ALEXANDRE TEIXEIRA VESSONI

Mecanismos de resistência à cloroquina em células de glioma humano e o uso de neurônios humanos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas como modelo de estudo da síndrome de Cockayne

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2015

ALEXANDRE TEIXEIRA VESSONI

Mecanismos de resistência à cloroquina em células de glioma humano e o uso de neurônios humanos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas como modelo de estudo da síndrome de Cockayne

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Carlos Frederico Martins Menck

Versão Original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Vessoni, Alexandre Teixeira.

Mecanismos de resistência à cloroquina em células de glioma humano e o uso de neurônios humanos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas como modelo de estudo da síndrome de Cockayne / Alexandre Teixeira Vessoni. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Câncer e degeneração do sistema nervoso central.

Versão do título para o inglês: Mechanisms of resistance to chloroquine-induced toxicity in human glioma cells, and the use induced pluripotent stem cells-derived human neurons as a model to study Cockayne syndrome.

1. Glioma 2. Cloroquina 3. Síndrome de Cockayne 4. Células-tronco 5. Neurodegeneração I. Menck, Prof. Dr. Carlos Frederico Martins II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB061/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Alexandre Teixeira Vessoni.

Título da Tese: Mecanismos de resistência à cloroquina em células de glioma humano e o uso de neurônios humanos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas como modelo de estudo da síndrome de Cockayne.

Orientador(a): Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 25 de março de 2009.

PARECER 885/CEP

Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 93ª reunião realizada em 24.003.09, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: *"Análise de Autofagia e Morte Celular frente Luz UVB em Células Deficientes e Proficientes para Reparo de DNA por Excisão de Nucleotídeos"*.

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão.**

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **24 de março de 2010.**

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO M.A ZANOTTO
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilmo.Sr.
ALEXANDRE TEIXEIRA VESSONI
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Dedicado à memória dos meus avós
Dedicado aos meus pais e ao meu irmão
Dedicado à memória do Faísca

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha família. Meu pai Marco, minha mãe Heloisa e meu irmão André. Estar em casa sempre foi como me sentir dentro de uma fortaleza. Não importava o “tempo lá fora”, vocês fizeram da nossa casa um lugar sempre seguro. Tive o melhor cuidado estilo “mamão com açúcar” que alguém poderia ter, graças ao esforço sobre-humano dos meus pais para que eu e meu irmão tivéssemos sempre “do bom e do melhor”. Claro que meus pais foram ajudados pelos meus avós, Alberto, Etelvina, Luíza e também João, que apesar de eu não ter tido o prazer de conhecer, vejo pelo meu pai que ele foi um homem grandioso que fez o mesmo pela sua família que meu pai fez por nós. E ao meu irmãozão, o meu melhor amigo, parceiro do estilo mamão com açúcar de viver, um especial e imenso obrigado por toda a diversão e companheirismo. Apesar de você ser o “mais novo”, sempre me senti amparado e protegido por você como se você fosse o meu “irmão mais velho”. Vocês todos foram, e sempre serão, essenciais para mim.

Em segundo lugar, esta tese não teria tomado esta forma se não fosse por todo o apoio da Annabel. Nunca que eu poderia imaginar que ser designado pelo chefe, para receber uma “recém-chegada” no laboratório, na manhã de um domingo chuvoso, poderia ser o início de uma história única, de afinidade em todos os sentidos, que nem mesmo 1 ano e meio vivendo em continentes separados foram capazes de abalar. Minha relação com você é a perfeita definição de parceria: a cada dia você me leva um pouco além, me sinto constantemente evoluindo ao seu lado; sua parceria me completa. Estar ao seu lado me torna cada vez mais curioso, maduro, seguro, feliz e apaixonado. Obrigado por tudo, Annabel.

Quero agradecer ao Eduardo e ao Professor Guido por terem me proporcionado uma experiência espetacular do que é fazer colaboração. Foram 493 e-mails trocados para compensar a dificuldade de se trabalhar à distância, até termos o trabalho finalizado. Foi uma sintonia incrível, onde todo mundo estava com o mesmo objetivo, e se doando da mesma maneira pra fazer o artigo acontecer. Rendeu não somente uma bela publicação, mas também uma amizade e admiração por esses dois.

Muito obrigado também à Luciana, com a qual tive uma experiência muito semelhante e, da mesma maneira, muito gratificante! Foi também mais uma grande oportunidade de trabalho colaborativo, discussões científicas e muita sintonia. Tudo muito enriquecedor!

Tenho muito que agradecer ao Professor Oswaldo Keith, o qual foi responsável por despertar de vez meu interesse pelo tema “células-tronco” (que corresponde à metade desta tese de doutorado), através da disciplina ministrada por ele na pós-graduação.

Huge thanks to all the Muotri lab fellows, who taught me everything about iPSCs, neuronal cell culture, and many more! Thank you very much for all the funny moments, and for great scientific talks. Cassi, Helen, Fer, Allan, Charlie, Earl, Bia, Leon, Angelina, Pinar, Pri, Lina, Jon, and also Karl (from UCSD Stem Cell Core), you guys are awesome!

Jerome, thank you very much for all the support you gave me by teaching me how to work on MEA, Imaris and Apotome, as well as the endless rides to Burnham. And of course, your friendship. Although “the water was hitting in your butt” for you to finish your thesis, you didn’t think twice to spend some time helping me. All your contribution was invaluable for the CS project to happen, and also to make my life easier and funnier in SD.

Heraí, um grande amigo que conheci em SD, e outra pessoa que teve um papel essencial para o projeto CS acontecer. Obrigado pela grande amizade e pelos vários momentos de diversão, por todas as análises feitas de bioinformática, por todas as conversas científicas! Foram excelentes momentos em SD! Espero que nossa colaboração e amizade só se intensifiquem daqui para frente!

Cleber, apesar desta amargura toda, você é um cara fera, que admiro, e que tenho certeza que chegará muito longe. Obrigado por me socorrer quando caí de paraquedas em SD (e em vários outros momentos), por tudo que me ensinou, e saiba que as lições de autoconfiança foram extremamente valiosas.

Angélica, agradeço muito toda a sua ajuda nos meus últimos meses em SD! Foi extremamente gratificante para mim ter tido a oportunidade de trabalhar com você, e poder lhe passar muito do que eu aprendi por lá! Fico muito feliz de que é você quem irá continuar o projeto CS!

Professor Alysson, sem palavras para descrever a oportunidade ímpar que você me proporcionou ao me aceitar em seu laboratório para um estágio. Apesar dos ganhos inestimáveis em termos científicos, tive uma experiência de vida extremamente enriquecedora e intensa em um curto intervalo de tempo ao participar do seu grupo. Apesar de sua posição de destaque e de estar sempre ocupado, saiba que admiro muito sua prontidão para responder qualquer e-mail, sobre qualquer assunto, além do fato de você ter me recebido em sua sala inúmeras vezes para discutirmos não somente sobre o projeto, mas também sobre qualquer outro tema não relacionado. Foram incríveis e inspiradores os vários *brainstorms* que desenvolvemos. Obrigado por compartilhar diversas de suas ideias científicas “guardadas a sete chaves”, e por deixar eu participar de processos criativos em cima delas. Obrigado por ouvir minhas ideias e me estimular a voar alto com elas. Esses momentos foram muito inspiradores, e certamente exerceram (e continuarão exercendo) uma forte influência na forma como faço/farei ciência.

Professor Menck, outra pessoa que me deixa sem palavras para descrever a sua importância para mim, tanto científica- quanto pessoalmente. Eu posso lhe dizer que com quem quer que eu fale, se esta pessoa conhece o Menck, ela promove uma rasgação de seda para o senhor, assim como eu inevitavelmente irei fazer a seguir. É impressionante a admiração que você desperta nas pessoas. Desde que eu assisti à sua aula, pela primeira vez, eu vi que você tinha uma profunda paixão pela educação, e que isso cativava a todos os alunos. Claro que não escapei, e fui cativado também. Eu não entendia nada do que o seu laboratório fazia, mas imaginei que poderia ser incrível participar do seu grupo. Ao longo desses anos, fui aprendendo a admirar você

por algumas razões, como: seu ímpeto por fazer a USP acontecer, decolar; sua simplicidade de ir até uma comunidade isolada, de chinelo, passar alguns dias lá, convivendo e conversando com os pacientes, levando conhecimento e aconselhando; sua vontade de batalhar para melhorar a condição de vida dessas pessoas; seu conhecimento científico e habilidade de discutir a fundo inúmeros assuntos, além de estar sempre assimilando novos conhecimentos/tecnologias a uma velocidade impressionante; capacidade de sempre identificar o ponto mais relevante em qualquer discussão da qual eu vi você participar; “fazer” tempo para ajudar seus alunos em horas críticas, como no fechamento da tese; seu carinho e preocupação com sua família, entre outras. Estas características tornam o senhor uma pessoa admirável, e tenha certeza de que aprendi muito observando o senhor. Um grande obrigado por tudo, e principalmente por confiar em mim e ter me dado a oportunidade de me juntar ao seu grupo, mesmo com uma média ponderada baixa.

Obrigado aos membros (e ex-membros) do laboratório de Reparo de DNA! Tati e Stephano, que me introduziram à cultura de células humanas; Raquel, que aguentou por um ano um aluno completamente perdido, e cujas broncas foram ouvidas (tarde, mas foram) e assimiladas; Veri e Maria Helena, essenciais para o pleno funcionamento do laboratório, que junto da Marinas, proporcionaram um ambiente *home-like* (além de estarem em constante disputa pelo preenchimento do espaço sonoro do laboratório); obrigado à Debora, Clarissa, Camila, Teiti, Satoru, Vitor, Naty, Ali, aos Rodrigues, Francis, Letícia, Soltys e Luís Portuga! Foram momentos incríveis, dentro e fora do laboratório! Um obrigado especial para a Lu A por todas as dicas em relação ao projeto CS, e ao Janu, por todo o estímulo e confiança depositada em mim. Valeu Leo Vinagrete e Carol Quayle! Demorou para começarmos a nos falar, mas nossa amizade e nossa parceria científica cresceram, e hoje tenho muita admiração e consideração por vocês!

Obrigado à Professora Nadja, por todas as críticas construtivas feitas a diversas partes desta tese!

Obrigado aos amigos da Bio USP: Leitão, Mamão, Pri, Si, Linguíça, Shrek, Ly, Dea, Gabi, Dani, Sapucaí, Jundo, Nescau, Meleca, Ícaro, Mathias, Chefe, CET, Prepúcio... foram anos de muita diversão!

Um baita obrigado a todo que fazem a Universidade pública acontecer. A todos os professores, técnicos, seguranças, funcionários do bandeirão, alunos, bibliotecários, funcionários da limpeza, *facilities*, secretaria e comissão da pós graduação... obrigado por fazerem a cidade universitária funcionar a pleno vapor! Foram todos essenciais para a realização desta tese.

Por fim, agradeço à FAPESP por ter me concedido uma bolsa de estudos no país, bem como uma bolsa de pesquisa no exterior (bolsa BEPE), e também à CAPES, por também ter me financiado no exterior (bolsa PDSE), permitindo que eu continuasse a pesquisa iniciada no laboratório do Professor Alysson. Por fim, um agradecimento à CNPQ, que junto da FAPESP, permitiu a compra de reagentes/equipamentos para o laboratório para o desenvolvimento desta tese.

Todas as vitórias ocultam uma abdicação

Simone de Beauvoir

Resumo

VESSONI, A. T. **Mecanismos de resistência à cloroquina em células de glioma humano e o uso de neurônios humanos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas como modelo de estudo da síndrome de Cockayne**. 2015. 229 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O funcionamento pleno e harmônico de uma célula está intimamente associado à sua capacidade de manter a integridade genômica. Diversos agentes químicos e físicos exógenos, bem como produtos do próprio metabolismo celular, podem interagir com o DNA, causando danos a esta molécula. Em resposta a esses eventos, uma intrincada rede de respostas a danos ao DNA é ativada, podendo culminar tanto na correção das lesões, como na ativação de programas de morte celular, como a apoptose, sempre com o intuito de preservar a homeostase tecidual. Falhas nestas respostas estão associadas a um aumento nas taxas de mutação e morte celular, processos intimamente associados à tumorigênese e ao envelhecimento. Neste trabalho, dividido em duas partes, utilizamos células de glioma humano como modelo de estudo para quimioterapia adjuvante, bem como também utilizamos neurônios humanos obtidos a partir de células-tronco pluripotentes induzidas como modelo de estudo para a neurodegeneração característica da síndrome de Cockayne, uma doença genética na qual os pacientes apresentam deficiências em mecanismos de reparo de DNA, bem como processos de neurodegeneração e envelhecimento precoce. Na primeira etapa, avaliamos as respostas de células de glioma a cloroquina, um promissor adjuvante no tratamento desta enfermidade, e notamos que a resistência das células a esta droga está relacionada ao seu potencial de membrana mitocondrial, ao que podemos interferir por meio da inibição da quinase ATR. Apesar da função canônica desta proteína se dar através da regência da resposta a danos ao DNA, notamos que a sua participação como agente promotor de resistência à cloroquina ocorre independentemente deste mecanismo. Também notamos que a combinação da cloroquina com a inibição de ATR, via silenciamento gênico, exerce um potente efeito tóxico sobre as células tumorais tratadas com o quimioterápico Temozolomida. Já na etapa final desta tese, através do emprego da reprogramação celular, obtivemos, pela primeira vez, neurônios humanos de pacientes portadores da síndrome de Cockayne a partir de fibroblastos de pele. Com este modelo de estudo, foi possível observar que esses neurônios apresentam uma reduzida densidade de *puncta* sináptica, bem como uma aparente deficiência na sincronia de suas atividades. Por fim, por meio do sequenciamento do RNA destes neurônios, identificamos uma desregulação na expressão de diversas vias relacionadas ao funcionamento e comunicação neural. As implicações para o uso da cloroquina como adjuvante no tratamento de gliomas, bem como as vantagens do uso de neurônios humanos de Cockayne em detrimento aos modelos atualmente disponíveis são discutidos.

Palavras-chave: Glioma. Cloroquina. Síndrome de *Cockayne*. Células-tronco. Neurodegeneração.

Abstract

VESSONI, A. T. **Mechanisms of resistance to chloroquine-induced toxicity in human glioma cells, and the use of induced pluripotent stem cells-derived human neurons as a model to study Cockayne syndrome.** 2015. 229 p. Ph. D. thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidad de São Paulo, São Paulo, 2015.

Genome integrity is constantly threatened by chemical and physical exogenous agents, as well as products of cells' own metabolism, and capability of cells to overcome these challenges is essential to achieve homeostasis. In response to DNA lesions, cells activate a dynamic and intricate network of DNA damage responses that ultimately results either in lesion resolution, or in cell death through apoptosis. Regardless the fate chosen, tissue homeostasis is the ultimate goal. Flaws in these responses are associated to an increase in mutation rates and cell death, both of which are strictly associated to tumorigenesis and aging. In this work, separated in two chapters, we used human glioma cells as a model to study adjuvant chemotherapy, and induced pluripotent stem cells-derived human neurons as a model to study neurodegeneration in Cockayne syndrome, a genetic disease in which patients display defects in DNA repair mechanisms, and also neurodegeneration and premature aging. In the first chapter, we investigated the responses of cancer cells to chloroquine treatment, a promising adjuvant drug in glioma therapy, and we noticed that cells' resistance to this drug was strictly associated to mitochondrial membrane potential values, which could be dismantled through ATR inhibition. Interestingly, we noticed that the ability of ATR to promote resistance of glioma cells to chloroquine was independent of its canonical role in the DNA damage responses. We also noticed that combined treatment of chloroquine with ATR inhibition through gene silencing exerted a powerful toxic effect on glioma cells treated with the chemotherapeutic Temozolomide. In the second chapter of this work, we employed cell-reprogramming techniques to obtain, for the first time, human neurons from Cockayne Syndrome patients from skin fibroblasts. With this model, we detected reduced density of synaptic *puncta*, as well as reduced synchrony in the activity of the patient's neurons. Through RNA sequencing, we noticed several pathways related to synapses and neuronal function deregulated in Cockayne Syndrome patient's neurons. Implications for the use of chloroquine as an adjuvant drug in glioma therapy, as well as the advantage of using induced pluripotent stem cells-derived Cockayne syndrome human neurons (instead of currently available models) to study this disease, are also discussed.

Keywords: Glioma. Chloroquine. Cockayne Syndrome. Stem cells. Neurodegeneration.

Lista de figuras

Figura 1 - Estrutura molecular do DNA.	26
Figura 2 - Mecanismos de indução de danos ao DNA e principais lesões formadas nestes processos.	27
Figura 3 - A via do reparo por excisão de nucleotídeos (NER)	29
Figura 4 - Esquema representativo das alterações genéticas/cromossômicas dos astrocitomas, bem como patobiologia e sobrevivência média dos pacientes após diagnóstico.	38
Figura 5 - A via da autofagia.	45
Figura 6 - Linha do tempo da doença Glioblastoma multiforme.	47
Figura 7 - Ensaio da viabilidade celular de células da linhagem U87MG expostas à CQ.	61
Figura 8 - Cinética do acúmulo de vacúolos autofágicos e mitocôndrias, bem como da variação do potencial de membrana mitocondrial e geração de ERO induzidos por CQ em células da linhagem U87MG.	63
Figura 9 - NAC protege células de glioma contra a toxicidade induzida por CQ.	65
Figura 10 - Análise comparativa dos efeitos da CQ entre 4 linhagens de glioma humano.	68
Figura 11 - Linhagens resistentes à CQ apresentam menor conteúdo mitocondrial e maior potencial de membrana mitocondrial.	70
Figura 12 - Análise de danos e fragmentação do DNA após tratamento com CQ.	72
Figura 13 - Alterações no perfil do ciclo celular de células de glioma induzidas por CQ.	73
Figura 14 - Silenciamento gênico de ATR potencializa morte celular induzida por CQ em células de glioma.	76
Figura 15 - CQ não ativa a via de ATR-Chk1.	78
Figura 16 - NAC protege células de glioma tratadas com siATR e CQ.	79
Figura 17 - siATR potencializa geração de ERO e acúmulo de LC3II induzidos por CQ.	80
Figura 18 - ATR protege células de glioma contra perda da integridade mitocondrial induzida por CQ.	81
Figura 19 - siATR combinado com CQ aumenta a sensibilidade de células de glioma ao quimioterápico TMZ.	82
Figura 20 - siATR potencializa toxicidade induzida por CQ em células da linhagem U87MG.	83

Figura 21 - Modelo sobre o mecanismo de ação da CQ em células de glioma humano.....	97
Figura 22 - Funções celulares desempenhadas pelas proteínas CSA e/ou CSB.....	103
Figura 23 - Reprogramação celular e possíveis aplicações.	109
Figura 24 - Alterações morfológicas dos fibroblastos observadas durante o processo de reprogramação celular.	125
Figura 25 - Aspectos macro- e microscópicos das células durante a diferenciação de iPSCs até NPCs.....	128
Figura 26 - Geração e caracterização de iPSCs de pacientes CS.	133
Figura 27 - Elevada expressão de TXNIP em iPSCs de pacientes CS.....	135
Figura 28 - Caracterização de NPCs derivadas de iPSCs.....	136
Figura 29 - Caracterização de neurônios de pacientes CS.	137
Figura 30 - Neurônios CS apresentam menor densidade de puncta sináptica.....	138
Figura 31 - Neurônios CS apresentam menor densidade de <i>sinapsina I</i>	139
Figura 32 - Análise da atividade neural por multieletrodo..	140
Figura 33 - Análise da atividade neural pelo ensaio do multieletrodo..	143
Figura 34 - Análise da atividade neural pelo ensaio do multieletrodo (não afetados vs afetados).	145
Figura 35 - Análise da expressão gênica de neurônios CS por sequenciamento do RNA mensageiro (RNAseq).....	149
Figura 36 - Análise da expressão de genes do genoma mitocondrial em neurônios CS por sequenciamento do RNA mensageiro.	151
Figura 37 - Análise da terminologia “funções fisiológicas, moleculares e celulares” em neurônios de pacientes CS por meio do software <i>Ingenuity</i>	153
Figura 38 - Análise da expressão dos transcritos dos genes PCLO, NGFR, NRG2, IL16, WIF1, SYT1 e MAP2 em neurônios derivados do paciente GM00739.....	157
Figura 39 - Análise da expressão dos transcritos dos genes PCLO, NGFR, NRG2, IL16, WIF1, SYT1 e MAP2 em neurônios derivados do paciente AG06244..	158
Figura 40 - Análise de morte celular em neurônios CS.	159

Figura 41 - Modelo evidenciando que neurônios de pacientes CS apresentam menor densidade de puncta e comunicação em rede deficiente.....	167
---	-----

Lista de tabelas

Tabela 1 - Descrição das linhagens de glioma humano utilizadas nesta tese.....	49
Tabela 2 - Comparação das linhagens celulares de glioma quanto a sensibilidade à CQ e seus efeitos.....	88
Tabela 3 - Características clínicas e celulares/moleculares dos pacientes CS e das células derivadas destes, respectivamente.....	113
Tabela 4 - Anotação de vias relacionadas ao funcionamento, desenvolvimento e manutenção de células nervosas/cérebro, e desreguladas em neurônios derivados de pacientes CS.....	155

Lista de abreviaturas e siglas

6-4 PP - 6-4 pirimidina-pirimidona

A, T, C, G - Adenina, Timina, Citosina, Guanina

ATM - Ataxia telangiectasia mutada

ATR - Ataxia telangiectasia relacionada a Rad3

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro

BSA - Albumina de soro bovino

cDNA - DNA complementar

CHK1 - Quinase de *checkpoint* 1

CPD - Dímeros de pirimidina ciclobutano

CQ - Cloroquina

CS - Síndrome de Cockayne

CSA – CSB - Grupo A ou B da Síndrome de Cockayne

DAPI - 4', 6-diamidino-2-fenilindole

$\Delta\psi_m$ - Potencial de Membrana Mitocondrial

DMEM - Meio de *Eagle* modificado por Dulbecco

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

dsDNA - Dupla fita de DNA

EBs - Corpos embrióides

EDTA - Ácido etilenodiamino teracético

Eqtx - Equitóxica

ERCC6 – ERCC8 - Grupo de complementação 6 ou 8 do reparo por excisão

ERO - Espécies reativas de oxigênio

ESCs - Células-tronco embrionárias

FGFb - Fator de crescimento de fibroblastos básico

GAPDH - Gliceraldeído 6-fostato desidrogenase

GBM - Glioblastoma multiforme

GDNF - Fator neurotrófico derivado de células da glia

GGR - Reparo genômico global

GSH - Glutathiona reduzida

H - horas

HEK - Células embrionárias de rim humano

INCA - Instituto nacional do câncer

iPSCs - Células-tronco pluripotentes induzidas

Kpb - Mil pares de base

Kda - Mil dáltons

LC3 - Proteína de cadeia leve 3 associada à microtúbulo

MAP2 - Proteína 2 associada a microtúbulo

MEF - Fibroblastos embrionários de camundongo

µg - Micrograma

µM - Micromolar

mM - Milimolar

mtDNA - DNA mitocondrial

RNA_m - RNA mensageiro

RNA_r - RNA ribossômico

N2 - Meio de cultura de EBs

NA - Não afetado

NAC - N-acetil L-cisteína

NER - Reparo por excisão de nucleotídeos

NG - Meio de cultura de NPCs, neurônios e rosetas

NPCs - Células progenitoras neurais

PARP - Poli(ADP-ribose) polimerase

PBS - Tampão fosfato salino

PCNA - Antígeno nuclear de proliferação celular

PCR - Reação de polimerase em cadeia

PI - Iodeto de propídeo

RNAi - RNA de interferência

RNA - Ácido ribonucleico

RNApol - RNA polimerase

RPA - Proteína de replicação A

RPM - Rotações por minuto

RT-PCR - Transcrição reversa por reação de polimerase em cadeia

SFB - Soro fetal bovino

siRNA - RNA dupla fita pequeno de interferência

siATR - siRNA tendo ATR como alvo

siScramble - siRNA controle (não possui alvos no genoma humano)

TCR - Reparo acoplado à transcrição

TFIIH - Fator de transcrição H da RNA polimerase II

TMZ - Temozolomida

TUNEL - *Terminal deoxynucleotidil transferase uracil nick end labeling*

TXNIP - Proteína inibidora de tiorredoxina

UV - Luz ultravioleta

UVC - Luz ultravioleta C

WHO: Organização mundial da saúde

WT - selvagem

XP - Xeroderma pigmentosum

XPA-XPG - grupos de complementação de xeroderma pigmentosum A a G

Sumário

Capítulo1 - Introdução e objetivos gerais.....	24
1.1 Introdução geral	25
1.1.1 <i>A molécula da vida</i>	25
1.1.2 <i>A vida sob constante ameaça: consequências da perda da integridade genômica</i>	26
1.1.3 <i>Resposta a danos ao DNA: um balanço entre vida e morte</i>	30
1.1.4 <i>Invertendo o jogo: quando a indução de danos ao DNA promove homeostase</i>	31
1.2 Objetivos gerais.....	33
Capítulo 2 - Um estudo investigativo sobre os efeitos citotóxicos da cloroquina em linhagens celulares de glioma humano.	34
2.1 Introdução.....	35
2.1.1 <i>Glioma: Definição e epidemiologia</i>	35
2.1.2 <i>Origem dos termos Glioma e Glioblastoma multiforme</i>	36
2.1.3 <i>GBM primários e secundários</i>	36
2.1.4 <i>Origem do GBM e implicações para sua natureza incurável</i>	39
2.1.5 <i>Sintomas, diagnóstico e o tratamento padrão-ouro de GBM</i>	41
2.1.6 <i>Redescobrimo a cloroquina: do combate à malária à adjuvante na terapia de GBM</i> ..	42
2.2 Objetivos	48
2.3 Material e métodos.....	49
2.3.1 <i>Cultura celular</i>	49
2.3.2 <i>Congelamento e descongelamento de células</i>	50
2.3.3 <i>Drogas e tratamentos</i>	50
2.3.4 <i>Ensaio de citotoxicidade/viabilidade celular</i>	51
2.3.5 <i>Análise de indução de morte celular</i>	51
2.3.5.1 <i>Formação de sub-G1</i>	51
2.3.5.2 <i>Ativação de caspase 3</i>	52
2.3.6 <i>Análise da presença de danos ao DNA</i>	53
2.3.6.1 <i>Fosforilação de H2AX</i>	53
2.3.6.2 <i>PCR longo quantitativo</i>	53

2.3.7	<i>Análise do Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$)</i>	54
2.3.8	<i>Análise de geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)</i>	55
2.3.9	<i>Análise da quantidade de mitocôndrias</i>	55
2.3.10	<i>Silenciamento gênico de ATR</i>	56
2.3.11	<i>Análise de expressão protéica por western blot</i>	57
2.3.12	<i>Imunofluorescência</i>	58
2.3.13	<i>Expressão da proteína LC3 fusionada à GFP</i>	59
2.4	Resultados	61
2.4.1	<i>Estudo comparativo dos efeitos da CQ em células de glioma humano</i>	61
2.4.1.1	<i>CQ causa acúmulo de vacúolos autofágicos e mitocôndrias, perda de potencial de membrana mitocondrial, e geração de ERO</i>	61
2.4.1.2	<i>NAC previne perda de viabilidade e alterações celulares induzidas por CQ</i>	63
2.4.1.3	<i>Comparação dos efeitos citotóxicos de CQ entre diferentes linhagens celulares de glioma humano</i>	66
2.4.1.4	<i>Células resistentes à CQ apresentam menor conteúdo mitocondrial e maior potencial de membrana mitocondrial</i>	69
2.4.1.5	<i>Perda do potencial de membrana mitocondrial induzida por CQ não é desencadeada por formação de danos ao DNA</i>	70
2.4.1.6	<i>Cloroquina induz alterações no perfil de ciclo celular</i>	72
2.4.2	<i>ATR protege células de glioma contra morte celular induzida por CQ</i>	74
2.4.2.1	<i>ATR previne fragmentação de DNA e ativação de caspase 3 em células de glioma tratadas com CQ</i>	74
2.4.2.2	<i>A via de ATR/CHK1 não é ativada em resposta à CQ</i>	77
2.4.2.3	<i>NAC protege células de glioma contra combinação de CQ com siATR</i>	79
2.4.2.4	<i>siATR aumenta o acúmulo de LC3II e geração de ERO induzidos por CQ</i>	80
2.4.2.5	<i>siATR acentua queda do potencial de membrana mitocondrial induzida por CQ e induz fragmentação mitocondrial</i>	80
2.4.2.6	<i>siATR e CQ potencializam citotoxicidade induzida por TMZ em células de glioma</i>	82
2.4.2.7	<i>siATR potencializa perda de viabilidade celular e fragmentação de DNA induzida por CQ em células da linhagem U87MG</i>	83
2.5	Discussão	84
2.5.1	<i>Potencial de membrana mitocondrial e conteúdo mitocondrial na resistência de células de glioma à CQ</i>	84

2.5.2	<i>Geração de ERO: causa ou consequência dos efeitos tóxicos induzidos por CQ?</i>	86
2.5.3	<i>Células de glioma e plasmódios: uma via comum de resistência à CQ?</i>	88
2.5.4	<i>Possíveis causas do acúmulo de LC3II em células de glioma mediada por CQ</i>	89
2.5.5	<i>Uma via não-canônica de ATR protege células de glioma contra a morte celular induzida por CQ</i>	92
2.5.6	<i>ATR protege a integridade mitocondrial e regula a autofagia</i>	93
2.5.7	<i>Uso de CQ e siATR combinado à TMZ: implicações para o tratamento de células resistentes</i>	94
2.6	Conclusões	98
Capítulo 3 - Uso de células-tronco pluripotentes induzidas para geração de um novo modelo celular para o estudo das características neurológicas de pacientes portadores da Síndrome de Cockayne.		99
3.1	Introdução	100
3.1.1	<i>O primeiro caso descrito da síndrome de Cockayne e os sintomas clínicos característicos desta doença</i>	100
3.1.2	<i>Características neurológicas</i>	101
3.1.3	<i>Epidemiologia e causa</i>	101
3.1.4	<i>Correlacionando deficiências celulares com aspectos clínicos</i>	103
3.1.5	<i>Um achado inesperado: fenótipo brando na ausência da proteína CSB</i>	105
3.1.6	<i>Limitações dos modelos celulares e animais para o estudo da neurodegeneração de CS</i>	106
3.1.7	<i>Reprogramação celular e a construção de modelos de estudo mais relevantes</i>	107
3.1.8	<i>Emprego de iPSCs no estudo de CS</i>	109
3.2	Objetivos	111
3.3	Material & métodos	112
3.3.1	<i>Inibidores e fatores de crescimento</i>	112
3.3.2	<i>Cultura de células</i>	112
3.3.2.1	<i>Fibroblastos humanos primários</i>	112
3.3.2.2	<i>Células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) e células-tronco embrionárias (ESCs)</i>	114
3.3.2.3	<i>Células precursoras neurais (NPCs) e neurônios</i>	114
3.3.3	<i>Congelamento e descongelamento de células</i>	115

3.3.4 Tratamento de placas de cultivo com matrigel (iPSCs/ESCs/EBs/rosetas) ou poli-l-ornitina e laminina (NPCs/neurônios)	116
3.3.4.1 iPSCs/ESCs/Ebs/rosetas	116
3.3.4.2 NPCs/neurônios	116
3.3.5 Ensaio do multieletrodo (MEA – Axion Biosystems)	117
3.3.6 Imunofluorescência	119
3.3.6.1 Caracterização Celular	119
3.3.6.2 Contagem de puncta	119
3.3.6.3 Análise de morte celular por caspase-3 ativa e TUNEL	120
3.3.7 Reprogramação Celular	121
3.3.8 Diferenciação de iPSCs em NPCs	126
3.3.9 Extração de RNA, microarray e sequenciamento do RNA (RNAseq)	128
3.3.10 Reação de PCR	129
3.3.11 Expressão da proteína GFP sob controle do promotor do gene sinapsina I	130
3.4 Resultados	131
3.4.1 Reprogramação celular e caracterização das iPSCs	131
3.4.2 Maior expressão de TXNIP em iPSCs de pacientes CS	134
3.4.3 Diferenciação neural	135
3.4.4 Neurônios CS apresentam menor densidade de puncta sináptica	137
3.4.5 Neurônios CS disparam em aparente menor sincronia	139
3.4.6 Análise do transcriptoma de neurônios CS	146
3.4.6.1 Análise de genes individuais	146
3.4.6.2 Análise dos transcritos mitocondriais	150
3.4.6.3 Análise de grupos de genes	151
3.4.7 Análise de morte celular em neurônios CS	158
3.5 Discussão	160
3.5.1 Um novo modelo para estudo de CS	160
3.5.2 Neurônios CS apresentam menor densidade de puncta sináptica e aparente menor sincronia da atividade neural	162
3.5.3 Menor densidade de puncta em neurônios CS: um problema majoritariamente transcricional?	163
3.5.4 Morte celular em neurônios CS	166

3.6	Conclusões	168
-----	------------------	-----

Capítulo 4 - Conclusões gerais	169
--------------------------------------	-----

Referências	171
-------------------	-----

Anexos	185
--------------	-----

A - *Autophagy in stem cell maintenance and differentiation*. **Vessoni AT**, Muotri AR, Okamoto OK. **Stem Cells and Development**, 2012.

