a compactação, H3K9me3, o que provocou defeitos no relaxamento, na sinalização de dano e execução do reparo (Serafim *et al.*, 2024). Finalmente, foi verificado que os altos níveis de HJURP contribuem para a resistência de células de GB à RI e para a resposta dos pacientes à radioterapia (Serafim *et al.*, 2024).

Sabe-se que o reparo das quebras está associado a rápidas mudanças no nível de compactação da cromatina, havendo uma compactação inicial para proteger o genoma e evitar consequências mais severas. Todavia a atividade de reparo depende de uma remodelação rápida da cromatina para criar domínios abertos e relaxados, permitindo o acesso das proteínas de reparo (Xu *et al.*, 2012). Nosso grupo demonstrou que a HJURP tem papel fundamental nessa transição. O relaxamento na cromatina provou-se necessário para o correto processamento das lesões, visto que a abertura mediada por HJURP foi requerida para o recrutamento de CtIP e RAD51, proteínas importantes para o processo de recombinação homóloga (Serafim *et al.*, 2024). RAD51 permite que ocorra a invasão das fitas de DNA da cromátide da irmã na região homóloga à lesão (Ma *et al.*, 2017), enquanto CtIP é promotora da ressecção (Sartori *et al.*, 2007). Este mecanismo permite o reparo livre de erros, pois a síntese de DNA na região lesionada é realizada utilizando a fita intacta como molde (Huertas, 2010; Jackson; Bartek, 2009; Price; D'andrea, 2013). Portanto, nossos dados demonstraram a importância de HJURP para a ocorrência de um reparo mais fidedigno.

Figura 1 - Recrutamento de HJURP e CENP-A em regiões de quebras de dupla fita de DNA induzidas por radiação ionizante ou enzimaticamente.



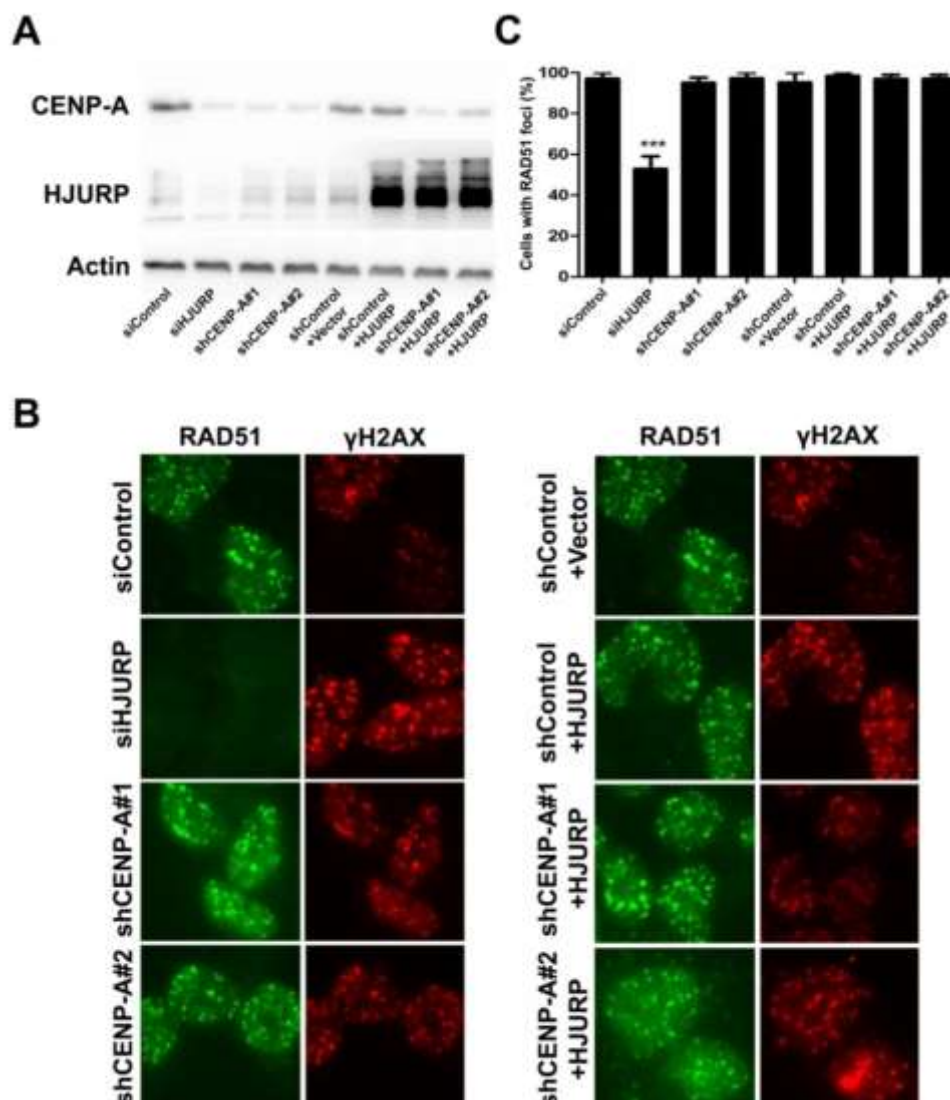
(A) Células T98G selvagens (colunas 1 e 2) ou que carregam a construção pOZ-HA-CENP-A (colunas 3 e 4), foram plaqueadas na densidade de 10^5 células por poço, em placa de 12 poços contendo lamínula circular de 18 mm. Após 24 horas, as células foram irradiadas com microlaser utilizando o equipamento PALM MicroBeam ($\lambda = 355$ nm, $E < 60$ uJ, $f = 100$ Hz, $t < 2$ ns) em objetiva de 63x e fixadas com parafomaldeído 4%, após 2, 5, 10, 25, 50 e 70 minutos. Em seguida, foi realizada a detecção com os anticorpos: anti-HJURP (vermelho), anti-pH2AX (verde), anti-HA (CENP-A carregando o tag de HA, em verde) e pH2AX (vermelho). (B) As linhagens celulares mencionadas foram transfectadas com vetor de expressão da meganuclease p84-ZFN e submetidas ao ensaio de imunoprecipitação de cromatina. Observa-se o recrutamento de HJURP e CENP-A também para as quebras induzidas enzimaticamente (Serafim *et al.*, 2024).

Como a proteína CENP-A, variante centromérica de H3, não possui as lisinas passíveis de metilação que a histona H3 apresenta, especulamos que, com a troca da histona H3 por CENP-A, ocorreria a eliminação de uma marca importante de heterocromatina, favorecendo o estado relaxado. Além disso, já foi descrito que na região de formação do cinetócoro, a incorporação de CENP-A previne a formação de heterocromatina, fato importante para manutenção da função centromérica (Ohzeki *et al.*, 2016). Diante destes fatos, a hipótese sugerida a partir dos dados do nosso grupo

foi que a incorporação de CENP-A, mediada por HJURP, poderia participar da transição entre os estados compactado e relaxado de cromatina, favorecendo a ressecção de fita e a recombinação homóloga e, portanto, um reparo mais eficiente.

Entretanto, nas análises que visavam comprovar se de fato a presença de CENP-A no local da quebra é necessária para o mecanismo de reparo, encontrou-se um resultado contraditório desta hipótese. Neste experimento o objetivo foi avaliar o requerimento de CENP-A para a formação de focos de RAD51. Para isso, as células foram irradiadas difusamente para geração de danos aleatórios, após terem sido silenciadas para HJURP ou CENP-A, e a formação de focos de H2AX fosforilada (γ H2AX) e RAD51, importantes marcadores da sinalização de dano, foi analisada. O silenciamento de CENP-A foi realizado em células superexpressoras de HJURP exógena e resistente ao siRNA dirigido para HJURP selvagem (HJURP-siR). Isto foi necessário para garantir a presença de HJURP nas células silenciadas para CENP-A, uma vez que é sabido que HJURP e CENP-A se co-estabilizam (Figura 2; Bernad *et al.*, 2011; HEO; Cho; Kim, 2013). Na parte A da figura, observa-se o resultado do *western blot*, que valida as condições experimentais utilizadas, demonstrando o silenciamento de HJURP e CENP-A, assim como a expressão exógena de HJURP-siR. Em B, observamos imagens de microscopia de fluorescência das células com marcação para γ H2AX e RAD51, após terem sido irradiadas com o objetivo de ocasionar as lesões no DNA. As marcações em vermelho indicam a região da célula em que o dano foi causado, e em verde o recrutamento da proteína de recombinação homóloga RAD51. O gráfico da parte C demonstra a porcentagem de focos de RAD51 nas células manipuladas experimentalmente. O padrão de formação de focos de RAD51 observado, sugere que a HJURP é capaz promover a sinalização de danos de forma independente de CENP-A, visto que quando CENP-A foi silenciada ocorreu a formação de focos de RAD51 de forma semelhante ao controle (Figura 2B e C), indicando que o processamento do reparo parece acontecer mesmo com a supressão de CENP-A. Este resultado se mostrou contraditório à hipótese de que a incorporação de CENP-A seria necessária para a abertura da cromatina. Por outro lado, o experimento ratifica a importância de HJURP para o reparo de DNA, pois quando a mesma foi silenciada, o aparecimento de focos de RAD51 diminuiu em aproximadamente 50% (Figura 2C).

Figura 2 - Investigação do papel de HJURP e CENP-A na sinalização de danos ao DNA em células T98G.



(A) As células T98G que carregam a construção pLVX-HJURP foram transfectadas com as construções pLKO-shCENP-A #1, pLKO-shCENP-A #2 ou com o vetor vazio. Em seguida, as células foram transfectadas com siControl ou siHJURP e foi adicionada doxíciclina (0,1 uM). Após 24 horas, as amostras de proteínas foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para a membrana de nitrocelulose e sondadas com os anticorpos HJURP, CENP-A e β -actina. Os sinais foram detectados por quimioluminescência. (B) As células descritas em (A) foram irradiadas (4 Gy) e 6 horas depois fixadas. Em seguida, as células foram processadas para marcação imunofluorescente usando os anticorpos RAD51 e γ H2AX. (C) Os focos induzidos por irradiação (IRIF) foram quantificados com o software ImageJ (versão 1.38). *** $p < 0,0001$ (Serafim *et al.*, 2024).

Temos duas suposições para explicar o resultado encontrado neste experimento. A primeira hipótese está baseada no fato de que a HJURP, ao promover a incorporação de CENP-A nos centrômeros, expulsa as histonas H3 dos

nucleossomos. Então, seria possível que, no contexto do reparo de quebras de dupla fita de DNA, a HJURP expulse as histonas dos nucleossomos que flanqueiam a quebra, mas não incorpore CENP-A posteriormente. Desta forma, CENP-A não teria função efetiva para o relaxamento da cromatina, já que sua presença seria decorrente apenas de sua interação física com HJURP. A segunda suposição decorre da efetividade do silenciamento efetuado no experimento. Ao se analisar a parte A da figura, observa-se que CENP-A ainda é detectada após silenciamento, embora em menor quantidade. Desse modo, é possível que o residual de CENP-A seja suficiente para exercer a função que foi sugerida pelos resultados anteriores do grupo, participando da transição do estado mais compactado para o estado mais aberto da cromatina. Com a finalidade de esclarecer a função de CENP-A no reparo, este trabalho de conclusão de curso (TCC) propôs realizar novos experimentos com método de silenciamento alternativo e mais eficaz para CENP-A, e avaliar parâmetros adicionais de capacidade celular de reparo de DNA nestas condições.

2. JUSTIFICATIVA

Dentre os tumores cerebrais, o glioblastoma é considerado o mais severo e letal, visto que o paciente geralmente não resiste mais de 14 meses após o diagnóstico. Este cenário é consequência das características deste tipo de tumor, como: grande capacidade proliferativa, resistência das células tumorais aos agentes genotóxicos, alta taxa de recidiva e o rápido crescimento de nova massa tumoral. Tais aspectos tornam o glioblastoma um sério problema de saúde pública, sendo os tratamentos disponíveis são apenas paliativos e visam melhorar de forma limitada a qualidade de vida do paciente, prolongando sua sobrevida por alguns meses. No contexto da biologia do tumor, foi caracterizado que a expressão elevada da proteína HJURP está correlacionada com a menor expectativa de vida dos pacientes (Valente *et al.*, 2013). Foi demonstrado também que o alto nível de expressão de HJURP induz aumento das taxas proliferativas e radioresistência em 11 linhagens celulares tumorais (Valente *et al.*, 2013). Nessa conjuntura, observamos também que pacientes com alta expressão de HJURP não respondem ao tratamento com RI. Conforme dados do nosso grupo, sabemos que HJURP participa da aquisição de tais competências, entretanto a participação de CENP-A não foi completamente elucidada. O objetivo deste trabalho, portanto, é esclarecer a participação de CENP-A na função de reparo de DNA exercida por HJURP, buscando entender se de fato atuam em conjunto no contexto do reparo de quebras de dupla fita, ou se CENP-A é detectada na lesão apenas por interagir fisicamente com HJURP. Para isso, pretendemos avaliar o potencial de reparo celular em células com silenciamento efetivo para CENP-A. Sabemos que a proteína HJURP possui potencial para se tornar um marcador importante na triagem dos pacientes para a radioterapia e um novo alvo terapêutico para o desenvolvimento de tratamentos mais específicos. Este estudo pode posicionar CENP-A neste cenário, ampliando o entendimento das bases moleculares da radioresistência em gliomas, e a identificação de biomarcadores e alvos terapêuticos.

3. OBJETIVO

O objetivo deste projeto é verificar se há requerimento de CENP-A para o relaxamento da cromatina e facilitação de reparo promovida pela HJURP nas lesões de DNA induzidas em células de glioma, avaliando parâmetros adicionais da sinalização e execução do reparo na ausência de CENP-A.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. *Cultura de Células*

As linhagens empregadas nos experimentos realizados foram previamente transformadas com o vetor pLVX-HJURP, que superexpressa HJURP de maneira induzível por doxícilina, ou pLVXTigh Puro como controle, sendo que para a linhagem contendo o vetor vazio iremos utilizar a sigla TP (Tigh Puro), e para a linhagem que carrega a superexpressão da proteína HJURP será utilizada a sigla HJ. Todas as linhagens foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glicose (DMEM, Sigma Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Life Technologies) e penicilina, estreptomicina e anfotericina (Sigma Aldrich). Mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, até atingirem a confluência de aproximadamente 80%. Após atingir a confluência adequada, as células foram descoladas da garrafa de cultura através do uso de tripsina (Thermo Fisher Scientific), e transferidas para microplacas de 6 poços ou 24 poços, após isso foram realizados os ensaios subsequentes.

4.2. *Silenciamento de CENP-A através de transfecção com siRNAs*

4.2.1 **Transfecção convencional**

No caso da análise de PCR quantitativo e dos *western blots*, para conduzir o experimento de silenciamento foram utilizadas microplacas de 6 poços e 400.000 células foram plaqueadas por poço. Para o ensaio do cometa, foram utilizadas microplacas de 24 poços e 100.000 células foram plaqueadas por poço. Após isso, as microplacas eram homogeneizadas e incubadas por 24h em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Ao término da incubação, foram preparados os lipossomas contendo siRNAs, conforme as quantidades e procedimento descritos abaixo:

- **RT-PCR quantitativo e Western blot:** 1,5 µL dos oligonucleotídeos (siRNAs à 10 µM), dirigidos para o RNA de CENP-A ou controle de sequência aleatória, foram adicionados em 300 µL de meio OptiMEM (Life Technologies) e a mistura foi homogeneizada. Em seguida, foi adicionado 3,0 µL de lipofectamina (RNAiMAX Invitrogen), homogeneizou-se bem e o sistema permaneceu em repouso por 15 minutos para formação dos complexos. Após o repouso, retirou-se o meio DMEM dos poços e foi adicionado 304 µL dos complexos (lipossomas contendo os siRNAs) e 1,196 mL de meio novo (DMEM) em cada poço.

- **Ensaio do cometa:** 0,4 μL dos oligonucleotídeos (siRNAs à 10 μM), dirigidos para o RNA de CENP-A ou controle de sequência aleatória, foram adicionados em 80 μL de meio OptiMEM (LifeTechnologies) e a mistura foi homogeneizada. Em seguida, foi adicionado 0,8 μL 6 de lipofectamina (RNAiMAX Invitrogen), homogeneizou-se bem e o sistema permaneceu em repouso por 15 minutos para formação dos complexos. Após o repouso, retirou-se o meio DMEM dos poços e foi adicionado 81 μL dos complexos (lipossomas contendo os siRNAs) e 318 μL de meio novo (DMEM) em cada poço.

As microplacas foram então homogeneizadas e incubadas por 44 horas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 .

4.2.2 Transfecção reversa

Nesse procedimento, a transfecção é realizada em conjunto com o plaqueamento, e para isso, utilizou-se microplacas de 6 poços e 400.000 células foram plaqueadas por poço. Foi adicionado 1,5 μL dos oligonucleotídeos (solução a 5 e 10 μM), dirigidos para o RNA de CENP-A ou controle de sequência aleatória (solução 10 μM), em 300 μL de meio Opti-MEM (LifeTechnologies) e a mistura foi homogeneizada. Em seguida, foi adicionado 3,0 μL de lipofectamina (RNAiMAX Invitrogen) homogeneizou-se bem e deixou em repouso por 15 minutos. Após o repouso, 1,196 mL de suspensão celular foi gotejada lentamente 5 nos poços sobre o meio contendo os complexos de lipossomos com siRNA já formados. A microplaca foi homogeneizada e incubada por 48 e 72h horas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 .