B - *Autophagy and genomic integrity*. **Vessoni AT**, Filippi-Chiela EC, Menck CF, Lenz G. **Cell Death and Differentiation**, 2013.

C - *Gap-filling and bypass at the replication fork are both active mechanisms for tolerance of low-dose ultraviolet-induced DNA damage in the human genome*. Quinet A, **Vessoni AT**, Rocha CR, Gottifredi V, Biard D, Sarasin A, Menck CF, Sary A. **DNA Repair**, 2014.

D - *Three-dimensional microenvironment confers enhanced sensitivity to doxorubicin by reducing p53-dependent induction of autophagy*. Gomes LR, **Vessoni AT**, Menck CF. **Oncogene**, 2015

Capítulo 1 - Introdução e objetivos gerais

1.1 Introdução geral

1.1.1 A molécula da vida

Toda a informação necessária para gerar e orquestrar o funcionamento de uma célula, e consequentemente de um organismo, está contida em uma macromolécula denominada ácido desoxirribonucleico, ou DNA. O entendimento do DNA como uma substância química se deu em 1869 pelo bioquímico suíço Friedrich Miescher, o qual havia isolado, a partir do núcleo de leucócitos, um composto químico rico em fósforo e denominado por ele de “nucleína”. Posteriormente, Miescher notou a presença da nucleína em células de galinha, touro, sapo e salmão, evidenciando a presença deste composto em diferentes espécies (MIESCHER, 1871, 1874a, 1874b; PORTIN, 2014). Em 1893, os bioquímicos Albrecht Kossel e Albert Neumann demonstraram que este composto, localizado no núcleo e com características ácidas (ácido nucleico), era composto por quatro diferentes bases. Foi Kossel quem também observou que a nucleína compunha, junto de histonas, o cromossomo (KOSSEL; NEUMANN, 1893; PORTIN, 2014). A noção de que cromossomos preservam sua identidade de uma geração para outra veio das observações do biólogo Theodor Boveri, em 1902, enquanto que em 1903, o geneticista Walter Sutton realizou que a segregação de diferentes caracteres durante a formação de gametas (como postulado por Gregor Mendel em 1865) podia ser explicado pelo padrão de segregação de cromossomos homólogos durante a meiose (BOVERI, 1902; PORTIN, 2014; SUTTON, 1903). Ainda em 1902, Clarence McClung havia sugerido que o sexo era determinado pelo cromossomo, dando suporte à teoria cromossômica de herança (MCCLUNG, 1902). Já em 1944, ao estudarem o fenômeno da transformação de bactérias não patogênicas em patogênicas (fenômeno observado inicialmente por Frederick Griffith em 1928 (GRIFFITH, 1928), Oswald Avery, Collin MacLeod e Maclyn McCarty mostraram que a característica virulenta era determinada pelo DNA, e que essas características podiam ser estavelmente mantidas na população por meio da propagação para as células-filhas (AVERY; MACLEOD; MCCARTY, 1944; PORTIN, 2014).

Todas estas características até então atribuídas ao DNA (autorreplicação, especificidade do pareamento das bases, e informação) foram satisfeitas no modelo da dupla-hélice do DNA,

proposto por Francis Crick e James Watson, em 1953, o que lhes rendeu o prêmio Nobel em fisiologia ou medicina, em 1962. O modelo proposto por estes autores implica que o DNA é uma dupla fita antiparalela, as quais se conectam por meio de pontes de hidrogênio entre bases contidas em fitas opostas (adenina pareia com timina, e citosina pareia com guanina). As bases, por sua vez, são conectadas a uma desoxirribose, a qual se liga a um grupo fosfato. A ligação fosfodiéster entre grupos fosfatos adjacentes dispõe as bases em uma linha contínua, e essa organização é responsável por codificar a informação contida no DNA (PORTIN, 2014; WATSON; CRICK, 1953). Uma ilustração com o modelo de Watson e Crick pode ser observado na figura 1.

Figura 1 - Estrutura molecular do DNA. Modelo proposto por James Watson e Francis Crick, em 1953. Adaptado de (PRAY, 2008)

1.1.2 A vida sob constante ameaça: consequências da perda da integridade genômica

O pleno funcionamento celular, bem como a transmissão fiel da informação genética de uma geração à outra, dependem da manutenção da integridade genômica. Do contrário do que se imaginou na época em que o modelo de Watson e Crick foi postulado, o DNA é uma molécula

altamente instável, e isto se deve tanto à constante exposição a agentes exógenos e endógenos capazes de lesioná-lo, bem como aos erros inerentes ao processo de replicação do DNA, sendo que ambos comprometem a qualidade da informação armazenada nesta molécula (FRIEDBERG, 2003). Dentre alguns dos agentes capazes de induzir danos ao DNA, têm-se: radiação ionizante (capaz de provocar quebras na dupla fita do DNA); alfa-benzo pireno (presente na fumaça do cigarro, e que após ser metabolizado a benzo pireno diol epóxido, pode interagir covalentemente com a guanina e intercalar no DNA); espécies reativas de oxigênio (ERO, as quais podem promover oxidação de bases no DNA); e luz ultravioleta (UV), que promove a formação de dímeros de pirimidina, os quais acarretam em distorção da dupla fita com consequente bloqueio da progressão das polimerases replicativa e do RNA. A figura 2 apresenta um esquema ilustrativo das lesões ao DNA resultantes destes processos.

Figura 2 - Mecanismos de indução de danos ao DNA e principais lesões formadas nestes processos. Adaptado de (HOEIJMAKERS, 2001)

Para lidar com estas ameaças, células desenvolveram uma intrincada rede de respostas a danos ao DNA, que compreende desde a detecção e remoção destas lesões, até a ativação de parada do ciclo celular em pontos precisos (*checkpoints*) e mesmo morte celular. No caso dos dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) e pirimidina pirimidona 6-4 foto produtos (6-4 PPs) induzidos por luz UV, células humanas dispõem de uma via conhecida como reparo por excisão de nucleotídeos, ou NER, a qual por meio da ação coordenada de mais de 30 proteínas, promove a excisão de um pequeno fragmento de fita simples do DNA no qual está contida a lesão, gerando uma lacuna que é posteriormente preenchida através da ação da polimerase do DNA. O NER é

subdividido em duas vias, as quais diferem, basicamente, no mecanismo pelo qual a lesão é detectada. Na subvia do reparo genômico global (*global genomic repair*, ou GGR), a lesão pode ser detectada em qualquer região do genoma, enquanto que na subvia do reparo acoplado à transcrição, (*transcription-coupled repair*, ou TCR), apenas lesões em genes transcricionalmente ativos são detectadas. No entanto, após a detecção da lesão, o processo de remoção da mesma é compartilhado por ambas as vias (COSTA et al., 2003).

A descoberta e caracterização desta via de reparo de DNA em humanos está completamente relacionada ao entendimento das consequências da falta deste. Em 1968, James Cleaver publicou o primeiro relato neste sentido, no qual mostrou que pacientes portadores da doença genética rara Xeroderma Pigmentosum (XP) apresentavam deficiência no reparo de lesões induzidas por luz UV (CLEAVER, 1968). Estes pacientes apresentam uma altíssima sensibilidade à luz solar, o que é evidenciado não somente pelo aparecimento de muitas manchas na pele exposta ao sol, mas também pelos elevados índices de câncer de pele (estima-se que pacientes XP apresentem um aumento de cerca de 10.000 vezes na incidência de câncer de pele não melanoma, e de 2.000 vezes de melanomas, antes dos 20 anos de idade) (HEBRA; KAPOSÍ, 1874; MENCK; MUNFORD, 2014). Assim, o trabalho de Cleaver foi pioneiro não somente em associar uma doença genética à deficiência de um mecanismo de reparo de DNA, mas também em mostrar que a inabilidade de manter a integridade genômica estava intimamente relacionada ao desenvolvimento de câncer. Nas décadas seguintes ao trabalho de Cleaver, uma série de estudos se sucedeu, permitindo identificar mais de 30 genes envolvido no NER (COSTA et al., 2003; MENCK; MUNFORD, 2014). Um esquema ilustrativo da via do NER encontra-se na figura 3.

Figura 3 - Reparo por excisão de nucleotídeos (NER). Esquema simplificado evidenciando as sub-vias: reparo genômico global (GGR) e reparo acoplado à transcrição (TCR). Após a detecção da lesão, as proteínas XPA, XPF, XPG e RPA, bem como o complexo TFIIH (composto, entre outras, por XPB e XPD), são recrutadas para promover abertura da dupla fita, excisão (e remoção) de um fragmento de aproximadamente 30 nucleotídeos que contém a lesão, para que em seguida, a polimerase do DNA promova a síntese do fragmento excisado, e consequente correção da lesão.

É muito importante notar que mutações em diferentes genes desta via podem resultar em características clínicas muito diferentes. Por exemplo, mutações no gene *XPC* (essencial para a via do GGR) estão associadas a maior incidência de tumores de pele, mas nenhum sintoma neurodegenerativo. Já mutações nos genes *ERCC6* e *ERCC8* (também conhecidos como *CSB* e *CSA*, e que codificam as proteínas *CSB* e *CSA*, respectivamente, as quais participam da etapa inicial do TCR), são comumente associados não só à sensibilidade à luz UV, mas também a diversos problemas que incluem déficit de crescimento, forte processo de neurodegeneração, e sintomas

de envelhecimento precoce, como perda de audição, cataratas e cifose, os quais são característicos da síndrome de Cockayne (MENCK; MUNFORD, 2014). As causas desses fenótipos tão variados não são completamente conhecidas, mas evidências sugerem que NER é um mecanismo versátil que pode reparar diferentes tipos de lesões, como as induzidas por ERO (produtos do próprio metabolismo), bem como o fato de algumas proteínas desta via (como CSA e CSB) também participarem, direta ou indiretamente, em outras vias de reparo de DNA (DIANOV et al., 1999; KAMENISCH et al., 2010). De fato, um aumento no acúmulo de mutações resultantes de processos oxidativos foi reportado no genoma mitocondrial de células deficientes em CSA ou CSB (AAMANN et al., 2010; KAMENISCH et al., 2010). Coletivamente, esses resultados sugerem que o reparo do DNA está intimamente relacionado à manutenção da homeostasia de um organismo, através da regulação de processos como tumorigênese, neurodegeneração e envelhecimento.

1.1.3 Resposta a danos ao DNA: um balanço entre a vida e a morte

A resposta à presença de danos ao DNA envolve não somente a ativação de mecanismos de reparo que promovem a sobrevivência celular, mas também pode resultar na ativação de programas de morte celular. Esta aparente contradição, na verdade, evidencia um mecanismo refinado que é regulado, principalmente, pela intensidade (ou quantidade) de lesões presentes no DNA. No centro desta regulação têm-se a proteína p53, também conhecida como o guardião do genoma, cujas funções exemplificam bem esse balanço entre vida ou morte. Utilizando o exemplo da luz UV, a presença de dímeros de pirimidina pode resultar na ativação das quinases ATM ou ATR, as quais detectam a presença de duplas ou simples quebras, respectivamente, e promovem uma cascata de reações que culmina na estabilização e ativação (via fosforilação) de p53. Ativado, este fator passa a acumular no núcleo e promover a transcrição de genes relacionados ao NER, como *XPC* e *DDB2* (os quais aumentam a cinética de reparo dos dímeros), bem como pode transcrever genes pró-apoptóticos, como *BAX* e *BAK*, os quais promovem abertura de poros na membrana externa mitocondrial, resultando em liberação de citocromo C, seguido de ativação de caspases efetoras (proteínas que irão promover clivagem do citoesqueleto e ativação de DNase), eventos estes característicos da apoptose (BATISTA et al., 2009a, 2009b).

A distinção de quais genes ativar é influenciado por diversos fatores. Além de diversas modificações pós-traducionais que p53 pode sofrer, sabe-se também que p53 liga-se com maior afinidade à região promotora de genes relacionados à sobrevivência (reparo de DNA, por exemplo), enquanto que a ligação a genes que promovam apoptose é mais variada, chegando a apresentar uma baixíssima afinidade para alguns destes promotores. Isto implica que para estes genes apoptóticos serem transcritos, a quantidade de proteína p53 ativada deve ser alta, efeito que ocorre na presença de muitos danos ao DNA (WEINBERG et al., 2005). Assim, têm-se um mecanismo no qual o destino das células é controlado com base na quantidade (bem como na natureza) das lesões. De um jeito ou de outro, a função de p53 é uma só: manter a integridade genômica, e consequente homeostase tecidual. Isto é promovido ou através do reparo de lesões no DNA, ou através da eliminação de células potencialmente tumorigênicas.

1.1.4 Invertendo o jogo: quando a indução de danos ao DNA promove homeostasia

Durante o período negro da história da humanidade que compreende 1914-1918, a busca pelo desenvolvimento de agentes químicos venenosos resultou na síntese do gás mostarda (BROOKES, 1990). Cerca de trinta anos mais tarde, Elmore e colaboradores sugeriram que este composto podia promover ligações cruzadas entre moléculas e, em 1957, a primeira evidência de que este agente era capaz de promover alquilação da posição N-7 da guanina foi reportada por Lawley e Wallick (ELMORE et al., 1948; LAWLEY; WALLICK, 1957). Em 1965, utilizando *Escherichia coli* como modelo de estudo, Lawley e Brooks notaram que a toxicidade do gás mostarda foi atribuída à sua capacidade de promover ligações cruzadas entre fitas do DNA, o que impedia sua separação durante a replicação (LAWLEY; BROOKES, 1965). Estes eventos marcaram o início do uso de quimioterápicos (que tinham como alvo a molécula do DNA) no tratamento do câncer (BROOKES, 1990). A partir daí, diversos outros compostos que eram capazes de lesionar o DNA, e consequentemente induzir morte celular por meio deste mecanismo, passaram a ser empregados com finalidade terapêutica. Vale notar que a radioterapia para o tratamento de câncer teve seu início muitas décadas antes, em 1896, quando raios X foram usados pela primeira vez por Emil Grubbe para tratar uma paciente com câncer de mama (HODGES, 1964). Apesar de desconhecido na época, um dos principais mecanismos moleculares por trás desta estratégia

terapêutica (radioterapia) também envolve a indução de danos ao DNA (LOMAX; FOLKES; O'NEILL, 2013).

Atualmente, diversos tipos de tumores malignos são tratados por meio de uma abordagem multimodal, que pode incluir remoção cirúrgica do tumor, seguida de radioterapia combinada com quimioterapia. Este é o caso, por exemplo, para glioblastoma multiforme, um tumor do sistema nervoso central altamente agressivo, e com um prognóstico muito ruim. Neste sentido, vale enfatizar que o tratamento multimodal promove uma sobrevida do paciente de cerca de um ano após o diagnóstico desta enfermidade. Este fato evidencia a necessidade de um maior entendimento e também da busca por novas estratégias terapêuticas para o combate desta doença.

1.2 Objetivos gerais

A presente tese teve como objetivos gerais: i) investigar os efeitos da cloroquina em células de glioma humano, tendo em vista seu potencial terapêutico como adjuvante no tratamento de glioblastoma multiforme, e ii) a geração de um novo modelo de estudo que permitisse investigar possíveis aspectos relacionadas à neurodegeneração e problemas de neurodesenvolvimento em pacientes portadores da síndrome de Cockayne.

Para isso, estes estudos foram divididos em duas seções denominadas: “Capítulo 2: Um estudo investigativo sobre os efeitos citotóxicos da cloroquina em linhagens celulares humanas de glioblastoma multiforme”, e “Capítulo 3: Uso de células-tronco pluripotentes induzidas para geração de um novo modelo celular para o estudo das características neurológicas de pacientes portadores da Síndrome de Cockayne”.

Capítulo 2 - Um estudo investigativo sobre os efeitos citotóxicos da cloroquina em linhagens celulares de glioma humano.

2.1 Introdução

2.1.1 Glioma: Definição e epidemiologia

De todos os tumores diagnosticados anualmente, pouco mais de 2% correspondem a tumores do sistema nervoso central (SNC). Entre 2006 a 2010, a taxa de incidência desses tumores foi de 21,03 casos por 100.000 indivíduos nos Estados Unidos da América (OSTROM et al., 2013). No Brasil, um estudo do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou pouco mais de 9.000 casos de tumores no SNC no ano de 2014 (cerca de 1,6% do total de casos de câncer diagnosticados neste ano) (INCA, 2014).

Aproximadamente 30% dos casos de tumores no SNC correspondem a gliomas. Estes tumores são divididos em astrocitomas, oligodendrogliomas, ou ependimomas, e esta distinção se dá baseada no tipo de célula da macroglia que se acredita ter dado origem ao tumor. Existe também um tipo de glioma que apresenta tanto células com características astrocíticas, como células com características oligodendrocíticas, sendo denominados oligoastrocitomas. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*, WHO), os astrocitomas perfazem mais de 70% dos gliomas, e são subdivididos em I-IV, de acordo com seu grau de invasividade/agressividade, vascularização, propensão à necrose, possibilidade de cura por remoção cirúrgica, bem como expectativa de vida do paciente após diagnóstico. Astrocitomas de grau I (ou astrocitoma pilocítico) são benignos (não invasivos) e bem delimitados. Esta característica os torna curáveis via remoção cirúrgica, contanto que estejam em uma área cerebral passível de intervenção. Astrocitomas de grau II (baixo grau de difusão) já apresentam capacidade de infiltração no tecido adjacente, além de proliferação moderada. A expectativa de vida do paciente é de 5-10 anos após diagnóstico. Grau III, também conhecido como astrocitoma anaplásico, possui maior capacidade de infiltração, angiogênese, e a expectativa de vida está em torno de 2-3 anos. Por fim, o grau IV, conhecido como glioblastoma multiforme (GBM), corresponde a tumores altamente invasivos, muito agressivos, necróticos, de acentuada angiogênese, e a expectativa média de vida do paciente após o diagnóstico é de aproximadamente 1 ano. Além de ser o mais agressivo, o GBM é também o astrocitoma mais

comum (pouco mais de 50% dos casos). Vale ressaltar que, dentre todos os tumores malignos do SNC, os gliomas respondem por mais de 80% dos casos. (AGNIHOTRI et al., 2013; LOUIS et al., 2007b; OSTROM et al., 2013).

2.1.2 Origem dos termos *Glioma e Glioblastoma multiforme*

O termo “glioma” foi cunhado pelo Dr. Rudolf Virchow em 1863. Dr. Rudolf foi pioneiro no uso combinado de técnicas macroscópicas e microscópicas para o estudo de tumores intracranianos, o que permitiu a ele identificar um grupo de tumores que possuíam alta capacidade de infiltração no tecido adjacente, elevada vascularização suscetível a hemorragias, amplas áreas em degeneração, além de ser composto por células proliferativas da glia. Daí, a origem do termo glioma = tumores derivados de células da glia (DAVIS, 1928; SCHERER, 1940a).

A partir daí e até meados de 1920, no entanto, o termo glioma passou a ser empregado para descrever muitos tumores que possuíam características distintas (tanto na aparência como na progressão clínica dos sintomas do paciente). Foi somente em 1926 que Bailey e Cushing publicaram um estudo no qual os gliomas foram divididos em mais de 10 subtipos, de acordo com o tipo de célula predominante no tumor, características macroscópicas, e aspectos clínicos do paciente (BAILEY; CUSHING, 1926; DAVIS, 1928; SCHERER, 1940a).

Foi a partir deste estudo que o nome “glioblastoma multiforme” (GBM) passou a substituir o termo “espongioblastoma multiforme”, o qual havia sido utilizado pela primeira vez em 1918 por Strauss, Globus e Ribbert, (LEINER; KRAUS, 1927), para descrever os tumores heteromorfos e compostos por células da glia (DAVIS, 1928; IACOB; DINCA, 2009; SCHERER, 1940a). Vale notar que o termo espongioblastoma deriva da palavra espongioblasto, que por sua vez, designa células embrionárias epiteliais que originam células da glia.

2.1.3 GBM primários e secundários

Em 1940, Dr. Hans-Joachim Scherer havia notado que alguns GBM se desenvolviam, após cirurgia, a partir de gliomas de menor grau (II e/ou III). Ele definiu esses GBM como secundários,

em oposição aos GBM primários, os quais não tinham nenhuma evidência de terem surgido a partir de tumores menos agressivos, e eram, por tanto, diagnosticados como GBM tal logo na primeira biópsia (SCHERER, 1940b). Na época, não foi possível para ele se aprofundar na distinção entre GBM primários e secundários. No entanto, hoje em dia, diversas características genéticas (além de constatações clínicas) permitem fazer a distinção entre estes dois tipos de GBM, além de confirmar as observações do Dr. Scherer. GBM primários (cuja origem é dita *de novo*, ou sem precedentes) respondem por mais de 90% de todos os GBMs, e acometem principalmente pessoas com mais de 60 anos, enquanto que os GBM secundários são mais comuns em pessoas jovens (menos de 45 anos) (FURNARI et al., 2007; OHGAKI; KLEIHUES, 2013).

Uma série de estudos recentes também identificou diversas alterações genéticas que constituem uma assinatura de GBM primários e secundários. Por exemplo, amplificação do gene *EGFR*, superexpressão de *MDM2*, deleção de *p16*, e perda de heterozigosidade do cromossomo 10q (o qual contém o gene *PTEN*), são características comumente encontradas em GBM primários. Por outro lado, mutações no gene *TP53* e superexpressão do gene que codifica a isocitrato desidrogenase I são comuns em astrocitomas de grau II, e mutações no gene *RB* (Retinoblastoma) são comuns em astrocitomas de grau III. A presença destas alterações genéticas em GBM sugerem que estes tenham se originado a partir de astrocitomas de menor grau, e são, por tanto, classificados como GBM secundários (FURNARI et al., 2007; OHGAKI; KLEIHUES, 2013). Essas características encontram-se representadas na figura 4.

Figura 4 - Esquema representativo das alterações genéticas/cromossômicas características dos astrocitomas de grau II, III e IV (GBM primário ou secundário), bem como características do tumor (patobiologia) e sobrevivência média do paciente após diagnóstico. Adaptado de (AGNIHOTRI et al., 2013; FURNARI et al., 2007).

No entanto, vale ressaltar que pelo menos três vias são comumente alteradas em GBM, independentemente de estes serem primários ou secundários. São elas: p53, mTOR e retinoblastoma. Nota-se que distintas alterações genéticas observadas entre GBM primários e secundários podem resultar em desregulação semelhante nestas vias. Por exemplo, mutações no gene *TP53* (GBM secundários) podem resultar em um efeito semelhante ao da superexpressão de MDM2 (comumente observado em GBM primários, e que irá resultar na inibição das atividades de p53). Desta forma, a via encontra-se alterada em ambos os GBM primários e secundários, embora por modificações geneticamente distintas. Já a deleção do gene *p16* (GBM primários) pode ter efeito muito similar às mutações no gene *Rb* (GBM secundários), já que p16 regula indiretamente os níveis de fosforilação de Rb, e consequentemente sua atividade. Estas, entre outras características, levaram à sugestão de que GBM primários e secundários podem ser

originados de diferentes tipos celulares (FURNARI et al., 2007; OHGAKI; KLEIHUES, 2013). Por fim, GBM, independente de serem primários ou secundários, são ainda classificados como: clássico (note-se amplificação de EGFR e perda de PTEN), neural (aumento nos níveis de marcadores neurais, como NEFL), pró-neural (amplificações de PDGFRA, mutações em p53 e em IDH1, e maior incidência em pacientes jovens, sendo o subtipo mais comum encontrado em GBM secundários) ou mesenquimal (baixa expectativa de vida, perda de p53 e NF1).

2.1.4 Origem do GBM e implicações para sua natureza incurável

Uma questão muito interessante refere-se a quais tipos celulares podem dar origem a gliomas. Em 2002, Robert Bachoo e colaboradores demonstraram que astrócitos deficientes em Ink4a/Arf -/-, e sob a constante ativação da via EGF (expressando EGFR constitucionalmente ativo, ou EGFR*), ambas características relativamente comuns de GBM primários, como pode ser observado na figura 1, se desdiferenciavam e adquiriam capacidade indefinida de proliferar *in vitro*. Também notaram que, na ausência de soro, estes astrócitos perdiam a expressão de GFAP (marcador astrocítico) e passavam a expressar marcadores de progenitores astrocíticos, além de formarem neuroesferas. Quando injetadas no cérebro de camundongos imuno-deficientes, estes astrócitos (assim como células-tronco neurais Ink4a/Arf -/- EGFR*) eram capazes de formar tumores com características de gliomas de alto grau de malignidade. Interessantemente, os tumores derivados dos astrócitos expressavam Olig2, marcador presente em células progenitoras oligodendrogiais e em gliomas humanos, assim como o marcador de neurônios Tuj1, mostrando que o tumor derivado de astrócitos maduros era capaz de originar células de outras linhagens (BACHOO et al., 2002).

Dez anos mais tarde e seguindo uma linha investigativa semelhante, Friedmann-Morvinski e colaboradores transduziram lentivírus oncogênicos (portando shRNA para NF1 e p53, dois genes comumente alterados no subtipo mais agressivo e de pior prognóstico do GBM, o mesenquimal) no hipocampo de camundongos que expressam CRE recombinase sob controle do promotor do gene neurônio-específico, *Sinapsina I*, e observaram a formação de tumores. Vale notar que o lentivírus continha uma construção que, além de expressar shRNA para os genes

descritos acima, também expressa GFP (proteína fluorescente verde, *green fluorescent protein*), e possuía RFP (*proteína fluorescente vermelha, red fluorescent protein*) flanqueado por sítios LoxP. Desta forma, quando o vírus transduzia neurônios (os quais expressam CRE), o RFP era excisado (CRE recombinase cliva os sítios LoxP flanqueando o gene RFP, removendo-o do genoma), e estas células eram, por tanto, apenas verdes (GFP positivas, e RFP negativas). Células que originalmente não eram neurônios (astrócitos, oligodendrócitos ou células-tronco neurais, por exemplo) expressavam ambos GFP e RFP. Desta maneira, foi possível aos autores identificar se as células que compunham os tumores eram originalmente neurônios (células tumorais verdes). De fato, autores observaram que neurônios eram capazes de originar gliomas de grau alto (subtipo mesenquimal). Para confirmar os achados, autores isolaram neurônios corticais dos animais e, *in vitro*, fizeram a transdução dos vírus oncogênicos, para então serem transplantados no cérebro de animais imuno-deficientes, e a formação de gliomas foi observada. Mais do que isso, autores observaram que astrócitos primários isolados do cérebro de camundongos, infectados com o vírus oncolítico, eram capazes de formar neurosféricas que expressavam marcadores de células-tronco neurais (Nestin e Sox2) e de neurônios (Tuj1), além de reduzir drasticamente a expressão de marcadores astrocíticos, mostrando que uma célula diferenciada podia originar não somente uma célula-tronco capaz de se manter, mas também de gerar uma população heterogênea de células que compõe o tumor. Outros marcadores exclusivos de células-tronco embrionárias também foram detectados, como Nanog e SSEA1, além de CD133+, um marcador associado a células-tronco de tumores do cérebro (FRIEDMANN-MORVINSKI et al., 2012). Por fim, gliomagenese também foi demonstrado a partir de células progenitoras de oligodendrócitos (LINDBERG et al., 2009).

Juntos, estes trabalhos mostram que não somente células-tronco/progenitoras neurais, mas também células diferenciadas (neurônios e astrócitos) apresentam potencial de gerar gliomas com alto grau de malignidade. A implicação destes achados é direta: em 1888, o médico Byrom Bramwell, em seu livro *Intracranial Tumors*, ressaltou que a notória capacidade de infiltração do GBM correlacionava-se com sua impossibilidade de remoção total (cura). Assim sendo, como é virtualmente impossível remover cirurgicamente todas as células tumorais, qualquer célula remanescente, tendo ela ou não características de células-tronco, tem potencial

de originar um novo GBM, o que ajuda a compreender a recorrência tumoral e a consequente natureza incurável desta doença.

2.1.5 Sintomas, diagnóstico e o tratamento padrão-ouro de GBM

As regiões do cérebro comumente acometidas por GBM são o lobo frontal (pode chegar a 40% dos casos) e o lobo temporal, seguido dos lobos parietal e occipital (LARJAVAARA et al., 2007; PARKER et al., 2015). Por comprometer o funcionamento do cérebro, os sintomas são diversos e incluem: dores de cabeça, comprometimento das habilidades motoras, enjoo, perda de memória, confusão, alterações de personalidade, convulsões, dificuldades sensoriais, paralisia de um lado do corpo, e até mesmo coma (ARBER et al., 2010; KELLY; MIRKWOOD; KAPP, 1984; PARKER et al., 2015).

A avaliação do tumor é geralmente feita através do imageamento por ressonância magnética (o qual permite avaliar a extensão tumoral, bem como a ocorrência de hemorragias). Técnicas mais refinadas, como o PETscan (*Positron Emission Tomography scan*), são também empregadas e permitem obter informações mais detalhadas, como o consumo de glicose (marcada radioativamente) pelo tumor. O diagnóstico tecidual (por meio de biópsia estereotáxica, ou após a remoção do tumor) é obrigatório para classificar o glioma (IACOB; DINCA, 2009).

Atualmente, o tratamento considerado “padrão ouro” para gliomas foi delineado por Roger Stupp e colaboradores em 2005, os quais combinaram radioterapia com o agente metilante temozolomida (TMZ). Resumidamente, após máxima remoção cirúrgica possível do tumor, pacientes são submetidos à uma dose total de 60 Gray (Gy) de radiação ionizante, fracionada em 6 semanas, sendo aplicada 2 Gy por dia (total de 5 dias por semana). Junto da radioterapia, TMZ é ministrado diariamente, a uma dose de 75 mg por metro quadrado de área superficial do corpo, até o final da radioterapia. Em seguida, são ministrados mais 6 ciclos de TMZ (150-200 mg por metro quadrado de área superficial do corpo) por 5 dias consecutivos, a cada 28 dias. De um total de 573 pacientes com GBM que fizeram parte do teste clínico nível III, notou-se um aumento de 12,1 para 14,6 meses na média de sobrevivência (radioterapia vs. radioterapia + TMZ). Já o índice

de 2 anos de sobrevivência aumentou de 10,4 para 26,5% (radioterapia vs. radioterapia + TMZ) (STUPP et al., 2005). Em paralelo, notou-se que pacientes cujas células tumorais apresentavam o gene MGMT metilado (silenciado) se beneficiavam da adição de TMZ à radioterapia (tempo médio de sobrevivência era de 21,7 meses, em relação aos 15,3 meses do grupo com *status* não metilado de MGMT (HEGI et al., 2005).

Com esses dados em mente, uma constatação importante deve ser feita. Bailey e Cushing classificaram 77 (dos 412 casos analisados por eles) como GBM (ou espongiblastoma multiforme, como também era conhecido na época) (BAILEY; CUSHING, 1926; SCHERER, 1940a). Além de notarem que era o grupo com maior número de casos dentre todos os grupos analisados por eles, notaram também que era o mais maligno. Dentre os casos estudados de GBM, apenas 5 correspondiam a pacientes que não tinham tido o tumor removido cirurgicamente. O tempo médio de vida desses pacientes era de 3 meses, enquanto que o do grupo de pacientes que haviam sido submetidos à cirurgia era de 12 meses (LASSMAN; HOLLAND, 2006). Considerando que o trabalho de Bailey e Cushing foi publicado em 1926, vemos que quase 90 anos depois, a expectativa média de sobrevivência dos pacientes portadores de GBM não foi alterada drasticamente, mesmo com a aplicação de um tratamento multimodal, como delineado em 2005 (STUPP et al., 2005). Desta forma, a busca por novas terapias torna-se imperativa.

2.1.6 Redescobrimo a cloroquina: do combate à malária à adjuvante na terapia de GBM

Em 2003, um ensaio clínico com 18 pacientes de GBM revelou que a adição de cloroquina (CQ) à terapia (radioterapia combinada ao agente cloro-etilante carmustina) resultou em uma média de 31,6 meses de sobrevivência dos pacientes após a cirurgia, em comparação com os 10,6 meses apresentados pelo grupo de pacientes submetidos à cirurgia e à terapia, mas não combinada à CQ. Neste estudo, um total de 60 Gy de radiação ionizante foi aplicado aos pacientes, junto de 4 ciclos de carmustina (200 mg/m²) e CQ (dose diária de 150 mg iniciada no dia da cirurgia, e mantida até o final do período de observação). Dos 9 pacientes que receberam tratamento combinado à CQ, 6 sobreviveram por pelo menos 22 meses após a cirurgia, sendo que um deles sofreu recorrência tumoral somente 50 meses após a cirurgia. Já no grupo controle,

apenas 1 de 9 pacientes atingiu 22 meses de sobrevida após cirurgia. O efeito tóxico induzidos pela CQ se limitou a um aumento na frequência de ataques epilépticos, os quais eram controlados por medicamentos (BRICEÑO; REYES; SOTELO, 2003).

Três anos mais tarde, o mesmo grupo publicou um novo estudo, agora com 30 pacientes (e seguindo um protocolo semelhante ao anterior), e notaram que o tempo médio de sobrevida do grupo tratado com terapia (radioterapia junto de carmustina) e CQ apresentou uma média de sobrevivência de 24 meses, em comparação com os 11 meses do grupo que havia sido tratado somente com terapia convencional. Como efeitos secundários advindos da CQ, os autores notaram que os níveis de plaquetas e leucócitos estavam menores neste grupo. Apesar do tamanho pequeno da amostra, os resultados, assim como os do estudo anterior, sugerem que CQ pode aumentar o tempo médio de vida (curto-médio prazo) dos pacientes se aliada à terapia convencional (SOTELO; BRICEÑO; LÓPEZ-GONZÁLEZ, 2006). Por fim, no ano seguinte, o mesmo grupo publicou um terceiro estudo, agora com 123 pacientes (sendo 41 designados para receber terapia combinada com CQ), e confirmaram resultados dos dois trabalhos anteriores, ao observarem que o tempo de sobrevivência médio era de 25,4 meses na presença de CQ (*versus* 11,4 meses no grupo controle), além de observarem que o tempo livre de crescimento tumoral após cirurgia era de 14,9 meses (*versus* 8,3 meses no grupo controle) (BRICEÑO; CALDERON; SOTELO, 2007).

A história da CQ remete à segunda guerra mundial. Na época, a ilha de Java, na Indonésia, era a maior produtora de quinina (um composto natural derivado da casca da árvore Cinchona, com propriedades antimaláricas). A produção havia sido introduzida ali por holandeses, e as sementes dessa árvore trazida dos Andes para a Europa no século 17. Com a tomada da ilha de Java por japoneses durante a segunda guerra mundial, o suprimento desta droga para os países aliados havia ficado comprometido, e estes se juntaram numa tentativa de sintetizar compostos capazes de combater a malária. Este grupo de cientistas acabou sendo informado sobre um composto, *resoquin*, que havia sido sintetizado por H. Andersag, em 1934, na Alemanha, nos laboratórios da Bayer, também com o intuito de gerar novos compostos para o combate à malária. Como Andersag notou alta toxicidade do composto, ele o abandonou. No entanto, a eficácia de *resoquin* no combate à malária mostrou-se superior a qualquer outro composto

disponível na época. Este composto foi então rebatizada de cloroquina, e foi a principal droga escolhida pela WHO no programa de erradicação da malária em 1950 e 1960, devido ao seu baixo custo de síntese, baixa toxicidade (contrário ao que Andersag havia notado) e alta eficácia clínica (MESHNICK; DOBSON, 2001).

CQ é uma droga que pertence ao grupo 4-aminoquinolina. Esta droga, uma base fraca, difunde-se pela membrana das células e, ao entrar em compartimentos ácidos (como lisossomos), sofre protonação, ficando retida dentro destes (propriedade lisossomotrópica) (FREDERICKSEN et al., 2002). Ao desestabilizar os lisossomos (evidências mostram que CQ é capaz de causar permeabilização da membrana lisossomal, como descrito por MICHIHARA et al., 2005), CQ interfere com processos de degradação que ocorrem dentro destas organelas (SOLOMON; LEE, 2009). Um dos processos afetados por CQ é a macroautofagia (a partir de agora chamada de autofagia), uma via catabólica que se baseia na reciclagem de componentes citoplasmáticos (como proteínas, lipídeos e mitocôndrias) via lisossomo. Neste processo, o autofagossomo (estrutura de dupla membrana que contém componentes citoplasmáticos sequestrados) fundiona-se ao lisossomo (formando o autofago-lisossomo), fazendo com que os componentes citoplasmáticos isolados entrem em contato com enzimas lisossomais, o que irá resultar na sua degradação (figura 5) (MIZUSHIMA, 2007). Na presença de CQ, o processo é comprometido (evidências sugerem que a fusão do autofagossomo com o lisossomo é comprometida, como descrito por Yoon et al. 2010), resultando no acúmulo de vacúolos autofágicos não processados e possivelmente tóxicos para as células, uma vez que estas passam a acumular proteínas oxidadas e/ou mitocôndrias disfuncionais, por exemplo, que seriam normalmente recicladas (DEGTYAREV et al., 2008).

Figura 5 - A via da autofagia. Esquema representativo do processo autofágico, mostrando o fagóforo (ou membrana de isolamento) englobando componentes citoplasmáticos, como proteínas e mitocôndrias, e dando origem ao autofagossomo. Posteriormente, este funde-se ao lisossomo, originando o autofagolisossomo, no qual enzimas lisossomais irão digerir os componentes citoplasmáticos que encontravam-se dentro do autofagossomo. Por fim, os produtos da digestão (como aminoácidos) são enviados para o citoplasma via permeases, como a LYAAT-1 (*lysosomal amino acid transporter-1*), para serem reaproveitados pela célula para síntese de macromoléculas e geração de ATP. Encontra-se indicado, também, a etapa onde cloroquina exerce função inibitória (fusão do autofagossomo com lisossomo, bem como na funcionalidade desta organela). Adaptado de (VESSONI; MUOTRI; OKAMOTO, 2012)

Neste sentido, vale ressaltar que em 2006, Ravikumar e colaboradores mostraram que a indução farmacológica da autofagia protegia células contra a apoptose induzida por estaurosporina por meio da degradação de mitocôndrias. Desta forma, mitocôndrias com membrana externa permeabilizada (que iriam culminar na liberação de citocromo C para o citoplasma, e consequente indução de apoptose) eram degradadas, resultando em proteção celular (RAVIKUMAR et al., 2006). Outros efeitos tóxicos relacionados à inibição da autofagia foram mostrados em células de glioma expostas à TMZ. Neste estudo, autores haviam notado

que a autofagia era necessária para que as células tumorais aumentassem os níveis de ATP em resposta ao tratamento com este quimioterápico. Este aumento de ATP, de alguma maneira, prevenia morte celular induzida por TMZ, e possivelmente, o papel da autofagia era de gerar algum composto que pudesse ser prontamente utilizado na fosforilação oxidativa, gerando energia (KATAYAMA et al., 2007). Por conta destes e muitos outros estudos, a inibição da autofagia passou a receber muita atenção como adjuvante na terapia contra diversos tipos de tumores (VESSONI et al., 2013). No que se refere aos ensaios clínicos conduzidos por Briceño e Sotello acerca da combinação de carmustina e radioterapia com CQ, é possível que o efeito adjuvante da CQ se dê, pelo menos em parte, pela inibição da autofagia nos tumores.

Apesar desses estudos, a quantidade de trabalhos analisando os efeitos da CQ em células de glioma humano ainda é pequena. Em 2008, Park e colaboradores analisaram os efeitos da CQ em células da linhagem de GBM humano, A172, e notaram que esta droga induzia fragmentação de DNA, geração de óxido nítrico (NO) e depleção de glutatona (uma proteína com importante função na manutenção do balanço REDOX e na detoxificação de diversos compostos intracelulares) (PARK et al., 2008). Além disso, notaram que a redução nos níveis de glutatona, e não o aumento nos níveis de NO, estavam diretamente relacionados à indução de morte celular induzida por CQ. Em 2010, Kim e colaboradores notaram que a sensibilidade das células de glioma à CQ era maior em células com *status* selvagem do gene *TP53*. Autores também notaram que CQ era capaz de induzir apoptose nestas células e o silenciamento de p53 por RNA interferência aumentava a resistência destas ao tratamento. Autores também notaram que um modelo xenográfico intracranial de glioma humano apresentava menor tamanho e menor quantidade de células tumorais mitóticas quando a estes animais havia sido ministrada CQ intratumoral (KIM et al., 2010). No segundo trabalho, foi demonstrado que CQ promovia acúmulo de LC3II (proteína presente no autofagossomo, indicando, neste caso, acúmulo de vacúolos autofágicos) em células de glioma, e que o uso de um inibidor de caspase reduzia ativação de caspase 3, mas não protegia as células contra a perda de viabilidade induzida por CQ. Autores também notaram que CQ promovia uma redução na quantidade de catepsina D ativa, além de esta passar a apresentar um padrão difuso no citoplasma, sugerindo perda da integridade da membrana lisossomal e consequente extravasamento de suas enzimas para o citosol (GENG et al., 2010).

Na figura 6, apresentamos uma linha do tempo com os principais fatos descritos na introdução desta tese que levaram a um maior entendimento da doença GBM, bem como ao desenvolvimento de protocolos terapêuticos importantes.

Figura 6 - Linha do tempo com alguns dos principais fatos que resultaram no entendimento atual da doença Glioblastoma multiforme, bem como no desenvolvimento de protocolos terapêuticos.

2.2 Objetivos

Desta forma, considerando os resultados clínicos positivos obtidos pelos pesquisadores Briceño e Sotelo acerca do uso da cloroquina como adjuvante na terapia convencional de GBM, aliado aos poucos estudos disponíveis acerca dos efeitos desencadeados pela cloroquina em diferentes células de glioma humano (bem como sobre os mecanismos de resistência a esta droga), o presente capítulo desta tese de doutorado tem dois objetivos principais:

- 1) Realizar um estudo comparativo entre quatro linhagens celulares de astrocitoma humano de alto grau de malignidade acerca dos efeitos celulares desencadeados por cloroquina; e
- 2) Analisar mecanismos que possam contribuir para a resistência dessas células à CQ.

2.3 Material e métodos

2.3.1 Cultura celular

Foram utilizadas as linhagens celulares de glioma humano U87MG, U343MG, U138MG e U251MG, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Bernd Kaina (Universidade de Mainz, Alemanha). Todas as linhagens são derivadas de astrocitomas primários, e uma descrição detalhada de todas elas, bem como dos pacientes, encontra-se na tabela 1 (ISHII et al., 1999).

Tabela 1 - Características das linhagens de glioma humano usados nesta tese.

	Características clínicas			p53		PTEN		p16	p14ARF
Linhagem Celular	Idade/Sexo do paciente	Grau do glioma	Localização do Tumor (Lobo)	Códon mutado	Alterações no DNA e aminoácidos	Códon mutado	Alterações no DNA e aminoácidos	-	-
U87MG	44/M	IV	occipital	WT/WT	-/-	éxon 3 íntron 3 54	deleção <i>in frame</i> <i>splicing</i> alternativo G1T deleção de 49 bp	deletado	deletado
U138MG	47/M	III ou IV	esquerda/ temporal	WT/213	-/ CGA (Arg)->CAA(Gln)	éxon1 íntron 8	deleção (homozigose) da região promotora (sem proteína) <i>splicing</i> alternativo G1T	deletado	deletado
U251MG	75/M	IV	lateral/ parietal	273/273	CGT(Arg)->CAT(His)/ CGT(Arg)->CAT(His)	241	<i>frameshift</i>	deletado	deletado
U343MG	54/M	III	direito/ temporal	WT/WT	-/-	124	TGT(Cys)->TCT(Ser)	deletado	deletado

Tabela 1 - Descrição das linhagens de glioma humano utilizadas nesta tese acerca: da idade e sexo dos pacientes da qual as células foram originadas; do grau de malignidade do glioma (de acordo com WHO, (LOUIS et al., 2007a); da localização do tumor no cérebro; e da descrição do *status* dos genes p53, PTEN, p16 e p14ARF nestas linhagens. (M: masculino; WT: cópia selvagem [*wild type*] do gene; bp: pares de base [*base pairs*]; G1T: alteração de guanina para timina na posição 1. Tabela adaptada de Ishii et al.

As linhagens de glioma foram cultivadas rotineiramente em meio DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium*) com 4,5 G/L de glicose (LGC Biotecnologia, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Atena Biotecnologia, Campinas, SP, Brasil) e 1% de antibiótico/antimicótico (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em uma incubadora a 37 °C e 5% CO₂. O sub-cultivo das células era feito cerca de duas vezes por semana através de lavagem com PBS (*Phosphate Buffer Saline*, LGC Bio), seguido de adição de tripsina-EDTA (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil) por aproximadamente 5 minutos (37 °C), neutralização da reação com meio

de cultura, centrifugação das células (1.200 RPM por 3 minutos) e, por fim, ressuspensão e distribuição das células entre placas de cultura (*Techno Plastic Products*, Trasadingen, Zollstrasse, Switzerland) numa razão 1:5.

2.3.2 Congelamento e descongelamento de células

O congelamento das células foi feito através da suspensão do precipitado de células em SFB acrescido de 10% de DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), seguido da distribuição destas entre criotubos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), os quais foram imediatamente colocados em um container de congelamento (*Mr.Frosty Freezing Container*, Thermo Fisher Scientific), no qual os criotubos ficavam isolados termicamente por isopropanol, permitindo um decréscimo gradual da temperatura a uma taxa de 1 °C por minuto. Cerca de 24 horas depois, os criotubos eram transferidos e armazenados em um tanque contendo nitrogênio líquido. O descongelamento das células foi feito através da incubação dos criotubos a 37 °C até total descongelamento, seguido de centrifugação das células, ressuspensão em meio de cultura e distribuição entre placas de cultura.

2.3.3 Drogas e tratamentos

Cloroquina difosfato (CQ): (25745, Fluka Biochemika, Sigma-Aldrich) dissolvida em água *Milli-Q* (concentração de 10 mM), seguido de filtração (usando uma seringa acoplada a um filtro de 0,22 µM), imediatamente antes do uso. Em seguida, a solução estoque foi diluída em meio de cultura na concentração final desejada, e as células foram incubadas com esta solução até o momento de sua coleta para a realização de diferentes análises.

N-Acetil L-Cisteína (NAC): (A7250, Sigma-Aldrich) dissolvida em DMEM (concentração de 40 mM), seguido de esterilização por filtração (0,22 µM), imediatamente antes do uso. Em seguida, esta solução foi diluída em meio de cultura na concentração final desejada, e as células incubadas continuamente até sua coleta para a realização do experimento.

Temozolomida (TMZ): (T2577, Sigma-Aldrich) dissolvida em DMSO (concentração de 100 mM), alíquotada e armazenada a -20 °C. Solução de uso foi preparada através da diluição da solução estoque em meio de cultura, e as células incubadas continuamente até sua coleta para realização de experimentos.

Cafeína: (C0750, Sigma=Aldrich) dissolvida em PBS (concentração de 77,2 mM), esterilizada por filtração (0,22 µM), e armazenada à temperatura ambiente. Para tratamento, esta solução foi diluída em meio de cultura imediatamente antes do uso (concentração final = 1 mM), e células pré-incubadas por 1 hora apenas com esta solução. Em seguida, meio era removido, e uma nova solução contendo CQ e cafeína era adicionada.

2.3.4 Ensaio de citotoxicidade/viabilidade celular

Aproximadamente 2×10^4 células foram plaqueadas por poço de placa de 24 poços (*multiwell* de 24) (*Techno Plastic Products*) e, no dia seguinte, submetidas a tratamento com CQ e/ou NAC e/ou TMZ pelo tempo e concentração desejados. Em seguida, os poços foram lavados com PBS, e as células incubadas com 250 µl de uma solução contendo o sal XTT (*tetrazolium*) e um carreador (ou acoplador de elétrons) na proporção 50:1 (*Cell Proliferation Kit II*, Roche, Basel, Suíça) diluídos em PBS, por cerca de 40 minutos a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, a formação de um sal solúvel em água (formazana, de coloração alaranjada) foi avaliada através da transferências de 200 µl da solução para uma placa de 96 poços, e a absorbância medida em um espectrofotômetro (Glomax96, Promega, Fitchburg, MA, EUA). A diferença dos valores obtidos nas leituras dos comprimentos de onda 462 e 650 nm foi usado como indicativo de viabilidade celular, já que a redução do XTT à formazana dá-se pela succinato desidrogenase, enzima presente na membrana interna da mitocôndria, e cuja atividade depende da integridade desta organela. Os valores foram expressos em porcentagem das células não tratadas (100% de viabilidade).

2.3.5 Análise de indução de morte celular

2.3.5.1 Formação de sub-G1

Aproximadamente $3,75 \times 10^4$ células foram plaqueadas em placas de 60 mm de diâmetro (*Techno Plastic Products*) e, no dia seguinte, foram submetidas a tratamento com CQ e/ou NAC. Após o tempo desejado, tanto o sobrenadante quanto as células aderidas foram coletadas, concentradas (1.200 RPM, 3 minutos), lavadas com PBS, concentradas novamente, ressuspendidas em 1 ml de etanol 70% (Labsynth, Diadema, SP, Brasil) e armazenadas a -20 °C por pelo menos um dia, mas não mais do que uma semana. Em seguida, células foram concentradas por centrifugação, e ressuspendidas em 200 µl de uma solução contendo 20 mg/mL

do intercalante de DNA iodeto de propídeo (PI) (Calbiochem, Merck, Whitehouse Station, NJ, EUA), 0,02 mg/mL RNase A (Life Technologies) e 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) em PBS, e incubadas no escuro, sob constante agitação, por cerca de 30 minutos. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com PBS, e as células analisadas em um citômetro de fluxo (Guava Easycyte, Millipore, Billerica, MA, EUA). Cerca de 10.000 eventos foram analisados, e a quantidade de DNA (eixo X, fluorescência vermelha, proporcional à quantidade de PI) por célula (eixo Y) avaliada no software GuavaExpress Pro (Guava Easycyte, Millipore), o que permitiu quantificar a população de células com quantidade sub-diplóide de núcleos (sub-G1), indicativo de morte celular (BATISTA et al., 2009c).

2.3.5.2 Ativação de caspase 3

A análise da clivagem (ativação) de caspase 3, usada como indicador de apoptose, foi feita por citometria de fluxo. Aproximadamente $3,75 \times 10^4$ células foram plaqueadas em placas de 60 mm de diâmetro (*Techno Plastic Products*) e, no dia seguinte, foram submetidas a tratamento com CQ. Após o tempo desejado, tanto o sobrenadante quanto as células aderidas foram coletadas, concentradas (1.200 RPM, 3 minutos), lavadas com PBS, concentradas novamente, ressuspensas em 1 ml de formaldeído 1% (Labsynth) (em PBS), incubadas por 15 minutos a 4 °C, lavadas com PBS, ressuspensas em etanol 70%, e armazenadas por pelo menos um dia a -20 °C. Em seguida, células foram ressuspensas em 0,2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) e 1% BSA (Sigma-Aldrich) em PBS (solução de bloqueio), incubadas por 40 minutos à temperatura ambiente, concentradas e ressuspensas em nova solução de bloqueio contendo anticorpo para a forma clivada de caspase 3 (diluição 1:50) conjugado ao fluoróforo FITC (559341, BD Pharmingen), e mantidas a 4 °C sob constante agitação por cerca de 16 horas. Em seguida, foram realizadas 2 lavagens com PBS, seguida de uma etapa de marcação do DNA com PI (como descrito no tópico anterior). Um total de 10.000 eventos foram então analisados por citometria de fluxo (Guava Easycyte, Millipore), e a porcentagem de células positivas para caspase 3 ativada (indicativo de morte celular por apoptose) (eixo X, fluorescência verde) avaliada no software GuavaExpress Pro (Guava Easycyte, Millipore) (QUINET et al., 2014). Células cultivadas na ausência de drogas foram usadas para definir níveis basais de ativação de caspase 3.

2.3.6 Análise da presença de danos ao DNA

2.3.6.1 Fosforilação de H2AX

A análise da fosforilação da histona variante H2A (H2AX) na serina 139 (γ -H2AX), usada como medida da formação de danos ao DNA, foi feita por citometria de fluxo, seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente para a detecção de ativação de caspase 3. No entanto, foi utilizado o anticorpo primário anti- γ -H2AX (diluição 1:500, clone JBW301, Upstate, Millipore e o anticorpo secundário anti-camundongo FITC (diluição 1:200) (Sigma-Aldrich). A porcentagem de células positivas para γ -H2AX (eixo X, fluorescência verde) foi avaliada no software GuavaExpress Pro (Guava EasyCyte, Millipore) (QUINET et al., 2014). Células cultivadas na ausência de drogas foram usadas para definir níveis basais de fosforilação de γ -H2AX.

2.3.6.2 PCR longo quantitativo

A análise da presença de danos capazes de distorcer e/ou causarem quebras no DNA foi feita através da técnica do PCR (*polymerase chain reaction*) longo. Nesta técnica, são utilizados primers que permitem a amplificação de longas regiões do genoma (12-14 kpb). Quanto maior a quantidade de danos ao DNA, menor a quantidade de amplicons sintetizados durante o PCR, os quais podem ser resolvidos por meio de um gel de agarose, permitindo estimar a quantidade de lesões por kpb de DNA, tendo como base a intensidade da banda presente no gel. Para isso, aproximadamente 1×10^6 células foram plaqueadas em placas de 100 mm de diâmetro (*Techno Plastic Products*) e, no dia seguinte, submetidas ao tratamento com CQ. Após o tempo desejado, somente as células aderidas foram coletadas com ajuda de tripsina, concentradas por centrifugação (1.200 RPM por 3 minutos), lavadas com PBS, concentradas novamente, e o DNA extraído usando o kit *DNeasy Blood & Tissue Kit* (69504, QIAGEN, Hilden, Germany). Em seguida, o DNA foi quantificado usando o Quant-iT Picogreen dsDNA kit (P7589, Life Technologies), de acordo com instruções do fabricante. As amostras foram diluídas para 3 ng/ μ l, e a reação do PCR longo foi feita utilizando o kit Takara LA PCR (RR013A, Takara Bio Inc, Millipore), seguindo especificações do fabricante. As etapas utilizadas no termociclador foram: 85 °C *hot start* com duração de 5 minutos (adição da polymerase ocorreu faltando 2 minutos para o fim desta etapa; 94 °C por 3 minutos; 29 ciclos de 94 °C por 30 segundos; 69 °C por 9 minutos; 4 °C infinito. Em seguida ¼ do produto do PCR (10 μ l) foi resolvido em um gel de agarose 0,7% com brometo de

etídeo por 30 minutos a 80 volts, para analisar a presença de uma única banda. Tendo confirmado a especificidade da reação de PCR, o produto do PCR foi quantificado por Quant-iT Picogreen dsDNA kit, e o valor de amostras irradiadas foi dividido por amostras não irradiadas. Em seguida, o cálculo do logaritmo natural negativo (-ln) dessa razão foi usado para determinar a frequência de lesões por fragmento de DNA, sendo que o valor obtido na amostra irradiada com luz UVC (e coletada imediatamente após este tratamento) foi considerado o controle positivo para lesões (100% de lesões) (ANDRADE-LIMA et al., 2015; FURDA et al., 2012). Os primers usados foram: *Forward*: TGGAAACCCTGTGGGCGGATAATA; *Reverse*: CTCCAGGCCTAAGGAGCAGCAGAA para o gene ANXA2, e *Forward*: AACCCCCAGGAGTGGTTCTTGTGA; *Reverse*: GTCAGCCATTGTTGGGGAATTGGT para o gene Lect1.

2.3.7 Análise do Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Aproximadamente $1,25 \times 10^4$ células foram plaqueadas em placas de 35 mm de diâmetro (*Techno Plastic Products*), e no dia seguinte, submetidas a tratamento com CQ e/ou NAC. Após incubação das células pelo tempo desejado, estas foram, então, lavadas com PBS, tripsinizadas, lavadas com PBS suplementado com 10% de SFB, centrifugadas (1.200 RPM por 3 minutos), e ressuspendidas em solução contendo 50 nM de *tetramethylrhodamine, methyl ester perchlorate* (TMRM) (Life Technologies) em PBS suplementado com 0,1% de SFB, e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 15 minutos no escuro (o TMRM, composto catiônico fluorescente é sequestrado por mitocôndrias ativas, acumulando de maneira proporcional ao potencial de membrana destas organelas, o que pode ser medido através da análise da intensidade da fluorescência (SCHEIBYE-KNUDSEN et al., 2012). Em seguida, células foram centrifugadas, ressuspendidas em PBS contendo 0,1% de SFB, e imediatamente analisadas por citometria de fluxo. 10.000 eventos foram analisados, e em um histograma, a média da fluorescência amarela (eixo X) por quantidade de células (eixo Y) é avaliada. Um aumento na intensidade da fluorescência (em relação ao grupo controle) indica um aumento do potencial de membrana mitocondrial, enquanto que uma diminuição na intensidade do sinal reflete despolarização da membrana desta organela (SCHEIBYE-KNUDSEN et al., 2012). A solução estoque de TMRM (10 mM em DMSO) foi dividida em alíquotas e armazenada a -20 °C protegida da luz, de acordo com instruções do fabricante.

2.3.8 Análise da geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

Aproximadamente $1,25 \times 10^4$ células foram plaqueadas em placas de 35 mm de diâmetro (*Techno Plastic Products*) e, no dia seguinte, submetidas ao tratamento com CQ por 48 horas. Células foram, então, lavadas com PBS, tripsinizadas, lavadas com PBS suplementado com 10% de SFB, centrifugadas (1.200 RPM por 3 minutos), e ressuspensas em solução contendo 10 μ M de DCFDA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate, 35845, Sigma-Aldrich) em DMEM sem vermelho de fenol (LGC Bio), mas suplementado com 0,2% de SFB, por 30 minutos a 37 °C e 5% de CO₂, protegido da luz. Com quinze minutos de incubação, células foram invertidas gentilmente para evitar sedimentação. Imediatamente após o período de incubação, células foram analisadas por citometria de fluxo. 10.000 eventos foram analisados, e em um histograma, a média da fluorescência verde (eixo X) por quantidade de células (eixo Y) foi avaliada. Um aumento na intensidade da fluorescência (em relação ao grupo controle) indica um aumento na geração de ERO (ASENSI et al., 2014). Como controle positivo, foram analisadas células incubadas com DCFDA na presença de 1-2 mM de H₂O₂.

2.3.9 Análise da quantidade de mitocôndrias

Aproximadamente $1,25 \times 10^4$ células foram plaqueadas em placas de 35 mm de diâmetro (*Techno Plastic Products*) e, no dia seguinte, submetidas ao tratamento com CQ e/ou NAC. Após incubação das células pelo tempo desejado, estas foram, então, incubadas (37 °C e 5% de CO₂ no escuro) com 50 nM de MitoTracker® *Deep Red* FM Probe (M22426, Life Technologies) em meio de cultura completo por 40 minutos. Diferentemente do TMRM, esta versão do mitotracker acumula em mitocôndrias independentemente de seu potencial de membrana (detalhes no site do fabricante e no material suplementar do trabalho de Yamada et al. 2012), e por isso foi usado para analisar o conteúdo mitocondrial. Em seguida, células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, ressuspensas em DMEM sem vermelho de fenol suplementado com 1% de FBS, e 10.000 eventos foram analisados por citometria de fluxo. Em um histograma, a média da fluorescência vermelha (eixo X) por quantidade de células (eixo Y) foi avaliada, e um aumento na intensidade da fluorescência (em relação ao grupo controle) indica um aumento na quantidade de massa mitocondrial por célula (SCHEIBYE-KNUDSEN et al., 2012).

2.3.10 Silenciamento gênico de ATR

Aproximadamente 1×10^6 células plaqueadas em placas de 100 mm foram transfectadas com 20 nM de *small interfering* RNA (siRNA) tendo como alvo o RNAm do gene ATR (siATR), por meio do reagente de transfecção oligofectamina (12252-011, Life Technologies). Para isso, siRNA foi misturado a oligofectamina em DMEM sem soro (de acordo com especificações do fabricante), e incubado a temperatura ambiente por 7 minutos. Em seguida, o meio das células foi removido, e DMEM sem soro foi adicionado, para em seguida a mistura de siATR + oligofectamina ser gotejada sobre a placa de células. 5 horas depois, foi adicionado SFB (concentração final = 10%). No dia seguinte, o mesmo procedimento foi repetido (um total de 40 nM de siATR foi transfectado num período de dois dias) (ANDRADE-LIMA; ANDRADE; MENCK, 2015a; QUINET et al., 2014). 24 horas após a segunda transfecção, as células foram replaqueadas para posterior tratamento com CQ e/ou TMZ. As duas sequências usadas para silenciar o gene ATR foram: 1) 5'-UUAACAUGUUCUUACCCUCAGGUGG-3' (HSS100878 *Stealth*) e 2) 5'-UUUAGAUGAGGUUCUAGUAUUUCCC-3' (HSS100876 *Stealth*). A sequência controle (siScramble) usada (a qual não possui nenhum RNA como alvo em células humanas) foi: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUGdTdT-3'. Para verificação dos níveis de silenciamento, 72 horas após a transfecção das células, o RNA foi extraído usando o kit *Purelink RNA Minikit* (12183025, Ambion, Foster City, CA, EUA) de acordo com instruções do fabricante. O RNA foi submetido à uma reação de transcrição reversa usando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (4368813, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com instruções do fabricante. Posteriormente, o cDNA gerado foi submetido à uma reação de PCR quantitativo usando o fluoróforo SYBR Green PCR Master Mix (4309155, Applied Biosystems), o qual intercala em DNA dupla fita e permite fazer uma quantificação absoluta, por meio de fluorescência, da quantidade de DNA amplificado a cada ciclo na reação de PCR conduzida no aparelho 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems). Os primers usados nestas reações foram: 5'-CCCATCTGTCAGTTTTTGGTAGAA-3' (*forward*) e 5'-CTGGCATGGAGTATTCGGAAGT-3' (*reverse*) para análise da expressão do gene ATR, e 5'-CCAGCTCACCATGGATGATG-3' (*forward*) e 5'-ATGCCGGAGCCGTTGTC-3' (*reverse*) para análise da expressão do gene β -actina (gene de referência). A expressão do gene ATR relativa ("R") ao gene β -actina foi calculado através da

fórmula matemática $R = 2^{\Delta CP \text{ ATR (siScramble - siATR)} / \Delta CP \beta\text{-actina (siScramble - siATR)}}$, onde “CP” (ou *crossing points*) refere-se ao ciclo do PCR onde a amplificação das amostras em questão foi detectada (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

2.3.11 Análise de expressão protéica por western blot

Após tratamento, tanto células do sobrenadante quanto células aderidas foram coletadas, centrifugadas, lavadas com PBS, e precipitado armazenado a -80 °C. A extração protéica foi feita através da suspensão do pellet em solução de lise contendo 50 mM Tris pH 7,5, 20 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,1% SDS (Sigma-Aldrich), coquetel de inibidor de proteases (*Cocktail Set III*, Calbiochem, San Diego, CA, EUA) e 0,25 unidades por ml de Benzonase (Novagen, Madison, WI, EUA). O lisado celular foi mantido no gelo por 10 minutos, seguido de centrifugação (14.000 RPM por 10 minutos a 4 °C). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e a quantificação da concentração protéica foi realizada utilizando o kit *Pierce BCA Protein Assay kit* (23225, Life Technologies), de acordo com especificações do fabricante. Uma curva de concentração de albumina de soro bovino (BSA) no intervalo de 0 – 8 µg/µL em relação à absorbância (comprimento de onda de 562 nm) foi gerada, permitindo quantificar a concentração das proteínas extraídas. Em seguida, cerca de 30 µg de proteína foram aliquotados e o volume completado para 30 µL com água milli-Q. 10 µL de tampão de amostra 4X (B0007, Life Technologies) foi adicionado a essa alíquota, seguido de incubação a 100°C por 10 minutos. Em seguida, amostras foram colocadas no gelo por cerca de 5 minutos, e aplicadas em um gel de poliacrilamida (NW04120BOX, *Bolt® 4-12% Bis-Tris Plus Gels*, Life Technologies). Proteínas foram, então, separadas através da aplicação de uma voltagem constante de 120 volts, por aproximadamente 90 minutos, na presença do tampão de corrida *Bolt® MOPS SDS* (B0001-02, Life Technologies), no sistema de corrida *Mini Gel Tank* (A25977, Life Technologies) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (IB3010-02, Life Technologies) por meio do aparelho de transferência *iBlot® Dry Blotting System* (Life Technologies). O marcador de peso molecular utilizado foi *Full-range Rainbow Marker* (RPN800E, Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra). A membrana foi então bloqueada através da incubação, a temperatura ambiente por 1 hora, com PBS adicionado de 0,5% de Tween 20 (P2287, Sigma-Aldrich) e 5% de leite em pó desnatado Molico (Nestlé, Vevey, Suíça). Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpos

de interesse por cerca de 16 horas diluídos na solução de bloqueio, sob agitação constante a 4°C. Os anticorpos utilizados foram: anti-LC3 (L8918, Sigma-Aldrich), anti-p-Chk1 Ser345 (2348, Cell Signaling, Danvers, MA, EUA), anti-GAPDH (SC32233 Santa Cruz, Santa Cruz, CA, EUA), anti-p62 (#5114, Cell Signalling), anti-Beta tubulina (SC5274, Santa Cruz), anti PARP (AB6079, Abcam, Cambridge, MA, EUA). Em seguida, membranas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos usando PBS adicionado de 0.5% de Tween 20, e incubada com anticorpo secundário conjugado a *horseradish peroxidase* (HRP) (A-9169 e A9044, Sigma-Aldrich) por uma hora à temperatura ambiente. Por fim, mais 3 lavagens da membrana com PBS + 0,5% Tween 20 foram realizadas, e membranas reveladas usando o fotodocumentador ImageQuant 3000 (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra).