4.3. Extração de RNA

Para a extração de RNA das células, todo o meio da placa de seis poços foi retirado e adicionados 1 mL de TRIzol (Invitrogen®), seguido da ressuspensão para lise celular. Após aguardar 5 minutos a temperatura ambiente para dissociação de nucleoproteínas, o conteúdo de cada poço foi transferido para um tubo eppendorf. Foram adicionados 200 μL de clorofórmio a cada tubo, seguido de agitação vigorosa durante 15 segundos e incubação à temperatura ambiente por 15 minutos. Ao término da incubação, os tubos foram centrifugados a 12.000 G por 15 minutos a 4°C para a separação do RNA (fase aquosa - superior) do DNA com as proteínas (fase orgânica – inferior – contendo clorofórmio + trizol). Os lipídeos formam uma interface esbranquiçada. A fase aquosa foi coletada com muito cuidado para não perturbar a

interfase lipídica e a fase orgânica, seguido de transferência para um novo tubo. Para a precipitação do RNA foram adicionados 250 uL de isopropanol gelado à fase aquosa, seguidos de homogeneização delicada. Nesta etapa, as amostras foram incubadas overnight a 4°C visando a melhor eficiência no processo de precipitação do RNA. As amostras foram centrifugadas a 12000 G por 10 minutos a 4°C, tornando visível o pellet de RNA proporcional à quantidade de células lisadas. O sobrenadante foi descartado e o pellet de RNA foi lavado duas vezes com etanol 70% gelado, de forma intercalada a centrifugações de 12000 G por 5 minutos a 4°C. Após as lavagens, o sobrenadante foi descartado e o tubo colocado coberto em bancada para secar o resíduo de etanol. Por fim, após 10 minutos, o pellet foi ressuspendido em 20 uL de água tratada com DEPC e as amostras foram quantificadas no aparelho Nanovue®, seguido do estoque em freezer -80°C. Para a transcrição reversa de RNA, é utilizado o kit High Capacity cDNA Archive" (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.4. RT-PCR quantitativo

A partir do produto da síntese de cDNA foi realizada a análise de PCR quantitativo, utilizando primers específicos para a amplificação seletiva de CENP-A, HJURP e HPRT (GENE CONTROLE) e SYBR Green (Applied Biosystems®) para detecção do produto de amplificação. A quantificação do produto da reação foi feita através da emissão de fluorescência verde após a ligação do reagente entre a dupla fita de DNA. O procedimento de amplificação foi feito de acordo com o seguinte protocolo:

Tabela 1 - Protocolo de amplificação por RT-PCR quantitativo para detecção de CENP-A, HJURP e HPRT.

Ciclo	Temperatura	Tempo
1	50°C	2 min
1	95°C	10 min
40	95°C	15 seg
	60°C	1 min
Final	4°C	-

Fonte: autora 2024.

O protocolo inclui configuração de ciclos de temperatura e duração para cada etapa da ocorrência. Os primers específicos para CENP-A, HJURP e HPRT foram utilizados, e a quantificação foi realizada com SYBR Green, observando a fluorescência emitida após a ligação do corante à dupla fita de DNA.

Para cada reação de volume final igual 12uL, foram utilizados 3 uL de solução de primers de CENP-A, HJURP e HPRT (F e R) em concentração variável, 6uL de SYBR Green (Applied Biosystems®) e 3uL de cDNA (5 ou 10 ng/ul).

Os resultados da amplificação foram processados pelo software do equipamento (7500 Real Time PCR System – Applied Biosystems®).

4.5. Tratamento com bleomicina

As células foram tratadas com bleomicina (GoldBio B-910-10) na concentração de 5µM durante o período de exposição de 2h. A bleomicina foi previamente solubilizada em água estéril na concentração de 10µM e armazenada a -20°C até o momento do uso, sendo diluída diretamente no meio de cultura no momento do tratamento. Em seguida, foram realizadas análises de quantificação a nível proteico de γH2AX por *western blot* e a quantificação de quebras no DNA através do ensaio do COMETA.

4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e *western blot*

A quantificação da expressão ou fosforilação das proteínas de interesse foi realizada por *western blot*. Para o silenciamento de CENP-A e tratamento com bleomicina, foram plaqueadas 400 mil células por poço em placas de 6 wells e, após 24 horas do plaqueamento, as células foram tratadas com os siRNAs apropriados durante 44 horas. Após isso, foi realizado o tratamento com bleomicina na concentração de 5µM durante 2h. A lise celular foi feita em três tempos, imediatamente após o tratamento com o fármaco (tempo 0h) e também após um período de recuperação, no qual retirou-se o tratamento com a bleomicina e foi adicionado meio novo (DMEM) que permaneceu em contato com as células durante o período de 3 ou 6 horas. Para realizar a lise celular foi empregado o tampão NP-40 (Life Technologies) e inibidor de protease 1X (Cell Signaling). As amostras foram quantificadas utilizando o kit BCA Pierce (Life Technologies) e utilizamos 30µg de proteína por condição em tampão de amostra Laemmli (Biorad) com 5% de β-mercaptoetanol e aquecidas por 10 minutos a 95°C. Então essas amostras protéicas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com tampão TBS-T (TBS 1X, 0,1% Tween-20) contendo 5% de leite desnatado (Molico), por 45 minutos em temperatura ambiente sob agitação. Ainda em agitação as membranas foram lavadas com tampão TBS-T 1X. Após a lavagem as membranas

foram incubadas overnight na câmara fria na presença de anticorpos primários específicos para as proteínas estudadas, diluídos adequadamente. Posteriormente, após as lavagens, as membranas foram incubadas com o 7 anticorpo secundário por 1 hora sob agitação à temperatura ambiente. Os anticorpos utilizados foram HJURP (Abcam 1008000); CENP-A (Cell Signaling 2186), γ H2AX (Cell Signaling 2577S) e Tubulina (Cell Signaling 2128S). Por fim, foi adicionado SignalFire™ Plus ECL para detecção das proteínas desejadas e as imagens foram adquiridas pelo equipamento Chemidoc (BioRad).

4.7. *Ensaio do cometa*

Para a quantificação das quebras de dupla fita de DNA utilizamos o ensaio do cometa. Foram plaqueadas 1×10^6 células das linhagens T98G-TP ou T98G-HJ por poço em placas de 24 wells. Após 24 horas de cultivo, as células foram tratadas com os respectivos siRNAs durante 44 horas. Após isso, foi realizado o tratamento com Bleomicina na concentração de $5 \mu\text{M}$ durante 2h, sendo feita a tripsinização imediatamente após o tratamento com o fármaco (tempo 0h) e também após um período de recuperação, no qual retirou-se o tratamento com a bleomicina e foi adicionado meio novo (DMEM), que permaneceu em contato com as células durante o período de 3 ou 6 horas. Como controle negativo (CN) foram utilizadas células sem tratamento. Após o período determinado de tratamento, as células foram tripsinizadas e centrifugadas (300G) e então ressuspensas em agarose baixo ponto de fusão (Sigma-Aldrich) à 37°C e colocadas em lâminas previamente revestidas com agarose (Life-Technologies). Então as lâminas foram incubadas overnight à 4°C em solução de lise (2.5M NaCl; 0.1M EDTA; 10mM Triz (pH10); 1%N-Laurylsarcosine; 5%Triton X-100; 10% DMSO). Após a lise, as lâminas foram incubadas por 30 minutos a 4°C em tampão de eletroforese (300mM Acetato de Sódio; 100 mM Tris-HCl (pH 8,3)). E então, as lâminas foram acomodadas na cuba de eletroforese com o mesmo tampão e submetidas a corrida por 35 minutos a 55 Volts (1V/cm). Ao final as lâminas foram incubadas em tampão de precipitação de DNA (7.5M acetato de amônia) por 30 minutos em temperatura ambiente. E em seguida, fixadas com álcool 70% por 30 minutos. Após a secagem das lâminas em temperatura ambiente, foram coradas com 50 μL de solução de brometo de etídio ($2 \mu\text{g/mL}$) e as imagens foram adquiridas com o auxílio do microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse).

4.8. Avaliação de focos de proteína envolvida em reparo de DNA através de imunofluorescência

A avaliação da formação dos focos de 53BP1 (ABCAM, ab21083) e H2AX fosforilada (Millipore, 05-636) em células T98G-HJ, após o tratamento com bleomicina na concentração de 5 μ M durante o período de exposição de 2h, foi realizada através de imunofluorescência. Inicialmente, 8x10⁴ células foram plaqueadas em microplacas de 24 poços contendo lamínulas tratadas com poliL-lisina e a placa foi incubada em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas de cultivo, foi realizado o tratamento com bleomicina durante 2h e as células foram lavadas com PBS 1X, fixadas em paraformaldeído 4% e permeabilizadas com triton X-100 0,25%. Em seguida, foi realizado o bloqueio com BSA 1%, soro fetal bovino 8% e glicina 0,1M. Após bloqueio, as células foram incubadas com o anticorpo primário e, em seguida, com o anticorpo secundário. Por fim, o núcleo foi corado com HOECHST (Invitrogen, H1398) e as células observadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse).

5. RESULTADOS

5.1. Padronização das condições ideais para realização de qRT-PCR com os primers de CENP-A

5.1.1 Definição da concentração ótima dos primers a ser utilizada

A primeira etapa de padronização consistiu na execução de uma reação de PCR quantitativa, utilizando cinco diluições dos primers (0,5 μ M, 1,0 μ M, 1,5 μ M, 2,0 μ M e 2,5 μ M) para a avaliação da concentração ideal de uso na reação de qRT-PCR. Nestas reações foi utilizado como template uma mistura dos cDNAs das linhagens T98G, U87MG e U251MG. A quantidade ideal de cada oligonucleotídeo foi determinada pela menor concentração de primers suficiente para obtenção do menor valor possível de Ct (Cycle threshold). Os valores de Ct são definidos na fase exponencial da reação e indicam o momento (em qual ciclo) a fluorescência de cada reação atinge o nível definido como limite. Portanto, os valores de Ct são inversamente proporcionais a quantidade de produto inicial na reação. Assim, quando utilizamos diferentes concentrações de primers, se a concentração não for limitante para a reação, os valores de Ct obtidos serão similares a partir de uma mesma amostra *template*. A Tabela 2 mostra os valores de Ct obtidos para os primers de CENP-A nas diferentes concentrações utilizadas. Podemos observar que 1,0 μ M foi suficiente para a obtenção

de níveis máximos de amplificação, uma vez que com maiores concentrações não houve decréscimo significativo nos valores de Ct. Então, esta foi a concentração escolhida para os experimentos.

Tabela 2 - Padronização da concentração ótima dos *primers* para CENP-A.

	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média
0,5µM	20,25	20,17	20	20,14
1,0µM	19,92	19,92	20,12	19,98
1,5µM	19,92	19,43	-	19,67
2,0µM	19,83	19,69	19,73	19,75
2,5µM	19,7	19,63	-	19,66

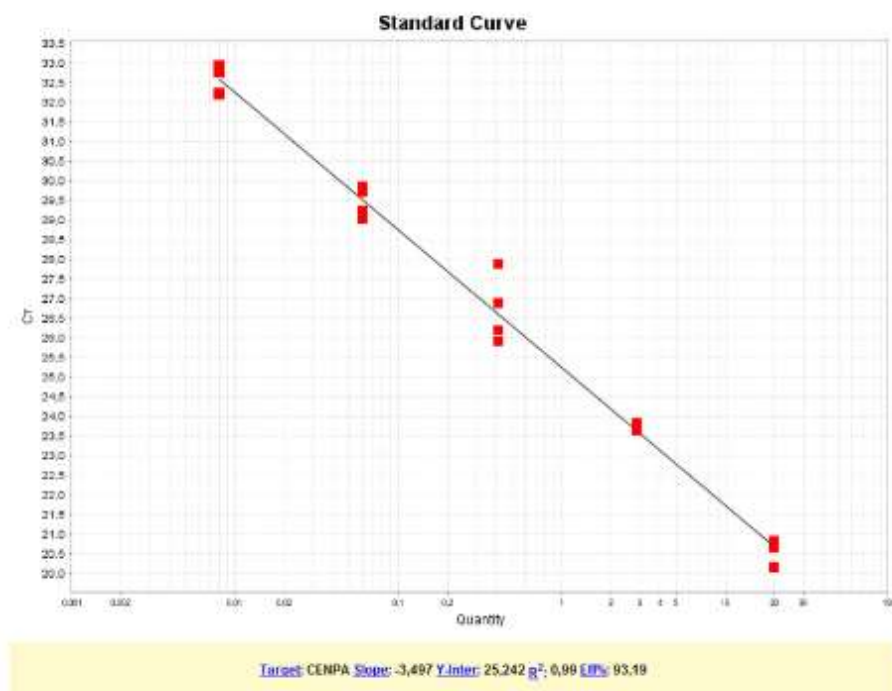
Replicatas técnicas com variações acima de 0,5 unidade de Ct entre as curvas foram excluídas dos cálculos por serem consideradas não confiáveis. A exclusão foi representada por um traço (elaborado pela autora 2024).

5.1.2 Avaliação da eficiência de amplificação dos primers

Após a determinação da concentração ideal de cada *primer*, foi realizada diluição seriada (1:7) de uma mistura de cDNAs para a verificação da eficiência de amplificação dos primers. Conforme o padrão de amplificação obtido para CENP-A, foi possível obter a curva de eficiência para o par de primers utilizado (Figura 3). As curvas foram obtidas a partir da interpolação dos valores de Ct obtidos de cada reação (eixo Y) e os respectivos logaritmos da concentração relativa de cDNA das amostras (eixo X). A reta correspondente a curva padrão foi traçada a partir dos valores médios de Ct de cada diluição de cDNA, e a eficiência da reação (E) de qRT-PCR foi calculada segundo Ramakers *et al.*, 2003 utilizando a seguinte fórmula:

$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

Figura 3 - Curva padrão das reações de verificação de eficiência de amplificação do primer para CENP-A.



O nível de mRNA dos transcritos em estudo foram avaliados no mix de cDNA's das linhagens celulares através de PCR em tempo real utilizando-se o sistema baseado no fluorocromo SYBR Green, com kit "Power SYBR Green Master Mix" (Applied Biosystems). O gene HPRT foi utilizado como controle de expressão constitutiva. A verificação da eficiência dos primers foi calculada através da reta média segundo Ramakers *et al.*, 2003. O gráfico foi construído através do software GraphPad Prism 5 (elaborado pela autora 2024).

O slope corresponde ao coeficiente de inclinação da reta da curva padrão. Uma reação com 100% de eficiência apresenta um valor de slope de -3,3 para análises da variação de Ct em função do log10 de diluições de cDNA 1:10. O coeficiente de correlação (R^2) determina a proximidade entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de Ct das amostras, onde valores próximos a 1 indicam uma proporção ideal entre esses parâmetros e 100% de eficiência de amplificação. Isso indica que, sob condições ideais de amplificação, a quantidade de produto gerado aumenta exponencialmente, dobrando a cada ciclo de reação. Para as situações práticas, uma eficiência de amplificação entre 90-110% é considerada bastante razoável para fazermos os cálculos de expressão relativa em condições padrão, isto é, considerando uma eficiência de aproximadamente 100%.

A figura 3 mostra a curva padrão (valores de Ct plotados em função do log10 da concentração de cDNA utilizado como template) obtidas para CENP-A, assim como os valores de eficiência da reação (93,19%), R^2 (0,99) e o coeficiente de inclinação da reta (slope: -3,497). Podemos observar que as amplificações mostraram eficiência

de aproximadamente 93%, o que é considerado satisfatório e viabilizou a continuidade do estudo com este conjunto de primers para CENP-A.