2.3.12 Imunofluorescência

Aproximadamente 2×10^4 células foram plaqueadas em lamínulas pré-esterilizadas com álcool 70%, lavadas com PBS, e posicionadas dentro de poços de placas *multiwell* de 24 poços, com ajuda de um fórceps (FC5005, Braintree Scientific, Braintree, MA, EUA), também esterilizado com álcool 70%. Após tratamento com CQ, células foram lavadas com PBS, seguido de fixação com 4% de paraformaldeído (158127, Sigma-Aldrich) dissolvido em PBS, por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, células fixadas foram lavadas 3 vezes com PBS, e incubadas com 0,1% de TritonX100 (234729, Sigma-Aldrich) em PBS por 15 minutos à temperatura ambiente para promover permeabilização das células. Células foram, então, incubadas por 40 minutos com solução de bloqueio contendo 2% de BSA em PBS (também à temperatura ambiente), e posteriormente incubada com anticorpo primário (anti-Tom20, SC11415, Santa Cruz) por 4 horas à temperatura ambiente. Em seguida, células foram lavadas 3 vezes com PBS, e anticorpo secundário anti-coelho (Sigma-Aldrich) conjugado a FITC foi aplicado às amostras (por 40 minutos à temperatura ambiente, no escuro), diluído em solução de bloqueio. Após 3 lavagens com PBS, lamínulas foram vertidas sobre uma lâmina de vidro em cima de 5 µl de solução de montagem contendo DAPI (F6057, Sigma-Aldrich), com ajuda do fórceps. Imageamento foi realizado em um microscópio confocal Zeiss LSM-780 NLO (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), através do software Zen Blue (Carl Zeiss).

2.3.13 Expressão da proteína LC3 fusionada à GFP

Células HEK293FT foram crescidas em DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de Glutamax, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de piruvato de sódio, e 1% de antibióticos/antimicóticos (Life Technologies) até atingirem aproximadamente 95-100% de confluência em uma placa de 150 mm de diâmetro (*Techno Plastic Products*), para serem então divididas em 5 placas de 150 mm, com ajuda do reagente de dissociação Tryple Express (12604-013, Life Technologies). No dia seguinte, foi preparado um mix dos seguintes plasmídeos para produção de lentivírus: pMDL (8,1 µg), RevRSV (3,1 µg), VSV-G (4,1 µg) e um plasmídeo recombinante para expressão de GFP fusionado a LC3, junto de 110 µl de solução estoque de 1mg/ml de PEI linear (*linear polyethylenimine*, 23966, Polysciences, Inc, Warrington, PA, EUA) em PBS (pH 4,65, esterilizado por filtração usando uma seringa acoplada a filtro de 0,22 µm), num volume final de 500 µl (em DMEM sem SFB). Os plasmídeos *helper* (pMDL, RevRSV e VSV-G) foram gentilmente doados pelo Prof. Dr. Alysson Renato Muotri (Universidade da Califórnia, San Diego, CA, EUA), enquanto que o plasmídeo contendo a construção GFP::LC3 foi gentilmente doado pela Prof. Dra. Maria S. Soengas (Centro Nacional Espanhol de Pesquisa em Câncer, Madrid, Espanha). A mistura de plasmídeos e PEI linear foi brevemente agitada, e mantida à temperatura ambiente por 10 minutos, antes de ser distribuída (gotejada gentilmente) sobre uma placa de 150 mm de células HEK293FT aproximadamente 70% confluentes. No dia seguinte, o meio foi trocado para 22 ml de meio de cultura de HEK293FT suplementado com 5% de SFB. 48 horas depois, o sobrenadante foi coletado, filtrado (0,22 µm), e ultracentrifugado (19.400 RPM, por 2 horas, a 8 °C). Em seguida, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado (vertido) em um frasco contendo hipoclorito (10%), e 100 µl de DMEM foi adicionado cuidadosamente à lateral do tubo de ultracentrifugação contendo o precipitado de vírus. O tubo contendo vírus foi armazenado dentro de um tubo falcon de 50 ml (Nunc), fechado, e colocado a 4 °C por cerca de 16 horas. No dia seguinte, o precipitado foi cuidadosamente ressuscitado com ajuda de uma pipeta de 200 µl, misturado com meio de DMEM, e distribuído entre até 5 placas de 100 mm de diâmetro aproximadamente 70% confluentes de células de glioma. 4 horas depois, SFB foi adicionado (final 10%), e no dia seguinte, meio descartado em hipoclorito 10%, e meio de cultura completo adicionado. A formação de vacúolos autofágicos após tratamento com CQ foi então analisada

nestas células sob um microscópio de fluorescência Zeiss Axiovert, e o imageamento das células foi feito com auxílio do software AxioVision 4.8.2.0.

2.4 Resultados

2.4.1 Estudo comparativo dos efeitos da CQ em células de glioma humano

2.4.1.1 CQ causa acúmulo de vacúolos autofágicos e mitocôndrias, perda de potencial de membrana mitocondrial, e geração de ERO

Para investigarmos os efeitos *in vitro* da CQ em células de glioma humano, iniciamos os estudos avaliando o efeito de diferentes doses dessa droga (5 – 75 μM) sobre a viabilidade celular (medida pelo ensaio do XTT) das células da linhagem U87MG (figura 7).

Figura 7 - Ensaio da viabilidade celular de células da linhagem U87MG expostas à CQ. Células da linhagem U87MG foram tratadas com diferentes doses de CQ por 48 horas, e a viabilidade celular analisada pelo ensaio do XTT.

Com base na figura 7, definimos a concentração de CQ (50 μM) de interesse como sendo aquela capaz de reduzir a viabilidade celular para próximo de 10% do valor das células não tratadas. Com base em estudos que mostraram a habilidade da CQ de i) bloquear a etapa final da autofagia (YOON et al., 2010), ii) induzir aumentos nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) (CHEN et al., 2005), bem como iii) causar permeabilização mitocondrial (BOYA; KROEMER, 2008), decidimos avaliar estes três eventos de uma forma tempo-dependente em células U87MG submetidas ao tratamento com esta dose de CQ (figura 5). É possível observar, por *western blot*, que o acúmulo de LC3II (o qual indica presença de vacúolos autofágicos nas células) aumenta

progressivamente ao longo de 24 horas de tratamento com CQ (figura 8A). Utilizando células de glioma que expressam estavelmente a proteína fluorescente verde “GFP” fusionada à proteína LC3, é possível analisar a presença de vacúolos autofágicos sob um microscópio de fluorescência, já que o LC3 passa de difuso no citoplasma para associado a vacúolos quando autofagossomos são formados. Assim, na figura 8B, confirmamos um aumento no número da quantidade de esferas verdes no citoplasma (6 horas de tratamento). Através da incubação das células com o fluoróforo *Mitotracker Deep Red FM* (Life Technologies), o qual se liga a mitocôndrias de maneira independente do potencial da membrana desta organela ($\Delta\psi_m$), e permite quantificar o conteúdo mitocondrial (DINGLEY; CHAPMAN; FALK, 2012; SCHEIBYE-KNUDSEN et al., 2012; YAMADA; KAWAMURA; HARASHIMA, 2012), observamos, por citometria de fluxo, que o conteúdo de mitocôndrias nas células de glioma aumenta significativamente ao longo do tempo de tratamento com CQ (figura 8C). Em contrapartida, ao incubar as células com o fluoróforo TMRM (Life Technologies), o qual é retido por mitocôndrias ativas e é comumente utilizado para analisar o $\Delta\psi_m$ (DINGLEY, 2012; SCHEIBYE-KNUDSEN et al., 2012), observamos, também por citometria de fluxo, uma queda significativa nos valores de $\Delta\psi_m$ ao longo do tratamento com CQ (Figura 8D). Por fim, utilizamos a sonda fluorescente DCFDA, comumente empregada para medir o estado redox celular (ASENSI et al., 2014; ERUSLANOV; KUSMARTSEV, 2010), para investigar a formação de ERO induzida por CQ. Esta sonda difunde-se para dentro da célula, onde é retida caso seja oxidada, e variações nos níveis de fluorescência (medidas também por citometria de fluxo) refletem variações no estado redox celular. Por esta análise, foi possível observar um aumento significativo na geração de ERO, porém, somente após 48 horas de tratamento com CQ (figura 8E), sugerindo que o acúmulo de vacúolos autofágicos, bem como o de mitocôndrias disfuncionais, precedem a geração de ERO induzida por CQ.

Figura 8 - Cinética do acúmulo de vacúolos autofágicos e mitocôndrias, bem como da variação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi m$) e geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) induzidos por 50 μM de CQ em células da linhagem U87MG. (A) Acúmulo de LC3II ao longo de 24 horas de tratamento contínuo com CQ (imagem representativa de dois experimentos independentes). (B) Imagem representativa do aumento do número de vacúolos autofágicos após 6 horas de tratamento com CQ, observados sob microscopia de fluorescência em células que expressam a proteína GFP fusionada a LC3. Análise, por citometria de fluxo, do conteúdo mitocondrial (C), $\Delta\psi m$ (D), e geração de ERO (E) na presença de CQ. Gráficos C, D & E mostram a média de 2 a 4 experimentos independentes $\pm$ erro padrão da média. Foi utilizado o teste estatístico *one-way* ANOVA seguido da análise de Bonferroni, e diferenças significativas são mostradas em relação ao controle (tempo zero) (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$).

2.4.1.2 NAC previne perda de viabilidade e alterações celulares induzidas por CQ

Tendo em vista a geração de ERO induzida por CQ (figura 8E), decidimos investigar qual seria o efeito do co-tratamento de CQ com um antioxidante. Para isto, decidimos utilizar a forma acetilada da L-cisteína (N-acetil L-cisteína, ou NAC), a qual é comumente empregada como antioxidante, e esta função pode ser explicada de duas maneiras: NAC pode interagir diretamente com ERO, devido à presença de tiol (ou grupo sulfidríla, SH, ligado a um carbono) na sua estrutura,

o qual confere ao NAC capacidade redutora e, por tanto, de neutralizar ERO (ZHANG; LAU; MONKS, 2011); e/ou através do aumento da síntese de glutathiona (GSH), já que NAC é precursor para a síntese deste tripetídeo (glutamina, cisteína e glicina) que promove detoxificação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (LUSHCHAK, 2012).

Inicialmente, analisamos o efeito da adição de NAC (25 mM) sobre a perda da viabilidade celular induzida por CQ (diferentes concentrações) (figura 9A). Para isso, NAC e CQ foram administrados concomitantemente, e mantidos em contato com as células por 48 horas, quando a viabilidade celular foi analisada pelo ensaio do XTT. Resultados mostram que NAC confere uma significativa proteção contra os efeitos tóxicos da CQ. Adicionalmente, após 48 horas de tratamento de CQ (50 μ M) + NAC (25 mM), trocamos o meio de cultivo celular para outro livre de drogas e, 72 horas depois desta troca, analisamos as células sob um microscópio de contraste de fase. Como pode ser observado na figura 9B, restaram poucas células isoladas na placa quando estas foram tratadas somente com CQ, em claro contraste com as condições “controle” e “NAC”. Já a combinação de NAC com CQ mostrou uma proteção significativa quando comparada às células tratadas somente com CQ, confirmando que NAC protege a viabilidade celular contra CQ. A adição de 25 mM de NAC também preveniu o acúmulo de LC3II induzido por 24 horas de tratamento com CQ 50 μ M, como pode ser observado na figura 9C. Ainda na figura 9C, é possível observar que NAC preveniu também o acúmulo de p62 (o qual ocorre quando a autofagia é bloqueada, já que esta proteína é degradada por esta via). Isto sugere que NAC preveniu a ativação de autofagia (pois vacúolos não acumularam), e/ou que NAC, de alguma maneira, impediu que CQ induzisse a disfunção lisossomal, evitando, assim, que as etapas finais da autofagia não fossem prejudicadas. Observamos, também, que a clivagem de PARP (comumente usada como marcador de apoptose) induzida por CQ também foi reduzida na presença de NAC (figura 9C), sugerindo que a perda de viabilidade celular é causada por apoptose, e que NAC bloqueia indução desta via de morte. A análise da formação de sub-G1 por citometria de fluxo (figura 9D) revelou que CQ induziu fragmentação de DNA, reforçando a idéia de morte celular por apoptose. Além disso, confirmamos que NAC protegeu contra a indução de células sub-G1 por CQ, confirmando o papel protetor deste antioxidante por diferentes metodologias. Por fim, observamos que NAC também preveniu a perda do $\Delta\psi_m$ induzida por CQ (figuras 9E & F).

Coletivamente, esses resultados sugerem que NAC exerce uma ação protetora logo nos primeiros estágios da toxicidade induzida por CQ.

Figura 9 - NAC protege células de glioma (U87MG) contra a toxicidade induzida por CQ. (A) Células foram submetidas a co-tratamento com NAC (25 mM) e CQ (50 μ M) por 48 horas, e a viabilidade celular analisada pelo ensaio do XTT. (B) 48 horas após tratamento, o meio de cultura foi trocado para meio de cultura livre de drogas, e às células foi dado um período de 72 horas de recuperação, após o qual foram analisadas sob um microscópio de contraste de fase. (C) Análise, por *western blot*, da expressão das proteínas LC3II, p62 e PARP clivado (C. PARP) após 24 horas de tratamento com CQ e/ou NAC (GAPDH foi usado como controle de expressão protéica endógena). (D) Análise da fragmentação de DNA por citometria de fluxo de células expostas a CQ e/ou NAC por 48 horas. (E) Histograma representativo mostrando queda no $\Delta\Psi$ m das células tratadas com CQ e/ou NAC por 24 horas. (F) Gráfico de barras mostrando a relação dos valores de $\Delta\Psi$ m das células tratadas com CQ ou CQ+NAC em relação ao valor de $\Delta\Psi$ m das células na condição controle. Gráficos em barra ilustram a média de três experimentos independentes $\pm$ erro padrão da média. Foi utilizado o teste estatístico *one-way* ANOVA seguido de análise de Bonferroni e diferenças significativas são mostradas em relação ao controle não tratado (figura D), e *t-test* não pareado (figura F) (** $P < 0,01$, *** $p < 0,001$).

2.4.1.3 Comparação dos efeitos citotóxicos da CQ entre diferentes linhagens celulares de glioma humano

Em seguida, decidimos expandir as análises feitas à linhagem celular U87MG para outras três linhagens de glioma humano (U343MG, U138MG e U251MG). Inicialmente, investigamos a sensibilidade destas células à CQ, bem como se NAC também exerce um papel protetor nessas células. É importante ressaltar que notamos uma maior sensibilidade das linhagens U138MG e U251MG à NAC (dados não mostrados) e, por isso, usamos uma dose um pouco menor dessa substância (20 mM) para estas células. Após as 48 horas de co-tratamento, analisamos a viabilidade celular pelo ensaio do XTT, e observamos que as três linhagens (especialmente U138MG e U251MG) apresentaram os maiores valores de resistência à CQ entre as quatro linhagens testadas. Observamos, também, que NAC protege todas as linhagens contra a perda de viabilidade induzida por CQ (figura 10A). A partir destes dados, definimos as doses de CQ capazes de induzir perda de viabilidade nas linhagens U343MG, U138MG e U251MG de maneira equivalente à dose de 50 μ M na linhagem U87MG (i.e., capaz de reduzir a viabilidade das células para 10% do valor do controle). Tendo estabelecido esta dose equitóxica de CQ (100 μ M para U343MG, e 150 μ M para ambas U138MG e U251MG), e com o objetivo de investigar mecanismos que contribuem para a resistência de células de glioma a esta droga, analisamos o acúmulo de LC3II e mitocôndrias disfuncionais, bem como geração de ERO, nestas linhagens, em resposta tanto à dose equitóxica quanto a dose de 50 μ M de CQ.

Primeiro, observamos que o tratamento com dose de 50 μ M de CQ por 24 horas é capaz de induzir acúmulo de LC3II em todas as linhagens, porém, em um menor grau do que foi observado para a linhagem U87MG (figura 10B). A dose equitóxica, por sua vez, parece causar um aumento um pouco mais pronunciado de LC3II do que 50 μ M, embora os níveis observados na linhagem U87MG ainda parecem continuar mais altos. Uma comparação entre as linhagens U87MG e U138MG, com doses menores (24 horas de tratamento) confirma um maior acúmulo de LC3II na linhagem mais sensível à CQ (figura 10C). Em relação ao acúmulo de mitocôndrias, todas as células parecem acumular esta organela em resposta à CQ, independente da dose testada, embora na dose equitóxica, o acúmulo seja mais pronunciado (figura 10D). Já em relação ao $\Delta\psi_m$, uma queda significativa em resposta à dose de 50 μ M só ocorre na linhagem U87MG.

Já nas outras três linhagens, uma queda significativa no $\Delta\psi_m$ só ocorre em resposta à dose equitóxica. Interessante, nesta dose equitóxica, a queda do potencial de membrana ocorre de maneira muito semelhante entre todas as linhagens (redução para cerca de 60% do valor do controle não tratado), como observado para as células da linhagem U87MG (figura 10E). De maneira semelhante, um aumento nos níveis de ERO só ocorreu após tratamento com a dose equitóxica. Curiosamente, nenhuma dose utilizada foi capaz de induzir aumentos nos níveis de ERO na linhagem U343MG (figura 10F).

Figura 10 - Análise comparativa dos efeitos da CQ entre 4 linhagens de glioma humano. (A) Análise da viabilidade celular pelo ensaio do XTT nas linhagens de glioma U343MG, U138MG e U251MG após 48 horas de tratamento com CQ (diferentes doses) e/ou NAC (25 mM para U343MG, e 20 mM para U138MG e U251MG). (B) & (C) Análise do acúmulo de LC3II por *western blot* em resposta a 24 horas de tratamento com diferentes doses de CQ. Análise do conteúdo mitocondrial (D), $\Delta\psi_m$ (E) e geração de ERO (F) por citometria de fluxo em diferentes linhagens de glioma após tratamento com 50 μ M de CQ ou dose equitóxica (Eqtx) nas linhagens U343MG, U138MG e U251MG. Gráficos D & E mostram a média de 2 a 3 experimentos independentes $\pm$ erro padrão da média. Foi utilizado o teste estatístico *one-way* ANOVA seguido da análise de Bonferroni, e diferenças significativas são mostradas em relação ao controle não tratado de cada linhagem celular (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$).

2.4.1.4 Células resistentes à CQ apresentam menor conteúdo mitocondrial e maior potencial de membrana mitocondrial

Além de entender como as doses de 50 μM e equitóxicas de CQ provocavam alterações nas diferentes células de glioma, decidimos investigar as diferenças basais (na ausência de CQ) no conteúdo mitocondrial, $\Delta\psi\text{m}$, e do estado REDOX, entre estas células. Para isso, comparamos as linhagens mais resistentes (U343MG, U138MG e U251MG) com a linhagem mais sensível (U87MG) à CQ. Na figura 11A, é possível observar que, em condições basais, as linhagens mais resistentes à CQ apresentaram um conteúdo mitocondrial significativamente menor do que a linhagem U87MG. Já em termos de $\Delta\psi\text{m}$, observamos o oposto: aquelas três linhagens apresentaram valores significativamente mais elevados do que a U87MG (figura 11B). Em ambas as análises, a linhagem U138MG foi a que apresentou variações menos significativas em relação à U87MG. De qualquer forma, estes resultados sugerem que um menor conteúdo mitocondrial, combinado ao maior nível de $\Delta\psi\text{m}$, possa estar relacionado à maior resistência de gliomas à CQ. Já ao analisar os níveis basais de ERO, notamos que as linhagens U87MG, U138MG e U251MG apresentaram níveis semelhantes entre si, porém, significativamente distintos da linhagem U343MG, a qual apresentou elevados níveis basais de ERO (figura 11C). Curiosamente, a linhagem U343MG não mostrou variações nos níveis de ERO após tratamento com CQ (figura 10F), sugerindo que ou os seus níveis basais de ERO já são muito elevados, e qualquer variação não pôde ser detectada pelo uso do DCFDA, ou que de fato não existiu nenhuma variação, implicando que um aumento nos níveis de ERO não é necessário para que ocorra perda da viabilidade celular após tratamento com CQ.

Figura 11 - Linhagens resistentes à CQ apresentam menor conteúdo mitocondrial e maior $\Delta\psi_m$. Por citometria de fluxo, comparamos (A) o conteúdo mitocondrial, (B) o $\Delta\psi_m$ e (C) a geração de ERO entre as linhagens celulares U343MG, U138MG e U251MG em relação à linhagem U87MG, em condições basais (ausência de tratamento com CQ). Figuras D, E & F apresentam histogramas representativos destas análises. Gráficos mostram a média de 3 experimentos independentes $\pm$ erro padrão da média. Foi utilizado o teste estatístico *one-way* ANOVA seguido da análise de Bonferroni, e diferenças significativas são mostradas em relação ao controle não tratado de cada linhagem celular (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e * $P < 0,001$).**

2.4.1.5 Perda do potencial de membrana mitocondrial induzido por CQ não é desencadeado por formação de danos ao DNA

A perda do $\Delta\psi_m$ é um evento observado durante a morte celular por apoptose. Tanto eventos extrínsecos (como ligação de substratos aos respectivos receptores de morte presentes na membrana celular), como eventos intrínsecos (danos ao DNA) podem culminar na permeabilização mitocondrial que precede a ocorrência da apoptose (BATISTA et al., 2009b). Assim, decidimos investigar se esta droga também era capaz de induzir danos ao DNA das células de glioma, os quais poderiam levar à permeabilização da membrana mitocondrial descrita anteriormente.

Para isso, observamos inicialmente, por citometria de fluxo, a fosforilação da histona H2A variante (H2AX), a qual é fosforilada na serina 139 (γ -H2AX) em resposta à presença de danos ao DNA, e comumente usada como marcador para presença de lesões no genoma. Como pode ser observado na figura 12A, notamos um pequeno aumento nos níveis de γ -H2AX somente 48 horas após tratamento com 50 μ M de CQ, sugerindo que, se o tratamento empregado com CQ resulta na formação de danos ao DNA das células de glioma, este é tardio, ocorrendo após a permeabilização da membrana mitocondrial (figura 8D). Eventualmente, esses danos podem ser resultados de processo apoptótico nas células, como verificado nos dados apresentados anteriormente. Para complementar nossas análises, também avaliamos a presença de danos ao DNA através de um método denominado PCR longo. Resumidamente, longas sequências do DNA (12-14 kpb) são amplificadas por uma reação de PCR, a qual é extremamente sensível à presença de lesões que causam distorção da dupla fita (como lesões induzidas por luz UV), bem como quebras simples ou duplas no DNA, as quais podem ser causadas por ERO (BATISTA et al., 2009b; COOKE et al., 2003; MENCK; MUNFORD, 2014). Assim, na presença de lesões, a amplificação destas sequências de DNA fica comprometida pelo bloqueio da polimerase, resultando em menor quantidade de produtos amplificados por PCR longo. Através da quantificação dos produtos deste PCR, é possível estimar a quantidade de lesões por kpb de DNA. Desta forma, usando um controle positivo para lesões (DNA coletado imediatamente após irradiação das células com 30 J/m² de UVC), avaliamos se o tratamento com 50 μ M de CQ em células de glioma (U87MG) induzia danos ao DNA capazes de bloquear a progressão da polimerase. Como pode ser observado na figura 12B, em nenhum dos tempos avaliados (total de 6 ou 24 horas de tratamento) foi detectada a presença de lesões significativas no DNA das células, reforçando a idéia de que a permeabilização da membrana mitocondrial induzida por CQ inicia-se independentemente da geração de danos ao DNA. Por fim, comparamos a formação de sub-G1 como medida de fragmentação de DNA (evento que ocorre durante morte celular por apoptose) entre as diferentes linhagens celulares de glioma 48 horas após tratamento com 50 μ M ou dose equitóxica de CQ. Resultados mostram que na dose de 50 μ M, fragmentação de DNA só é detectada na linhagem U87MG, enquanto que nas outras linhagens, níveis comparáveis de fragmentação genômica só foram detectados quando a dose equitóxica foi empregada (figura 9C). Vale notar que a linhagem U138MG mostrou

níveis de fragmentação de DNA mais discretos do que as linhagens U343MG e U251MG quando tratada com a dose equitóxica. Considerando que os níveis de γ -H2AX apresentam um pequeno aumento somente 48 horas após tratamento com CQ (figura 12A), é possível que esta reflita a fragmentação de DNA observada (figura 12C), e que seja resultado da ativação de apoptose, reforçando a idéia de que a permeabilização mitocondrial não esteja sendo iniciada pela presença de danos ao DNA.

Figura 12 - Análise de danos e fragmentação do DNA após tratamento com CQ. (A) Análise, por citometria de *fluxo*, da fosforilação de H2AX na serina 139 (γ -H2AX) de células U87MG em resposta a tratamento com 50 μ M de CQ por diferentes tempos (horas). (B) Análise da presença de lesões no DNA de células U87MG em resposta a tratamento com 50 μ M de CQ por 6 ou 24 horas, através do método do PCR longo. Células irradiadas com luz UVC (30 J/m²) e coletadas imediatamente após este tratamento foram utilizadas como controle positivo para a presença de lesões. (C) Análise da formação de sub-G1 por citometria de *fluxo* em células de glioma expostas à CQ (50 μ M ou dose equitóxica – Eqtx) por 48 horas. Gráficos A & B mostram resultados de 3 experimentos independentes $\pm$ erro padrão da média. Gráfico C mostra resultado de 2 experimentos independentes $\pm$ erro padrão da média. Foi utilizado o teste estatístico *one-way* ANOVA seguido da análise de Bonferroni, e diferenças significativas são mostradas em relação ao controle não tratado (***P<0,001).

2.4.1.6 Cloroquina induz alterações no perfil de ciclo celular

Durante as análises de sub-G1, notamos que o perfil do ciclo celular era alterado e de maneira diferente entre as quatro linhagens de glioma, mesmo quando as doses equitóxicas de CQ eram empregadas (figura 13A). Nesse sentido, notamos que CQ 50 μ M induziu um aumento expressivo da porcentagem de células na fase G1 do ciclo celular na linhagem U87MG, enquanto

que esta mesma dose não induziu nenhuma alteração significativa no perfil do ciclo celular das linhagens U138MG e U251MG (total de 48 horas de tratamento). Curiosamente, a dose equitóxica (150 μ M) induziu um aumento na porcentagem de células na fase G2 nestas duas linhagens. Já para a linhagem U343MG, a dose de 50 μ M resultou em um perfil semelhante ao observado para a linhagem U87MG (maior presença de células na fase G1), embora o tratamento com a dose equitóxica (100 μ M) tenha resultado num perfil semelhante àquele das linhagens U138MG e U251MG (porcentagem de células em G2 aumenta). Na figura 13B, um histograma representativo do perfil do ciclo celular da linhagem U138MG evidencia um aumento de células em G2, após tratamento com 150 μ M de CQ por 48 horas. Estes dados sugerem que um aumento na quantidade relativa de células na fase G1 (U87MG) ou de células em S/G2/M (U343MG, U138MG e U251MG tratadas com as doses equitóxicas), possa ser resultado da ativação de mecanismos que induzam parada em pontos específicos do ciclo celular.

Figura 13 - Alterações no perfil do ciclo celular de células de glioma induzidas por CQ. (A) Distribuição de células nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular nas linhagens celulares U87MG, U343MG, U138MG e U251MG após 48 horas de tratamento com as doses indicadas de CQ (gráficos em barras mostram a média de 3 experimentos independentes $\pm$ erro padrão da média; para o cálculo da porcentagem de células em cada fase do ciclo, a população de células em sub-G1 foi excluída das análises). (B) Histograma representativo para a linhagem U138MG, evidenciando a redução da porcentagem de células na fase G1, e aumento da porcentagem de células em G2 do ciclo celular após tratamento com dose de 150 μ M de CQ por 48 horas.

Parada no ciclo celular (ou indução de *checkpoint*) é desencadeada em resposta a danos ao DNA, evitando que a célula se divida até que as lesões tenham sido resolvidas, prevenindo,

assim, estresse replicativo e acúmulo de mutações. Neste processo, algumas proteínas desempenham um papel chave como sinalizadoras (ou seja, conectam o processo de detecção da lesão a uma resposta que culmina na ativação de checkpoint e indução de processos de reparo de DNA). Dentre estas proteínas, a quinase ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*) tem um papel fundamental na resposta ao acúmulo de simples fita de DNA (originados do desacoplamento da progressão da helicase da progressão da polimerase replicativa, resultante da presença de alguns tipos de lesões no DNA, como dímeros de pirimidina), com consequente parada de ciclo celular em fase S/G2 (ANDRADE-LIMA; ANDRADE; MENCK, 2015a; QUINET et al., 2014). Apesar de não termos detectado nenhuma evidência de indução de danos ao DNA por CQ (somente indícios de fragmentação do DNA como consequência de apoptose induzida por essa droga), decidimos investigar se a quinase ATR poderia contribuir, de alguma forma, para a alteração do perfil do ciclo celular observado nas linhagens mais resistentes à CQ e, em caso afirmativo, se esta proteína poderia contribuir para a resistência destas linhagens aos efeitos citotóxicos de CQ.

2.4.2 ATR protege células de glioma contra morte celular induzida por CQ

2.4.2.1 ATR previne fragmentação de DNA e ativação de caspase 3 em células de glioma tratadas com CQ

Para investigar um possível papel de ATR na resposta de células de glioma à CQ, utilizamos RNA interferência (RNAi) para reduzir os níveis de RNA mensageiro (RNAm) deste gene. Para isso, transfectamos células de glioma U138MG (linhagem cuja resistência à CQ foi umas das mais altas observadas dentre as células utilizadas neste trabalho) com uma de duas sequências *small interfering* RNA (siRNA). A transfecção de ambas as sequências de siRNA para o gene ATR (siATR) já haviam sido padronizadas e testadas pelo então aluno de doutorado em nosso laboratório, Leonardo Carmo de Andrade-Lima. Como pode ser observado na figura 14A, ambas as sequências de siATR foram capazes de reduzir os níveis do RNAm do gene alvo para menos de 50% do valor do controle (células transfectadas com uma sequência de siRNA [siScramble] que não possui alvos em células humanas). Em seguida, analisamos a resposta das células silenciadas para ATR à CQ, e

notamos que ambas as sequências de siATR foram capazes de potencializar drasticamente a perda da viabilidade celular induzida por CQ, a níveis similares (figura 14B). Devido ao efeito muito semelhante de ambas as sequências na viabilidade celular frente à CQ, decidimos continuar as investigações com somente uma das sequências de siATR. Também analisamos o efeito da combinação de cafeína (capaz de inibir a função quinase de ATR) com CQ. Para isso, células foram pré-tratada com as doses indicadas de cafeína por 1 hora, para então o meio de cultura ser trocado para meio contendo CQ e cafeína. Este co-tratamento produziu um efeito mais moderado sobre a viabilidade celular do que o observado para a combinação de siATR com CQ. Vale ressaltar que as concentrações de cafeína utilizadas (2,5 e 5 mM) estão acima da dose capaz de inibir 50% da atividade quinase de ATR ($IC_{50} = 1,1 \text{ mM}$) (CORTEZ, 2003).

Em seguida, analisamos o perfil de ciclo celular, e notamos um pequeno aumento da porcentagem de células em G2 quando tratadas com siATR e CQ, em comparação com células tratadas somente com CQ (somente siATR não pareceu ter nenhum efeito sobre o ciclo nas condições analisadas) (figura 14C), sugerindo que o bloqueio do ciclo em G2 observado no tratamento das células com CQ não parece ser influenciado por ATR, como já havíamos suspeitado. No entanto, ao analisarmos a quantidade de células sub-diplóides, notamos que siATR potencializou significativamente a indução de células sub-G1 (figura 14D & E). Para complementar as análises, analisamos a ativação de caspase 3 por citometria de fluxo, e notamos um aumento significativo desta nas células co-tratadas (figura 14F), sugerindo que o aumento da toxicidade induzida por CQ por meio de silenciamento de ATR se dá por um aumento nos níveis de apoptose.

Figura 14 - Silenciamento gênico de ATR potencializa morte celular induzida por CQ em células de glioma. (A) Análise da expressão gênica de ATR por PCR quantitativo em células de glioma (U138MG) transfectadas com duas sequências diferentes de siATR (siATR1 e siATR2). Uma sequência de RNA sem alvo conhecido em células humanas (siScramble) foi usada como controle. (B) Análise da viabilidade celular (XTT) de células tratadas com CQ por 48 horas (diferentes doses) na presença de cafeína (2,5 ou 5 mM), ou após tratamento com siATR. (C) Distribuição de células silenciadas para ATR nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular após tratamento com CQ (100 μ M); a população de células em sub-G1 foi excluída das análises). (D) Histogramas representativos das imagens usadas para quantificar a distribuição de células nas diferentes fases do ciclo celular, bem como a porcentagem de células subdiploides (sub-G1) após tratamento com CQ (100 μ M) e siATR por 48 horas. (E) Quantificação de sub-G1 em células co-tratadas com siATR e CQ. (F) Quantificação de caspase 3 ativa por citometria de fluxo em células co-tratadas com siATR e CQ. Gráficos A & F mostram média de dois experimentos independentes, enquanto gráficos B, C & E mostram média de 3 experimentos independentes $\pm$ erro padrão da média. Foram utilizados os testes estatísticos *t*-test não pareado (figura A) e *one-way* ANOVA seguido da análise de Bonferroni (figuras E & F), e diferenças significativas são mostradas em relação à condição não tratada (* $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$).

2.4.2.2 A via de ATR/CHK1 não é ativada em resposta à CQ

Como descrito anteriormente, ATR tem uma atividade de quinase, a qual resulta na fosforilação de CHK1 em resposta a danos ao DNA. Esta proteína ativada, por sua vez, passa a orquestrar uma resposta que culmina em parada de ciclo celular e indução de reparo de DNA. No entanto, como não detectamos presença de danos ao DNA após tratamento com CQ, decidimos confirmar que a via de ATR-CHK1 não era ativada em resposta ao tratamento com CQ. Para isso, tratamos células da linhagem U138MG com CQ (100 μ M) por 6 ou 24 horas, e analisamos a fosforilação de CHK1 (na posição serina 345) através de detecção com anticorpo específico, em ensaio de *western blot*. Como controle positivo para funcionalidade da via ATR-CHK1 nestas células, estas foram irradiadas com luz UVC (30 J/m²) e coletadas 6 horas após tratamento. Resultados mostram que ATR é capaz de fosforilar CHK1 nas células da linhagem U138MG (como pode ser observado após irradiação com luz UVC), além de mostrar que esta via não é ativada nas células expostas à CQ (figura 15A). Neste mesmo ensaio, também confirmamos a eficácia de cafeína em bloquear a fosforilação de CHK1 induzido por luz UVC (QUINET et al., 2014).

Em resposta a lesões ao DNA induzidas por luz UV, a inibição de ATR (tanto por silenciamento gênico, quanto por cafeína) pode aumentar a quantidade de quebras nesta molécula, já que a ativação de *checkpoint*/reparo de DNA fica comprometida, podendo levar a colapso da forquilha com consequentes quebras no DNA. Assim, para confirmar ausência de lesões no DNA após tratamento com CQ e siATR, realizamos o ensaio do PCR longo (figura 12B). A ausência de problemas na amplificação do DNA confirmou que lesões que distorcem a dupla fita, ou que geram simples ou duplas quebras no DNA, não são formadas quando células são tratadas com CQ e siATR, confirmando resultados anteriores (figura 12B). Irradiação com luz UVC (30 J/m²) foi usada como controle positivo para a sensibilidade da reação do PCR longo.

Figura 15 - CQ não ativa a via de ATR-CHK1. (A) Análise, por western blot, da fosforilação de CHK1 (serina 345) em resposta ao tratamento com CQ 100 μ M (6 ou 24 horas de tratamento) em células da linhagem U138MG. Irradiação com 30 J/m² de UVC foi usado como controle positivo para fosforilação de CHK1 nestas células, assim como a capacidade da cafeína de bloquear a função quinase de ATR também foi testada. (B) Ensaio do PCR longo em células silenciadas para ATR e tratadas com CQ (100 μ M) por 6 ou 24 horas. (gráficos mostram a média de 3 experimentos independentes $\pm$ erro padrão da média). Foi utilizado o teste estatístico *one-way* ANOVA seguido da análise de Bonferroni, e diferenças significativas são mostradas em relação ao controle (DNA de células não tratadas) (***) ($P < 0,001$).

2.4.2.3 NAC protege células de glioma contra combinação de CQ com siATR

Havíamos notado que NAC exercia um efeito protetor contra CQ (figuras 9A e 10A). Desta forma, investigamos se o mesmo efeito seria observado na presença de siATR (figura 16). Resultados mostram que a porcentagem de células sub-diplóides induzidas por CQ (doses de 40 e 80 μ M) após tratamento de 48 horas é drasticamente aumentada pelo silenciamento de ATR (de acordo com o que foi observado pelo ensaio de viabilidade na figura 14B), e que o co-tratamento com NAC exerceu um efeito protetor nesta condição.

Figura 16 - NAC protege células de glioma tratadas com siATR e CQ. Células de glioma (U138MG) silenciadas para ATR foram tratadas com CQ (40 ou 80 μ M) por um total de 48 horas, na presença de 20 mM de NAC, e a porcentagem de células sub-diplóides (sub-G1) analisada por citometria. Gráficos mostram a média de 3 experimentos independentes $\pm$ erro padrão da média. Foi utilizado o teste estatístico *two-way* ANOVA seguido da análise de Bonferroni (*** $P < 0,001$).

2.4.2.4 siATR aumenta o acúmulo de LC3II e geração de ERO induzidos por CQ

Em seguida, investigamos a perda do $\Delta\psi_m$, acúmulo de LC3II e geração de ERO nas células tratadas com CQ na presença de siATR. Na figura 17A & B, é possível notar que o silenciamento de ATR provocou um aparente aumento nos níveis de ERO induzidos pelo tratamento por 48 horas com a dose de 100 μM de CQ. Já na figura 17C, nota-se que o acúmulo de LC3II induzido por 24 horas de tratamento com CQ 100 μM aumentou drasticamente.

Figura 17 - siATR potencializa geração de ERO e acúmulo de LC3II induzidos por CQ. (A) Histograma representativo da análise da geração de ERO induzido após tratamento com 100 μM de CQ por 48 horas nas células da linhagem U138MG. Na figura B, a alteração nos níveis de ERO é expressa por meio da relação tratado com CQ/não tratado para ambas as condições (siScramble e siATR) (gráfico expressa a média de 2 experimentos independentes $\pm$ erro padrão da média). (C) Análise, por *western blot*, do acúmulo de LC3II 24 horas após tratamento com dose de 100 μM de CQ em células silenciadas para ATR.

2.4.2.5 siATR acentua queda do potencial de membrana mitocondrial induzido por CQ e induz fragmentação mitocondrial

Em seguida, notamos que o silenciamento de ATR também acentuou a perda de $\Delta\psi_m$ induzido por tratamento de 24 horas com dose de 100 μM de CQ (figura 18A e B). Também analisamos, por imuno-marcação com o anticorpo anti-Tom20 (*translocase of outer membrane*

subunit 20), o qual se liga a um receptor presente na membrana externa mitocondrial, o formato das mitocôndrias após tratamento com CQ em células silenciadas para ATR. Notamos um aumento significativo no número de células que possuíam somente mitocôndrias fragmentadas, e nenhuma com morfologia filamentosa (figura 18C & D). Juntos, estes resultados sugerem que ATR protege células de glioma contra perda de integridade mitocondrial e morte celular.

Figura 18 - ATR protege células de glioma contra perda de integridade mitocondrial induzida por CQ. (A) Histograma representativo do $\Delta\psi_m$ em células da linhagem U138MG silenciadas para ATR (siATR) e tratadas com dose de 100 μM de CQ por 24 horas. (B) Mudança relativa (tratado/não tratado) do $\Delta\psi_m$ (gráfico expressa a média de 3 experimentos independentes $\pm$ erro padrão da média). (C) Imagens representativas de mitocôndrias imuno-marcadas com anticorpo anti-Tom20, evidenciando que o tratamento com dose de 100 μM de CQ em células silenciadas para ATR promove fragmentação mitocondrial. (D) Porcentagem de células que possuem apenas mitocôndrias fragmentadas (gráfico expressa a média de 2 experimentos independentes $\pm$ erro padrão da média). Foram utilizados os testes estatísticos *t*-test não pareado (figura B) e *one-way* ANOVA, seguido da análise de Bonferroni (figura D), e diferenças significativas são mostradas em relação ao controle (siScramble na figura A; siATR CQ 0 μM na figura D) (* $P < 0,05$).

2.4.2.6 siATR e CQ potencializam citotoxicidade induzida por TMZ em células de glioma

Decidimos investigar se os achados descritos anteriormente poderiam ter algum impacto no tratamento clínico de pacientes portadores de glioma. Para isso, decidimos avaliar a combinação de CQ e siATR com o quimioterápico comumente empregado no tratamento desta enfermidade, temozolomida (TMZ). Neste experimento, células foram avaliadas pelo ensaio do XTT após 5 dias de tratamento contínuo com doses baixas (capazes de reduzir não mais do que 10% da viabilidade celular em relação ao controle não tratado) de CQ e/ou TMZ (10 μ M para ambas as drogas), combinadas com o silenciamento de ATR. Primeiro, notamos que o silenciamento de ATR aumentou significativamente ($p < 0,05$) a toxicidade induzida por TMZ. Notamos, também, que a combinação de TMZ com CQ, no regime e doses escolhidos, não exerceu nenhum efeito sinérgico. No entanto, a combinação de CQ com TMZ, na presença de siATR, reduziu significativamente ($p < 0,001$) a viabilidade das células (figura 19). Desta forma, resultados sugerem que o triplo tratamento pode aumentar significativamente a sensibilidade das células ao quimioterápico TMZ.

Figura 19 - siATR combinado com CQ aumenta sensibilidade de células de glioma ao quimioterápico TMZ. Células da linhagem U138MG foram tratadas por 5 dias contínuos com TMZ e/ou CQ (10 μ M para ambas as drogas) após silenciamento gênico de ATR por RNA interferência. A viabilidade celular foi analisada por XTT (gráfico expressa a média de 2 experimentos independentes $\pm$ erro padrão da média). Foi utilizado o teste estatístico *two-way* ANOVA seguido da análise de Bonferroni (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$).

2.4.2.7 siATR potencializa perda de viabilidade celular e fragmentação de DNA induzida por CQ em células da linhagem U87MG

Por fim, decidimos verificar se o aumento da sensibilidade à CQ era restrito à linhagem U138MG. Para isso, investigamos a viabilidade celular, bem como a fragmentação do DNA, em células da linhagem U87MG silenciadas para ATR. Resultados preliminares mostram que siATR é capaz de aumentar a toxicidade mediada por CQ em células desta linhagem (figura 20).

Figura 20 - siATR potencializa toxicidade induzida por CQ em células da linhagem U87MG. (A) Análise da viabilidade celular de células da linhagem U87MG expostas à CQ (10 ou 50 μ M) por 48 horas após silenciamento de ATR por RNA interferência (gráfico mostra média $\pm$ erro padrão da média de um experimento realizado em triplicata). (B) Análise (por citometria de fluxo) da formação de sub-G1 em células da linhagem U87MG expostas a 25 μ M de CQ por 72 horas (histogramas representativos de um experimento realizado em duplicata).

2.5 Discussão

2.5.1 Potencial de membrana mitocondrial e conteúdo mitocondrial na resistência de células de GBM à CQ

Ao estudar a resposta das linhagens de glioma humano U87MG, U343MG, U138MG e U251MG à CQ, notamos diferentes níveis de sensibilidade destas células a esta droga. Um estudo conduzido por Kim e colaboradores mostrou um papel importante de p53 na resistência de células de glioma à CQ. Autores mostraram que células mutadas ou nulas em p53 eram mais resistentes à CQ, e que p53 aumentava a transcrição de BAX em resposta a esta droga (KIM et al., 2010). Nossos resultados estão de acordo com esses achados, já que as duas células mais resistentes à CQ (U138MG e U251MG) analisadas apresentam o gene *TP53* mutado (mais detalhes na seção Material & Métodos). No entanto, chamou nossa atenção o fato da linhagem U343MG (p53 selvagem) apresentar resistência relativamente alta à CQ, especialmente em doses mais baixas (até 50 μ M), onde as células da linhagem U87MG apresentam redução de cerca de 90% de viabilidade, enquanto que as células da linhagem U343MG ainda estão próximas de 100% (valores semelhantes para as células mutadas no gene p53) (ver figuras 7 e 10A). Desta forma, resultados sugerem que somente o status de p53 por si só é insuficiente para determinar a sensibilidade das células à CQ.

Para ganhar mais conhecimento acerca desta questão, conduzimos análises comparativas entre as 4 linhagens celulares no que se refere à análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), conteúdo mitocondrial, geração de ERO e acúmulo de LC3II, todos eventos que havíamos notado acontecer em resposta ao tratamento com CQ (figura 8). Neste sentido, ao analisarmos o $\Delta\psi_m$ basal das células, notamos que a célula mais sensível (U87MG) apresentava menor $\Delta\psi_m$, enquanto que as mais resistentes (U138MG e U251MG) apresentavam maior $\Delta\psi_m$. De fato, um aumento no potencial de membrana mitocondrial já foi positivamente correlacionado com a resistência das células à apoptose, já que a dissipação do $\Delta\psi_m$ está intimamente relacionada à liberação de fatores pró apoptóticos, como citocromo C, para o citoplasma (FOLLSTAD; WANG; STEPHANOPOULOS, 2000; HEERDT; HOUSTON; AUGENLICHT, 2005). Interessante, a linhagem

U343MG apresentou $\Delta\psi_m$ maiores do que a linhagem U87MG, e até mesmo significativamente maiores do que a linhagem U138MG (figura 11B). Dessa forma, apesar de apresentar status selvagem do gene *TP53*, células U343MG podem ter sua resistência à CQ explicada pelos níveis basais de $\Delta\psi_m$ relativamente altos.

Outro dado que nos chamou a atenção refere-se à diferença nos níveis basais do conteúdo mitocondrial, no qual as células U87MG apresentaram os maiores valores, enquanto que as células resistentes (U138MG e U251MG) apresentaram valores menores (figura 11A). Desta maneira, isso nos fez considerar que o conteúdo mitocondrial poderia, também, influenciar a suscetibilidade das células à CQ. De fato, Ravikumar e colaboradores mostraram, em 2006, que a indução de autofagia por rapamicina protegia células contra insultos apoptóticos que ativavam a via intrínseca (mitocondrial) de morte celular. Neste trabalho, os autores notaram que a redução do conteúdo mitocondrial por autofagia acabava por reduzir, também, a quantidade de citocromo C capaz de ser liberado no citoplasma após tratamento com agentes indutores de apoptose (RAVIKUMAR et al., 2006). Assim, é possível que a diferença no conteúdo mitocondrial que observamos entre as linhagens celulares possa, de fato, influenciar sua sensibilidade à CQ através da limitação de citocromo C que a célula dispõe para ser liberado num evento de despolarização mitocondrial.

Uma relação entre a sensibilidade das células à CQ e o $\Delta\psi_m$ ficou evidente quando tratamos as diferentes células com doses equitóxicas de CQ (ou seja, capazes de resultar em uma redução similar da viabilidade celular entre elas). Na realidade, o uso da dose equitóxica (50 μ M para U87MG, 100 μ M para U343MG, e 150 μ M para U138MG e U251MG) resultou em uma queda relativa do $\Delta\psi_m$ de maneira muito semelhante entre as diferentes linhagens (figura 10E). A fragmentação do DNA (indicativo de morte celular) também ocorreu, em níveis muito semelhantes para todas as linhagens celulares (com exceção da linhagem U138MG, onde a fragmentação foi menos pronunciada), quando doses equitóxicas foram empregadas (figura 12C). Quando todas as células foram tratadas com a dose de 50 μ M (muito tóxica para a linhagem U87MG, mas pouco tóxica para as demais), não foi observado queda de $\Delta\psi_m$ e nem fragmentação do DNA nas linhagens U138MG, U343MG e U251MG. Logo, esses resultados confirmam que as células resistentes à CQ possuem maior capacidade de manter os valores de

$\Delta\psi_m$ elevados na presença desta droga, e a morte celular parece estar diretamente relacionada ao momento em que o $\Delta\psi_m$ é desfeito. A origem das diferenças observadas no $\Delta\psi_m$ basal entre as células utilizadas não foi estudada, mas pode refletir, por exemplo, diferenças na composição de fosfolipídios da membrana mitocondrial. Como suporte desta hipótese, já foi mostrado, por exemplo, que a ausência do fosfolipídio cardiolipina (presente na mitocôndria) compromete a manutenção do potencial de membrana desta organela (JIANG et al., 2000).

Assim, notamos que a linhagem celular mais sensível à CQ (U87MG) apresenta menor $\Delta\psi_m$ e maior conteúdo mitocondrial, enquanto que o oposto é observado para as células resistentes (U138MG e U251MG). A linhagem U343MG, que apresenta sensibilidade à CQ intermediária entre as todas as linhagens, apresenta valores de $\Delta\psi_m$ e conteúdo mitocondrial semelhantes à linhagem U251MG. É possível, por tanto, que a combinação dos valores de $\Delta\psi_m$ e conteúdo mitocondrial aumentem sua resistência à CQ, mas que o *status* selvagem de *TP53* contribua para que a sua sensibilidade à esta droga não seja tão alta quanto a da linhagem U251MG. Desta forma, as análises apresentadas nesta tese indicam que uma combinação entre $\Delta\psi_m$ e conteúdo mitocondrial basal, e não somente o status do gene *TP53*, regulam a sensibilidade das células à CQ.

2.5.2 Geração de ERO: causa ou consequência dos efeitos tóxicos induzidos por CQ?

Em nossas análises, notamos um aumento de ERO após o tratamento com CQ, embora somente em tempos tardios (48 horas), quando outros eventos (como a queda de $\Delta\psi_m$ e o acúmulo de mitocôndrias) já haviam sido desencadeados (figura 8). Como suporte destes resultados, foi mostrado que o tratamento de células de glioma de rato (C6) com CQ resultou na expressão de óxido nítrico sintase somente após 24 horas de tratamento, sendo que o pico da expressão desta enzima foi de 48 horas pós-tratamento (CHEN et al., 2005). Esta enzima, por sua vez, catalisa a formação de óxido nítrico, indutor de estresse oxidativo (RAJASEKARAN; HELLSTROM; SIKKA, 2001; WEI et al., 2000). Desta forma, estes dados estão de acordo com nossas observações de que a indução de ERO ocorre em tempos tardios após tratamento com CQ.

Alguns autores atribuem ao aumento de ERO a indução de morte celular por CQ. Na verdade, Toler e colaboradores chegaram a propor que o efeito adjuvante da CQ nos ensaios clínicos conduzidos por Sotello e Briceño foram devidos a uma potencialização do estresse oxidativo induzido pela radiação ionizante à qual os tumores haviam sido submetidos (TOLER; NOE; SHARMA, 2006). Apesar de termos notado um aumento na geração de ERO nas células tratadas com CQ, esse aumento não parece induzir morte celular. Como pode ser observado na figura 9C, a clivagem de PARP (evento comumente usado como indicador de apoptose) ocorre pelo menos 24 horas após tratamento com CQ, enquanto que neste tempo, os níveis de ERO continuam muito semelhantes aos do controle (figura 8E). No entanto, temos que considerar que um pequeno aumento nos níveis de ERO (indetectável pela nossa metodologia), nos tempos iniciais de tratamento com CQ, possa iniciar danos à mitocôndria. Isso, por sua vez, levaria à perda do potencial de membrana desta organela, resultando num ciclo vicioso que culminaria num forte aumento de ERO em tempos mais tardios. Para poder averiguar essa hipótese, pode ser que outros métodos de detecção de ERO mais sensíveis precisem ser empregados. De qualquer maneira, se o aumento de ERO estivesse ligado à indução de morte celular, detectaríamos alguma variação nos níveis de ERO na linhagem U343MG, a qual também apresenta fragmentação de DNA e perda de viabilidade celular após tratamento com CQ. No entanto, nenhuma variação foi detectada em células desta linhagem, sugerindo que um aumento nos níveis de ERO não é a principal causa de morte celular após tratamento com CQ. Desta forma, nossos resultados confirmam o trabalho de Park e colaboradores, que mostraram que a geração de óxido nítrico após tratamento com CQ não era responsável pela indução de morte celular, já que inibidores da síntese de óxido nítrico não reduziam a toxicidade induzida por CQ (PARK et al., 2008).

Um resumo dos dados apresentados nesta tese acerca da sensibilidade das células de glioma à CQ, bem como dos valores de conteúdo mitocondrial, $\Delta\psi_m$ e geração de ERO, encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 - Comparação das linhagens celulares de glioma quanto a sensibilidade à CQ e seus efeitos.

Parâmetro analisado	U87MG	U343MG	U138MG	U251MG
Sensibilidade à CQ	+++	++	+	+
$\Delta\psi_m$ basal	+	+++	++	+++
Conteúdo mitochondrial basal	+++	+	++	+
Indução de EROs por doses equitóxicas de CQ	+	-	+	+

Tabela 2 - Análise comparativa da sensibilidade das linhagens celulares de glioma U87MG, U343MG, U138MG e U251MG à CQ, bem como do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) e conteúdo mitocondrial basais, e capacidade de geração de ERO após 48 horas de tratamento com doses equitóxicas de CQ. A quantidade de “+” indica uma medida quantitativa, e a atribuição destes valores foi feita baseada nos resultados apresentados nas figuras 4, 6, 7 e 8. O símbolo “-” indica ausência.

2.5.3 Células de glioma e plasmódios: uma via comum de resistência à CQ?

Como apresentado anteriormente, CQ foi uma droga que teve amplo uso no combate à malária. No entanto, o uso em larga escala da CQ contribuiu para o surgimento de parasitas resistentes à esta droga (MESHNICK; DOBSON, 2001). Desta forma, voltar-se para os mecanismos de resistência empregados pelos parasitas pode facilitar nossa compreensão acerca dos diferentes graus de sensibilidade das diferentes células de glioma a esta droga. Nesse âmbito, vale comentar que o parasita causador da malária, dentro da célula hospedeira (eritrócito), promove a degradação de hemoglobina a heme. Por sua vez, heme, um produto tóxico para o parasita, é convertido à hemozoína, a qual é relativamente inerte. Na presença de CQ, a formação da hemozoína é bloqueada pela ligação de CQ a heme, promovendo seu acúmulo e consequente toxicidade para o parasita (PATZEWITZ et al., 2013). Este mecanismo todo ocorre dentro do vacúolo digestivo do parasita, considerado uma estrutura semelhante ao lisossomo por apresentar pH ácido e conter proteases (mas não glicosilases nem outras enzimas típicas do lisossomo) (WUNDERLICH; ROHRBACH; DALTON, 2012). Recentemente, Patzewitz e

colaboradores notaram que um dos mecanismos de resistência à CQ empregado pelo plasmódio baseava-se no aumento do transporte de glutathione reduzida (GSH) para dentro do vacúolo, o qual ligava-se a heme, promovendo sua detoxificação (PATZEWITZ et al., 2013). Como notamos que o co-tratamento das células com NAC as protegia não somente de morte celular induzida por CQ (figuras 9A, D e 10A), mas também dos primeiros efeitos desencadeados por esta droga (acúmulo de LC3II e queda de $\Delta\psi_m$, figura 9), não descartamos a possibilidade do tratamento com NAC ter aumentado a quantidade de GSH intra-lisossomal, o que resultaria em função protetora (estabilizadora do lisossomo), evitando, assim, o desencadeamento dos primeiros eventos associados ao tratamento com CQ. Neste sentido, vale comentar o trabalho de Raj e colaboradores, que sugeriram que GSH pode ligar-se à CQ, e mediar sua expulsão celular via transportadores PfMRP localizados na membrana plasmática do parasita (RAJ et al., 2009). Neste caso, GSH evitaria o acúmulo de CQ dentro das células. PfMRP, ou *Plasmodium falciparum multidrug resistance-associated protein*, é um receptor localizado na membrana celular, mas também aparece associado a membrana de vesículas intracelulares. Dessa maneira, Raj e colaboradores sugeriram a possibilidade de GSH se ligar diretamente à CQ, dentro do vacúolo digestivo, e mediar a expulsão desta droga. Considerando que transportadores que promovem resistência à diversas drogas (MRP) encontram-se associados à membrana lisossomal de células humanas (RAJAGOPAL; SIMON, 2003), é possível que o aumento de GSH (via NAC) resulte em um aumento na concentração deste tripeptídeo dentro do lisossomo, conseqüente ligação à CQ, e expulsão para fora do lisossomo via estes receptores. Desta forma, a integridade lisossomal ficaria preservada, e explicaria a ablação de todos os eventos desencadeados por CQ, quando as células eram co-tratadas com NAC (figura 9). Como suporte desta hipótese, a capacidade de GSH promover detoxificação de drogas (como do inibidor de topoisomerase, doxorubicina) via MRP já foi reportada (ZAMAN et al., 1995).

2.5.4 Possíveis causas do acúmulo de LC3II em células de glioma mediada por CQ

Com a presença da CQ, a etapa final da autofagia (fusão do autofagossomo com o lisossomo) fica comprometida, e vacúolos autofágicos passam a acumular (YOON et al., 2010). Em paralelo, é possível que o acúmulo de LC3II/vacúolos autofágicos que observamos seja

potencializado devido à ativação das etapas iniciais da autofagia. Pelo menos três mecanismos que podem contribuir para esse efeito são discutidos abaixo.

A despolarização da membrana mitocondrial pode resultar na geração de ERO. Um dos mecanismos propostos para isso é que, com a despolarização da membrana, o citocromo C é liberado para o citoplasma, o que rompe com o fluxo de elétrons na cadeia de transporte de elétrons (CTE). Isso pode resultar na manutenção dos complexos I e II (anteriores ao complexo IV, ou citocromo C oxidase) no estado reduzido, favorecendo a redução de oxigênio molecular, e consequente formação de superóxido mitocondrial. O superóxido pode ser detoxificado via superóxido dismutase, resultando na produção de H_2O_2 . Este, por sua vez, é conhecido por inibir a atividade de ATG4, uma protease que converte LC3II em I. Assim, passa a ocorrer o acúmulo de LC3II, o qual favorece a elongação do fagóforo e, por tanto, a formação de autofagossomos (SCHERZ-SHOUVAL; SHVETS; ELAZAR, 2007). Um segundo mecanismo de ativação da autofagia ocorre via diminuição da quantidade disponível de GSH intracelular, o que pode resultar no aumento de tióis oxidados, os quais constituem, de alguma maneira, um sinal para a ativação da autofagia (DESIDERI; FILOMENI; CIRIOLO, 2012). Considerando que notamos um aumento da geração de ERO induzido por CQ, é plausível que o mecanismo mediado por ATG4 possa contribuir para o aumento dos níveis de LC3II observado nas células tratadas com CQ. No entanto, a geração de ERO é tardia, enquanto que o acúmulo de LC3II ocorre nos momentos iniciais do tratamento com CQ (figura 8A & E). Assim, se o mecanismo mediado por inativação de ATG4 contribui para o aumento de LC3II, este deve ser no final do período analisado (próximo de 48 horas). No entanto, como já discutido anteriormente, Park e colaboradores mostraram que CQ era capaz de reduzir os níveis de GSH disponíveis em células de glioma A172 (PARK et al., 2008). Desta forma, é plausível que a depleção de GSH induzida por CQ possa resultar em um aumento de tióis oxidados, os quais culminam na ativação de autofagia. De fato, Park e colaboradores notaram que 1 hora após tratamento com CQ, os níveis de GSH já haviam sido significativamente reduzidos. Assim, é possível que o rápido acúmulo que observamos de LC3II possa ser explicado pela rápida depleção de GSH induzida por CQ.

Um terceiro mecanismo também pode contribuir significativamente para o aumento dos níveis de LC3II. Sabe-se que a permeabilização da membrana mitocondrial constitui um sinal para

a ativação da autofagia, o que pode resultar na degradação seletiva de mitocôndrias por esta via (processo conhecido como mitofagia, ou autofagia de mitocôndrias). A mitofagia é coordenada principalmente pelas proteínas Parkin e Pink1, onde Pink1 (que encontra-se associado à mitocôndria) é normalmente degradado por PARL, mas passa a acumular na membrana externa desta organela em resposta à despolarização da membrana mitocondrial. Isso permite que Parkin ligue-se a Pink1, e passe a ubiquitinar outras proteínas da membrana externa mitocondrial. Estas ubiquitinas funcionam como uma “ponte” entre a mitocôndria e a proteína p62 localizada no fagóforo, o qual envolve a mitocôndria “marcada”, gerando um autofagossomo que transportará esta organela para ser degradada no lisossomo (JIN; RICHARD, 2010). Como pode ser observado na figura 8A, C & D, o acúmulo de mitocôndrias ocorre em paralelo à despolarização destas organelas e ao acúmulo de LC3II. Isto sugere que mitocôndrias disfuncionais passam a acumular na célula em paralelo ao acúmulo de vacúolos que não são processados (evidenciado pelo acúmulo de p62 na figura 9C), devido à função desestabilizadora da CQ sobre os lisossomos. Logo, é possível que a mitofagia esteja sendo ativada pelo acúmulo dessas mitocôndrias despolarizadas que, como não são degradadas, criam um ciclo vicioso que resulta em um aumento contínuo de LC3II ao longo do tempo.

Com base em nossos resultados, de que co-tratamento com NAC previne a despolarização mitocondrial induzida por CQ (figura 9), junto dos resultados de Park que mostram uma rápida depleção de GSH após tratamento com CQ, é possível que acúmulo de tióis oxidados e de mitocôndrias despolarizadas sejam importantes contribuidores para a indução de autofagia e consequente acúmulo de LC3II nas células de glioma em resposta à CQ.

Uma questão que se sucede é: o que causa a queda do $\Delta\psi_m$ após tratamento com CQ? Como observado por Geng e colaboradores, o tratamento com CQ resulta no aparecimento de um padrão difuso no citoplasma de catepsina D, sugerindo permeabilização da membrana lisossomal (GENG et al., 2010). Já foi mostrado, também, que a liberação de catepsina D do lisossomo (através do detergente lisossomotrópico MSDH, ou *O-methyl-serine dodecylamine hydrochloride*) para o citoplasma resulta na clivagem de Bid, o qual induz translocação de BAX para a mitocôndria, seguido de liberação de citocromo C e perda do potencial da membrana desta organela (APPELQVIST et al., 2012; GOGVADZE; ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY, 2006). Vale notar que

a clivagem de Bid também pode ser promovida não só pela catepsina D, mas também pela B (BOYA; KROEMER, 2008). Desta forma, é plausível que a origem da queda do potencial da membrana mitocondrial seja devido à liberação das catepsinas B e D para o citosol (promovida pela permeabilização lisossomal induzida por CQ), seguida da clivagem de BID e consequente translocação de BAX para a mitocôndria.

2.5.5 Uma via não-canônica de ATR protege células de glioma contra a morte celular induzida por CQ

Pela primeira vez, mostramos que ATR contribui de forma significativa para a resistência de células de glioma à CQ. Por meio do silenciamento gênico de ATR, notamos um aumento da sensibilidade das células de glioma à CQ, o qual parece estar intimamente relacionado ao aumento da apoptose, já que observamos tanto ativação da caspase-3 quanto fragmentação do DNA, dois eventos relacionados a esse tipo de morte celular (figura 14A, B, E & F).

ATR desempenha uma função essencial ao orquestrar uma resposta à presença de danos ao DNA. Nesta resposta, a atividade quinase de ATR resulta na ativação (fosforilação) da proteína CHK1, evento crucial que precede a parada de ciclo celular e a ativação de mecanismos de reparo do DNA. Desta forma, ATR possui uma função essencial na preservação da integridade genômica. No entanto, através do uso de uma metodologia (PCR longo) que permite a detecção de quebras no DNA, bem como a presença de lesões capazes de distorcer a dupla fita do DNA (como aquelas induzidas por luz UV), não detectamos um aumento significativo na quantidade de lesões ao DNA das células de glioma tratadas com CQ e/ou siATR (figura 15B). A fosforilação de CHK1 também não foi detectada (figura 15A), sugerindo que o mecanismo pelo qual ATR protege as células contra os efeitos de CQ independe da ativação de sua via canônica. Desta forma, esperávamos que a cafeína, um clássico inibidor da atividade quinase de ATR (capaz, por tanto, de bloquear a fosforilação de CHK1 por esta proteína), não induzisse nenhuma sensibilização das células à CQ. No entanto, notamos que cafeína foi capaz de induzir sensibilização das células de glioma à CQ, embora de maneira muito mais sutil se comparada com os efeitos de siATR (figura 14B). Vale ressaltar que as doses de cafeína usadas foram mais altas (2,5 e 5 mM) do que a dose comumente utilizada para inibir a função quinase de ATR em estudos de resposta a danos ao DNA induzidos

por luz UV (1 mM) (ANDRADE-LIMA; ANDRADE; MENCK, 2015b; QUINET et al., 2014), estando, por tanto, muito acima da dose necessária para inibir 50% da atividade (IC50) da função quinase de ATR (1,1 mM) (FOUKAS et al., 2002). Nesse sentido, é importante notar que cafeína não apresenta um efeito específico sobre a via de ATR, diferentemente do que é esperado para o silenciamento gênico via RNA de interferência. Vale notar que a dose IC50 para ATM, uma outra quinase que coordena uma resposta à presença de duplas quebras no DNA, é de 0,2 mM, cerca de 5 vezes menor do que o valor necessário observado para ATR. Além de ATM, outros possíveis alvos celulares da cafeína são: mTOR (IC50 = 0,4 mM) e DNA-PK (IC50 = 10 mM) (FOUKAS et al., 2002). Logo, o pequeno aumento da sensibilidade das células de glioma à CQ, causado pelo co-tratamento com cafeína, pode ser devido à sua influência sobre diversas vias, e não constitui evidência de que a via de ATR-CHK1 é ativada pelo tratamento com CQ.

2.5.6 ATR protege a integridade mitocondrial e regula a autofagia

Tendo em vista os efeitos da CQ sobre a perda do $\Delta\psi_m$ e o acúmulo de vacúolos autofágicos em células de glioma, nos perguntamos se ATR poderia ter alguma relação com esses eventos. Como pode ser observado na figura 18A & B, o silenciamento gênico de ATR resultou numa maior queda do $\Delta\psi_m$ induzida por CQ. Como esse evento ocorre dentro de poucas horas após o início do tratamento com CQ, resultados sugerem que ATR exerce um efeito protetor contra os efeitos tóxicos iniciais induzidos pela CQ.