5.2. Padronização do silenciamento de CENP-A utilizando RNA de interferência

Inicialmente, foi necessário trabalharmos na definição das sequências mais adequadas para o siRNA dirigido à CENP-A. Para isso, utilizamos dados da literatura e experiências anteriores de nosso grupo, e partimos de algumas regiões alvo selecionadas seguindo critérios de eficiência descritos por Sathyan *et al.*, 2017. Posteriormente, através de buscas com a ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), verificamos quais sequências apresentavam menor probabilidade de efeito *off target*. Os oligonucleotídeos a seguir foram caracterizados como os mais apropriados:

Tabela 3 - Sequências de siRNA direcionadas ao CENP-A

	siCENP-A CDS#1	siCENP-A CDS#2
SENSE	5'-CAGGCCGAGUUACUCUCUCCCAA-3'	5'-UUGGGAAGAGAGUAAACUCGGCCUG-3'
ANTISENSE	5'-UUGGGAAGAGAGUAAACUCGGCCUG-3'	5'-AGAGAUGAACUAGAAAUGCUUCUG-3'

Dados adaptados de Sathyan *et al.*, 2017 e análise realizada no BLAST

5.2.1 Primeira tentativa de silenciamento

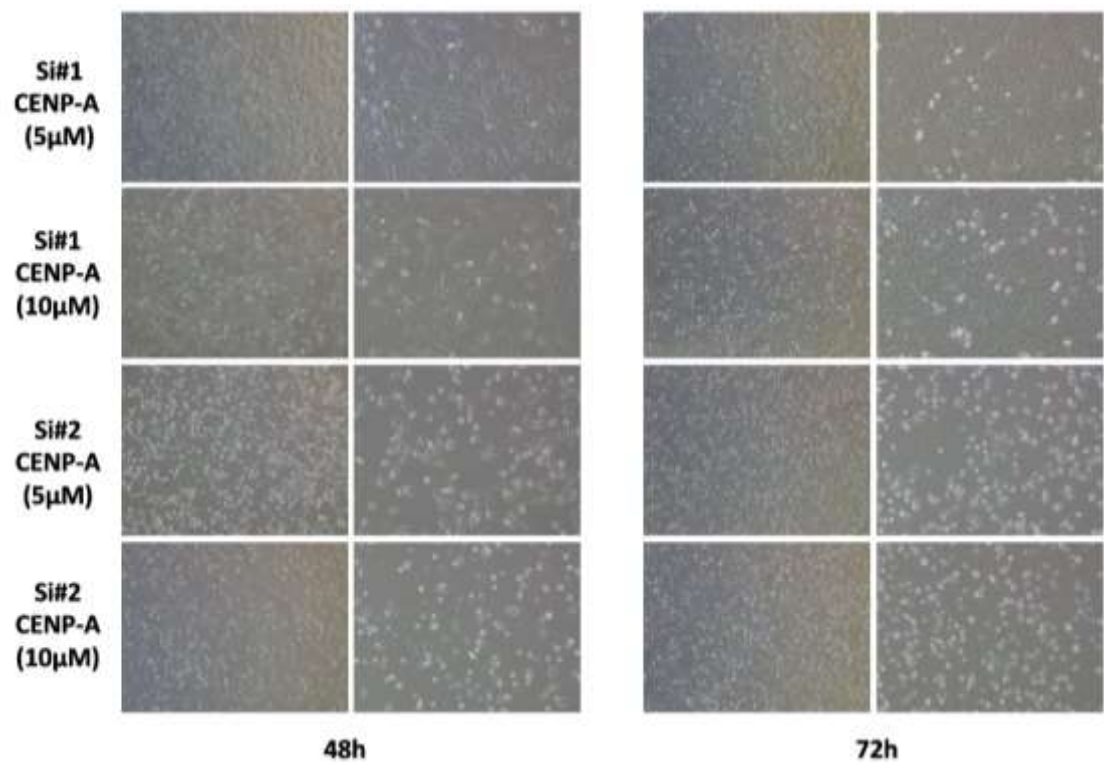
Para padronização do protocolo de silenciamento de CENP-A e posteriores experimentos, utilizamos a linhagem T98G, que apresenta níveis elevados de HJURP, dentre as demais linhagens de GB selvagens disponíveis em nosso laboratório. Inicialmente, o protocolo de silenciamento de CENP-A foi realizado de acordo com o tópico transfecção reversa descrito anteriormente nos materiais e métodos e, após um, dois ou três dias da transfecção, a morfologia das células em cultura foi analisada em microscópio óptico de contraste de fase (Figuras 4, 5 e 6). Em seguida, foi realizada a extração de RNA e as reações de RT-PCR quantitativo, também conforme já descrito.

Na figura 4 é possível observar uma quantidade reduzida de células na condição transfectada com o siCENP-A#1 e, principalmente na condição com siCENP-A#2, em relação ao siControl, além de grande quantidade de células mortas e com morfologia alterada. Tais observações são mais evidentes na maior concentração de siRNAs empregada (10uM), tanto para siCENP-A#1 como para siCENP-A#2. Neste contexto,

é importante ressaltar que CENP-A é considerado um fator fundamental na formação adequada do cinetócoro e montagem do fuso mitótico, e o seu silenciamento resulta na localização incorreta das proteínas do cinetócoro (Blower; Karpen, 2001), apoptose e aumento da senescência em vários tipos celulares (Heo; Cho; Kim, 2013; Maehara; Takahashi; Saitoh, 2010). Desta forma, dada a sua importância para a finalização do ciclo celular, é compreensível que a célula sofra as alterações apontadas com a depleção de CENP-A.

No caso das células transfectadas com siCENP-A#1, entretanto, as diferenças são menos evidentes, o que sugeriu a menor eficiência desta sequência. Porém, ao analisarmos os resultados do PCR quantitativo, percebemos uma maior eficiência com siCENP-A#1, e vimos que a concentração de 10 uM traz melhores resultados para ambas as sequências de siRNAs (Tabela 5). Contudo, cabem algumas ressalvas, durante esta primeira tentativa, devido a pouca quantidade de células na condição com siCENP-A#2 (72h), não foi possível a extração de RNA e posterior avaliação da expressão gênica por PCR quantitativo. Além disso, a expressão do gene controle (HPRT) mostrou-se alterada (Tabela 4), o que explica o valor de eficiência negativo para a condição de siCENP-A#1 5 uM (72h) (Tabela 5). Este efeito na amplificação do gene controle provavelmente decorre da baixa viabilidade das células, já indicada pelas alterações morfológicas citadas anteriormente.

Figura 4 - Primeira tentativa de silenciamento de CENP-A na linhagem celular T98G.



Microscopia de contraste de fase em células T98G, com aumento de 40X e 100X, após 48 e 72 horas de transfecção com siCENP-A#1 ou siCENP-A#2 (elaborado pela autora 2024).

Tabela 4 - Dados do cálculo das quantidades relativas da primeira tentativa de silenciamento pelo método do 2- $\Delta\Delta$ Ct (Livak; Schmittgen, 2001).

Amostras	Gene de Referência (HPRT)				Gene de Interesse (CENP-A)						
	Ct1	Ct2	Ct3	Média Ct	Ct1	Ct2	Ct3	Média Ct	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$
Si#1 5µM (48h)	26,463	26,556	-	26,510	30,896	30,587	30,231	30,571	4,062	2,636	0,161
Si#1 10µM (48h)	19,827	19,938	19,891	19,885	24,809	24,750	24,688	24,749	4,864	3,438	0,092
Si#2 5µM (48h)	24,742	25,061	24,786	24,863	28,187	28,106	27,927	28,073	3,210	1,785	0,290
Si#2 10µM (48h)	24,228	24,191	24,264	24,228	28,219	28,363	28,427	28,336	4,108	2,683	0,156
Si#1 5µM (72h)	28,810	28,477	29,108	28,798	29,872	30,117	29,771	29,920	1,122	-0,304	1,235
Si#1 10µM (72h)	25,940	25,664	26,374	25,993	29,103	28,968	28,968	29,013	3,020	1,595	0,331
Sicontrol	18,360	18,241	18,322	18,308	20,053	19,414	-	19,734	1,426	0,000	1,000

Replicatas técnicas com variações acima de 1,0 unidade de Ct entre as curvas foram excluídas dos cálculos por serem consideradas não confiáveis. A exclusão foi representada por um traço (elaborado pela autora 2024).

Tabela 5 - Eficiências obtidas na primeira tentativa de silenciamento.

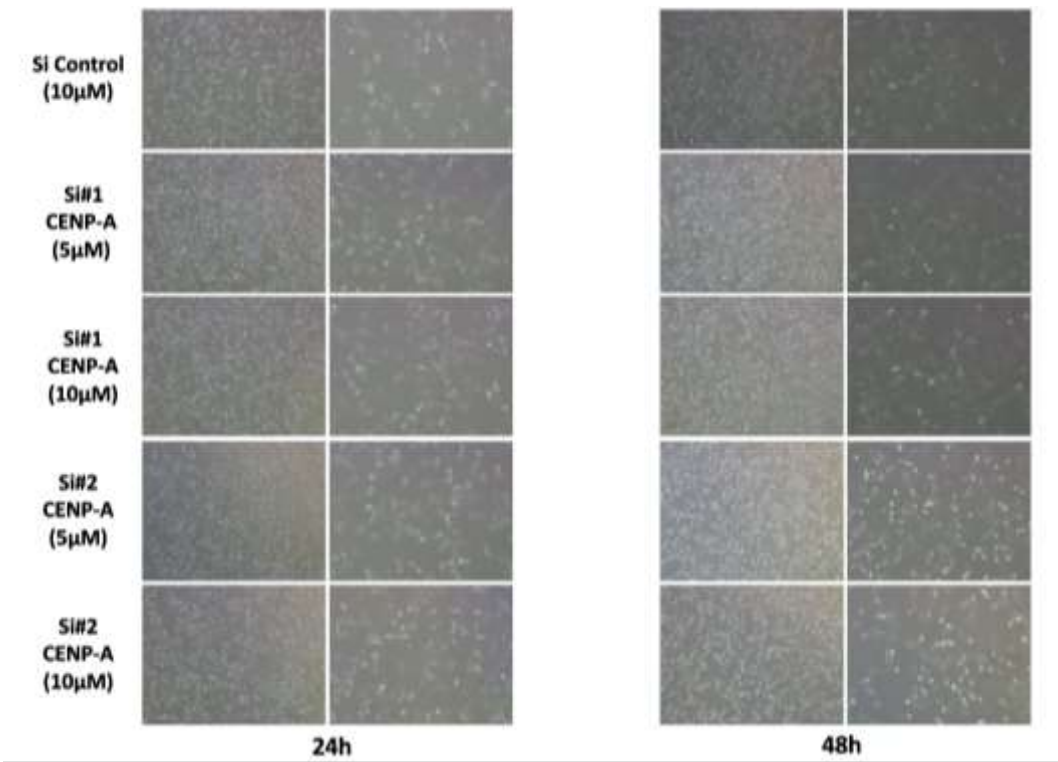
Amostras	Eficiência do silenciamento (%)
Si#1 5µM (48h)	83.91
Si#1 10µM (48h)	90.77
Si#2 5µM (48h)	70.97
Si#2 10µM (48h)	84.43
Si#1 5µM (72h)	-23.45
Si#1 10µM (72h)	66.89

Eficiências de silenciamento de CENP-A em diferentes concentrações e tempos de tratamento com siRNAs (%) (elaborado pela autora 2024).

5.2.2 Segunda tentativa de silenciamento

Visto que a manutenção das células por 72h sob condição de silenciamento para CENP-A comprometeu a sobrevivência da cultura celular, foi necessário em nossa segunda tentativa investigar a eficiência do silenciamento em períodos menores, como 24h e 48h. Além disso, aumentamos a concentração de células plaqueadas para 500.000 células por poço, visando obter quantidades suficientes de RNA para a posterior análise por PCR quantitativo. Ao observar a figura 5, percebemos uma melhora significativa na morfologia e na quantidade de células viáveis. Entretanto, mais uma vez, em determinadas condições [siCENP-A#1 5uM (24h), siCENP-A#1 10uM (48h) e siCENP-A#2 10uM (48h)], não foi possível a extração de RNA suficiente para posterior quantificação por qPCR. Ainda assim, ao analisar os dados obtidos por qPCR, percebemos que os valores de Ct para o gene de referência estão adequados (Tabela 6), e que a sequência siCENP-A#2 aparenta ser mais eficiente na supressão de CENP-A, destacando-se o período de 48h com eficiência de 94,62% (Tabela 7). Devido à dificuldade de obtenção de RNA de boa qualidade em todas as condições analisadas, realizamos um terceiro experimento alterando nosso protocolo de transfecção, visando minimizar o tempo de exposição das células aos siRNAs, conforme descrito a seguir.

Figura 5 - Segunda tentativa de silenciamento de CENP-A na linhagem celular T98G.



Microscopia de contraste de fase em células T98G, com aumento de 40X e 100X, após 24 e 48 horas de transfecção com siCENP-A#1 ou siCENP-A#2 (elaborado pela autora 2024).

Tabela 6 - Dados do cálculo das quantidades relativas da segunda tentativa de silenciamento pelo método do 2-ΔΔCt (Livak; Schmittgen, 2001).

Amostras	Gene de Referência (HPRT)				Gene de Interesse (CENP-A)				ΔCt	ΔΔCt	2 ^{-(ΔΔCt)}
	Ct1	Ct2	Ct3	Média Ct	Ct1	Ct2	Ct3	Média Ct			
Si#1 10µM (24h)	21,249	21,916	-	21,582	25,279	25,679	25,359	25,439	3,857	1,503	0,353
Si#2 5µM (24h)	20,685	20,385	-	20,535	25,563	25,527	25,612	25,568	5,032	2,679	0,156
Si#2 10µM (24h)	21,735	21,798	21,860	21,766	26,082	26,108	26,165	26,118	4,321	1,967	0,256
Sicontrol (24h)	21,350	21,246	21,127	21,298	23,628	23,621	23,536	23,595	2,354	0,000	1,000
Si#1 5µM (48h)	21,479	21,950	21,297	21,715	26,043	26,184	26,118	26,115	4,540	2,987	0,126
Si#2 5µM (48h)	22,283	22,430	22,448	22,357	28,083	28,266	28,122	28,157	5,770	4,217	0,054
Sicontrol(48h)	21,338	21,486	21,452	21,412	23,023	22,930	22,981	22,978	1,553	0,000	1,000

Replicatas técnicas com variações acima de 1,0 unidade de Ct entre as curvas foram excluídas dos cálculos por serem consideradas não confiáveis. A exclusão foi representada por um traço (elaborado pela autora 2024).

Tabela 7 - Eficiências obtidas na segunda tentativa de silenciamento.

Amostras	Eficiência do silenciamento (%)
Si#1 10 μ M (24h)	64.72
Si#2 5 μ M (24h)	84.38
Si#2 10 μ M (24h)	74.43
Si#1 5 μ M (48h)	87.39
Si#2 5 μ M (48h)	94.62

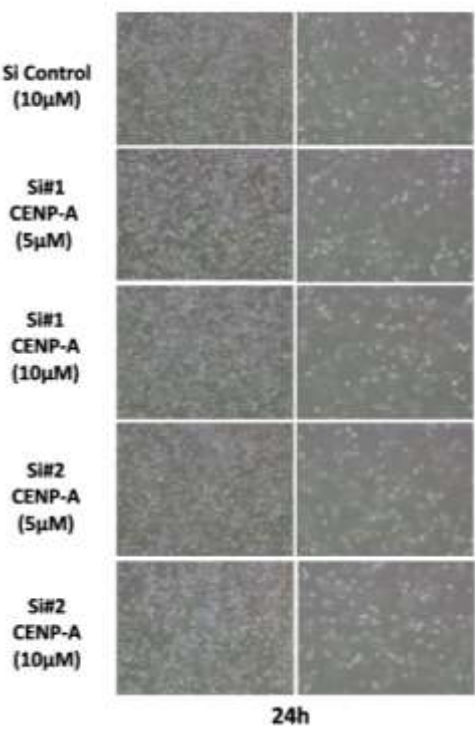
Eficiências de silenciamento de CENP-A em diferentes concentrações e tempos de tratamento com siRNAs (%) (elaborado pela autora 2024).

5.2.3 Terceira tentativa de silenciamento

Na terceira tentativa de silenciamento, pensamos em uma nova abordagem para reduzir os efeitos nocivos do silenciamento de CENP-A na linhagem T98G e obter uma boa quantidade de células com morfologia celular adequada. Observamos durante a rotina de cultivo celular, que a linhagem tumoral T98G possui uma dificuldade intrínseca em aderir e adquirir morfologia característica ao ser descolada do substrato e, conforme o procedimento de silenciamento destacado anteriormente (transfecção reversa), tais células passavam por tripsina, eram plaqueadas e logo em seguida transfectadas com siRNAs. Supomos que este procedimento poderia estar sendo um pouco agressivo e decidimos realizar primeiramente o plaqueamento, e somente após 24h realizar a transfecção com siRNAs. Conforme a figura 6, vemos uma quantidade substancialmente maior de células em comparação a segunda tentativa, e ambas as tentativas partiram de 500.000 células plaqueadas por poço, indicando que, de fato, este novo procedimento estaria permitindo maior preservação da cultura celular.

Os resultados encontrados através de qPCR demonstraram uma boa eficiência de silenciamento em todas as condições com exceção de siCENP-A#1 5 μ M (24h). O maior percentual de eficiência de silenciamento foi na condição siCENP-A#2 10 μ M (48h) (Tabela 9).

Figura 6 - Terceira tentativa de silenciamento de CENP-A na linhagem celular T98G.



Microscopia de contraste de fase em células T98G, com aumento de 40X e 100X, após 24 horas de transfecção com siCENP-A#1 ou siCENP-A#2 (elaborado pela autora 2024).

Tabela 8 - Dados do cálculo das quantidades relativas da terceira tentativa de silenciamento pelo método do 2-ΔΔCt (Livak; Schmittgen, 2001).