Nesse sentido, recentemente foi descrita uma função de ATR na qual esta proteína migra para a mitocôndria, e previne a translocação de BAX para esta organela em resposta ao tratamento com luz UV. Interessante, esta função independe da atividade quinase de ATR, já que o tratamento com NU6027 (inibidor da função quinase de ATR), bem como o silenciamento de ATRIP (necessário para recrutar ATR para sítios de lesão no genoma e subsequente fosforilação de CHK1) não aumentaram a translocação de BAX para a mitocôndria (ZHENGKE, 2013). Desta forma, hipotetizamos que o mesmo mecanismo descrito por Zhengke possa ocorrer nas células tratadas com CQ, onde ATR possa reduzir a indução de apoptose nas células de glioma em resposta à CQ, através da manutenção da integridade mitocondrial. Observamos, também, que a inibição de ATR potencializa a fragmentação mitocondrial (figura 18C). Além de este ser um

evento que ocorre durante a apoptose, sabe-se também que BAX desempenha um papel fundamental neste processo (SHERIDAN et al., 2008). Logo, estes dados reforçam a idéia de que a via inibitória de ATR sobre BAX possa ter um papel central na resistência de células de glioma à CQ. Experimentos que comprovem a translocação de BAX para mitocôndrias na presença de CQ e na ausência de ATR são necessários para confirmar esse processo.

Notamos também que o silenciamento de ATR resultou em um aumento da quantidade de LC3II nas células tratadas com CQ (figura 17C). Desta forma, é muito provável que a inibição de ATR tenha resultado em um aumento da autofagia na presença de CQ via desestabilização mitocondrial. Assim, é tentador especular que ATR possa desempenhar um papel regulador importante no controle da qualidade mitocondrial através da mitofagia.

Notamos, também, que NAC protegeu as células contra a fragmentação de DNA induzida tanto por CQ, quanto por CQ + siATR (figura 16). Neste sentido, podemos especular que o aumento dos níveis de GSH induzidos por NAC preveniram as etapas iniciais da toxicidade induzida por CQ, como a permeabilização lisossomal. Assim, a depleção de ATR por si só não exerce nenhum efeito sobre a célula, caso os eventos promovidos pela CQ não tenham sido desencadeados.

2.5.7 *Uso de CQ e siATR combinado à TMZ: implicações para o tratamento de células resistentes*

Por fim, fornecemos evidência de que o triplo tratamento (CQ + siATR + TMZ) é capaz de sensibilizar fortemente células de glioma. Diferentes mecanismos podem estar por trás deste efeito. Em primeiro lugar, o silenciamento de ATR pode tornar células mais sensíveis às lesões genômicas induzidas por TMZ. Nosso grupo mostrou que TMZ, o qual promove metilação de bases do DNA, resultava na ativação de ciclos fúteis de reparo de pareamento errôneo de bases, com consequente geração de duplas quebras no DNA (BATISTA et al., 2007; ROOS et al., 2007). Neste sentido, uma das lesões geradas por TMZ é a O-6 metil-guanina (O6MG). Apesar de não ser a lesão mais importante quantitativamente (responde por cerca de 6% das bases metiladas), é a mais importante qualitativamente, já que é a mais tóxica dentre as lesões causadas por esta droga

(ZHANG; STEVENS; BRADSHAW, 2011). Na presença de O6MG, ocorre um pareamento errôneo de bases (incorporação de timina frente a O6MG) durante a replicação do DNA. Isso inicia um mecanismo que promove a retirada da base recém incorporada (reconhecida como errada), seguido de re-polimerização do DNA naquela região. No entanto, como a O6MG continua presente na fita molde, os ciclos de reparo do pareamento errôneo repetem-se de maneira fútil, e acredita-se que isso resulte em colapso da forquilha de replicação, com consequente geração de quebras no DNA. Essas quebras no DNA resultam na ativação de ATR e ATM, as quais irão promover bloqueio de ciclo celular e ativação de reparo de DNA (CAPORALI et al., 2004). Assim, a sensibilização que observamos das células a TMZ promovida pelo silenciamento de ATR (figura 19) pode ser devido ao comprometimento do reparo das quebras no DNA. A combinação de CQ com TMZ, no entanto, não resultou em nenhum efeito se comparado com as células na condição controle. Estamos cientes de que um trabalho recente mostrou que CQ aumenta morte celular induzida por TMZ em células de glioma. Neste trabalho, autores usaram uma dose duas vezes maior de TMZ (20 μ M) do que a utilizada nesta tese, realizaram ensaio clonogênico ao invés do XTT, e as células usadas foram U251MG e LN229 (GOLDEN et al., 2014). Assim, uma mistura de todos estes fatores pode explicar o porquê a combinação de TMZ com CQ não mostrou nenhum efeito em termos de citotoxicidade em nossas análises.

No entanto, nós notamos que a combinação de CQ com TMZ induzia uma forte queda na viabilidade das células de glioma na presença do silenciamento gênico de ATR, mostrando um efeito sinérgico. Apesar de meramente especulativo, o efeito sinérgico pode se dar através da acentuação da queda do $\Delta\psi_m$. Neste sentido, Oliva e colaboradores, ao analisarem uma linhagem de GBM resistente a TMZ, notaram, dentre outras características, que essas células possuíam menor atividade dos complexos I e V da CTE, ao passo que a atividade dos complexos II, III e IV (citocromo C oxidase) estavam aumentados. Os pesquisadores, então, concluíram que os dados sugerem um melhor acoplamento da CTE, e também que o aumento da atividade da citocromo C oxidase acaba por reduzir o *pool* de citocromo C disponível para ser liberado no citosol pela mitocôndria. O uso de um inibidor da atividade da citocromo c oxidase (e dos complexos II e III) resultou no aumento da sensibilidade de células desta linhagem à apoptose induzida por TMZ, sugerindo que alterações na CTE implicam em resistência a essa droga (OLIVA

et al., 2010). Interessante, esses dados foram confirmados em biópsia de pacientes, onde os autores notaram que a atividade dos complexos II, III e IV estava aumentada no tumor recorrente (em relação ao primário). Ao analisarmos nossos resultados, notamos que a combinação de siATR com CQ reduz drasticamente o $\Delta\psi_m$ (figura 18A & B). Logo, especulamos que CQ + siATR aumente a toxicidade de TMZ via redução do $\Delta\psi_m$, possivelmente via aumento da translocação de BAX para esta organela. Neste processo, por tanto, a depleção de ATR potencializaria o aumento da localização de BAX na mitocôndria (processo este iniciado pelo extravasamento das catepsinas B e D para o citoplasma por meio da ação da CQ), seguido de permeabilização da membrana mitocondrial e consequente extravasamento de citocromo C, tornando as células mais propensas a estímulos pró-apoptóticos, como aqueles induzidos por TMZ.

Por último, apresentamos um modelo no qual nossos dados e o dos trabalhos dos autores citados nesta tese encontram-se esquematizados, sumarizando os principais mecanismos pelos quais CQ parece induzir toxicidade em células de glioma humano (figura 21).

Figura 21 - Modelo sobre o mecanismo de ação da CQ em células de glioma humano baseado nos resultados e hipóteses (bem como nos trabalhos de diversos autores) apresentados no presente capítulo desta tese. (quadro pontilhado verde indica etapas da autofagia).

2.6 Conclusões

As análises dos dados apresentados no capítulo 2 desta tese permitem concluir que:

- O *status* do potencial de membrana mitocondrial basal das células de glioma (e não somente do gene *TP53*) é um fator que permite inferir sobre (e comparar) a resistência de diferentes linhagens celulares à CQ.

- A proteção conferida por NAC às células de glioma contra CQ não depende da capacidade antioxidante deste aminoácido, mas sim, da sua capacidade de preservar a autofagia e de evitar a perda do potencial de membrana mitocondrial.

- ATR protege células de glioma contra morte celular induzida por CQ de maneira independente da sua via canônica de atuação. Esta proteção se dá pela manutenção da integridade da membrana mitocondrial.

- CQ aumenta a sensibilidade de células de glioma ao quimioterápico TMZ em células silenciadas para ATR.

Capítulo 3 - Uso de células-tronco pluripotentes induzidas para geração de um novo modelo celular para o estudo das características neurológicas de pacientes portadores da Síndrome de *Cockayne*.

3.1 Introdução

3.1.1 O primeiro caso descrito da síndrome de Cockayne e os sintomas clínicos característicos desta doença

A síndrome de *Cockayne* (CS) foi descrita em 1936 pelo médico inglês Edward Alfred Cockayne (COCKAYNE, 1936), que diagnosticou uma garota e um garoto (idades de 7 e 6 anos, respectivamente), filhos de pais normais, em uma família com um total de sete filhos. Cockayne descreveu os pacientes como apresentando uma cabeça pequena, embora com formato normal, olhos aprofundados na face, maxilar prognático, tronco curto e de circunferência fina, com pés e mãos proporcionalmente grandes. Eram crianças amigáveis, que riam mais frequentemente do que outras crianças não afetadas, mas que raramente pronunciavam alguma palavra compreensível. Apesar de não serem completamente surdas, a audição era visivelmente comprometida. A inteligência das crianças foi descrita como abaixo da média. Eritemas, os quais, de acordo com a mãe, ficavam mais evidente após exposição ao sol, estavam presentes no dorso das mãos, orelhas, rosto e pernas. Médicos notaram, também, atrofia da retina, e crescimento/desenvolvimento lento (nanismo) em ambos os pacientes, além de extremidades (pés) sempre frios, mesmo no verão. 10 anos mais tarde, Cockayne publicou um outro artigo, no qual descrevia a progressão das condições clínicas dos irmãos, evidenciando uma piora tanto do estado mental quanto físico dos pacientes (COCKAYNE, 1946). Relatos subsequentes de outros médicos evidenciaram a constância dessas e outras características entre os pacientes desta síndrome (Síndrome de Cockayne, ou CS), como cáries frequentes independentemente dos cuidados odontológicos e da dieta; propensão à pneumonia, bem como à disfunção renal e do fígado; hipertensão; convulsões; a não descida dos testículos; cifose; problemas de equilíbrio; caquexia; entre outros (NATALE, 2011; RAPIN et al., 2006; WEIDENHEIM; DICKSON; RAPIN, 2009). No entanto, em se tratando da idade da manifestação dos sintomas e do óbito, foram reportados casos que nem sempre se assemelhavam ao descrito por Cockayne. Assim, baseado principalmente nessas características, os casos de CS foram subclassificados em: tipo I (pacientes nascem normais, e os sintomas começam a se manifestar nos primeiros anos de vida; óbito dos

pacientes se dá por volta dos 16 anos), tipo II (paciente já apresenta sintomas de CS ao nascer, e a expectativa de vida é de apenas 5 anos após o nascimento), e tipo III (sintomas manifestam-se mais tardiamente, e pacientes chegam a viver, em média, até os 30 anos). Vale ressaltar que, para os 3 grupos, pneumonia/complicações pulmonares respondem pela maioria dos óbitos dos pacientes, seguida de falha renal e parada cardíaca (NATALE, 2011). Dados epidemiológicos sugerem que o tipo I é o mais comum, e o tipo III o mais raro, embora Natale tenha sugerido que a raridade do tipo III pode simplesmente refletir um problema de diagnóstico (NATALE, 2011).

3.1.2 Características neurológicas

Além do retardo mental, severa limitação para se comunicar verbalmente, declínio das habilidades cognitivas/motoras e microcefalia, outras condições patológicas relativas ao sistema nervoso central foram descritas, como: mineralização (causada pelo depósito de cálcio e às vezes ferro, principalmente nos núcleos da base); gliose (ou proliferação/ativação exacerbada de células da glia); perda de axônios no nervo óptico; ventrículos aumentados; atrofia do cerebelo com pronunciada perda de células de Purkinje e células granulares; engrossamento do crânio; e perda progressiva de mielina na substância branca. Acredita-se que esta última característica seja responsável pela espasticidade (aumento do tônus muscular) e pela marcha atáxica (passadas irregulares, cambaleantes e instáveis) observada nos pacientes (RAPIN et al., 2006; WEIDENHEIM; DICKSON; RAPIN, 2009).

3.1.3 Epidemiologia e causa

CS é uma doença genética rara, com padrão de herança autossômico recessivo. A taxa de incidência de CS foi estimada como sendo de pelo menos 2,7 por um milhão de nascimentos na Europa ocidental (KLEIJER et al., 2008), e de 2,77 no Japão (KUBOTA et al., 2015). No Brasil, pelo menos quatro relatos de casos foram feitos: em 1999, por Guardioli e colaboradores (em Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul); em 2000, por Karam e colaboradores (também no Rio Grande do Sul); em 2006, por Bertola e colaboradores (em São Paulo, capital) (BERTOLA et al., 2006); e

em 2012, por de Sant'Anna e colaboradores (em Barueri, São Paulo) (DE SANT'ANNA et al., 2012; GUARDIOLA et al., 1999; KARAM et al., 2000).

Mutações nos genes *ERCC8* (*excision repair cross-complementation group 8*, também conhecido como *CSA*, de *cockayne syndrome A*) ou *ERCC6* (*CSB*) são responsáveis pelo aparecimento dos sintomas (NANCE; BERRY, 1992). O gene *CSB* possui aproximadamente 71 kpb, está organizado em 12 éxons, é localizado no cromossomo 5, e mutações neste gene respondem por 80% dos casos de CS. Já o gene *CSA* possui aproximadamente 84 kpb, está localizado no cromossomo 10 e possui 20 éxons. A proteína *CSA*, de 44 kda (*mil daltons*) possui diversos motivos WD40, os quais permitem interação com outras proteínas e consequente formação de complexos multiproteicos. Já a proteína *CSB*, de 168 kda, é uma ATPase dependente de ligação à dupla fita de DNA, pertencente à família SWI2/SNF2 de fatores remodeladores da cromatina, que também possui um sítio de ligação à ubiquitina na sua porção C-terminal (CITTERIO et al., 2000; SAIJO, 2013).

Essas características das proteínas *CSA* e *CSB* são essenciais para a função crítica desempenhada por elas no reparo do DNA acoplado à transcrição, ou TCR (*transcription-coupled repair*), uma sub via do reparo do DNA por excisão de nucleotídeos (NER) (conforme previamente discutido no capítulo 1 desta tese). A via do TCR promove o reparo de lesões que resultam no bloqueio da progressão da RNA polimerase II (RNAPol II). Em resposta à parada da RNAPol II frente a uma lesão no DNA, *CSB* passa a se ligar fortemente a esta polimerase, e altera a conformação do DNA ao fazer com que este se enrole sobre ela, o que parece favorecer o acesso de proteínas de reparo de DNA a esta região. *CSB* promove, em seguida, o recrutamento da proteína *CSA*, a qual precede (e é essencial) para o recrutamento de outras proteínas do NER, que irão, então, promover a excisão da fita contendo a lesão. Vale ressaltar que *CSA* liga-se a RBX1 e CUL4A, formando um complexo proteico com atividade ubiquitina-ligase, o qual é capaz de ubiquitinar *CSB*, tornando esta proteína alvo de degradação proteassomal, o que constitui uma etapa essencial para recuperação da transcrição do RNA após o processamento da lesão (GROISMAN et al., 2006; HANAWALT; SPIVAK, 2008; SPIVAK; GANESAN, 2014). *CSA* e *CSB* também parecem desempenhar uma função importante em remover a RNAPol II do sítio da lesão por meio de ubiquitinação desta, facilitando a ancoragem de proteínas de reparo. No entanto, não está

claro se a RNAPol II é direcionada para a degradação, ou se ela é realocada para uma posição distante (*backtracking*), para que retorne após resolução da lesão. Assim, fibroblastos CS apresentam uma deficiência para retomar a transcrição após irradiação com luz UV. Esta deficiência é usada como diagnóstico celular para confirmar o acometimento do paciente por esta síndrome (LAUGEL, 2013; MAYNE; LEHMANN, 1982).

3.1.4 Correlacionando deficiências celulares com aspectos clínicos

A participação no TCR foi a primeira função descrita para essas proteínas. Em seguida, uma série de estudos se sucedeu, apontando diversos outros mecanismos (tanto nucleares quanto citoplasmáticos) no qual estas proteínas participavam. Alguns desses mecanismos encontram-se esquematizados na figura 22.

Figura 22 - Funções celulares desempenhadas pelas proteínas CSA e/ou CSB. (1) CSA e CSB aumentam níveis da atividade transcrricional da RNA polimerase II (DIANOV et al., 1997); CSB promove alongação do RNA durante atividade da RNA polimerase II (SELBY; SANCAR, 1997); (2) CSB promove síntese de RNAr (BRADSHER et al., 2002); (3) Região N-terminal de CSB interage com p53, e região C-terminal de CSB interage com CSA via porção C-terminal, formando um complexo que regula a ubiquitinação e degradação de p53 via proteassoma, em uma maneira dependente de MDM2 (LATINI et al., 2011) ; (4)

CSA e CSB acumulam dentro de mitocôndrias em resposta a estresse oxidativo (ERO), associando-se à mtOGG1, mtSSBP1 e DNA mitocondrial, e protegendo contra o acúmulo de mutações mitocondriais induzidas por insulto oxidativo (KAMENISCH et al., 2010) ; (5) CSB promove autofagia e previne o acúmulo de mitocôndrias disfuncionais (SCHEIBYE-KNUDSEN et al., 2012); (6) CSB remove PARP1 de sítios de lesão no DNA, prevenindo sua hiper ativação, a qual resulta em consumo de NAD⁺. Na ausência de CSB, ocorre uma acentuada depleção de NAD⁺, resultando no aumento dos níveis de lactato que, por sua vez, aumentam o consumo de oxigênio. A falta de NAD⁺ também reduz a atividade de Sirt1 (uma desacetilase dependente de NAD⁺), cuja atividade é importante para o biogênese e funcionamento mitocondrial. De fato, autores notaram acentuada polarização mitocondrial e geração de ERO nas células deficientes em CSB (SCHEIBYE-KNUDSEN et al., 2014); (7) CSB regula a transcrição de hOGG1 e, consequentemente, o reparo da lesão 8-oxoguanina via excisão de bases (BER) (DIANOV et al., 1999).

Tendo em vista algumas das diversas funções esquematizadas acima acerca das proteínas CSA e CSB, uma pergunta lógica que se sucede é: como essas deficiências celulares conectam-se com o complexo fenótipo dos pacientes? É provável que a enorme variedade dos sintomas clínicos dos pacientes reflita uma conjuntura de todos estes (e possivelmente outros) fatores. Assim, o acúmulo de mitocôndrias disfuncionais e a geração de ERO, alterações metabólicas, aumento nas taxas de mutação do DNA mitocondrial, bem como problemas transcrpcionais, são todos possíveis candidatos para explicar os sintomas clínicos. No entanto, entender qual destas alterações tem um papel predominante no fenótipo, ainda é uma questão em debate.

No entanto, alguns trabalhos parecem fornecer pistas interessantes nesse sentido. Uma hipótese interessante implica que as deficiências transcrpcionais causadas pela falta das proteínas CSA ou CSB podem contribuir de maneira muito significativa para o fenótipo dos pacientes. Diferentes grupos tiveram sucesso em demonstrar que tanto CSA quanto CSB são importantes para o metabolismo do RNA (BRADSHER et al., 2002; DIANOV et al., 1997; KOCH et al., 2014; SELBY; SANCAR, 1997), deficiências na qual poderiam resultar em comprometimento da expressão de diversos genes, o que teria impacto em inúmeros processos celulares e, consequentemente, no fenótipo complexo dos pacientes. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que pacientes que manifestam xeroderma pigmentosa (XP) com características de CS tipo II (XP/CS) (a qual inclui calcificação do gânglio basal, gliose, perda de neurônios, nervo óptico atrófico, espasticidade, perda de audição, perda da mielina, entre outros (LINDENBAUM et al., 2001)), apresentam mutações nos genes *XPB*, *XPD* ou *XPG*, todos os quais interagem com o complexo TFIIH, que, além de participar no NER, é fator essencial para a atividade de RNAPol II

(síntese de RNA mensageiro), e também para a RNAPol I (síntese de RNA ribossômico). A descrição da participação tanto de CSB (BRADSHER et al., 2002) quanto de CSA (KOCH et al., 2014) neste complexo multi-proteico mostra uma via molecular em comum para pacientes que tem uma sobreposição de fenótipos (CS e XP/CS), sugerindo, assim, que problemas na transcrição, bem como no reparo do DNA, podem exercer uma contribuição majoritária para os sintomas.

3.1.5 Um achado inesperado: fenótipo brando na ausência da proteína CSB

Todas as funções descritas anteriormente levam à conclusão de que não só CSA, mas principalmente a proteína CSB, desempenham diversos papéis celulares cruciais, e que a falta de uma delas acarreta em consequências desastrosas para o paciente. No entanto, em 2004, Horibata e colaboradores publicaram um trabalho descrevendo um paciente que possuía uma mutação em homozigose no gene *CSB* que resultava em parada prematura da tradução do RNAm (na altura do aminoácido 77, dentre os 1493 que compõem esta proteína). A detecção da proteína por meio de anticorpos que reconhecem a região N-terminal revelaram ausência da proteína (possivelmente, devido à degradação do pequeno fragmento polipeptídico gerado, ou decaimento do RNA). Este paciente, aos 33 anos de idade, ao contrário do que se esperaria, apresentava somente sensibilidade (branda) à luz solar, apesar da clara deficiência das células na recuperação da transcrição após irradiação com luz UV, mas nenhum outro sintoma característico da CS. Autores sugeriram, então, que a presença de uma forma truncada da proteína deveria ser mais tóxica do que a total ausência desta. Alternativamente, também sugeriram que alguma mutação supressora poderia compensar pela falta da proteína CSB (HORIBATA et al., 2004). Uma linha de raciocínio semelhante já havia sido apresentada por Mallery e colaboradores, em 1998, após analisarem os sítios de mutações no gene *CSB* em 16 pacientes com fenótipos variando entre tipo I e tipo II, e concluírem que o fenótipo não poderia ser correlacionado nem ao tipo nem à posição da mutação neste gene, sugerindo que o *background* genético poderia exercer uma forte influência no aspecto clínico que seria manifestado (MALLERY et al., 1998).

Dois anos depois, uma publicação muito interessante reforçou essa idéia. Autores reportaram que a mutação em homozigose 2282 C>T (parada prematura) no gene *CSB* era responsável pelo fenótipo de dois irmãos de origem hispânica diagnosticados com síndrome *De Sanctis-Cacchione*, a qual é caracterizada por um fenótipo de XP (hiperpigmentação da pele) com forte neurodegeneração, mas sem apresentar características típicas de CS, como face de “passarinho”, caquexia, retinopatia, cataratas ou calcificação do gânglio basal (COLELLA et al., 2000; GREENHAW et al., 1992). No entanto, a mesma mutação, também em homozigose, já havia sido descrita em um paciente turco portando os sintomas clássicos de CS (COLELLA et al., 2000; LEHMANN et al., 1993). Em conjunto, estes trabalhos sugerem que o silenciamento gênico ou *knockout* das proteínas CSA ou CSB podem não ser a melhor forma de estudar a relação de processos celulares com a manifestação severa do fenótipo nos pacientes, principalmente por dois motivos: por não recapitular o *background* genético do paciente, além da possibilidade de que a ausência total da proteína pode ser menos tóxica do que a presença de formas truncadas.

3.1.6 Limitações dos modelos celulares e animais para o estudo da neurodegeneração de CS

Modelos celulares forneceram um conhecimento enorme acerca dos processos nos quais CSA e CSB participam, além de importantes pistas/hipóteses de como estes fenômenos contribuem para o aspecto clínico dos pacientes. No entanto, quando se trata dos fenótipos neurológicos, o uso de fibroblastos humanos de pele (modelo mais comumente usado para o estudo desta doença), oferece evidentes limitações, já que estas células não representam aquelas de maior relevância (neurônios e células da glia) para o estudo desta questão. Além dos modelos celulares/*in vitro*, modelos animais são comumente empregados para o estudo de CS. Eles recapitulam alguns dos fenótipos observados nos pacientes, como a sensibilidade à luz UV (decorrente da deficiência no TCR) mas não todos. Infelizmente, a neurodegeneração severa observada nos pacientes é deficientemente mimetizada nos modelos animais (JAARSMA et al., 2013; SCHEIBYE-KNUDSEN et al., 2012). Na realidade, os animais apresentam um fenótipo muito brando em termos de neurodegeneração. O duplo *knockout* do gene CSB e de outro gene relacionado à via de reparo NER (como XPA ou XPC) aparece como uma alternativa a isso, pois estes animais duplo-deficientes apresentam alterações neurológicas mais severas, além de

outras características que se assemelham aos pacientes (como severa deficiência no crescimento e degeneração da retina) (LAPOSA; HUANG; CLEAVER, 2007). Apesar de sugerirem uma forte associação entre neurodegeneração e a deficiência total do NER (já que ambas as sub-vias, GGR e TCR, são deficientes nesse modelo), esta abordagem adiciona uma outra variável genética que pode mascarar (ou dificultar) o estudo específico das deficiências de CSA ou CSB no fenótipo neurodegenerativo humano. Desta forma, modelos mais adequados para o estudo das características neurológicas de CS, que recapitem o *background* genético dos pacientes, são necessários.

3.1.7 Reprogramação celular e a construção de modelos de estudo mais relevantes

Em 2006, Takahashi e Yamanaka publicaram um trabalho mostrando que células diferenciadas podiam ser reprogramadas a um estado pluripotente, denominadas células-tronco pluripotentes induzidas, ou iPSCs (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Takahashi e Yamanaka mostraram que a expressão dos fatores transcricionais Oct4, Sox2, Klf4 e c-myc (também conhecidos como “fatores de Yamanaka”), por meio de transdução retroviral, resultavam na reprogramação celular de fibroblastos da ponta da cauda de camundongos em iPSCs, ou seja, células que apresentavam capacidade ilimitada de auto renovação e proliferação, além da habilidade de originar células dos três tecidos germinativos (avaliada pela formação de teratomas quando estas eram injetadas em animais imuno-suprimidos). Menos de um ano mais tarde, eles mostraram que a mesma abordagem também era capaz de reprogramar fibroblastos humanos de pele.

A importância destes trabalhos evidencia-se pelo fato de Yamanaka, junto de John Gurdon (que mostrou, em 1962, que o núcleo de uma célula diferenciada continha toda a informação genética necessária para originar um organismo inteiro quando injetado em um óvulo anucleado (GURDON, 1962), terem sido agraciados com o prêmio Nobel de medicina em 2012.

As implicações (ditas revolucionárias) deste método são evidentes: é possível obter, virtualmente, qualquer célula do corpo de um indivíduo, a partir de uma biópsia de pele. Recentemente, até mesmo protocolos que reprogramam células epiteliais renais obtidas da urina

foram reportados, mostrando que métodos completamente não invasivos podem ser utilizados para obtenção das iPSCs (ZHOU et al., 2012). Isso possibilita a obtenção e análise de diversos tipos celulares de um paciente, bem como triagem de drogas personalizada, e até mesmo a geração de células visando terapia regenerativa (as quais apresentam baixíssimos ou nenhum risco de rejeição, já que as células que seriam transplantadas são derivadas do próprio paciente) (MARCHETTO; WINNER; GAGE, 2010). De fato, o primeiro transplante de células derivadas de iPSCs ocorreu no Japão, no Instituto de Pesquisas Biomédicas e Inovação no qual uma mulher de 70 anos de idade, sofrendo de degeneração macular, recebeu um transplante de células do epitélio pigmentar da retina obtidas a partir da reprogramação de células da sua própria pele (fonte: nature.com). Vale também ressaltar que esta tecnologia ofereceu uma alternativa ao uso de células-tronco pluripotentes derivadas do blastocisto (embrião), driblando, assim, um empecilho (ético) advindo da necessidade de “destruir” um embrião para que estas células pudessem ser obtidas (TANABE; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2014).

Em um curto intervalo de tempo após a publicação dos trabalhos de Yamanaka, a tecnologia se espalhou rapidamente, e vem permitindo a geração de modelos de estudo de doenças/desenvolvimento. Em um trabalho pioneiro, Marchetto e colaboradores empregaram a técnica de reprogramação celular para obter e estudar neurônios de crianças portadoras da síndrome de Rett, uma das formas mais severas dentro do espectro autista. Além de observarem diferenças em termos do tamanho do corpo celular e da habilidade dos neurônios para se comunicarem (correlacionando sintomas clínicos das crianças das quais as células foram derivadas com achados *in vitro*), os pesquisadores mostraram que era possível corrigir as células autistas com o uso de drogas (MARCHETTO et al., 2010). Esse trabalho, além de inaugurar um campo de modelamento e tratamento personalizado para esta doença, também confirmou o potencial revolucionário da técnica desenvolvida por Yamanaka. De fato, o modelamento (e triagem de drogas) de diversas doenças, como Alzheimer, Parkinson, Esclerose Lateral Amiotrófica, entre outras, vêm se beneficiando desta tecnologia (CHESTKOV et al., 2014; CORTES et al., 2014; KONDO et al., 2013). Uma ilustração representando o processo de reprogramação e possíveis aplicações das células iPSCs é apresentada na figura 23.

Figura 23: Reprogramação celular e possíveis aplicações. A diferenciação de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs), derivadas da reprogramação de células diferenciadas (como fibroblastos de pele), permite a obtenção de diversos tipos celulares (como células precursoras neurais [NPCs], neurônios e células da macroglia) de um indivíduo. Desta forma, é possível recapitular o genoma de pacientes acometidos por doenças genéticas em células de relevância para a triagem de drogas e, possivelmente, para terapia celular. Figura adaptada de (MARCHETTO; WINNER; GAGE, 2010)

3.1.8 Emprego de iPSCs no estudo de CS

Em 2012, Andrade e colaboradores mostraram a possibilidade de gerar iPSCs a partir de fibroblastos de pele de pacientes CS. Além disso, pesquisadores notaram que estas células apresentavam maior estresse oxidativo, além de maior expressão de TXNIP, ou *thiorredoxin-inhibitor protein*, correlacionando a expressão deste gene à redução das defesas antioxidantes celulares, o que poderia explicar o aumento basal do estresse oxidativo observado (ANDRADE et al., 2012). Este trabalho foi pioneiro no uso de iPSCs para modelar esta síndrome, abrindo a perspectiva de que diferentes modelos celulares poderiam ser gerados para estudar aspectos da síndrome de CS ainda não investigados pelas limitações impostas pelos modelos atuais. Além do mais, como discutido anteriormente, não se pode descartar que o *background* genético dos pacientes CS possa contribuir para os sintomas clínicos manifestados pelos pacientes. Dessa

maneira, o uso de iPSCs nos possibilita recapitular não só a mutação de interesse, mas também o *background* genético dos pacientes em diferentes tipos celulares de maior relevância para o estudo de características específicas desta síndrome.

3.2 Objetivos

Considerando que i) os modelos animais de CS não recapitulam a maioria dos fenótipos neurológicos observados em pacientes, e que ii) o uso de tipos celulares mais adequados (neurônios) poderia permitir investigar características exclusivas destas células, o presente capítulo desta tese teve o seguinte objetivo geral:

- A obtenção de células neurais no laboratório que recapitulassem o genoma de indivíduos portadores de CS.

Além disso, considerando as evidências de que uma disfunção transcricional pode ter uma forte influência sobre a manifestação do fenótipo dos pacientes, o presente capítulo desta tese teve como objetivo específico:

- Analisar o perfil transcricional de neurônios de pacientes CS por meio do sequenciamento do RNA destas células, e analisar uma possível relação com o fenótipo dos pacientes.

3.3 Material & Métodos

3.3.1 Inibidores e fatores de crescimento

Dorsomorfina: (3093, *Tocris Biosciences*, Bristol, Reino Unido) preparado através da reconstituição do pó em água ultra pura (estoque = 1 mM) seguido de filtração. Alíquotas foram armazenadas a -20 °C. Após descongelamento, foram mantidas a 4 °C por até 10 dias.

FGF-básico (FGFb): (PHG0263, *Life Technologies*) preparada através da reconstituição do pó em PBS + 0,1% de BSA (pré-filtrado) (estoque = 100 µg/ml). Alíquotas foram armazenadas a -20 °C (ou -80 °C para tempos longos de estocagem). Após descongeladas, as alíquotas foram mantidas armazenada a 4 °C por não mais do que 7 dias, após o qual eram descartadas.

Rock Inhibitor: (1254, *R&D Systems*, Mineápolis, MN, EUA) preparado através da reconstituição do pó em água ultra pura (estoque = 5 mM). Alíquotas foram armazenadas a -20 °C. Após descongelamento, foram mantidas a 4 °C por até 10 dias.

SB431542: (04001010, *Stemgent*, Cambridge, MA, EUA) preparado através da reconstituição do pó em DMSO (estoque = 10 mM). Aquecimento a 37 °C por alguns minutos pode ser necessário para total dissolução do pó. Alíquotas foram armazenadas a -20 °C. Após descongelamento, foram mantidas a 4 °C.