Amostras	Gene de Referência (HPRT)				Gene de Interesse (CENP-A)				ΔCt	ΔΔCt	2 ^{-(ΔΔCt)}
	Ct1	Ct2	Ct3	Média Ct	Ct1	Ct2	Ct3	Média Ct			
Si#1 5µM (24h)	21,375	21,862	-	21,375	20,72	20,618	-	20,669	-0,950	0,666	0,630
Si#1 10µM (24h)	20,438	20,346	-	20,392	21,668	21,424	21,504	21,532	1,140	2,756	0,148
Si#2 5µM (24h)	20,943	20,995	20,979	20,969	21,792	21,668	22,211	21,89	0,918	2,534	0,173
Si#2 10µM (24h)	20,756	20,609	20,683	20,683	21,702	21,470	-	21,586	0,903	2,519	0,174
Sicontrol (24h)	20,199	20,415	20,267	20,307	18,685	18,656	18,693	18,678	-1,616	0,000	1,000
Si#1 5µM (48h)	21,123	21,180	21,077	21,152	22,151	22,335	22,255	22,247	1,120	2,985	0,126
Si#1 10µM (48h)	21,468	21,120	21,324	21,294	22,454	22,27	22,302	22,342	1,038	2,902	0,134
Si#2 5µM (48h)	21,677	21,492	21,422	21,585	22,507	22,33	22,056	22,298	0,767	2,631	0,161
Si#2 10µM (48h)	22,103	22,388	21,977	22,245	25,173	24,677	-	24,925	2,769	4,633	0,040
Sicontrol (48h)	19,601	19,746	19,689	19,674	17,687	17,790	17,967	17,815	-1,864	0,000	1,000

Replicatas técnicas com variações acima de 1,0 unidade de Ct entre as curvas foram excluídas dos cálculos por serem consideradas não confiáveis. A exclusão foi representada por um traço (elaborado pela autora 2024).

Tabela 9 - Eficiências obtidas na terceira tentativa de silenciamento.

Amostras	Eficiência do silenciamento (%)
Si#1 5µM (24h)	36.96
Si#1 10µM (24h)	85.15
Si#2 5µM (24h)	82.73
Si#2 10µM (24h)	82.55
Si#1 5µM (48h)	87.37
Si#1 10µM (48h)	86.62
Si#2 5µM (48h)	83.86
Si#2 10µM (48h)	95.97

Eficiências de silenciamento de CENP-A em diferentes concentrações e tempos de tratamento com siRNAs (%) (elaborado pela autora 2024).

5.3. *Averiguação do silenciamento de CENP-A por western blot na linhagem T98G*

5.3.1 Primeira tentativa

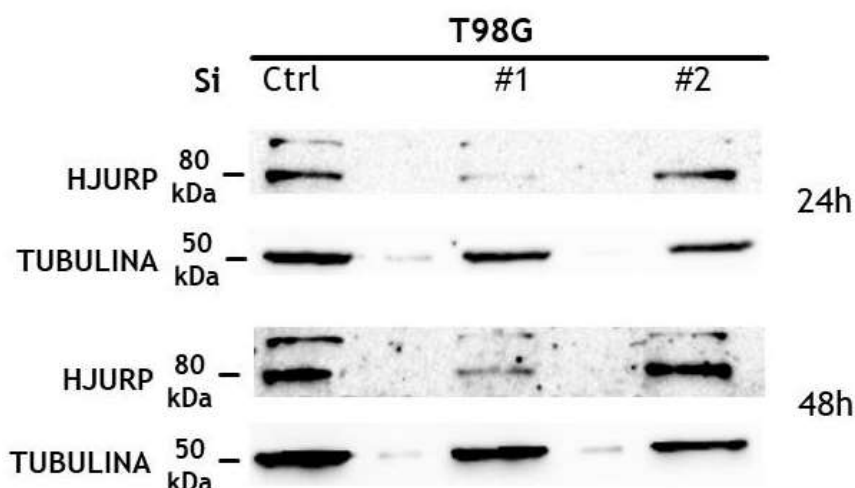
Conforme os resultados da padronização do silenciamento de CENP-A na linhagem T98G por RT-PCR quantitativo obtidos anteriormente, decidimos manter a concentração de siRNAs em 10uM e a quantidade de 400.000 células plaqueadas por poço, e então, verificamos o nível proteico de CENP-A e HJURP, inicialmente, após 24h e 48h. O protocolo de silenciamento de CENP-A foi realizado de acordo com o descrito em transfecção convencional nos materiais e métodos. Em seguida, foi realizada a extração de proteínas, a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e western blot, de acordo com o descrito previamente.

A figura 7 consta o resultado da primeira tentativa de averiguação, a qual foi realizada com a linhagem T98G selvagem, gel de poliacrilamida 12% e 12 ug de amostra proteica por condição experimental. Na figura, observa-se somente os níveis proteicos de HJURP, pois não conseguimos detectar CENP-A após revelação da membrana, sendo que atribuímos tal dificuldade a reduzida quantidade de proteína obtida.

Em relação a expressão de HJURP, ao observar a figura 7, torna-se claro que a sequência de siCENP-A#1 afeta o seu nível proteico, reduzindo fortemente a expressão de HJURP em relação ao siControl. Este cenário não contempla a condição experimental necessária para responder à questão fundamental deste trabalho, que é esclarecer a participação da CENP-A na função de reparo promovida por HJURP, e para isso, é preciso suprimir a CENPA, mas manter altos níveis de expressão de HJURP. Então, para resolver esta questão, os próximos experimentos foram

executados com linhagens transformadas utilizando vetor pLVX-HJURP, que superexpressa HJURP de maneira induzível por doxíciclina, ou pLVX-Tight-Puro (vetor vazio), sendo que para a linhagem contendo o vetor vazio iremos utilizar a sigla TP (Tight-Puro), e para a linhagem que carrega a superexpressão da proteína HJURP será utilizada a sigla HJ.

Figura 7 - A expressão de HJURP na linhagem T98G após o silenciamento.



Western blot mostrando o nível de expressão proteico de HJURP em células T98G após a transfecção com siControl, siCENP-A#1 ou siCENP-A#2. Após 24 e 48 horas, as amostras de proteínas foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para a membrana de nitrocelulose e sondadas com os anticorpos CENP-A e Tubulina. Os sinais foram detectados por quimioluminescência (elaborado pela autora 2024).

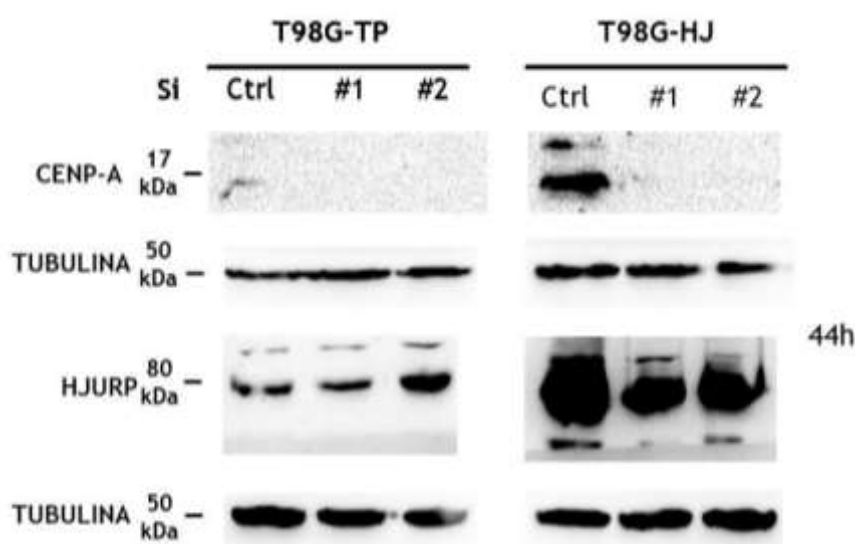
5.3.2 Segunda tentativa

As alterações experimentais para a segunda tentativa foram aumentar a concentração da amostra proteica (30ug) visando detectar CENP-A, e conduzir os experimentos com a linhagem superexpressora de HJURP exógena (T98G-HJ) e a linhagem controle (T98G-TP) tratadas com doxíciclina (indutora do promotor presente no vetor pLVX), para obter e manter níveis elevados de HJURP mesmo após o silenciamento de CENP-A com siCENP-A#1. Além disso, como foi visto anteriormente, manter as células por períodos maiores sob condição de silenciamento resulta em maior eficiência na supressão proteica, desta forma, fixamos o período de incubação em 44h, no qual conseguimos obter células viáveis e a quantidade pretendida de proteína (30 ug).

Ao observar a figura 8, percebe-se que mesmo na linhagem T98G-HJ, o siCENP-A#1 afeta a expressão de HJURP. Entretanto, os níveis proteicos se mantêm elevados

e adequados para a condição experimental almejada, ou seja, ao empregar T98G-HJ e T98G-TP contorna a questão e possibilitou a realização dos próximos experimentos. Em relação a expressão de CENP-A, desta vez foi possível detectar a proteína nas condições controle, principalmente nas células T98G-HJ, que possuem alto nível de expressão de HJURP. Já foi visto em estudo anterior que a superexpressão de CENP-A proporciona o aumento dos níveis proteicos de HJURP (Jeffery *et al.*, 2021), o que corrobora os resultados da figura 8, ou seja, no contexto de ausência ou baixa quantidade de CENP-A é necessário induzir HJURP exogenamente para manter seus níveis de expressão. Além disso, nota-se que o silenciamento foi efetivo devido à ausência de CENP-A nas condições de silenciamento, sendo, portanto, a quantidade de 30 ug adequada para o experimento.

Figura 8 - A expressão de CENP-A e HJURP na linhagem T98G após o silenciamento.



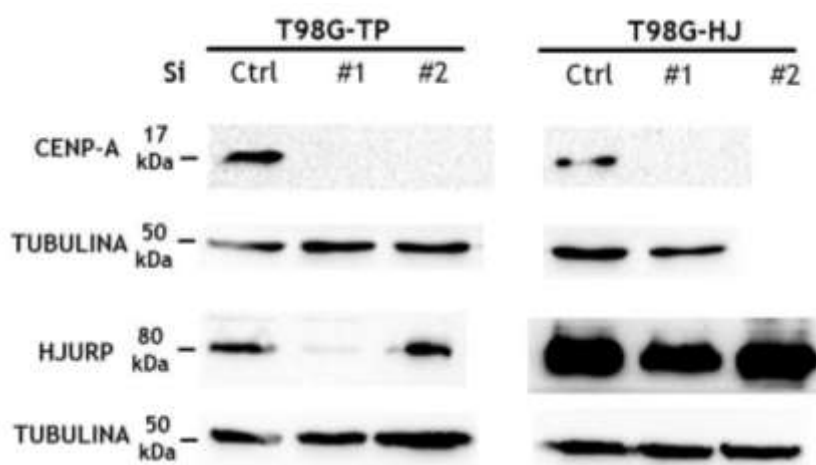
Western blot mostrando o nível de expressão proteico de HJURP e CENP-A em células T98G-TP e T98G-HJ após a transfecção com siControl, siCENP-A#1 ou siCENP-A#2, e tratamento com doxíciclina para indução da expressão da HJURP. Após 44 horas, as amostras de proteínas foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para a membrana de nitrocelulose e sondadas com os anticorpos CENP-A e Tubulina. Os sinais foram detectados por quimioluminescência (elaborado pela autora 2024).

5.3.3 Terceira tentativa

Visando otimizar os resultados encontrados na segunda tentativa, desta vez, optamos por empregar o gel de poliacrilamida 15%, que possui poros de menor tamanho e poderia facilitar na detecção de CENP-A, pois trata-se de uma proteína de peso molecular muito baixo (17 kDa). Além disso, supomos que o tempo de transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose estivesse

influenciando na detecção, e poderíamos estar “perdendo” as proteínas menores durante o processo. Por isso, reduzimos o tempo de transferência na tentativa de detectar CENP-A de forma mais efetiva. Foram realizados três experimentos com o mesmo conjunto de amostras para conseguirmos detectar as proteínas conforme a figura 9, sendo que somente no último experimento conseguimos detectar de maneira satisfatória o nível proteico de CENP-A na situação controle. Na condição T98G-HJ com siCENP-A#2, a detecção de CENP-A não foi possível, resultando na ausência dessa raia na Figura 9. Já a detecção de HJURP para essa mesma condição foi realizada a partir da mesma amostra, porém em um gel de uma corrida anterior. De maneira geral, conseguimos averiguar, por meio do *western blot*, a expressão das proteínas de interesse após o silenciamento, conseguindo observar a depleção de CENP-A de forma eficiente e a manutenção de altos níveis de HJURP nas células T98G-HJ.

Figura 9 - A expressão de CENP-A e HJURP na linhagem T98G após o silenciamento.



Western blot mostrando o nível de expressão proteico de HJURP e CENP-A em células T98G-TP e T98G-HJ após a transfecção com siControl, siCENP-A#1 ou siCENP-A#2, e tratamento com doxíciclina para indução da expressão da HJURP. Após 44 horas, as amostras de proteínas foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para a membrana de nitrocelulose e sondadas com os anticorpos CENP-A e tubulina. Os sinais foram detectados por quimioluminescência (elaborado pela autora 2024).

5.4. Averiguação do silenciamento de CENP-A por RT-PCR quantitativo nas linhagens T98G-TP e T98G-HJURP

Devido à suspeita de que o siCENP-A#1 estivesse reduzindo a expressão proteica de HJURP, realizamos o PCR quantitativo para avaliar esse efeito a nível de RNA e averiguar o silenciamento de CENP-A nas linhagens T98G-TP e T98G-HJ de forma

mais acurada. Os valores de Ct obtidos e as quantidades relativas de CENP-A e HJURP estão mostrados nas tabelas 10 e 11, respectivamente.

Em relação ao silenciamento de CENP-A, foram obtidas porcentagens satisfatórias de silenciamento tanto na linhagem T98G-TP quanto na T98G-HJ. Entretanto, as sequências de siRNAs foram mais eficientes na linhagem T98G-TP, com porcentagem de 92,9% (siCENP-A#1) e 91,2% (siCENP-A #2), enquanto que a linhagem T98G-HJ obteve eficiências de 83,7% (siCENP-A#1) e 88,3% (siCENP-A #2) (tabela 12). Isso provavelmente se deve ao fato de que HJURP e CENP-A se co-estabilizam, de modo que a superexpressão de HJURP pode ter levado ao aumento dos níveis proteicos de CENP-A, afetando a eficiência do silenciamento.

Em relação a expressão de HJURP, é possível observar na tabela 13 que a sequência siCENP-A#1 também reduz a expressão a nível de RNA, resultando em 36,3% de HJURP na linhagem T98G-TP, sendo que o siCENP-A#2 também apresenta certa influência, porém em menor proporção, resultando em uma expressão de 80,6% de HJURP na linhagem T98G-TP. Outro ponto relevante, é a confirmação dos altos níveis de expressão de HJURP na linhagem T98G-HJ, que possui o vetor que carrega a superexpressão da proteína. Conforme a tabela 13, a linhagem T98G-HJ com siCENP-A#1 apresentou um aumento de expressão de HJURP de 1218,5%, enquanto que a linhagem T98G-HJ com siCENP-A#2 apresentou aumento 1540,1% em comparação com a linhagem T98G-TP.

Tabela 10 - Dados do cálculo das quantidades relativas de CENP-A pelo método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak; Schmittgen, 2001).

Amostras	Gene de Referência (HPRT)				Gene de interesse (CENP-A)				ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$
	Ct1	Ct2	Ct3	Média Ct	Ct1	Ct2	Ct3	Média Ct			
T98G-TP Si#1 10 μ M	22,863	21,349	-	22,106	25,23	25,124	25,554	25,302	3,197	3,81	0,071
T98G-TP Si#2 10 μ M	22,902	22,673	-	22,788	26,091	25,968	24,971	25,677	2,889	3,502	0,088
T98G-TP Sicontrol	22,809	22,086	-	22,447	21,989	21,764	21,749	21,834	-0,613	0,000	1,000
T98G-HJ Si#1 10 μ M	20,799	21,234	20,548	20,86	24,14	24,338	24,474	24,317	3,457	2,618	0,163
T98G-HJ Si#2 10 μ M	21,741	21,953	22,048	21,914	25,837	25,899	25,802	25,846	3,932	3,093	0,117
T98G-HJ Sicontrol	20,540	21,163	-	20,851	21,556	21,585	21,930	21,690	0,839	0,000	1,000

Replicatas técnicas com variações acima de 1,0 unidade de Ct entre as curvas foram excluídas dos cálculos por serem consideradas não confiáveis. A exclusão foi representada por um traço (elaborado pela autora 2024).

Tabela 11. Dados do cálculo das quantidades relativas de HJURP pelo método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak; Schmittgen, 2001).

Amostras	Gene de Referência (HPRT)				Gene de interesse (HJURP)				ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$
	Ct1	Ct2	Ct3	Média Ct	Ct1	Ct2	Ct3	Média Ct			
T98G-TP Si#1 10µM	22,863	21,349	-	22,106	20,342	20,343	20,456	20,38	-1,725	1,462	0,363
T98G-TP Si#2 10µM	22,902	22,673	-	22,788	19,944	19,947	19,842	19,911	-2,877	0,311	0,806
T98G-TP Sicontrol	22,809	22,086	-	22,447	19,249	19,411	19,118	19,260	-3,187	0,000	1,000
T98G-HJ Si#1 10µM	20,799	21,234	20,548	20,860	14,016	14,046	14,134	14,065	-6,795	0,728	12,185
T98G-HJ Si#2 10µM	21,741	21,953	22,048	21,914	14,785	14,794	14,766	14,782	-7,132	0,390	15,401
T98G-HJ Sicontrol	20,540	21,163	-	20,851	13,382	13,331	13,272	13,328	-7,523	0,000	1,000

Replicatas técnicas com variações acima de 1,0 unidade de Ct entre as curvas foram excluídas dos cálculos por serem consideradas não confiáveis. A exclusão foi representada por um traço (elaborado pela autora 2024).