3.3.2 Cultura de células

3.3.2.1 Fibroblastos humanos primários

Os fibroblastos humanos de pele GM00969, GM00739, GM10903 e AG06244 foram comprados da *CORIELL Cell Repositories* (Camden, Nova Jersey, EUA). Os fibroblastos 5461 e W83 (humanos, também derivados da pele) pertencem ao banco de células do laboratório do Professor Alysson Renato Muotri (Universidade da Califórnia, San Diego, CA, EUA). Características das células, bem como dos indivíduos (afetados e não afetados) dos quais estas foram originadas, encontram-se na tabela 3. Células foram cultivadas rotineiramente em meio DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium*) com 4,5 g/L de glicose (Cell Gro, Corning, Nova Iorque, EUA)

suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, *Life Technologies*) e 1% de antibiótico (Gibco, *Life Technologies*) em uma incubadora a 37 °C e 5% CO₂. O sub-cultivo das células era feito cerca de uma vez por semana através de lavagem com PBS (*Phosphate Buffer Saline*, Cell Gro), seguido de adição de tripsina-EDTA (Gibco, *Life Technologies*) por aproximadamente 5 minutos (37 °C), neutralização da reação com meio de cultura, centrifugação das células (1.200 RPM por 3 minutos) e, por fim, ressuspensão e distribuição do precipitado de células entre placas de cultura (Corning) numa razão 1:5.

Tabela 3 - Características clínicas e celulares/moleculares dos pacientes e das células derivadas destes, respectivamente, utilizadas.

Código do fibroblasto	GM00969 (NA)	5461 (NA)	W83 (NA)	AG06244 (CS)	GM00739 (CS)	GM10903 (CS)
Sexo	feminino	feminino	masculino	feminino	feminino	feminino
Idade (anos)	2	adolescente	38	4	3	9
Raça	caucasiana	caucasiana	caucasiana	caucasiana	caucasiana	hispânica/latina
Descrição clínica	não afetado	não afetado	não afetado	<ul style="list-style-type: none"> - velocidade de condução nervosa reduzida - Desmielinização segmentada - calcificação no putâmen - retardo do crescimento - baixa estatura - face típica - fotossensibilidade - características senis 	<ul style="list-style-type: none"> - não falava nem andava aos 5 anos de idade - aparentemente normal ao nascer - cataratas e degeneração da retina - face típica - contratura das juntas - infecções pulmonares frequentes 	<ul style="list-style-type: none"> - Perdeu capacidade de andar e a maior parte da fala aos 3 anos - microcefalia - retardo do crescimento - neurodegeneração - no entanto, não apresentava caquécia, face típica, calcificação do gânglio basal, degeneração retinal, mas apresentava máculas hiperpigmentadas/sardas
Acúmulo de 8OXoG pós IR	não	-	-	sim	sim	-
Síntese de RNA pós UV	-	-	-	-	deficiente	deficiente
Mutação	-	-	-	-	- um alelo possui 1088A>T (codon de parada prematura); outro alelo possui 2648C>T (causa <i>frameshift</i>) (gene CSB)	- homozigoto para 2282 C>T (parada prematura) no codon 735 (gene CSB)
Fonte	CORIELL	Muotri	Muotri	CORIELL	CORIELL	CORIELL

Tabela 3 - Detalhes contidos nesta tabela acerca dos fibroblastos GM00969, AG06244, GM00739 e GM10903 foram obtidos no site da Coriell Cell Repositories (<https://catalog.coriell.org/>) (instituição da qual estas células foram obtidas), bem como nos artigos de (COLELLA et al., 2000; GREENHAW et al., 1992; LEHMANN et al., 1993; LEVINSON et al., 1982; SCHMICKEL et al., 1977; TUO et al., 2003). Já as células 5461 e W83 pertencem ao estoque de células do laboratório do Professor Alysson Renato Muotri (Universidade da Califórnia, San Diego, CA, EUA) e os detalhes acerca deste material biológico foram obtidos por comunicação pessoal com membros deste laboratório. “-” indica informação não disponível ou que não se aplica. “NA” indica não afetado, e “CS” indica paciente da síndrome de Cockayne.

3.3.2.2 Células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) e células-tronco embrionárias (ESCs)

As iPSCs e as ESCs eram cultivadas rotineiramente em meio mTeSR-1 (5870, StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) suplementadas com o antibiótico primocina (100µg/ml) (ant-pm-1, Invivogen, San Diego, CA, EUA). O meio mTeSR-1 era preparado através da mistura do meio base + suplemento, aliquotado em tubos falcon de 50 ml (Cell Gro, Corning), e armazenados a -20 °C. Alíquotas eram descongeladas conforme o uso. Primocina (também aliquotada e armazenada a -20 °C) era adicionada imediatamente antes do meio ser adicionado às células. O meio de cultura era trocado diariamente, e o sub-cultivo das colônias era feito a cada 8 dias (aproximadamente). Para isso, pedaços de colônias eram manualmente destacados com o auxílio de uma ponteira (P1000) sob o microscópio EVOs (*Advanced Microscopy Group*, Bothell, WA, EUA) dentro da cabine de fluxo laminar, e distribuídos cuidadosamente entre placas previamente tratadas com matrigel (ver instruções abaixo). As ESCs H1 e Hues6 (H6) utilizadas neste trabalho foram previamente adquiridas pelo Professor Alysson Muotri.

3.3.2.3 Células precursoras neurais (NPCs) e neurônios

As NPCs eram cultivadas rotineiramente em meio NG (DMEM/F12 50:50 [10 092 CV, *Fisher Scientific*] suplementado com 0,5X de Gem21 Neuroplex [400-160, Gemini, West Sacramento, CA, EUA], 0,5X de N2 Neuroplex [400-163, Gemini] e 1% de antibióticos [*Gibco, Life Technologies*]). Este meio também era dividido em alíquotas de 50 ml, as quais eram armazenadas a -20 °C. FGFb era adicionado (concentração final de 20 ng/ml) ao meio NG imediatamente antes deste ser colocado em contato com as células. O meio de cultura das células era trocado a cada dois dias, de modo a manter a concentração de FGFb constante. O sub-cultivo das NPCs era feito por meio da lavagem das células com PBS, seguido de incubação com accutase (A6964, Sigma-Aldrich) por 10 minutos a 37 °C, neutralização da reação com meio de cultura, centrifugação das células (1.200 RPM por 3 minutos) e, por fim, ressuspensão e distribuição do precipitado de células entre placas de cultura (previamente tratadas com poli-l-ornitina e laminina [ver instruções abaixo]) numa razão 1:5. O sub-cultivo das células era feito sempre que as células atingiam cerca de 90% de confluência. Para diferenciação de NPCs em neurônios, o meio das células (NG+FGFb) foi trocado para meio NG contendo *Rock Inhibitor* (5µM final). Dois

dias depois, meio foi trocado para NG apenas, e então, meio era trocado 2 vezes por semana, até que neurônios atingissem o tempo de maturação desejado.

3.3.3 Congelamento e descongelamento de células

O congelamento das células foi feito através da suspensão do precipitado de células em SFB (fibroblastos) ou NG+FGFb (NPCs) acrescido de 10% de DMSO (Sigma-Aldrich). Já para as iPSCs, as colônias de células eram inicialmente incubadas com PBS por 5 minutos a 37 °C, e com o auxílio de uma agulha de insulina, as colônias eram cortadas (de forma a fazer um desenho quadriculado de cortes sobre a placa). O PBS era, então, removido, e meio mTeSR-1 era adicionado para, imediatamente, as células serem destacadas da placa com o auxílio de um *cell lifter* (148-16759-P5, Spectrum, Washington, EUA), e movidas cuidadosamente para um falcon de 15 ml com o auxílio de uma pipeta. Após colônias terem sedimentado por ação da gravidade no fundo do tubo, elas foram cuidadosamente ressuspensas em solução Cryostor *cell cryopreservation media* (C2874, Sigma-Aldrich) (0,5 - 1 ml, dependendo da quantidade de colônias iPSCs), e distribuídas entre criotubos (0,5 ml por criotubo) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), os quais foram imediatamente colocados em um container de congelamento (*Mr.Frosty Freezing Container*, Thermo Fisher Scientific) e transferidos para um freezer a -80 °C, permitindo um decréscimo gradual da temperatura a uma taxa de 1 °C por minuto. Cerca de 24 horas depois, os criotubos eram transferidos e armazenados em um freezer a -150 °C. O descongelamento das células (fibroblastos e NPCs) era feito através da incubação dos criotubos a 37 °C até total descongelamento, seguido de centrifugação das células, ressuspensão em meio de cultura adequado, e distribuição entre placas de cultivo. Já para as colônias de iPSCs, após total descongelamento do vial de células, estas eram cuidadosamente transferidas para um tubo falcon de 15 ml (Cell Gro, Corning), e 2 ml de DMEM era gotejado lentamente pela lateral do tubo, ao passo que o tubo falcon era manipulado cuidadosamente para fazer com que DMEM e solução de congelamento Cryostor se misturassem ao longo deste processo. Em seguida, o tubo falcon era mantido na posição vertical por alguns minutos, até que as colônias de iPSCs estivessem todas precipitadas no fundo do tubo. Em seguida, Cryostor + DMEM a aspirado com o auxílio de uma pipeta *pasteur*, meio mTeSR-1 era adicionado, e pedaços de colônias distribuídos entre placas de cultivo.

3.3.4 Tratamento de placas de cultivo com matrigel (iPSCs/ESCs/EBs/rosetas) ou poli-l-ornitina e laminina (NPCs/neurônios)

Antes de plaquear as colônias de iPSCs/ESCs, EBs ou as NPCs, as placas foram pré-tratadas com aminoácidos/componentes da matriz extracelular para melhorar significativamente a aderência das células às placas de cultivo. Para cada tipo celular, um tratamento específico foi feito, como descrito abaixo:

3.3.4.1 iPSCs/ESCs/Ebs/rosetas

Em primeiro lugar, alíquotas foram feitas a partir da distribuição da solução estoque de matrigel (300 µl por Eppendorf de 1,5 ml) (CB40234, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), e armazenadas a -20 °C. Para isso, enquanto o frasco estoque de matrigel era descongelado no gelo, ponteiros P1000 foram resfriados (estéreis) a -20 °C, enquanto que os tubos Eppendorfs eram mantidos (estéreis) no gelo. Estes cuidados são essenciais, pois o matrigel começa a formar um gel a partir de 10 °C. Após completamente descongelado, o matrigel foi aliquotado (usando ponteiros e tubos já resfriados), e mantido no gelo. Quando todas as alíquotas estavam prontas, elas foram transferidas e armazenadas a -20 °C. Para preparar as placas de cultivo para crescimento de células iPSCs, uma alíquota de matrigel foi descongelada no gelo, e em seguida, misturada com 25 ml de DMEM (temperatura de 4 °C), com o uso de uma pipeta de 5 ml, previamente resfriada (mantida no freezer -20 °C por cerca de 10 minutos). Rapidamente, e com o uso da pipeta resfriada, a solução de DMEM + matrigel foi distribuída entre as placas de cultivo de células (2 ml por placa de 60 mm). As placas foram, então, imediatamente movidas para a geladeira (podem ser estocadas dessa maneira por cerca de uma semana), ou para a incubadora de células (37 °C), e mantidas ali por pelo menos uma hora antes do plaqueamento de células ser feito. Após esta uma hora, o DMEM + matrigel foi aspirado (com o auxílio de uma pipeta *pasteur*), e logo em seguida (não deixar a placa seca por muito tempo), as colônias de iPSCs (ressuspendidas em mTeSR-1) foram movidas para a placa, e incubadas a 37 °C.

3.3.4.2 NPCs/neurônios

Uma solução estoque de poli-l-ornitina (10mg/ml) (P3655, Sigma-Aldrich) foi preparada através da dissolução do pó em água estéril ultra pura (Life Invitrogen), seguida de esterilização por filtração (0,22 µM), aliquotada em tubos Eppendorfs de 1,5 ml (1 ml por tubo) e

armazenamento a -20 °C. A solução de laminina (23017-015, Life Technologies) já vem pronta para uso, e era mantida estocada a -80 °C, ou a -20 °C em caso seu uso fosse rotineiro. A preparação das placas se deu da seguinte maneira: uma solução de uso de poli-l-ornitina (10 µg/ml) em água ultra pura estéril foi preparada a partir do estoque, e distribuída entre as placas de cultivo. Estas foram mantidas a 37 °C por cerca de 12 horas, quando foram, então, lavadas 3 vezes com água ultra pura ou PBS. Em seguida, uma solução com laminina (diluída 1:400 a partir do estoque) em PBS foi aplicada sobre as placas, as quais foram mantidas a 37 °C por pelo menos 4 horas. Antes do plaqueamento das NPCs/neurônios, as placas foram lavadas 2 vezes com PBS. (assim que a última lavagem for realizada e o PBS removido, as células foram imediatamente movidas para a placa, de modo a evitar que a placa ficasse seca por minutos). A solução estoque de poli-l-ornitina era descongelada à temperatura ambiente, enquanto que a solução estoque de laminina era descongelada no gelo (de acordo com instruções do fabricante). Para ensaios de imunofluorescência, as células foram plaqueadas em lamínulas de vidro. Para isso, as soluções de uso, tanto da poli-l-ornitina quanto da laminina, eram preparadas em concentrações mais altas (ambas foram preparadas a partir da diluição 1:100 do estoque). O restante do protocolo usado foi o mesmo.

3.3.5 Ensaio do multieletrodo (MEA – Axion Biosystems)

Para o ensaio do multieletrodo (Maestro, Axion Biosystems, Atlanta, GA, EUA), o preparo das placas foi feito diferentemente do que descrito para as placas de cultivo/lamínulas de vidro. Em primeiro lugar, ao invés de poli-l-ornitina, foi utilizado o agente catiônico PEI linear (*linear polyethylenimine*, 23966, Polysciences) a uma concentração de 1 mg/ml em PBS (pH 4.65, esterilizado por filtração usando uma seringa acoplada a filtro de 0,22 µM). 7,5 µl desta solução foram cuidadosamente aplicados sobre o eletrodo, localizado no centro de cada poço da placa de 48 wells (Axion M768-KAP-48), por meio de uma micropipeta de volume máximo de 10 µl (para facilitar esta etapa, as placas eram mantidas inclinadas a 45°, por meio de apoio em uma caixa de ponteiros, facilitando a localização visual dos eletrodos). No espaço entre poços, foi adicionada água estéril (para evitar que a gota de 7,5 µl secasse), e a placa foi incubada por cerca de 12 horas a 37 °C. Em seguida, os poços foram lavados com cerca de 500 µl de água ultra pura estéril (Life Technologies) por 3 vezes. Após a última lavagem, os poços foram cuidadosamente secos

(especialmente o eletrodo), com o auxílio de uma pipeta *pasteur*, mas de forma que esta não tocasse os eletrodos, evitando assim destacá-los/danificá-los. Em seguida, 7,5 µl de solução de laminina (diluição 1:100 a partir da solução estoque, em PBS) foi aplicada sobre os eletrodos, e a placa incubada a 37 °C por cerca de 12 horas. Imediatamente antes do plaqueamento das NPCs, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS, e as células foram imediatamente plaqueadas após o PBS da última lavagem ter sido aspirado (5×10^4 NPCs foram plaqueadas por poço, num volume total de 5 µl de NG+FGFb, aplicados em cima do eletrodo, de modo que as células se concentrassem somente nesta região). A placa foi cuidadosamente movida para a incubadora de células, e ali mantida por 40 minutos. Em seguida, foi cuidadosamente adicionado 200 µl de NG+FGFb à lateral de cada poço. Placa foi então retornada para a incubadora, e cerca de 16 horas depois, o meio foi trocado para meio de diferenciação neuronal (NG sem FGFb, com adição de *Rock inhibitor*) total de 500 µl por poço). Após dois dias, o meio foi trocado novamente (NG apenas), e por duas semanas, o meio foi trocado, cuidadosamente, 2 vezes por semana (cerca de 100 µl de meio eram deixados em cada poço durante estas trocas, de modo a evitar que as células ficassem completamente secas). Com duas semanas de diferenciação, o meio Neurobasal (21103-049, Life Technologies) suplementado com glutamax (final 2 mM) (35050-079, Life Technologies) e B-27 (final 1x, 17504-044, Life Technologies) passou a ser utilizado. As leituras da atividade neuronal foram feitas após 5 semanas de diferenciação (24 horas após troca do meio de cultura das células), no aparelho Maestro (Axion Biosystems), utilizando-se o software Axis 2.0 (Axion Biosystems). Os parâmetros utilizados para a leitura das placas foram: 3 minutos de gravação (iniciada 5 minutos após a placa de células ter sido posicionada no equipamento Maestro) à temperatura constante de 37 °C; modo “*Neuronal Broad Band*”; filtro de frequência 10 – 2500 Hz; a detecção de *spikes* foi feita utilizando o método “*Adaptive Threshold Crossing*” ($threshold = 5.5 \times Std\ Dev$); e o algoritmo usado para definir um *burst* foi “*Poisson Surprise*”, sendo que o valor definido como “surpresa mínima” foi 3. As leituras das placas foram realizadas no laboratório da pesquisadora Anne Bang (Instituto de pesquisa médica Sanford/Burnham, San Diego, CA, EUA).

3.3.6 Imunofluorescência

3.3.6.1 Caracterização Celular

Para os ensaios de imunofluorescência, as células plaqueadas em lamínulas foram lavadas com PBS, e fixadas com paraformaldeído 4% (em PBS) por 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, células foram lavadas 2 vezes com PBS, e permeabilizadas com 0,2% de TritonX 100 (Sigma-Aldrich) em PBS por 15 minutos, seguido de uma hora de bloqueio (2% BSA em PBS). Em seguida, células foram incubadas com anticorpo primário por aproximadamente 4 horas à temperatura ambiente em 2% BSA + 0,1% Tween 20 (Sigma-Aldrich) (em PBS), seguido de 3 lavagens com PBS + Tween 20 0,1%, antes da aplicação do anticorpo secundário (Alexa Fluor anti-coelho 555, anti-camundongo 488, e anti-galinha 647, *Life Technologies*, também em solução 2% BSA + 0,1% Tween 20), seguido de incubação por 1 hora à temperatura ambiente no escuro, e duas lavagens com PBS + 0,1% Tween 20, após a qual células foram incubadas, por 10 minutos no escuro, com DAPI (diluição 1:10.000 da solução estoque em PBS) (80051-386, Calbiochem, Millipore). Por fim, uma última lavagem com PBS foi realizada, e então, lamínulas foram vertidas (com ajuda de um fórceps) sobre 7,5 µl de solução de montagem (Prolong Gold Antifade, P36930, *Life Technologies*) em uma lâmina de vidro. Anticorpos primários usados para caracterização das iPSCs foram: Nanog (AF1997, R&D); TRA-1-60 (ab16288, Abcam), Oct4 (ab19857, Abcam) Sox2 (2748S, Cell Signalling) e Lin28 (ab46020, Abcam). Anticorpos usados para caracterização de NPCs foram: Nestin (MA1-46100, Thermo Scientific); e Musashi (EP1302, Abcam). Anticorpos para a caracterização de neurônios/astrócitos foram: Map2 (ab5392, Abcam), GFAP (Z0344, DAKO), CTIP2 (ab18465, Abcam), NeuN (ABN91, Millipore), V-Glut (135311, Synaptic Systems), Homer-1 (160003, Synaptic Systems) e Tuj-1 (01409, StemCell).

3.3.6.2 Contagem de *puncta*

Para os experimentos de *puncta*, $1,25 \times 10^5$ NPCs foram plaqueadas sobre lamínulas (posicionadas dentro de poços de multiwell de 24 poços), e dois dias depois, diferenciação neuronal foi iniciada. 5 semanas depois, células foram fixadas e preparadas para imunofluorescência (como descrito acima). Anticorpos usados foram: Map2 (ab5392, Abcam), Sinapsina I (AB1543p, Millipore) e PSD-95 (75-028, Neuromab). Preparações foram imageadas utilizando uma objetiva de 100X, utilizando a função Z-stack (9 fatias com 0,56 µM de intervalo

entre elas), e imagens adquiridas foram processadas pela função “projeção de intensidade máxima”, do software Zen Blue, e *Puncta* (co-localização de sinapsina I com PSD-95 por 50 μ M de filamento [Map2-positivo]) contados visualmente.

3.3.6.3 Análise de morte celular por caspase-3 ativa e TUNEL

NPCs foram transduzidas com lentivírus portando a sequência do GFP (proteína fluorescente verde, *green fluorescent protein*) sob regulação do promotor do gene *sinapsina I* (expresso exclusivamente em neurônios) (MARCHETTO et al., 2010). Estas células foram subcultivadas, e diferenciação neuronal iniciada. Com 3 semanas de diferenciação, células foram dissociadas seguindo o seguinte protocolo: meio de cultura foi aspirado, e células incubadas com PBS por 5 minutos na incubadora. Em seguida, 3 ml de solução de accutase (suplementada com DNase [Roche, 04 716 728 001], diluição 1:1.000 do estoque) foi adicionada por placa de 100 mm (Corning), e células incubadas com essa solução por 30 minutos a 37 °C (a cada 5 minutos, as placas eram movimentadas para assegurar a distribuição homogênea da solução de dissociação sobre toda a placa). Após esse período, a dissociação da rede de neurônios foi continuada cuidadosa- e lentamente com a ajuda de uma micropipeta de 1.000 μ l, através da aspiração e liberação das células por cerca de 10 vezes. Em seguida, células foram lavadas com 10 ml de tampão de lavagem (2,5 μ M de EDTA, 20 mM de HEPES e 1% μ l de SFB em PBS), passadas por uma malha de 40 μ M (352340, BD Biosciences), centrifugadas (1.200 RPM, 4 minutos), ressuspendidas em NG, e células positivas para GFP foram separadas por meio de *FACS-sorting* (*fluorescence-assisted cell sorting*) (BD Influx Sorter, BD Biosciences), e 10×10^4 células plaqueadas por poço de *multiwell* de 96 poços com fundo de vidro, na presença de Rock Inhibitor (5 μ M, R&D Systems), BDNF (20 ng/ml, 45002, Peprotech) e GDNF (20 ng/ml, 45010, Peprotech). Células foram fixadas 4 dias após o plaqueamento, e a marcação de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*, C10619, Life Technologies), a qual evidencia a presença de quebras no DNA (usado como marcador para apoptose) foi realizada seguindo as instruções do fabricante. Além disso, a marcação com anticorpo primário para caspase-3 ativada (5A1E, Cell Signaling) também foi feita, seguido de marcação com anticorpo secundário anti-coelho 555 (Alexa Fluor, Life Technologies), e da marcação do DNA com DAPI (como explicado anteriormente). Células foram, então, analisadas sob um microscópio de fluorescência Zeiss

Apotome, na objetiva de 60X, e células positivas para TUNEL ou caspase-3 contadas (e normalizadas para o total de células, ou seja, positivas para DAPI).

3.3.7 Reprogramação Celular

Os fibroblastos derivados de pessoas não afetadas (GM00969, 5461 e W83) e de afetadas (GM00739, GM10903 e AG06244) foram reprogramados para o estágio de pluripotência por meio da expressão de Sox2, Nanog, Klf4 e c-myc através de transdução viral. Todos os fibroblastos foram reprogramados utilizando-se de vírus não-integrativos (*Sendai Virus*, *CytoTune®-iPS Kit*, *Life Technologies*). O protocolo usado foi baseado nas recomendações do fabricante, porém, com muitas modificações, as quais encontram-se detalhadas a seguir. Os fibroblastos W83 foram os únicos reprogramados por meio de retrovírus, e a caracterização das iPSCs, NPCs e neurônios derivados deste Fibroblastos derivados de indivíduo aparentemente sadio encontram-se descritos em manuscrito em preparação por pesquisadores do grupo do Professor Alysson Muotri, bem como na patente WIPO *Patent Application* WO/2013/163455).

Dia 1: Aproximadamente 2×10^5 fibroblastos foram plaqueados em placas de 35 mm, em meio de cultura para fibroblastos.

Dia 2: O kit de reprogramação *CytoTune®-iPS Kit* foi descongelado no gelo, e após completamente descongelado, os 4 Eppendorfs foram centrifugados brevemente, para coletar possíveis resíduos de vírus presentes na tampa do tubo. Em seguida, o conteúdo dos 4 tubos (100 µl de preparação viral por tubo, sendo que cada tubo correspondia a um vírus responsável por promover a expressão de um dos fatores de Yamanaka) foi misturado em um único tubo. Essa mistura foi, então, adicionada à um falcon contendo DMEM suplementado com 5% de SFB, na ausência de antibióticos, perfazendo um total de 5 ml de meio + vírus. Em seguida, o meio dos fibroblastos foi aspirado com o auxílio de uma pipeta *pasteur*, e 1 ml do meio + vírus adicionado a cada uma das cinco placas nas quais os diferentes fibroblastos encontravam-se plaqueados. (nota: apesar de um kit *CytoTune®-iPS* ser designado para uma reprogramação, de acordo com instruções do fabricante, o kit foi usado para cinco).

OBS: os tubos *Eppendorfs* que continham a preparação viral foram descontaminados com hipoclorito 10% (por 20 minutos) antes de terem sido descartados no lixo hospitalar (seguindo as normas da Universidade da Califórnia San Diego para descarte deste tipo de material).

Dia 3: Meio contendo vírus foi descartado em falcon com hipoclorito 10% (somente após 20 minutos de descontaminação este meio foi aspirado com auxílio de uma pipeta *pasteur* e descartado como meio de cultura “normal”), e meio DMEM 10% (sem antibióticos) foi adicionado.

Dia 4: 2 *vials* de células MEF (*mouse embryonic fibroblasts*) tratadas com mitomicina-C (GSC-6001M, *Globalstem*, Miami Lakes, FL, EUA) foram descongelados (seguindo instruções para descongelamento de fibroblastos, como descrito anteriormente), e células foram, então, ressuspensas em meio DMEM:F12 50:50 (Cell Gro, Corning) contendo 10% de SFB. (nota: DMEM pode ser usado ao invés de DMEM:F12). A quantidade de células contidas em 2 *vials* foi dividida entre 10 placas de 100 mm.

Dia 4: Sinais de toxicidade, como células no sobrenadante, bem como alteração da morfologia celular (razão núcleo:citoplasma alta) foram observados nos fibroblastos que haviam sido transduzidos com o kit *CytoTune®-iPS*. Estas células foram, então, lavadas com PBS, e 0,5 ml de *Tryple Express* (*Life Technologies*) foi adicionado a cada placa. Cerca de 5-10 minutos depois, a reação foi neutralizada com meio de cultivo de fibroblastos, e células foram, então, concentradas por centrifugação (1.200 RPM, por 3 minutos). Estas células foram ressuspensas em meio de cultivo de fibroblastos, e divididas entre duas placas de 100 mm contendo as MEFs (cujo meio de cultura havia sido previamente aspirado com auxílio de uma *pasteur*).

Dia 5: Meio das células co-cultivadas (fibroblastos humanos + MEFs) foi trocado para 12 ml de meio de cultivo de células-tronco (meio HUES), o qual é preparado pela mistura de: 316 ml de DMEM:F12 50:50 + 80 ml de *knockout serum replacement* (KSR, 10828028, *Life Technologies*) + 4 ml de aminoácidos não essenciais (45000-700, *Life Technologies*) + 800 µl de 2-mercaptoetanol (21985023, *Life Technologies*), seguido de filtração (0,22 µM). Este meio foi mantido a 4 °C, e imediatamente antes do meio ser adicionado às células, FGFb foi adicionado à uma concentração final de 30 ng/ml.

Dia 6: Do dia 6 ao dia 10, o meio foi trocado diariamente (12 ml de meio HUES suplementado com FGFb e VPA [*valproic acid*, Sigma-Aldrich, concentração final: 100 μ M]). (nota: VPA é preparado através da dissolução do pó em água ultra pura, à uma concentração estoque de 500 mM; este é então filtrado, aliquotado, e armazenado a -20 °C; cada alíquota descongelada é usada, e o que sobrou é descartado).

OBS 1: No dia 9, descongelar novos *vials* de MEFs, como descrito no “dia 4”. O motivo é que estas células MEFs, após 6 dias em cultura, tem uma queda drástica na produção dos fatores da matriz extracelular (como fibronectina, colágeno e laminina), os quais são necessários para dar suporte ao crescimento das células-tronco pluripotentes (VILLA-DIAZ et al., 2009). Este novo conjunto de MEFs descongelada no dia 9 irá ser responsável por produzir meio condicionado (contendo os fatores da matriz extracelular em questão), e por isso, foi chamada de MEF-CM (de *conditioned media*)

OBS 2: No dia 10, adicionar meio HUES (SEM FGFb) ao conjunto de placas da MEF-CM descongelada no dia 9 (12 ml de meio por placa).

Dia 11: i) passar o meio das placas MEF-CM para falcons de 50 ml (será chamado de meio CM);

ii) colocar meio HUES nas placas de MEF-CM;

iii) adicionar FGFb ao meio CM (concentração final de 30 ng/ml);

iv) aspirar o meio do conjunto de placas que contém as células sendo reprogramadas plaqueadas sobre o primeiro conjunto de MEFs (descongeladas no dia 4), e adicionar 12 ml do meio CM suplementado com FGFb por placa.

OBS 1: Do dia 12 até o dia 16, os passos do dia 11 foram repetidos (durante este período, sinais de toxicidade foram observados, inclusive nas células MEF)

OBS 2: No dia 15, um novo conjunto de MEFs foi descongelado (conforme descrito no “dia 4”). Após a coleta do meio condicionado das placas de MEF-CM, estas células foram descartadas.

Dia 16: lavar placas contendo fibroblastos sendo reprogramados + MEFs descongeladas no primeiro dia com PBS, e incubar nesta solução por 5 minutos na incubadora. Após esse período, colocar meio de cultura HUES (suplementado com FGFb), e com a ajuda de um *cell lifter*, destacar aproximadamente metade das células de cada placa, e movê-las (cuidadosamente com uma pipeta, evitando muitos movimentos de “puxar e soltar” o meio) para a nova placa de MEFs que foram descongeladas no dia 15. Este processo foi feito pois as MEFs descongeladas no dia 4 já estavam com uma morfologia de células sofridas, além da placa estar muito cheia de células, e o meio ficando amarelo (ácido) muito rápido.

OBS: do dia 17 ao dia 22, trocar o meio (meio HUES com FGFb). No dia 21, descongelar nova leva de MEFs. No dia 22, adicionar meio HUES sem FGFb a esta nova leva de MEFs.

OBS 3: do dia 22 ao dia 28, usar meio condicionado (como descrito no dia 11). Durante este período, foi observado o aparecimento de colônias de iPSCs sob um microscópio EVOs. Estas foram, então, movidas para placas de 35 mm pré-tratadas com matrigel (como descrito anteriormente), de modo que uma colônia de iPSCs foi movida para uma placa, possibilitando, assim, o isolamento de clones (os quais apareceram bem isolados uns dos outros durante a reprogramação). Para movê-las, pedaços da colônia foram destacados com o auxílio de uma ponteira de 20 µL acoplada à respectiva micropipeta, e sob o microscópio EVOs, dentro da cabine de fluxo laminar (destaca-se um pedaço da colônia, e imediatamente, ela é aspirada com ajuda da micropipeta, e movida para uma placa pré-tratada com matrigel [sem a presença de MEFs], e contendo mTeSR-1). Repete-se esta etapa até que toda a colônia tenha sido transferida, em pedaços, para a placa de matrigel. A partir daí, o cultivo das iPSCs segue as instruções descritas no início desta sessão.

OBS 4: se até o dia 27 colônias de iPSCs não tiverem aparecido, repetir os procedimentos de preparação e cultivo com meio condicionado, até que colônias possam ser isoladas.

Na figura 24, imagens representativas das células em cinco dias (dias 2, 5, 10, 15 e 22) do processo de reprogramação.

Figura 24 - Alterações morfológicas dos fibroblastos observadas durante o processo de reprogramação celular. Imagens representativas das alterações morfológicas (observadas sob uma objetiva de 4X no microscópio EVOs) nos dias 2, 5, 10, 15 e 22 do processo de reprogramação (descrição de cada um desses dias encontra-se no tópico “Reprogramação celular” da sessão “Material & Métodos”. Seta vermelha no dia 22 evidencia uma colônia de iPSCs rodeada por células MEF e outras células sem a morfologia característica de uma colônia de iPSCs.

3.3.8 Diferenciação de iPSCs em NPCs

Para a obtenção de neurônios, foi utilizado um protocolo que envolve a diferenciação das iPSCs em NPCs, passando pelos estágios de corpos embrióides (EBs) e roseta (MARCHETTO et al., 2010). Detalhes do protocolo encontram-se abaixo.

Dia 1: células iPSCs cultivadas por aproximadamente 8-10 dias (após sub-cultivo) tiveram seu meio de cultura (mTeSR-1) substituído por meio N2 (DMEM:12 50:50 + N2 [1x, 17502-048, *Life Technologies*] + antibióticos [1%, *Life Technologies*]) suplementado com dorsomorfina (final 1 μ M, Tocris) + SB431542 (final 10 μ M, Stemgent).

Dia 2: Meio de cultura foi aspirado com auxílio de uma pipeta *pasteur*, e meio N2 suplementado com dorsomorfina e SB431542 foi novamente adicionado.