Tabela 12 - Eficiências obtidas no silenciamento de CENP-A.

Amostras	Eficiência do silenciamento (%)
T98G-TP Si#1 10µM	92.9
T98G-TP Si#2 10µM	91.2
T98G-HJ Si#1 10µM	83.7
T98G-HJ Si#2 10µM	88.3

Fonte: autora 2024

Tabela 13 - Expressão de HJURP nas linhagens T98G-TP e T98G-HJ após silenciamento de CENP-A.

Amostras	Expressão relativa de HJURP (%)
T98G-TP Si#1 10µM	36.3
T98G-TP Si#2 10µM	80.6
T98G-HJ Si#1 10µM	1218.5
T98G-HJ Si#2 10µM	1540.1

Fonte: autora 2024

5.5. Averiguação do silenciamento de CENP-A por western blot nas linhagens T98G-TP e T98G-HJURP

Conforme os resultados da padronização do silenciamento de CENP-A na linhagem T98G e verificação por *western blot* obtidos anteriormente, conseguimos confirmar a depleção de CENP-A de forma eficiente e a manutenção de altos níveis de HJURP nas células T98G-HJ. Era necessário realizar repetições visando obter o resultado com todas as condições estipuladas e proceder a análise estatística dos dados. Para

isso, realizamos o protocolo padronizado, no qual, empregamos a concentração de siRNAs em 10 μ M e a quantidade de 400.000 células plaqueadas por poço, e então, verificamos o nível proteico de CENP-A e HJURP após 44h da transfecção. O protocolo de silenciamento de CENP-A foi realizado de acordo com o descrito anteriormente nos materiais e métodos. Em seguida, foi realizada a extração de proteínas, a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e o western blot, também de acordo com o descrito previamente.

A figura 10 apresenta o resultado de expressão proteica de HJURP e CENP-A em todas as condições estipuladas, ou seja, nas linhagens T98G-TP e T98G-HJ após o silenciamento com siControl, siCENP-A#1 ou siCENP-A#2. Em relação a expressão de HJURP, o efeito do siCENP-A#1 foi ratificado em nível proteico, ou seja, HJURP foi reduzida significativamente em relação ao siControl. Entretanto, os níveis de HJURP se mantêm elevados e adequados para a condição experimental almejada, pois utilizamos as linhagens transformadas com o vetor pLVX-HJURP, que superexpressa HJURP de maneira induzível por doxíciclina, possibilitando a realização dos próximos experimentos.

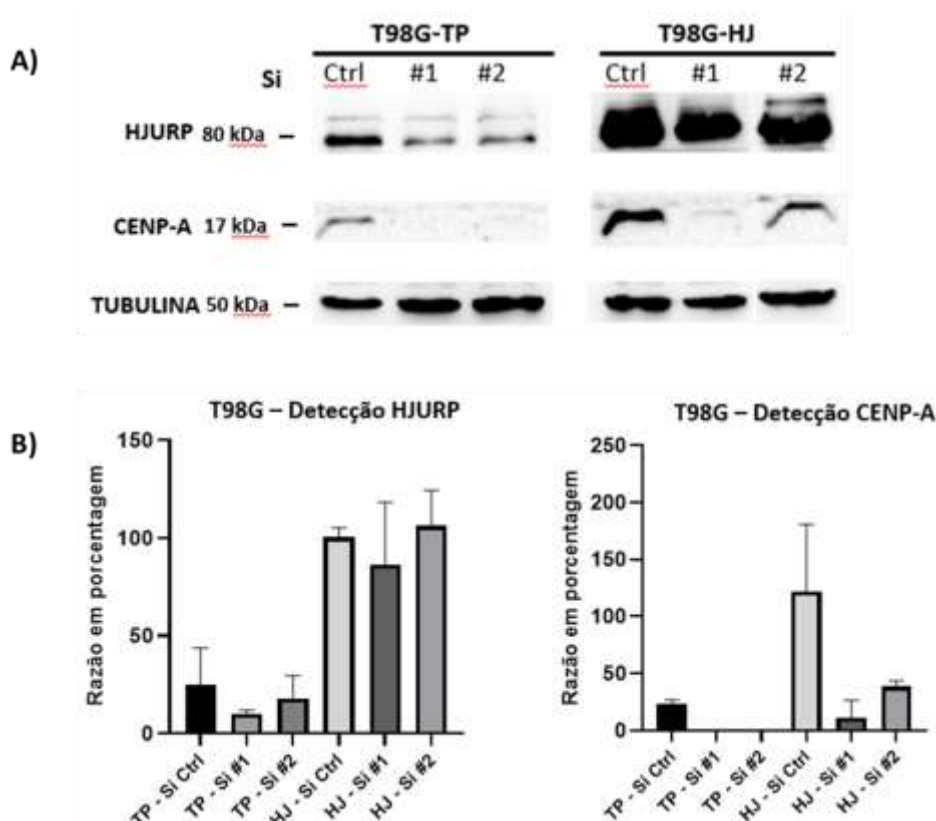
Em relação a expressão de CENP-A, nota-se que o silenciamento foi bastante efetivo, principalmente na linhagem T98G-TP, que possui menor nível de expressão da proteína, favorecendo a depleção de CENP-A pelos siRNAs. Já na linhagem T98G-HJ, devido ao fato de que HJURP e CENP-A se co-estabilizam, a superexpressão de HJURP proporcionou um aumento dos níveis proteicos de CENP-A. Assim, a eficiência de silenciamento foi menor, especialmente para o siCENP-A#2, que se mostrou menos efetivo no silenciamento em comparação com siCENP-A#1 para as células T98G-HJ (figura 10).

Desse modo, obtivemos e validamos através do RT-PCR quantitativo e *western blot* o sistema experimental delineado para este trabalho, ou seja, células com silenciamento efetivo de CENP-A e a manutenção da expressão de HJURP, sendo que o siRNA#1 se mostrou o mais eficaz para o silenciamento de CENP-A. Portanto, alcançamos os níveis proteicos adequados de CENP-A e HJURP para a próxima sequência de experimentos a serem realizados (ensaio do COMETA).

Por fim, é importante ressaltar que o gráfico presente na figura 10 não contém a análise estatística, pois foram realizados apenas 2 experimentos independentes. Por isso, ainda não é possível apontar a significância estatística das diferenças

observadas e quantificá-las com segurança, sendo que o gráfico mostrado é ilustrativo.

Figura 10 - A expressão de HJURP e CENP-A na linhagem T98G-TP e T98G-HJ após o silenciamento.



A. *Western blot* mostrando o nível de expressão proteico de HJURP e CENP-A em células T98G-TP e T98G-HJ após a transfecção com siControl, siCENP-A#1 ou siCENP-A#2. Após 44 horas da transfecção, as amostras de proteínas foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para a membrana de nitrocelulose e sondadas com os anticorpos HJURP, CENP-A e Tubulina. Os sinais foram detectados por quimioluminescência. **B.** As bandas do *western blot* mostradas na parte A da figura foram quantificadas com o software *Image J* e os valores da densitometria foram plotados com o auxílio do software *Prisma* (elaborado pela autora 2024).

5.6. Padronização das condições de tratamento com bleomicina requeridas para a geração de quebras de dupla-fita de DNA

5.6.1 Análise da fosforilação de H2AX nas linhagens T98G-TP e T98G-HJ após o tratamento com bleomicina

O fármaco escolhido para mimetizar o tratamento com radiação ionizante foi a bleomicina, um antibiótico radiomimético que é empregado em experimentos citogenéticos para induzir quebras no DNA, permitindo assim, verificar a capacidade de reparo das células. Seu mecanismo de ação é baseado principalmente na inibição

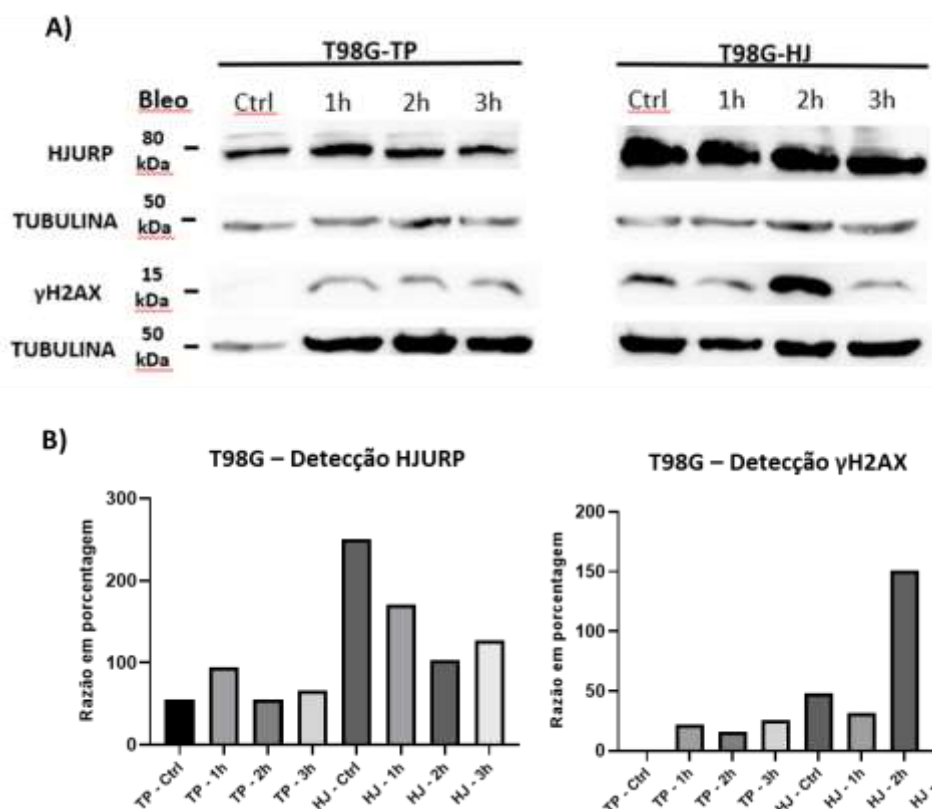
da síntese do material genético, pois se intercala e liga-se às fitas de DNA causando impedimento espacial, e por consequência, a inibição de sua síntese (Cheson, 2000). O passo inicial foi padronizar a concentração e a duração do tratamento com o fármaco suficientes para induzir dano ao DNA, porém mantendo boa viabilidade da cultura celular. Para isso, inicialmente averiguamos a fosforilação de H2AX (γ H2AX), um importante marcador da sinalização de dano, por *western blot*. Para isso, testamos a bleomicina na concentração de 5 μ M e a quantidade de 600.000 células plaqueadas por poço, durante os períodos de 1, 2 e 3 horas de tratamento. Em seguida, foi realizada a extração de proteínas, a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e o *western blot*, de acordo com o descrito anteriormente nos materiais e métodos.

Ao observar a figura 11, é possível inferir que a concentração de 5 μ M é suficiente e adequada para gerar danos ao DNA, visto que em todas as condições de tratamento a histona H2AX foi detectada na sua forma fosforilada. O tempo de tratamento de 2 horas proporcionou níveis de γ H2AX satisfatórios em ambas as linhagens analisadas, com destaque para a linhagem superexpressora de HJURP (figura 11A), além de permitir a manutenção da viabilidade da maior parte das células da cultura. Em relação às condições controle do experimento (T98G-TP Ctrl e T98G-HJ Ctrl), nas quais não houve adição do fármaco, percebe-se que a linhagem T98G-HJ apresentou um nível basal aumentado de γ H2AX, independente do tratamento (figura 11A). Atualmente, vários trabalhos têm relatado a participação de HJURP em vias moleculares que regulam proliferação e o ciclo celular, acelerando **a transição G1/S** em linhagens celulares provenientes de diferentes tipos tumorais, como bexiga, fígado, pulmão e pâncreas (Cao *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Lai *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2020; Wei *et al.*, 2019). Sabe-se também que o aumento na atividade proliferativa gera grandes quantidades de danos ao DNA (Taylor e Lindsay, 2016). Então, uma possibilidade é que o dano basal observado na linhagem T98G-HJ seja decorrente desta competência de acelerar o ciclo celular, que a superexpressão de HJURP pode estar induzindo nestas células. Esta é uma hipótese que deverá ser testada em experimentos futuros.

Além disso, nota-se que a linhagem T98G superexpressora de HJURP, no período entre 2h e 3h de tratamento, apresentou maior facilidade em lidar com o dano induzido pelo fármaco, já que a porcentagem de γ H2AX reduz drasticamente neste intervalo (figura 11A). Este comportamento é condizente com os dados obtidos anteriormente pelo nosso laboratório, nos quais foi visto que a superexpressão de HJURP favorece a descompactação da cromatina no entorno da ruptura, facilitando toda a sinalização

de dano e o processamento das lesões. O gráfico apresentado na figura 11B também não contém a análise estatística, pois foi realizado apenas 1 experimento independente.

Figura 11 - A expressão de HJURP e γ H2AX nas linhagens T98G-TP e T98G-HJ após tratamento com bleomicina.



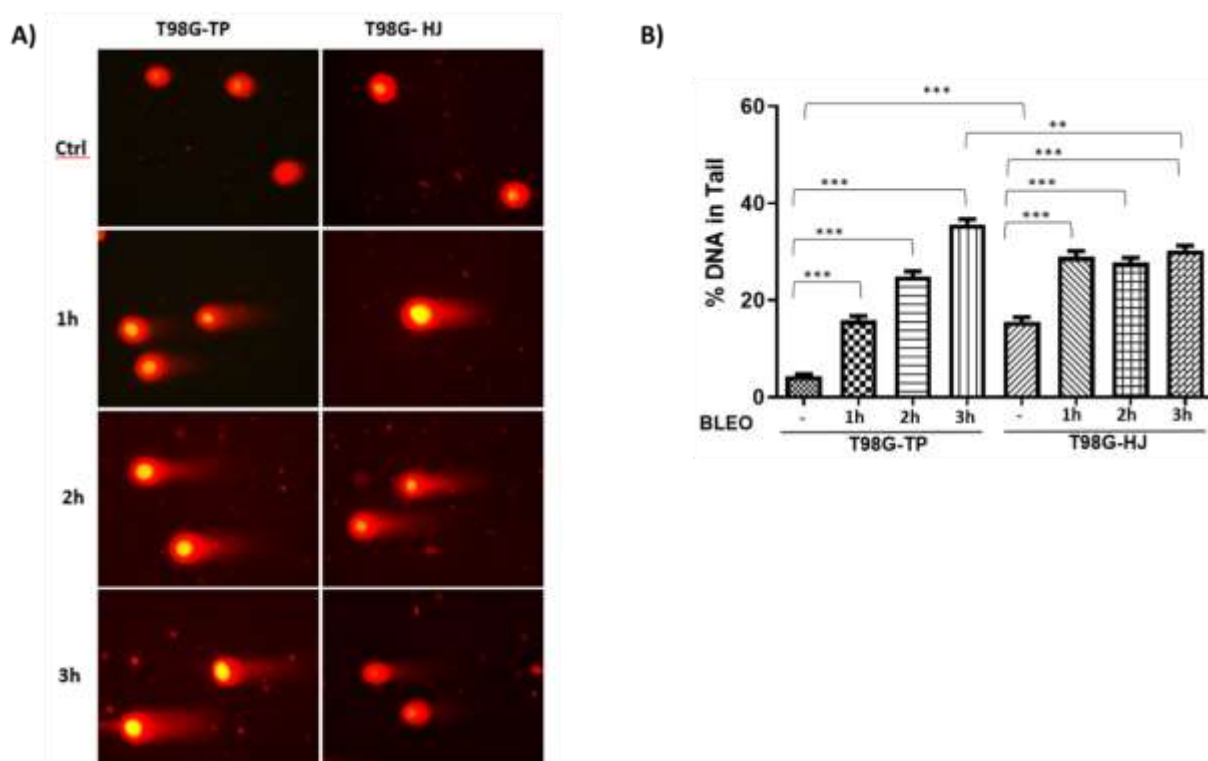
A. *Western blot* mostrando o nível de expressão proteica de HJURP e fosforilação de H2AX (γ H2AX) em células T98G-TP e T98G-HJ após o tratamento com bleomicina por 1, 2 e 3 horas. Previamente, foi realizado o tratamento com doxiciclina para indução da expressão da HJURP. Então, as amostras de proteínas foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para a membrana de nitrocelulose e sondadas com os anticorpos HJURP e γ H2AX e Tubulina. Os sinais foram detectados por quimioluminescência. **B.** As bandas do *western blot* mostrado na parte A da figura foram quantificadas com o software *Image J* e os valores da densitometria foram plotados com o auxílio do software *Prisma* (elaborado pela autora 2024).

Sabendo que a fosforilação de H2AX não é exclusiva para o contexto de quebra de dupla fita de DNA (Lyu *et al.*, 2019; Hsu *et al.*, 2021), o nosso próximo passo foi averiguar, dentre a quantidade total de dano gerada pela bleomicina, a porcentagem específica referente a quebras de dupla fita de DNA, e para isso, foi realizado o ensaio do cometa neutro. Neste experimento, foram plaqueadas a quantidade de 40.000 células por poço das linhagens T98G-TP e T98G-HJ, que permaneceram em cultura

durante 48h. Após isso, foi realizado o tratamento com bleomicina na concentração de 5 μ M durante os períodos de 1, 2 e 3 horas para gerar danos ao DNA. De maneira geral, percebe-se que, em ambas as linhagens, as diferentes condições de tratamento resultaram em maior porcentagem de DNA na cauda do que as respectivas condições controles, mostrando a efetividade da bleomicina em induzir quebras de dupla fita de DNA.

Em concordância com os resultados do *western blot* de padronização da concentração de bleomicina mostrados anteriormente, a linhagem T98G-HJ mostrou uma maior capacidade no processamento das lesões ao DNA em relação a T98G-TP no período de 3h, ratificando a importância de HJURP no contexto de reparo do material genético. Além disso, as células T98G-HJ apresentaram, novamente, aumento na quantidade de dano basal em relação a T98G-TP, de forma independente do tratamento com bleomicina. Neste caso, especificamente com relação a quantificação de quebras de duplas de DNA, o que suporta a hipótese da participação de HJURP no controle da proliferação e do ciclo celular nas células de glioma, como relatado para linhagens de outros tipos tumorais. A “análise estatística” apresentada no gráfico da figura 12B representa a variação na porcentagem de DNA na cauda em um grupo amostral de 100 células provenientes de apenas 1 experimento independente, sendo, portanto, ilustrativa.

Figura 12 - A fragmentação de DNA nas linhagens T98G-TP e T98G-HJ após o tratamento com bleomicina.



A. A análise da fragmentação do DNA foi feita através do ensaio do cometa neutro. Após o tratamento por 1h, 2h e 3h com bleomicina (5 μ M), as células indicadas foram colocadas em lâminas contendo agarose. Após a lise celular e eletroforese, as células foram fixadas e marcadas com brometo de etídio e, por fim, fotografadas utilizando microscópio de fluorescência. **B.** A quantificação do DNA fragmentado foi realizada utilizando o software CometScore. A porcentagem de DNA na cauda foi utilizada como parâmetro. A significância estatística foi determinada pela análise de variância One way ANOVA, com pós-teste de Tukey. ** p<0,001; *** p<0,0001 (elaborado pela autora 2024).

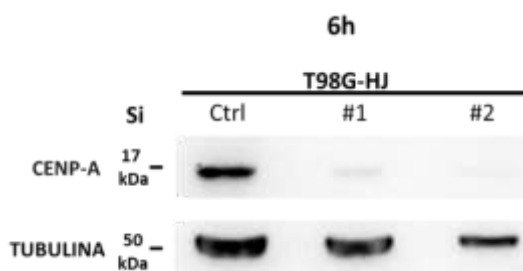
5.7. Ensaio do COMETA nas linhagens T98G-TP e T98G-HJURP após silenciamento de CENP-A e tratamento com bleomicina

Conforme os resultados anteriores obtidos a partir das padronizações do silenciamento de CENP-A e das condições de tratamento com bleomicina, obtivemos os níveis proteicos adequados de CENP-A e HJURP, e definimos a concentração e duração de tratamento suficientes para gerar danos ao DNA. Tais condições eram imprescindíveis para investigarmos o real papel da CENP-A na função de reparo promovida pela HJURP. O próximo passo deste trabalho era verificar a capacidade das células silenciadas de reparar quebras de dupla fita de DNA induzidas por bleomicina e, para isso, foi realizado o ensaio do cometa neutro.

Neste experimento, realizou-se uma análise da cinética da resolução das lesões, baseada na quantificação de quebras imediatamente após a indução de um dano agudo e transitório ao DNA, através do tratamento com bleomicina na concentração de 5 μ M por 2 horas, e também em tempos sucessivos de recuperação após esse tratamento. Para isso, o meio com o fármaco foi retirado e foi adicionado meio fresco (DMEM), que permaneceu em contato com as células durante os seguintes períodos de recuperação: 3 horas (tempo 3h) e 6 horas (tempo 6h). Para este experimento, foram plaqueadas 100.000 células por poço das linhagens T98G-TP e T98G-HJ, que permaneceram em cultura durante 24 horas. Em seguida, foi realizada a transfecção com os siRNAs apropriados e a incubação por 44 horas e, por fim, o tratamento com bleomicina. As demais etapas do protocolo do ensaio do cometa foram realizadas de acordo com o descrito anteriormente nos materiais e métodos.

Inicialmente, foi necessário confirmar por *western blot* se a expressão de CENP-A, a nível proteico, se mantinha suprimida durante os períodos de recuperação selecionados. Para isso, realizamos o silenciamento de CENP-A por 44h e o tratamento com bleomicina 5 μ M por 2 horas em células T98G-HJ, que possuem maior nível de expressão de CENP-A, visto que a superexpressão de HJURP proporciona o aumento dos níveis proteicos de CENP-A devido a co-estabilização que ocorre entre estas duas proteínas. Além disso, selecionamos o tempo mais longo de recuperação, ou seja, de 6 horas, para verificar se a depleção de CENP-A se manteria nas condições estipuladas. Ao observar a figura 13, é possível afirmar que a expressão de CENP-A permanece suprimida durante os períodos de recuperação selecionados, 3h e 6h, visto que o silenciamento permaneceu efetivo após o maior período de recuperação, por isso, demos continuidade para o ensaio do cometa.

Figura 13 - Análise da expressão de CENP-A na linhagem T98G-HJ no período de recuperação de 6 horas.



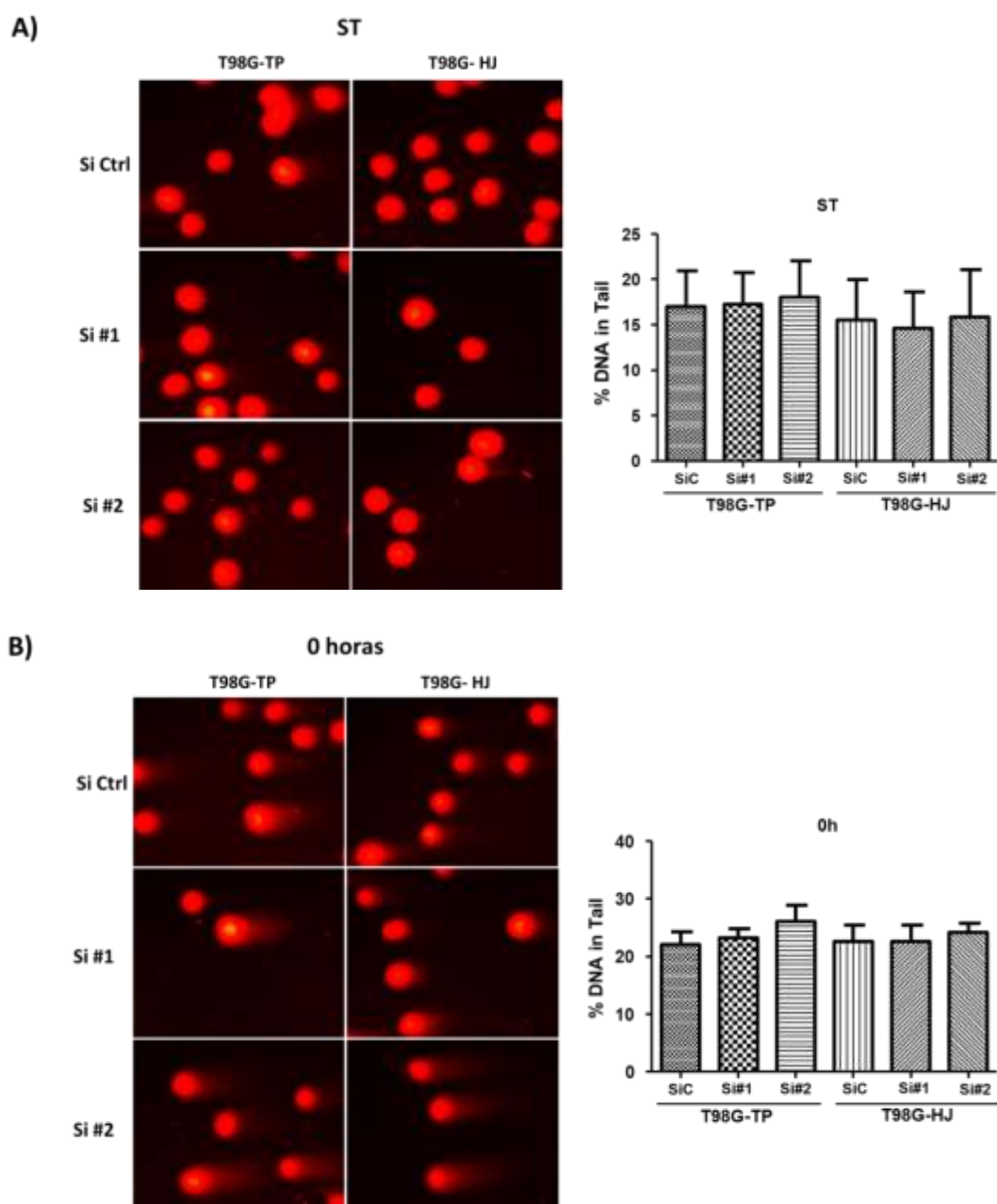
Western blot mostrando o nível de expressão proteico de CENP-A em células T98G-HJ após a transfecção com siControl, siCENP-A#1 ou siCENP-A#2. Após 44 horas da transfecção, foi realizado o tratamento com bleomicina na concentração de 5 μ M durante o período de exposição de 2h. Os

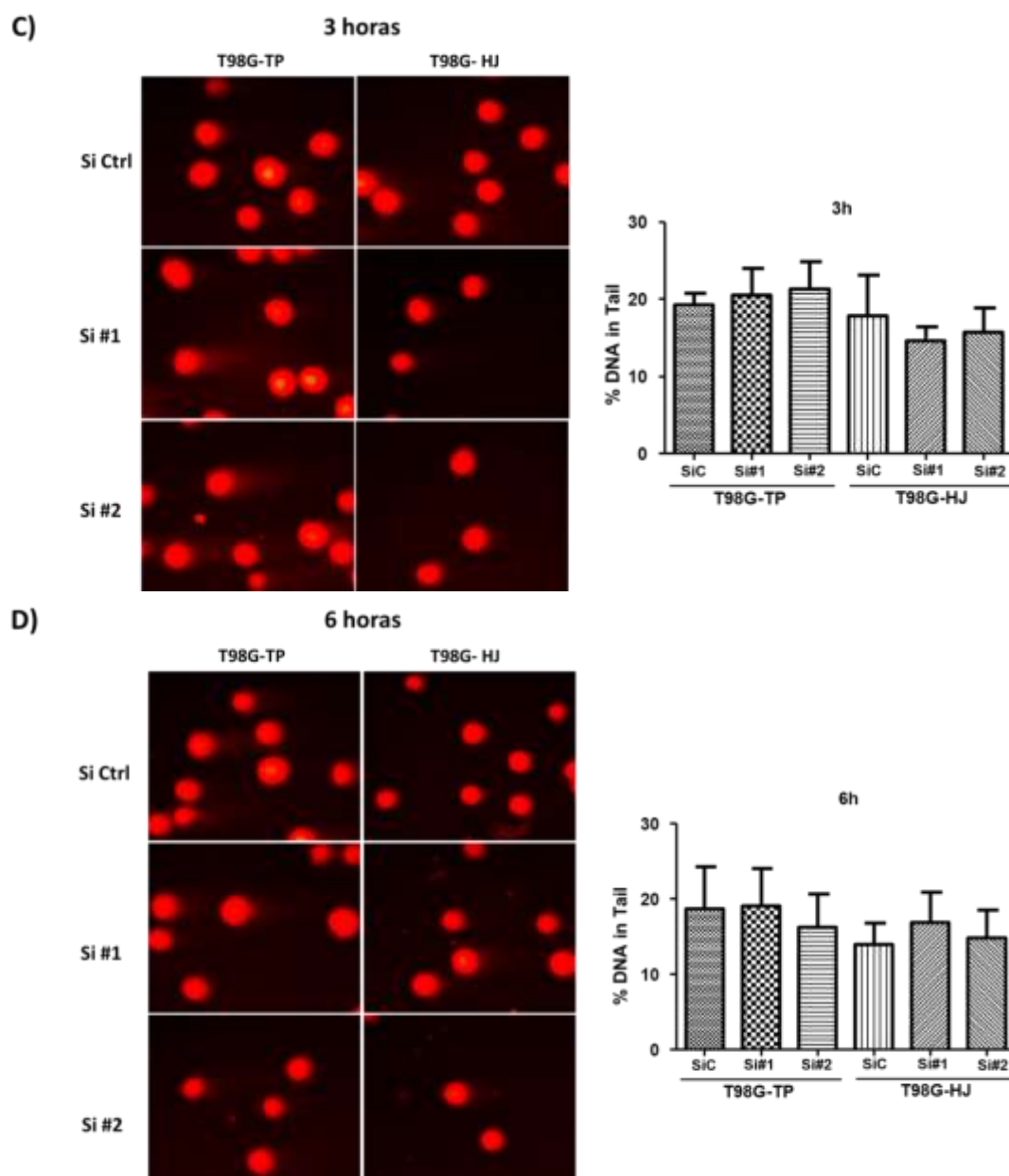
diferentes lisados proteicos foram separados por SDS-PAGE imediatamente após o período de recuperação de 6 horas (tempo 6h). Em seguida, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose e sondadas com os anticorpos para CENP-A e tubulina. Os sinais foram detectados por quimioluminescência em equipamento ChemiDoc (BioRad) (elaborado pela autora 2024).

No resultado obtido na figura 14, as imagens sugerem que em todas as condições avaliadas (ST, 0h, 3h e 6h), a linhagem T98G superexpressora de HJURP apresenta uma maior capacidade no processamento das lesões em relação a T98G-TP, ratificando a importância de HJURP no contexto de reparo do material genético. Este comportamento se torna mais evidente nas condições de recuperação, nas quais as células T98G-HJ mostram-se mais eficientes na recuperação das quebras em relação às células T98G-TP, evidenciando uma dinâmica de reparo na qual aparentemente HJURP favorece o processamento das lesões no período avaliado. Entretanto, a análise estatística feita a partir das quantificações de três experimentos independentes não mostrou diferenças significativas nas comparações realizadas, sendo que para todas as comparações o valor de p foi maior que 0,01, ou seja, sem relevância significativa. Isso possivelmente se deve ao grande desvio observado entre as repetições, o que pode ser visualizado nos gráficos apresentados na figura 14. Portanto, ainda são necessárias novas repetições deste experimento para confirmação do resultado obtido.

Importantemente, nosso conjunto de dados sugere que, no contexto do reparo de quebras de dupla fita de DNA, a presença ou não de CENP-A não interfere na capacidade de processamento de lesões executada por HJURP, já que as células superexpressoras de HJURP parecem reparar os danos com a mesma eficiência nas condições siControl, ou siCENP-A#1 e siCENP-A#2.

Figura 14 - Avaliação da fragmentação de DNA nas linhagens T98G-TP e T98G-HJ após o silenciamento de CENP-A e tratamento com bleomicina.





A fragmentação do DNA foi avaliada através do ensaio do cometa neutro. Após os tratamentos indicados foi feita a lise e a eletroforese e, em seguida, as células foram fixadas, marcadas com brometo de etídio e por fim fotografadas utilizando microscópio de fluorescência. **A.** Após o silenciamento de CENP-A por 44 horas, as células indicadas foram colocadas nas lâminas contendo agarose. Esta condição se trata do controle negativo, e, portanto, sem tratamento (ST) com bleomicina. **B.** Para esta condição, após o silenciamento de CENP-A, as células foram tratadas com bleomicina a 5 μ M durante 2h e imediatamente colocadas em lâminas contendo agarose (tempo 0h). **C.** Já nesta condição, após o silenciamento de CENP-A, as células foram tratadas com bleomicina a 5 μ M durante 2h, em seguida, retirou-se o tratamento e foi adicionado meio novo (DMEM), com incubação por 3 horas (tempo 3h) para recuperação. **D.** Após o silenciamento de CENP-A, as células foram tratadas com bleomicina a 5 μ M durante 2h, em seguida, retirou-se o tratamento e foi adicionado meio novo (DMEM), com incubação por 6 horas (tempo 6h) para recuperação. Nos gráficos mostrados em **A, B, C e D**, foi feita quantificação do DNA fragmentado, em três experimentos independentes, utilizando o software CometScore. A porcentagem de DNA na cauda foi utilizada como parâmetro. A significância estatística foi determinada pela análise de variância One way ANOVA, com pós-teste de Tukey (elaborado pela autora 2024).

5.8. Análise da fosforilação de H2AX nas linhagens T98G-TP e T98G-HJURP após o silenciamento de CENP-A e tratamento com bleomicina

Após o resultado obtido com o cometa, focamos em verificar a expressão de HJURP e γ H2AX (H2AX fosforilada) nas mesmas condições de silenciamento, tratamento com bleomicina e tempos de recuperação aplicados no ensaio anterior, para entendermos melhor a sinalização de danos envolvida na dinâmica de reparo que encontramos previamente. Uma vez que o *western blot* estava bem estabelecido e dispunhamos de anticorpos para γ H2AX, poderíamos avaliar a dinâmica de sinalização de danos através desse parâmetro. Sabe-se que a variante de histona H2AX é fosforilada em resposta a presença de quebras no DNA ou em condição de estresse de replicação (Redon *et al.*, 2003; Lyu *et al.*, 2019; Hsu *et al.*, 2021). Portanto, pelo fato de não ser uma marcação específica de quebras de dupla fita do DNA, como o cometa neutro, é esperado não coincidir a porcentagem de quebras encontradas anteriormente e a ativação de H2AX em cada condição executada. De qualquer forma, esse parâmetro nos permite verificar se a sinalização de danos, que sabemos ser facilitada pela HJURP, ocorre de forma apropriada na ausência de CENP-A. Para essa análise, foram plaqueadas 400.000 células por poço das linhagens T98G-TP e T98G-HJ, que permaneceram em cultura durante 24h. Em seguida, foi realizada a transfecção com os respectivos siRNAs durante 44 horas e então o tratamento com bleomicina 5 μ M durante 2h, com coleta das células para preparação dos lisados proteicos nas condições de controle negativo (ST), dano agudo (0h), e recuperação de 3h (tempo 3h) e 6h (tempo 6h). O protocolo de silenciamento de CENP-A e o tratamento com bleomicina foram realizados de acordo com o descrito anteriormente nos materiais e métodos. Em seguida, foi realizada a extração de proteínas, a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e o *western blot*, também de acordo com o descrito previamente.

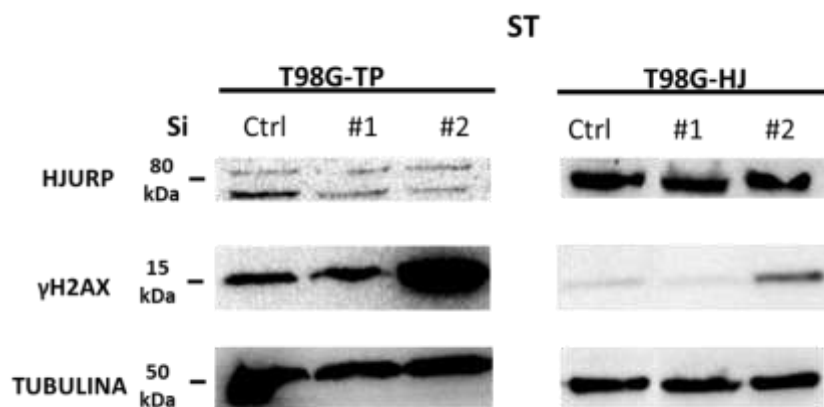
Ao observar a figura 15, na condição sem tratamento (ST), fica evidente a função de HJURP no reparo das lesões, nesse caso causadas pelo próprio silenciamento de CENP-A (já observado anteriormente), já que a quantidade de H2AX fosforilada na linhagem T98G-HJ diminui muito em comparação com a T98G-TP. Além disso, esta observação corrobora que silenciar CENP-A por si só gera níveis expressivos de dano ao DNA. Este comportamento, de maneira geral, foi replicado nas demais condições avaliadas, onde os altos níveis de HJURP mostraram-se associados com a diminuição de γ H2AX. Este resultado é condizente com os dados obtidos anteriormente pelo

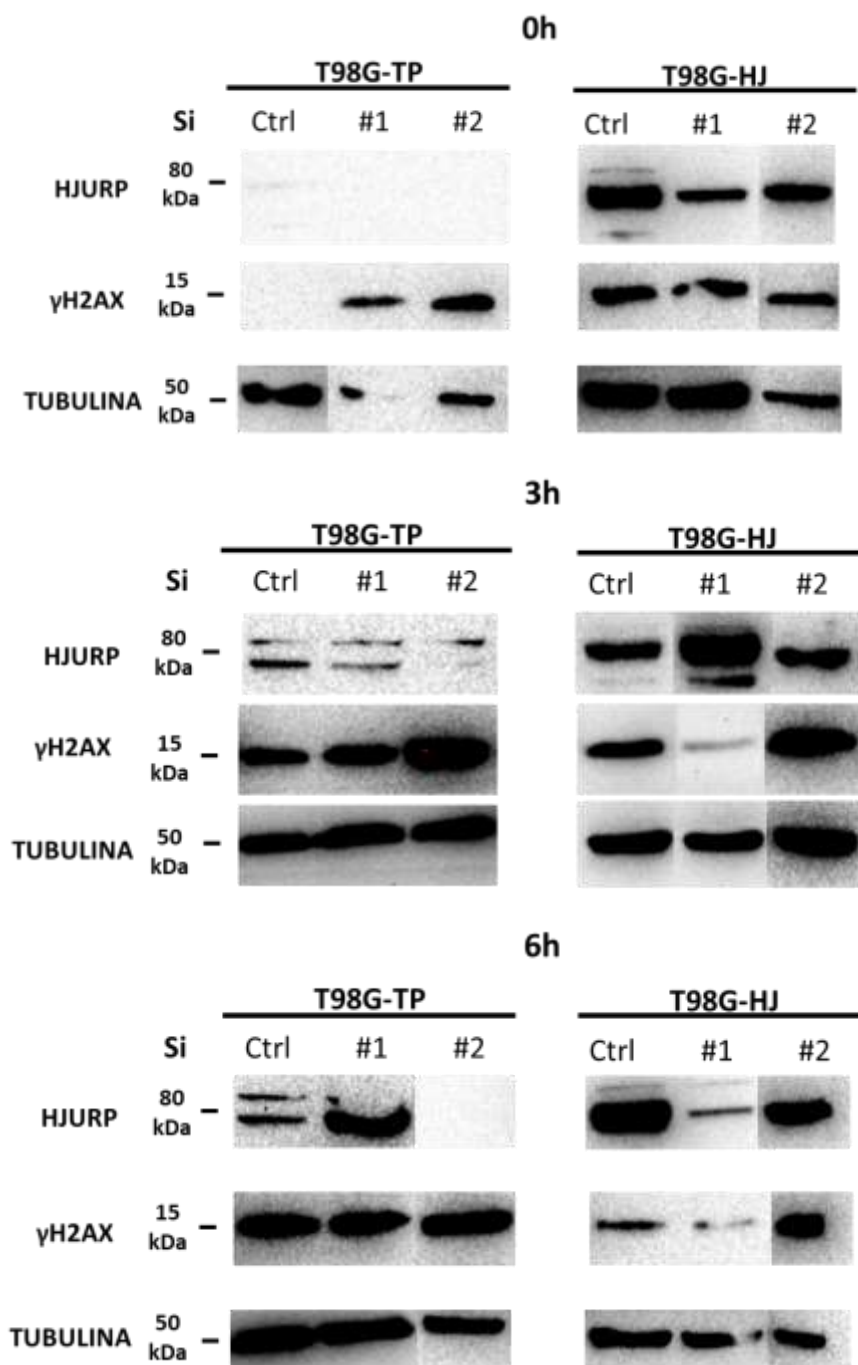
nosso laboratório, nos quais foi visto que a superexpressão de HJURP favorece a descompactação da cromatina no entorno da ruptura, facilitando toda a sinalização de dano e o processamento das lesões. Portanto, neste estudo avançamos um pouco na caracterização desse processo, pois vimos que a HJURP é capaz de favorecer a sinalização de danos mesmo na ausência de CENP-A, o que indica que esta função pode ser desempenhada sem envolver o parceiro usual da chaperona HJURP.

Outro ponto curioso que observamos, conforme figura 15, foi uma aparente indução na expressão de HJURP na condição de 3h de recuperação, onde a linhagem T98G-HJ tratada com bleomicina mostrou um incremento na expressão de HJURP, quando silenciada com siCENP-A#2 em relação ao siControl. Esse padrão de indução de HJURP é um achado novo e surpreendente, que precisa ser melhor investigado. Porém, esse experimento mostrou grandes variações e falhas em algumas raias, de modo que repetições ainda precisam ser feitas para confirmação dos resultados e realização da análise estatística dos dados.

Assim como para o ensaio do cometa, em todas as condições experimentais realizadas, não detectamos diferenças consideráveis e consistentes na quantidade de γ H2AX, entre as condições siControl, e siCENP-A#1 ou siCENP-A#2, o que sugere novamente que a presença ou não de CENP-A, não interfere com a função de HJURP no controle da sinalização de danos. Então, para a principal pergunta deste trabalho, se CENP-A possui função na atividade de facilitação do reparo executada pela HJURP, obtivemos indícios de que a variante de histona CENP-A não é requerida.

Figura 15 - Análise da expressão de HJURP e γ H2AX nas linhagens T98G-TP e T98G-HJ após silenciamento de CENP-A e tratamento com bleomicina.



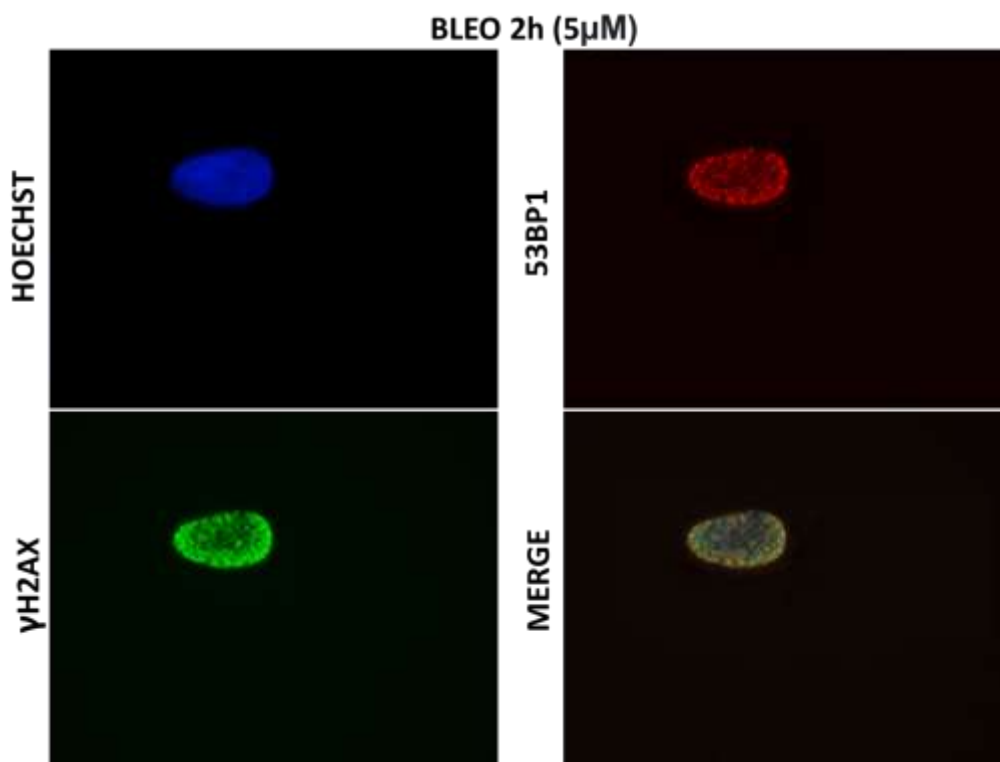


Western blot mostrando o nível de expressão proteico de HJURP e γ H2AX em células T98G-TP e T98G-HJ após a transfecção com siControl, siCENP-A#1 ou siCENP-A#2. Após 44 horas da transfecção, foi realizado o tratamento com bleomicina na concentração de 5 μ M durante o período de exposição de 2h. As amostras foram separadas por SDS-PAGE imediatamente após o tratamento com o fármaco (tempo 0h) e também após o período de recuperação de 3 horas (tempo 3h) e 6 horas (tempo 6h). Como controle negativo foram utilizadas células sem tratamento (ST). Em seguida, as amostras proteicas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose e sondadas com os anticorpos para HJURP, γ H2AX e tubulina. Os sinais foram detectados por quimioluminescência (elaborado pela autora 2024).

5.9. Avaliação da formação de focos de proteínas envolvidas em reparo de DNA através de microscopia de fluorescência

Com o objetivo de aprender a executar o protocolo de imunofluorescência e iniciar a padronização do experimento de resolução de focos, foi realizado um experimento piloto empregando a linhagem T98G-HJ e o tratamento com bleomicina na concentração de 5 μ M durante o período de exposição de 2h. Após a geração de danos ao DNA, as células foram imediatamente fixadas. Na figura 16 é possível observar que a resposta à geração de danos no DNA ocorreu adequadamente, através da formação de focos de 53BP1, proteína promotora de reparo pela ativação da via de “reparo por junção de pontas não homólogas” (NHEJ, do inglês *non-homologous end joining*), e de γ H2AX, variante de histona importante na sinalização da existência de dano. Verifica-se que o tempo de tratamento foi suficiente para promover o recrutamento de 53BP1 para as lesões, o que pode ser verificado pela co-localização do sinal de 53BP1 e γ H2AX (figura 4, MERGE).

Figura 16 - Formação de focos de 53BP1 e γ H2AX na linhagem T98G-HJ após tratamento com bleomicina.



Células T98G-HJ tratadas com bleomicina à 5 μ M durante o período de exposição de 2h e fixadas imediatamente após o tratamento. Foi realizada a detecção com anti- γ H2AX (verde) e anti-53BP1 (vermelho). Em MERGE temos a sobreposição das imagens obtidas com os filtros verde e vermelho em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse) (elaborado pela autora 2024).

6. DISCUSSÃO

Conforme relatado ao longo do tópico de resultados, nossos achados demonstram em conjunto que CENP-A não contribui na função de reparo executada por HJURP. Neste contexto, avanços recentes nos estudos sobre a dinâmica da cromatina, destacam o papel fundamental da remodelação de cromatina para processos que ocorrem no núcleo celular, como a replicação, transcrição e o reparo do DNA (Stirpe; Heun, 2023). CENP-A, variante da histona H3, é essencial para a formação de centrômeros e cinetócoros funcionais (Barnhart *et al.*, 2011; Dunleavy *et al.*, 2009; Foltz *et al.*, 2009) sendo que a instabilidade centromérica pode acarretar em anormalidades congênitas, envelhecimento prematuro e câncer (Barra; Fachinetti, 2018). Entretanto, a superexpressão de CENP-A promove a sua deslocalização do centrômero (Gascoigne *et al.*, 2011) e contribui para a montagem de cinetócoros ectópicos (Shrestha *et al.*, 2017). Nesse contexto, o processo de remodelação da cromatina parece estar diretamente relacionado ao carregamento de CENP-A nos centrômeros e a sua remoção em regiões ectópicas (Dunleavy *et al.*, 2011; Shukla *et al.*, 2018). Mecanismos de regulação transcricional e pós-traducional atuam de forma integrada para prevenir e remover esse acúmulo inadequado (Stirpe; Heun, 2023). De fato, estudos demonstram uma correlação entre a superexpressão de CENP-A e a progressão do câncer, sendo reconhecida como um importante marcador prognóstico em carcinomas, como o hepatocelular e o renal (Zhang *et al.*, 2020b; Wang *et al.*, 2021). Portanto, o correto direcionamento de CENP-A especificamente para o centrômero, assim como a correção da incorporação incorreta em regiões não centroméricas, são processos essenciais para a sobrevivência celular.

Entre os locais não centroméricos onde o recrutamento de CENP-A foi observado, observou-se a ocorrência em quebras de fita dupla de DNA (Mathew *et al.*, 2014) e seu recrutamento parece estar correlacionado com a atividade da via de reparo por junção de pontas não homólogas (NHEJ, do inglês *non-homologous end joining*) (Helfricht *et al.*, 2013). Uma vez que o recrutamento de CENP-A ocorre de forma independente de H2AX, marcador de sinalização de dano ao DNA, é provável que essa proteína se localize em DSBs durante os estágios iniciais do reparo (Zeitlin *et al.*, 2009). Dados recentes mostraram também que CENP-A participa do reparo de quebras em regiões centroméricas ao induzir a recombinação homóloga durante a

fase G1 do ciclo celular, em um mecanismo dependente da ação de USP11 (Yilmaz *et al.*, 2021), sugerindo uma conexão entre CENP-A e as vias de reparo de danos ao DNA. Há indícios de que o direcionamento de CENP-A para as regiões de dano pode ser mediado pelo complexo ATRX-DAXX, que interage com CENP-A e atua tanto no reparo por NHEJ quanto por recombinação homóloga (Juhász *et al.*, 2018; Koschmann *et al.*, 2016; Lacoste *et al.*, 2014).

Por outro lado, outro estudo indicou que danos ao DNA em células de roedores, causados por drogas genotóxicas, resultam na desorganização da cromatina centromérica, acompanhada pela deslocalização de CENP-A, em um mecanismo dependente de p53 e da transcrição de repetições centroméricas. A deslocalização de CENP-A também requer a ativação da proteína ATM e a fosforilação da serina 30 de CENP-A (Hédouin *et al.*, 2017). Adicionalmente, foi visto que a desorganização centromérica também é observada em células em processo de senescência (Swanson *et al.*, 2013) e que o próprio silenciamento de CENP-A induz senescência prematura em células humanas (Maehara *et al.*, 2010). Conjuntamente, esses achados indicam a existência de um mecanismo de manutenção da estabilidade genômica, ao promover a desorganização centromérica e impedir que células com danos no DNA se dividam. Mais recentemente, um estudo avaliou como a superexpressão de CENP-A influencia o destino de células com diferenças no *status* do gene supressor tumoral p53. Os resultados demonstraram que a superexpressão de CENP-A leva a radiosensibilidade em linhagens tumorais e não tumorais, de maneira dependente de p53. A radiosensibilidade ocorre em células com p53 selvagem, além de perturbação mitótica e senescência. Além disso, foi observado que a p53 funcional não permite a mudança na identidade celular. Entretanto, caso p53 não apresente funcionalidade, o ciclo celular progride mesmo após a perturbação mitótica, permitindo que a superexpressão de CENP-A altere a identidade celular. Tal estudo também realizou marcação de γ H2AX e cometa para ver se o reparo estaria envolvido na radiosensibilidade, entretanto não observaram mudança no DNA ou na taxa de reparo (Jeffery *et al.*, 2021).

Desta forma, as evidências na literatura de que CENP-A possui função no reparo de DNA são controversas. Neste trabalho, o objetivo principal era verificar se a presença de CENP-A afeta a capacidade de processamento e reparo de lesões facilitada pela HJURP. Conforme detalhado no tópico resultados, a análise da cinética de resolução de quebras de dupla fita de DNA induzidas por bleomicina, sob

silenciamento de CENP-A, utilizando o ensaio do cometa, confirmou a relevância de HJURP no reparo das lesões, com a superexpressão de HJURP levando à redução das DSBs, especialmente após 6 horas, o que indica um reparo otimizado. Este ensaio sugeriu que CENP-A não contribui para a função de HJURP no reparo de DNA, já que não houve diferenças significativas na fragmentação do DNA entre as condições de controle e silenciamento de CENP-A. Além disso, a expressão de HJURP e a fosforilação de H2AX foram analisadas por *western blot*, nas mesmas condições de silenciamento de CENP-A e tratamento com bleomicina, corroborando mais uma vez a importância de HJURP no reparo, já que a superexpressão resultou em menor fosforilação de H2AX. Importaneamente, os resultados do *western blot* também sugeriram que a presença de CENP-A não interfere na capacidade de processamento e reparo de lesões ao DNA executada por HJURP, pois células silenciadas ou não para CENP-A não mostraram diferenças na quantidade de γ H2AX. Além disso, de maneira interessante, foi identificada uma possível indução da expressão de HJURP em algumas condições experimentais relacionadas ao silenciamento de CENP-A e bleomicina, o que demanda investigação adicional.

Estes resultados ratificam os achados do grupo que indicam que HJURP atue de forma independente de CENP-A na sinalização mediada por RAD51 para promover a facilitação geral do reparo, sendo CENP-A detectada na lesão apenas por interagir fisicamente com HJURP. Desta forma, HJURP, no contexto de reparo ao DNA, promove o *turnover* de H3k9me3 e HP1, facilitando a sinalização de danos e o reparo de quebras de dupla fita (Serafim *et al.*, 2024), sendo que CENP-A não participa da transição entre os estados compactado e relaxado de cromatina. Entretanto, mais estudos são necessários para entender se a CENP-A possui outras funções relacionadas ao reparo do DNA.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo aprofundou a investigação sobre o papel da CENP-A na atividade de reparo de DNA mediada pela HJURP. Os dados obtidos sugerem fortemente que a HJURP pode exercer suas funções de reparo independentemente da presença da variante de histona CENP-A.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, T.; DUTTA, A. P21 in cancer: Intricate networks and multiple activities. **Nature Reviews Cancer**, v.9, n.1, p.1-12, 2009. Nature Publishing Group.
- ALLSHIRE, R. C.; KARPEN, G. H. Epigenetic regulation of centromeric chromatin: Old dogs, new tricks? **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 12, p. 923–937, 2008.
- BARNHART, M. C. *et al.* HJURP is a CENP-A chromatin assembly factor sufficient to form a functional de novo kinetochore. **Journal of Cell Biology**, v. 194, n. 2, p. 229–243, 2011.
- BARRA, V.; FACHINETTI, D. The dark side of centromeres: types, causes and consequences of structural abnormalities implicating centromeric DNA. **Nature Communications**, v.9, p.532, 1 dez. 2018. Nature Publishing Group.
- BERNAD, R. *et al.* Xenopus HJURP and condensin II are required for CENP-A assembly. **Journal of Cell Biology**, v. 192, n. 4, p. 569–582, 2011.
- BLOWER, M. D.; KARPEN, G. H. The role of Drosophila CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 8, p. 730–739, 2001.
- CAO, R. *et al.* Silencing of HJURP induces dysregulation of cell cycle and ROS metabolism in bladder cancer cells via PPAR γ -SIRT1 feedback loop. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 12, p. 2282–2295, 2017.
- CHEN, T. *et al.* HJURP promotes hepatocellular carcinoma proliferation by destabilizing p21 via the MAPK/ERK1/2 and AKT/GSK3 β signaling pathways. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 37, n. 1, 15 ago. 2018.
- CHEN, T. *et al.* HJURP promotes epithelial-to-mesenchymal transition via upregulating SPHK1 in hepatocellular carcinoma. **International Journal of Biological Sciences**, v. 15, n. 6, p. 1139–1147, 2019.
- CHESON, B. D: **Pharmacology of Cancer Chemotherapy: miscellaneous chemotherapeutic agents**. In: De Vita Jr, V. T.; Hellmann, S.; Rosenberg, A.S. (org.). *Cancer Principles & Practice of Oncology*. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. P.452-459.
- CLEVELAND, D. W.; MAO, Y.; SULLIVAN, K. F. Centromeres and kinetochores: From epigenetics to mitotic checkpoint signaling. **Cell**, v. 112, n. 4, p. 407–421, 2003.
- DUNLEAVY, E. M. *et al.* HJURP Is a Cell-Cycle-Dependent Maintenance and Deposition Factor of CENP-A at Centromeres. **Cell**, v. 137, n. 3, p. 485–497, 2009.
- DUNLEAVY, E. M.; ALMOUZNI, G.; KARPEN, G. H. H3.3 is deposited at centromeres in S phase as a placeholder for newly assembled CENP-A in G phase. **Nucleus (Austin, Tex.)**, v. 2, n. 2, p. 146–157, 2011.
- FOLTZ, D. R. *et al.* Centromere-Specific Assembly of CENP-A Nucleosomes Is Mediated by HJURP. **Cell**, v. 137, n. 3, p. 472–484, 2009.
- GASCOIGNE, K. E. *et al.* Induced ectopic kinetochore assembly bypasses the requirement for CENP-A nucleosomes. **Cell**, v. 145, n. 3, p. 410–422, 29 abr. 2011.
- HÉDOUIN, S. *et al.* CENP-A chromatin disassembly in stressed and senescent murine cells. **Scientific Reports**, v. 7, 10 fev. 2017.
- HELFRICHT, A. *et al.* Remodeling and spacing factor 1 (RSF1) deposits centromere proteins at DNA double-strand breaks to promote non-homologous end-joining. **Cell**

Cycle, v. 12, n. 18, p. 3070–3082, 15 set. 2013.

HEO, J. I.; CHO, J. H.; KIM, J. R. HJURP regulates cellular senescence in human fibroblasts and endothelial cells via a p53-dependent pathway. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 68, n. 8, p. 914–925, 2013.

HOUSE, N. C. M.; KOCH, M. R.; FREUDENREICH, C. H. Chromatin modifications and DNA repair: Beyond double-strand breaks. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n.9, p.1-9, 2014.

HU, Z. *et al.* The expression level of HJURP has an independent prognostic impact and predicts the sensitivity to radiotherapy in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 2, p. 1–15, 2010.

HUERTAS, P. DNA resection in eukaryotes: Deciding how to fix the break. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 17, n. 1, p. 11–16, 2010.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1071–1078, 2009.

JANSEN, M.; YIP, S.; LOUIS, D. N. Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 7, p. 717–726, 2010.

JEFFERY, D. *et al.* CENP-A overexpression promotes distinct fates in human cells, depending on p53 status. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, 1 dez. 2021.

JUHÁSZ, S. *et al.* ATRX Promotes DNA Repair Synthesis and Sister Chromatid Exchange during Homologous Recombination. **Molecular Cell**, v. 71, n. 1, p. 11-24.e7, 5 jul. 2018.

KANG, D. H. *et al.* Prognostic relevance of hjurp expression in patients with surgically resected colorectal cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 1–12, 1 nov. 2020.

KATO, T. *et al.* Activation of Holliday junction-recognizing protein involved in the chromosomal stability and immortality of cancer cells. **Cancer Research**, v. 67, n. 18, p. 8544–8553, 2007.

KOSCHMANN, C. *et al.* ATRX loss promotes tumor growth and impairs nonhomologous end joining DNA repair in glioma. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 328, 2 mar. 2016.

LACOSTE, N. *et al.* Mislocalization of the Centromeric Histone Variant CenH3/CENP-A in Human Cells Depends on the Chaperone DAXX. **Molecular Cell**, v. 53, n. 4, p. 631–644, 20 fev. 2014.

LAI, W. *et al.* HJURP promotes proliferation in prostate cancer cells through increasing CDKN1A degradation via the GSK3 β /JNK signaling pathway. **Cell Death and Disease**, v. 12, n. 6, 1 jun. 2021.

LATHIA, J. D.; MACK, S. C.; MULKEARNS-HUBERT, E. E. *et al.* Cancer stem cells in glioblastoma. **Genes e Development**. v. 29, n.12; 2015.

LI, L. *et al.* Increased expression of holliday junction-recognizing protein (HJURP) as an independent prognostic biomarker in advanced-stage serous ovarian carcinoma. **Medical Science Monitor**, v. 24, p. 3050–3055, 2018.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using

real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

MA, C. J. *et al.* Protein dynamics of human RPA and RAD51 on ssDNA during assembly and disassembly of the RAD51 filament. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 2, p. 749–761, 2017.

MAEHARA, K.; TAKAHASHI, K.; SAITOH, S. CENP-A Reduction Induces a p53-Dependent Cellular Senescence Response To Protect Cells from Executing Defective Mitoses. **Molecular and Cellular Biology**, v. 30, n. 9, p. 2090–2104, 1 maio 2010.

MALANGA, M.; ALTHAUS, F. R. The role of poly(ADP-ribose) in the DNA damage signaling network. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 83, n. 3, p. 354–364, 2005.

MAO, M. *et al.* HJURP regulates cell proliferation and chemo-resistance via YAP1/NDRG1 transcriptional axis in triple-negative breast cancer. **Cell Death and Disease**, v. 13, n. 4, 1 abr. 2022.

MATHEW, V. *et al.* The Histone-Fold Protein CHRAC14 Influences Chromatin Composition in Response to DNA Damage. **Cell Reports**, v. 7, n. 2, p. 321–330, 24 abr. 2014.

MEIR, E. G. VAN.; HADJIPANAYIS, C. G.; NORDEN, A. D. *et al.* Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 60, n. 3, p. 166-93, 2010.

MISHRA, P. K. *et al.* Misregulation of Scm3p/HJURP causes chromosome instability in *saccharomyces cerevisiae* and human cells. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 9, 2011.

MÜLLER, S. *et al.* Phosphorylation and DNA binding of HJURP determine its centromeric recruitment and function in CenH3CENP-A loading. **Cell Reports**, v. 8, n. 1, p. 190–203, 2014.

OHZEKI, J. ICHIROU *et al.* KAT7/HBO1/MYST2 Regulates CENP-A Chromatin Assembly by Antagonizing Suv39h1-Mediated Centromere Inactivation. **Developmental Cell**, v. 37, n. 5, p. 413–427, 2016.

PERPELESCU, M. *et al.* HJURP is involved in the expansion of centromeric chromatin. **Molecular Biology of the Cell**, v. 26, n. 15, p. 2742–2754, 2015.

PRICE, B. D.; D'ANDREA, A. D. Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. **Cell**, v. 152, n. 6, p. 1344–1354, 2013.

RAMAKERS, C. *et al.* Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62–66, 2003.

REDON, C. *et al.* Yeast histone 2A serine 129 is essential for the efficient repair of checkpoint-blind DNA damage. **EMBO Reports**, v. 4, n. 7, p. 678–684, 1 jul. 2003.

RICARD, D. *et al.* Primary brain tumours in adults. **The Lancet**, v. 379, n. 9830, p. 1984–1996, 2012.

SARTORI, A. A. *et al.* Human CtIP promotes DNA end resection. **Nature**, v. 450, n. 7169, p. 509–514, 2007.

SATHYAN, K. M.; FACHINETTI, D.; FOLTZ, D. R. α -amino trimethylation of CENP-A by NRMT is required for full recruitment of the centromere. **Nature Communications**, v. 8, 7 mar. 2017.

SERAFIM, R. B. *et al.* HJURP is recruited to double-strand break sites and facilitates

DNA repair by promoting chromatin reorganization. **Oncogene**, v. 43, n. 11, p. 804–820, 7 mar. 2024.

SHRESTHA, R. L. *et al.* Mislocalization of centromeric histone H3 variant CENP-A contributes to chromosomal instability (CIN) in human cells. **Oncotarget**, [s.l.], v. 46781, 2017. Disponível em: <www.impactjournals.com/oncotarget/>.

SHUKLA, M. *et al.* Centromere DNA Destabilizes H3 Nucleosomes to Promote CENP-A Deposition during the Cell Cycle. **Current Biology**, v. 28, n. 24, p. 3924–3936.e4, 17 dez. 2018.

SINGH, M. *et al.* EMT: mechanisms and therapeutic implications. **Pharmacol Ther** 2018; 182: 80–94

STIRPE, A.; HEUN, P. The ins and outs of CENP-A: Chromatin dynamics of the centromere-specific histone. **Seminars in Cell and Developmental Biology**. Elsevier Ltd, 15 fev. 2023.

STUPP, R. *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 5, p. 459–466, 2009.

SWANSON, E. C. *et al.* Higher-order unfolding of satellite heterochromatin is a consistent and early event in cell senescence. **Journal of Cell Biology**, v. 203, n. 6, p. 929–942, 23 dez. 2013.

TAYLOR, E. M. and LINDSAY, H. D. DNA replication stress and cancer: cause or cure?. **Future Oncol**. v. 12, p. 221–237, 2016.

VALENTE, V. *et al.* Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 10, p. 1–11, 2009.

VALENTE, V. *et al.* Modulation of HJURP (Holliday Junction-Recognizing Protein) Levels Is Correlated with Glioblastoma Cells Survival. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

VAN MEIR, E. G. *et al.* Exciting New Advances in Neuro-Oncology: The Avenue to a Cure for Malignant Glioma. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 60, n. 3, p. 166–193, 1 maio 2010.

VILLALVA, C. *et al.* O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) promoter methylation status in glioma stem-like cells is correlated to temozolomide sensitivity under differentiation-promoting conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 6, p. 6983–6994, jun. 2012.

WANG, C. JING *et al.* Holliday junction recognition protein promotes pancreatic cancer growth and metastasis via modulation of the MDM2/p53 signaling. **Cell Death and Disease**, v. 11, n. 5, 1 maio 2020.

WANG, Q. *et al.* CENPA promotes clear cell renal cell carcinoma progression and metastasis via Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Journal of Translational Medicine**, v. 19, n. 1, 1 dez. 2021.

WEI, Y. *et al.* Knockdown of HJURP inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation, migration, and invasion by repressing Wnt/ β -catenin signaling. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 23, p. 1–10, maio 2019.

WHITFIELD, B. T.; HUSE, J. T. Classification of adult-type diffuse gliomas: Impact of

the World Health Organization 2021 update. **Brain Pathology** John Wiley and Sons Inc, 1 jul. 2022.

XU, Y. *et al.* Histone H2A.Z Controls a Critical Chromatin Remodeling Step Required for DNA Double-Strand Break Repair. **Molecular Cell**, v. 48, n. 5, p. 723–733, 2012.

YILMAZ, D. *et al.* Activation of homologous recombination in G1 preserves centromeric integrity. **Nature**, v. 600, n. 7890, p. 748–753, 23 dez. 2021.

YU, Z. *et al.* Dynamic phosphorylation of CENP-A at Ser68 orchestrates its cell-cycle-dependent deposition at centromeres. **Developmental Cell**, v. 32, n. 1, p. 68–81, 2015.

ZEITLIN, S. G. *et al.* Double-strand DNA breaks recruit the centromeric histone CENP-A. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n.37, p. 15762-15767, 2009.

ZHANG, Y. *et al.* The oncogenic role of CENP-A in hepatocellular carcinoma development: evidence from bioinformatic analysis. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 1-8, 2020.