Dia 3: Células foram incubadas com PBS por 5 minutos, e com o auxílio de uma agulha de insulina, foram cortadas (atenção foi prestada para que os cortes não resultassem na divisão das colônias em pedaços muito pequenos). Em seguida, PBS foi removido, e 3 ml de meio N2 (suplementado com 1 μ M dorsomorfina, 10 μ M SB431542 e 5 μ M de *Rock Inhibitor*) foi adicionado. Com o auxílio do *cell lifter*, colônias foram destacadas da placa, aspiradas com uma pipeta de 5 ml, e liberadas novamente na placa com o bico da pipeta pressionado contra o fundo da placa. Desta maneira, os pedaços de colônias grandes foram quebrados (novamente, cuidado para que os pedaços de colônias não sejam totalmente desfeitos, mas sim, apenas reduzidos a pedaços pequenos). Em seguida, o conteúdo de células derivados de uma placa de 60 mm foi transferido para um poço de uma *multiwell* de 6 poços, e *imediatamente* colocado sobre uma plataforma (*shaker*) a 90 RPM, a 37 °C e 5% de CO₂.

Dia 4: Foi observada a formação de pequenas esferas. No entanto, também foi possível notar o meio turvo, resultante da presença de muitas células mortas. Por isso, o meio foi trocado. Para isso, a placa foi movimentada manualmente, em círculos, dentro da cabine de fluxo laminar, até que as esferas ficassem concentradas no meio do poço. Em seguida, a pipeta *pasteur* (acoplada a um sistema de vácuo) foi cuidadosamente utilizada para sugar o meio de cultura pelas extremidades do poço, de maneira que as esferas não fossem aspiradas. Em seguida, meio N2 +

dorsomorfina + SB431542, sem *Rock Inhibitor* foi adicionado (3 ml por poço), e placa foi novamente posicionada sobre o shaker.

Dia 6: Foi repetida a etapa realizada no dia 4.

Dia 8: Meio de cultura contendo esferas foram movidas para um falcon de 15 ml, e precipitadas no fundo deste por ação da gravidade. Em seguida, meio foi aspirado com ajuda de uma pipeta *pasteur*, e meio NG suplementado com FGFb foi adicionado. Com o auxílio de uma micropipeta de 1.000 µl, esferas grandes foram reduzidas a pedaços menores através do posicionamento da ponteira no fundo do falcon, seguido da liberação do meio de cultura contendo esferas. Atenção foi prestada para que as esferas não fossem completamente dissociadas. Em seguida, estas foram movidas para uma placa de 60 mm (ou dividida entre 2 – 3 placas, dependendo da quantidade de esferas formadas) pré-tratadas com matrigel, e em seguida, movidas para dentro da incubadora.

Dia 9 e 11: Meio das placas contendo EBs plaqueadas foi trocado (NG+FGFb).

Dia 13: Placas foram lavadas com PBS, e meio NG + FGFb adicionado novamente. Em seguida, a formação de rosetas foi observada sob um microscópio EVOs. Estas foram, então, destacadas manualmente (com o auxílio de uma ponteira de 200 µl), e após a quantidade desejada de rosetas ter sido coletada, estas foram transferidas para uma outra placa pré-tratada com matrigel. Nesta etapa, as rosetas foram destacadas pelas suas bordas, evitando que fossem quebradas em pedaços menores, permitindo que pudessem ser destacadas integralmente.

Dia 14: Meio das placas contendo rosetas plaqueadas foi trocado (NG+FGFb).

Dia 16: Placas foram lavadas com PBS, e meio NG + FGFb adicionado novamente. Em seguida, a presença de rosetas foi observada, mais uma vez, sob um microscópio EVOs. Estas foram, então, destacadas manualmente (com o auxílio de uma ponteira de 200 µl), e após a quantidade desejada de rosetas ter sido coletada, estas foram transferidas para um falcon de 15 ml, e precipitadas por ação da gravidade. Em seguida, foram lavadas com PBS, e 200 µl de Accutase foi adicionado às rosetas. Estas foram incubadas a 37°C por 10 minutos, quando 1 ml de NG+FGFb foi adicionado e, com o auxílio de uma micropipeta de 1.000 µl, rosetas foram

dissociadas em células (NPCs) isoladas. Em seguida, estas foram concentradas por centrifugação (1.200 RPM por 3 minutos), ressuspensas em meio NG + FGFb, e transferidas para uma placa pré-tratada com poli-l-ornitina e laminina.

Na figura 25, imagens são mostradas acerca dos aspectos macro- e microscópicos das células nos diferentes estágios da diferenciação de iPSCs até NPCs.

Figura 25 - Aspectos macro- e microscópicos das células durante a diferenciação de iPSCs até NPCs.

3.3.9 Extração de RNA, microarray e sequenciamento do RNA (RNAseq)

Para o microarray, culturas de iPSCs foram incubadas com PBS por 5 minutos a 37 °C, e em seguida, destacadas da placa com o auxílio do *cell lifter* (148-16759-P5, Spectrum, Washington, EUA), e concentradas por centrifugação (1.200 RPM por 3 minutos). Em seguida, PBS foi aspirado com ajuda de uma pipeta *pasteur*, e o precipitado de células foi colocado em gelo seco e transportado para um freezer -80 °C, onde foi armazenado. Para o sequenciamento do RNA (RNAseq) dos neurônios, cultura de células neurais (cujas NPCs já haviam sido previamente transduzidas com o lentivírus *sinapsina I::GFP*), ao completarem 5 semanas de diferenciação, foram dissociadas e células positivas para GFP foram separadas (por *FACS-sorting*, como descrito anteriormente) e coletadas. No entanto, ao invés de serem replaqueadas, elas foram imediatamente centrifugadas (1.200 RPM por 4 minutos), o pellet lavado com PBS, movido

para um tubo *Eppendorf* de 1,5 ml, re-centrifugado, e após o PBS ser removido com a ajuda de uma pipeta *pasteur*, o precipitado de células foi colocado em gelo seco, e transportado para um freezer -80°C, onde foi armazenado.

O RNA de todos os pellets foi extraído através do uso do Trizol (15596018, *Life Technologies*), seguindo as instruções do fabricante. Para a análise do RNA das iPSCs por *microarray*, foi usado o *Gene Chip Human Gene 1.0 ST Array* (Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA), e as análises foram realizadas no *Functional Genomics Core* do Instituto Salk (San Diego, CA, EUA). Já o RNA dos neurônios foi sequenciado no Instituto Scripps de pesquisa (San Diego, CA, EUA), no *Next Generation Sequencing Core* (mínimo de 40 milhões de leituras alinhadas do tipo “paired-end”, sendo que cada uma apresentava 100 nucleotídeos de comprimento). Os dados gerados (*microarray* e RNAseq) foram processados e analisados pelo Professor Roberto Hirochi Herai (Professor assistente da Pontifícia Universidade Católica do Paraná). Para a análise de vias (conjunto de genes), foi utilizado o software *Ingenuity* (<http://www.ingenuity.com/products/ipa>).

3.3.10 Reação de PCR

A detecção da expressão dos genes Oct4, Sox2, AFP, MSX1 e PAX6 foi feita por PCR. Após extração do RNA, 2 µg de RNA foram usados na reação de transcrição reversa (RT), seguindo recomendações do fabricante (*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*, 4368814, *Life Technologies*). Em seguida, o produto da reação da RT foi diluído 1:10, e 1 µl deste foi usado na reação de PCR, seguindo os parâmetros: 94 °C/2 minutos; 94 °C/15 segundos + 60 °C/30 segundos + 72 °C/30 segundos repetido 28 vezes; 4 °C. Os primers usados foram: Oct4 For: GGGAGGGGAGGAGCTAGG, Oct4 Rev: TCCAACCAAGTTGCCCCAAAC; NANOG For: CCTATGCCTGTGATTTGTGG, NANOG Rev: CTGGGACCTTGTCTTCCTTT; AFP For: AAAAGCCCACTCCAGCATC, AFP Rev: CAGACAATCCAGCACATCTC; MSX1 For: AGGACCCCGTGGATGCAGAG; MSX1 Rev: GGCCATCTTCAGCTTCTCCAG; PAX6 For: CCCATTATCCAGATGTGTTTGC; PAX6 Rev: TGGTGAAGCTGGGCATAGGC.

3.3.11 Expressão da proteína GFP sob controle do promotor do gene *sinapsina I*

Células HEK293FT foram crescidas em DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de Glutamax, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de piruvato de sódio, e 1% de antibióticos/antimicóticos (Life Technologies) até atingirem aproximadamente 95-100% de confluência em uma placa de 150 mm de diâmetro (*Techno Plastic Products*), para serem então divididas em 5 placas de 150 mm, com ajuda do reagente de dissociação Tryple Express (12604-013, *Life Technologies*). No dia seguinte, foi preparado um mix dos seguintes plasmídeos para produção de lentivírus: pMDL (8,1 µg), RevRSV (3,1 µg), VSV-G (4,1 µg) e um plasmídeo recombinante para expressão de EGFP sob controle do promotor do gene da *sinapsina I*, junto de 110 µl de solução estoque de PEI linear (*linear polyethylenimine*, 23966, Polysciences, Inc, Warrington, PA, EUA) 1 mg/ml em PBS (pH 4,65, esterilizado por filtração usando uma seringa acoplada a filtro de 0,22 µm), num volume final de 500 µl (em DMEM sem SFB). A mistura de plasmídeos e PEI linear foi brevemente vortexada, e mantida à temperatura ambiente por 10 minutos, antes de ser distribuída (gotejada) sobre uma placa de 150 mm de células HEK293FT aproximadamente 70% confluentes. No dia seguinte, o meio foi trocado para 22 ml de meio de cultura de HEK293FT suplementado com 5% de SFB. 48 horas depois, o sobrenadante foi coletado, filtrado (0,22 µm), e ultracentrifugado (19.400 RPM, por 2 horas, a 8 °C). Em seguida, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado (vertido) em um frasco contendo hipoclorito (10%), e 100 µl de DMEM foi adicionado cuidadosamente à lateral do tubo de ultracentrifugação contendo o precipitado de vírus. O tubo contendo vírus foi armazenado dentro de um tubo falcon de 50 ml (Nunc), fechado, e colocado a 4 °C por cerca de 16 horas. No dia seguinte, o precipitado foi cuidadosamente ressuspensionado com ajuda de uma pipeta de 200 µl, misturado com meio de DMEM, distribuído entre criotubos (100 µl por tubo, sendo que cada 100 µl continha vírus produzido por 2 placas de 150 mm de HEK293FT), e congelados com o auxílio de caixa de congelamento *Mr. Frosty* (Thermo Fisher Scientific). NPCs foram transduzidas por essa preparação viral (um vial foi usado para transduzir 2 placas de 100 mm contendo NPCs a aproximadamente 60-70% de confluência).

3.4 Resultados

3.4.1 Reprogramação celular e caracterização das iPSCs

A reprogramação dos fibroblastos encontra-se descrita detalhadamente na seção “Material & Métodos”. Resumidamente, fibroblastos foram transduzidos com vetores virais não integrativos (*Sendai Virus*, *CytoTune®-iPS Kit*, *Life Technologies*), visando a expressão dos fatores de Yamanaka (Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc). O aparecimento de colônias iPSCs para os diferentes fibroblastos usados se deu em torno da quarta semana após a transdução viral, e cerca de quatro a cinco clones de cada linhagem reprogramada foram isolados, amplificados e congelados. Destes, dois clones (C1 e C2) de cada linhagem foram caracterizados e usados nas análises que serão apresentadas a seguir. O fibroblasto W83 foi o único não reprogramado por essa metodologia (sendo utilizados vetores retrovirais neste caso). Isso se deve ao fato deste fibroblasto (que foi adicionado posteriormente ao conjunto de células usadas neste trabalho) ter sido reprogramado por Cassiano Carromeu, então membro do laboratório do Professor Alysson Muotri (*WIPO Patent Application WO/2013/163455*).

A caracterização das iPSCs foi feita por meio da análise (por imunofluorescência) da expressão dos marcadores associados à pluripotência, Lin28, Octa4 e SSEA4 (imagem representativa de todas as linhagens são mostradas na figura 26A). Em seguida, analisamos, por PCR, a expressão dos genes Oct4 e Sox2 (figura 26B). Como controle negativo (ausência da expressão de marcadores de pluripotência), bem como positivo (expressão destes marcadores), utilizamos RNA derivado de fibroblastos (AG06244) e de células-tronco embrionárias (H1), respectivamente. Resultados mostram que todas as iPSCs (C1 e C2) derivadas dos fibroblastos GM00969, 5461, AG06244 e GM00739 expressam marcadores de pluripotência. A capacidade destas células de expressarem genes característicos de cada um dos três tecidos germinativos (endoderme, mesoderme e ectoderme) também foi analisado por PCR (figura 26C). Basicamente, iPSCs foram diferenciadas em corpos embrióides, ou EBs, com modificações em relação à metodologia descrita na seção “Material & Métodos”. Ao invés dos inibidores dorsomorfina e SB431542, foi adicionado SFB (10%), e células foram mantidas em diferenciação por 2 semanas

no *shaker* (meio de cultura era trocado a cada 3 dias). Desta forma, na ausência de FGFb (essencial para manutenção das células no estado pluripotente), de dorsomorfina e SB431542 (limitam diferenciação das células para ectoderme) e na presença de SFB (composto por diversos fatores que promovem diferenciação celular), as iPSCs puderam ativar vias de diferenciação relacionadas a qualquer tecido germinativo, e este potencial (pluripotência) foi analisado por PCR. Desta forma, notamos que o marcador de pluripotência Oct4 estava presente nas iPSCs cultivadas em meio de cultura para células-tronco (mTeSR-1), mas não nas EBs formadas por este protocolo. Já a expressão de genes característicos da endoderme (AFP), mesoderme (MSX1), e ectoderme (PAX6) foi detectada nas EBs, mas não nas iPSCs. Assim, estes resultados sugerem que as células resultantes da reprogramação celular são capazes de se diferenciar em células dos três tecidos germinativos. Em seguida, foi analisado o perfil transcricional global (ou geral) das iPSCs, comparando-as, novamente, com o fibroblasto AG06244, e com as células-tronco embrionárias H1 e Hues6 (H6). Para isso, o RNA extraído destas células foi analisado por *microarray* (especificações encontram-se na seção “Material & Métodos”). Resultados mostram que as iPSCs apresentam um perfil transcricional mais próximo daquele apresentado pelas ESCs, do que do fibroblasto (figura 26D). Ao analisar especificamente a expressão de genes/isoformas relacionado(a)s à pluripotência, foi possível observar um perfil muito semelhante ao do padrão global, no qual fibroblastos estão mais distantes de ESCs e iPSCs, as quais constituem um grupo-irmão (figura 26E). Por fim, o cariótipo das células foi analisado, mostrando que nenhuma aberração cromossômica evidente estava presente (figura 26F) (a figura de um clone de cada linhagem foi mostrado).

Figura 26 - Geração e caracterização de iPSCs de pacientes CS. (A) Detecção, por imunofluorescência, de marcadores de pluripotência (Lin28, Oct4 e SSEA4) no clone 1 (C1) das iPSCs derivada do fibroblasto

GM00969. (B) Análise da expressão dos genes Oct4 e Sox2 (GAPDH é usado como controle) em fibroblastos AG06244, ESCs (H1) e nas iPSCs derivadas dos fibroblastos GM00969, 5461 (ambos derivados de pessoas não afetadas [NA] pela síndrome de *Cockayne*), AG06244 e GM00739 (ambos afetados). (C) Expressão dos genes AFP, MSX1 e PAX6 (característicos dos tecidos germinativos endoderme, mesoderme e ectoderme, respectivamente) em iPSCs e em EBs (corpos embrióides). Análise, por microarray, do perfil geral da expressão gênica (D), bem como apenas de genes característicos de células pluripotentes (E) em fibroblastos AG06244, ESCs (H1 e H6), e nas iPSCs geradas neste trabalho. (F) Imagens do cariótipo das iPSCs (apenas um clone de cada linhagem foi representado).

3.4.2 Maior expressão de *TXNIP* em iPSCs de pacientes CS

Nosso grupo foi o pioneiro na obtenção de iPSCs de paciente (GM10903) com mutação no gene *CSB* (ANDRADE et al., 2012). Neste trabalho, Andrade e colaboradores notaram, por *microarray*, que estas iPSCs expressavam altos níveis de *TXNIP*, e isto foi sugerido como um possível mecanismo para explicar o aumento do estresse oxidativo observado em células desses pacientes (ANDRADE et al., 2012; PASCUCCI et al., 2012; SCHEIBYE-KNUDSEN et al., 2012). Assim, analisamos a expressão relativa deste gene nas iPSCs derivadas dos pacientes AG06244 e GM00739 em relação às ESCs e também às iPSCs controle, e notamos que as células de ambos os pacientes apresentavam aumento da expressão de *TXNIP* (figura 27). Assim, resultados sugerem que aumento da expressão de *TXNIP* é, de fato, uma característica de iPSCs de pacientes CS.

Figura 27 - Elevada expressão de TXNIP em iPSCs de pacientes CS. Gráficos mostram a média dos valores da expressão de TXNIP dos dois clones (C1 e C2) de cada paciente (AG06244 e GM00739) (normalizados para a expressão total de cada um deles), relativo à média da expressão de TXNIP nos clones 1, 2 e 3 de ambas H1 e Hues6 (vs. ESCs), ou relativo à média da expressão de TXNIP dos dois clones (1 e 2) das iPSCs GM00969 e 5461 (não afetados).

3.4.3 Diferenciação neural

Em seguida, realizou-se a diferenciação das iPSCs em células neurais. Para isso, utilizamos um protocolo estabelecido pelo grupo do Professor Alysson (MARCHETTO et al., 2010), o qual baseia-se no uso de inibidores (dorsomorfina, SB431542 e *Rock Inhibitor*), remoção e adição de FGFb em períodos específicos, além da dissociação manual das células em diferentes etapas (maiores detalhes podem ser observados na seção “Material & Métodos”). Após a dissociação das rosetas, obtivemos células individualizadas cuja população foi denominada de células precursoras neurais, ou NPCs. Esta população de células é assim chamada por conter tanto células-tronco neurais (multipotente, com capacidade de proliferação indefinida e de auto renovação), quanto células progenitoras neurais (que se distinguem da anterior por apresentarem capacidade proliferativa limitada) (SOHUR et al., 2006). A expressão de Musashi1, Nestin e Sox2 (marcadores comumente empregados na caracterização destas células (TIAN et al., 2013) foi analisada por imunofluorescência, e resultados mostraram que essas células eram

positivas para os três marcadores (imagem representativa de todas as linhagens é mostrada na figura 28).

Figura 28 - Caracterização de NPCs derivadas de iPSCs. A expressão dos marcadores Musashi1, Nestin e Sox2 nas NPCs derivadas do clone 1 de iPSCs derivadas do paciente AG06244 foi analisada por imunofluorescência. Campos individuais para cada marcador são mostrados, e na última coluna, a fusão de todos os canais junto de DAPI (azul, marcação do DNA).

Tendo obtido as NPCs, o próximo passo foi a diferenciação destas células em neurônios. Para isso, FGFb (que estimula proliferação celular e inibe diferenciação) foi removido, e células cultivadas por 5 semanas sob esta condição (mais detalhes na seção “Material & Métodos”). Em seguida, uma caracterização das células foi feita por imunofluorescência, onde os marcadores Map2, Tuj1 e GFAP foram usados. Os dois primeiros evidenciam a presença de neurônios na cultura, enquanto que o terceiro é específico para astrócitos. Como pode ser observado na figura 29, as NPCs obtidas de todas as linhagens são capazes de originar neurônios e astrócitos.

Figura 29 - Neurônios de pacientes CS. Imunofluorescência de neurônios derivados de pacientes CS evidenciam a presença de neurônios (MAP2 e Tuj1, branco e verde, respectivamente) bem como de astrócitos (GFAP, vermelho). DAPI (azul) é usado para marcar o núcleo das células. CS: neurônios derivados de pacientes; NA: neurônios derivados de indivíduos não afetados.

3.4.4 Neurônios CS apresentam menor densidade de puncta sináptica

Uma análise que vem sendo comumente empregada em neurônios derivados de iPSCs é a densidade de *puncta* sináptica. Esta análise baseia-se na contagem, por imunofluorescência, da quantidade de pontos (proteínas da sinapse) ao longo do filamento neuronal (evidenciado por Map2 ou Tuj1, por exemplo). O fato de uma redução da densidade de *puncta* sináptica ter sido descrita em alguns modelos de doenças neurodegenerativas/neurodesenvolvimento, como Alzheimer, autismo e esclerose lateral amiotrófica (BUTTINI et al., 2005; LIU et al., 2012; MARCHETTO et al., 2010), sugere que este é um mecanismo geral em neurônios disfuncionais e/ou pouco desenvolvidos. Assim, decidimos investigar a quantidade de puncta em neurônios de pacientes CS. No nosso caso, definimos *puncta* como sendo a co-localização de sinapsina I (proteína pré-sináptica) com PSD-95 (pós-sináptica) sobre o filamento neural (Map2). Os resultados são apresentados de duas maneiras: dados obtidos de cada linhagem analisada (média de todas as contagens dos diferentes experimentos $\pm$ erro padrão da média) (figura 30B), ou um gráfico comparativo entre os grupos “não afetados” *versus* “afetados” (média de todas as contagens dos diferentes experimentos $\pm$ erro padrão da média) (figura 30C). Como pode ser

observado na figura 30, notamos uma redução na densidade de *puncta* nos neurônios de todos os pacientes analisados (GM00739, GM10903 e AG06244), quando comparados com os neurônios de indivíduos não afetados (GM00969, 5461 e W83). É importante notar, no entanto, que quando analisados individualmente, a única linhagem de “não afetados” que não apresenta diferença estatisticamente significativa em relação às linhagens AG06244 C1, GM00739 C2, e GM10903 C2, é a 5461C2 (análise *One-way ANOVA*, seguida do pós-teste Bonferroni). Esta é, também, a linhagem não afetada com menor quantidade de *puncta* analisados. Logo, é possível que com a realização de mais experimentos, a diferença torne-se mais evidente para esta linhagem também, mesmo embora a média assemelhe-se a das outras linhagens não afetadas. Com exceção desta linhagem controle, todas as outras apresentam diferença estatisticamente significativa em relação a todas as linhagens afetadas, mas não entre si (o mesmo vale para as linhagens afetadas, que não diferem estatisticamente entre si).

Figura 30 - Neurônios CS apresentam menor densidade de puncta sináptica. (A) Figura ilustrativa evidenciando menor quantidade de puncta (sinapsina I + PSD-95) por filamento (Map2) nos neurônios de pacientes (NA=Não afetado=GM00969; AF [afetado] 1=AG06244; AF2=GM00739). (B) Contagem do total de puncta por 50 μ M de filamento. Dados mostram a contagem de dois experimentos independentes (GM00969 C2, W83 C1, 5461 C1, AG06244 C2, GM10903 C1) ou de um experimento (5461 C2, AG06244 C1, GM00739 C1, GM00739 C2, GM10903 C2). O número de *puncta* contado por linhagem está indicado em “Nº de *puncta*”. (C) Representação em gráfico de barras da média $\pm$ erro padrão da média da contagem de *puncta* (“não afetado” é composto pelas médias de cada uma das linhagens não afetadas, enquanto que “afetados” é composto pelas médias de cada uma das linhagens afetadas). Foi utilizado o teste estatístico *t*-test não pareado (*** $p < 0,001$).

Adicionalmente, analisamos somente a quantidade de sinapsina I por filamento. Resultados indicam que a quantidade de pontos por filamento é menor nas células de pacientes (figura 31A & B).

Figura 31 - Neurônios CS apresentam menor densidade de *sinapsina I* por filamento. (A) Contagem do total de *sinapsina I* por 50 μ M de filamento. O número de *sinapsina I* contado por linhagem está indicado em “N° de puncta”. (B) Representação em gráfico de barras da média $\pm$ erro padrão da média da contagem de puncta (“não afetado” é composto pelas médias de cada uma das linhagens não afetadas, enquanto que “afetados” é composto pelas médias de cada uma das linhagens afetadas). Foi utilizado o teste estatístico *t-test* não pareado ($p < 0,001$).**

3.4.5 Neurônios CS disparam em aparente menor sincronia

Tendo em vista os resultados acerca do número de *puncta*, decidimos investigar a comunicação entre os neurônios. Para isso, utilizamos o aparelho *Maestro*, da companhia *Axion Biosystems*, no qual, por meio do cultivo dos neurônios sobre multieletródos, foi possível medir a atividade (disparos de potencial de ação, ou “*spikes*”) destes. A técnica baseia-se na capacidade que o multieletródo (MEA) tem de detectar mudanças no potencial de campo, ou seja, alterações na voltagem no meio de cultura que são causadas pelo influxo/efluxo de íons durante o potencial de ação dos neurônios (figura 32A). Na figura 32B, é possível observar o perfil das ondas detectadas em um eletrodo ao longo de 3 minutos de análise. A atividade dos neurônios pode ser representada por meio de um gráfico *raster plot*, no qual o eixo X indica o tempo transcorrido da medição, enquanto que no eixo Y, cada linha representa um eletrodo (dos dezesseis) contido em um poço da placa de cultura (Figura 32C). Neste gráfico, cada traço branco simboliza a

ocorrência de um *spike*. Também é possível observar pontos largos e vermelhos, ou *bursts*, os quais indicam um conjunto de *spikes* concentrados em um curto intervalo de tempo.

Figura 32 - Análise da atividade neural por multieletrodo. (A) Esquema da placa de 48 poços utilizada nos ensaios de multieletrodo, bem como da disposição dos 16 eletrodos por poço, e do posicionamento de um neurônio sobre o eletrodo, o qual é capaz de detectar alterações no potencial de campo, resultantes do potencial de ação (*spike*). **(B)** Imagem representativa dos sinais (curvas sobrepostas) detectados pelo multieletrodo ao longo de uma leitura de 3 minutos de duração. **(C)** *Raster plot* ilustrativo obtido de uma leitura da linhagem W83, no qual é possível ver *spikes* (traços brancos), *bursts* (pontos vermelhos), bem como sincronia (quando estes eventos ocorrem em um curto intervalo de tempo em mais de um eletrodo).

O software utilizado para as análises (Axis 2.0) oferecia duas possibilidades para o usuário definir um *burst*: i) através da seleção da quantidade mínima de *spikes*, bem como do tempo máximo que as separava (*Inter-Spike Interval Threshold*), ou ii) pela distribuição de *Poisson*, onde o usuário indicava o “fator surpresa mínimo”, valor este que influencia a sensibilidade do sistema. Para não precisar realizar uma pré-análise dos dados visando selecionar os parâmetros que melhor definiam *bursts* para todas as linhagens analisadas, *bursts* foram definidos através da distribuição de *Poisson*, e o fator surpresa utilizado foi 3, como descrito na seção “Material & Métodos”. Como utilizamos uma placa *multiwell*, no qual cada um dos 48 poços possuía 16 eletrodos, foi possível, também, que o software avaliasse a sincronia da atividade (*spikes* e/ou

bursts que ocorriam em diferentes eletrodos do mesmo poço, em um curto intervalo de tempo, sugerindo que estas atividades não eram isoladas, mas sim, resultantes da comunicação de grupos de neurônios localizados sobre diferentes eletrodos). Foram realizados três experimentos independentes (todos com neurônios cultivados em placas de 48 poços), sendo que cada linhagem (clone) utilizada por experimento era plaqueada pelo menos em *quadruplicada*. Os parâmetros analisados ao longo de 3 minutos de leitura foram: número de *spikes*, número de *bursts*, porcentagem do total de *spikes* que ocorriam dentro de *bursts*, e a sincronia destes eventos. Os resultados obtidos para cada linhagem celular utilizada são apresentados na figura 33, sob o título de “dados brutos”.

Foi observado uma grande variabilidade nos dados gerados neste experimento (por exemplo, clones derivados do mesmo indivíduo podem apresentar muita variação, como é o caso dos clones 1 e 2 das linhagens 5461 e AG06244). Esta variação pode ser devida, por exemplo, ao descolamento de células da placa de cultura, evento comumente observado na cultura de neurônios. Por isso, decidimos, além de analisar somente os “dados brutos”, aplicar alguns filtros, numa tentativa de comparar a atividade de diferentes poços que satisfaziam um critério mínimo de semelhança, para evitar justamente contabilizar poços que não apresentavam nenhuma atividade pois não continham células aderidas. Para isso, realizamos uma segunda análise dos dados, onde apenas os poços que satisfaziam ambos os seguintes critérios foram contabilizados: i) apresentar pelo menos um *spike* em pelo menos metade dos eletrodos, e ii) apresentar pelo menos um *burst*. As análises feitas sob esses critérios foram denominadas de “ambos os filtros”, e também podem ser observadas na figura 33.

Primeiro, se nota que a aplicação dos filtros praticamente não altera qualitativamente a informação observada nos gráficos “dados brutos”, com exceção do parâmetro “porcentagem de *spikes* dentro de *bursts*”, onde a aplicação dos filtros aumentou os valores obtidos para os dois clones da linhagem GM00739 em relação às linhagens não afetadas (GM00969, 5461 e W83). Para os outros três parâmetros analisados, a aplicação destes filtros não alterou qualitativamente o dado apresentado. Vale ressaltar que a quantidade de poços contabilizados na análise (encontra-se indicado logo abaixo do eixo X nas figuras) reduz em mais de 50% para todas as linhagens quando os filtros são aplicados, evidenciando que menos da metade dos poços

analisados satisfazem as duas condições (pelo menos 50% dos eletrodos apresentam pelo menos 1 spike e ocorrência de pelo menos um *burst*). Esse dado confirma (como pode ser observado pelo erro padrão da média para cada linhagem) que o experimento apresenta muita variação mesmo quando são comparados poços contendo células da mesma linhagem, plaqueadas no mesmo experimento. Ainda assim, considerando estas observações, foi possível observar que 4 dos 5 clones não afetados apresentam valores semelhantes de número de *spikes*, enquanto que a variação é maior dentro do grupo de células que compreendem as linhagens dos pacientes. Uma tendência semelhante, mas menos pronunciada, pode ser observada para o número de *bursts*. Para os valores “índice de sincronia”, três das cinco linhagens controle apresentam valores mais elevados do que todas as seis linhagens afetadas. Vale ressaltar que a linhagem afetada AG06244 (C1) apresentou valores muito altos de número de *spikes*, ao passo que os valores do índice de sincronia foram muito baixos.

Figura 33 - Análise da atividade neural pelo ensaio do multieletrodo. Número de *spikes*, número de *bursts*, porcentagem de *spikes* dentro de *bursts*, e índice de sincronia, foram avaliados, em três experimentos independentes, e gráficos mostram a média $\pm$ erro padrão da média para cada clone (encontra-se indicado, abaixo do eixo X, a quantidade de poços contabilizados nas análises). “Dados brutos” indica que todos os poços foram utilizados nas análises, enquanto que “ambos os filtros” indica que somente os poços que satisfizeram ambos os critérios: i) pelo menos 50% dos eletrodos do poço apresentaram pelo menos um *spike*, e ii) pelo menos um *burst* por poço foram utilizados nas análises.

Numa tentativa de evidenciar uma tendência, agrupamos todas as células não afetadas em um grupo, e as comparamos com o outro grupo que compreendia todas as demais células (afetadas) (figura 34). Notamos que parece existir uma menor sincronia na atividade das células derivadas de pacientes CS. Interessante, ao aplicar os filtros, apesar de a quantidade de *spikes* no grupo “afetados” parecer mais elevada em relação ao grupo controle, o índice de sincronia continua mais baixo. Assim, os resultados indicam que neurônios de pacientes CS, apesar de apresentarem níveis semelhantes (ou até pouco mais altos) de *spikes*, apresentam, também, um aparente déficit na sincronia, o que de fato é o esperado pela menor densidade de *puncta* sináptica e sinapsina I observada nessas células.

Figura 34 - Análise da atividade neural pelo ensaio do multieletrodo. Número de *spikes*, número de *bursts*, porcentagem de *spikes* dentro de *bursts*, e índice de sincronia, foram avaliados, em três experimentos independentes, e gráficos mostram a média $\pm$ erro padrão da média de todos os valores obtidos para as linhagens derivadas de indivíduos não afetados, bem como para as linhagens derivadas de indivíduos afetados (“n” indica a quantidade de poços contabilizados). “Dados brutos” indica que todos os poços foram utilizados nas análises, enquanto que “ambos os filtros” indica que somente os poços que satisfizeram ambos os critérios: i) pelo menos 50% dos eletrodos apresentaram pelo menos um spike, e ii) pelo menos um burst detectado, foram utilizados nas análises. Foi utilizado o teste estatístico *t-test* não pareado (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

3.4.6 Análise do transcriptoma de neurônios CS

3.4.6.1 Análise de genes individuais

Como discutido na introdução deste capítulo, evidências sugerem que uma desregulação transcricional possa contribuir de maneira impactante no fenótipo dos pacientes CS, inclusive na neurodegeneração. Desta maneira, decidimos analisar o transcriptoma (por meio do sequenciamento do RNA mensageiro) dos neurônios dos pacientes AG06244 e GM00739, e comparar com o perfil transcricional dos neurônios derivados dos indivíduos GM00969 e 5461 (os dois clones de cada linhagem). Para isso, NPCs foram transduzidas com um lentivírus portando uma construção que permite à célula expressar o gene da proteína fluorescente verde (GFP) sob regulação do promotor do gene exclusivo de neurônios, *sinapsina I* (como descrito anteriormente por Marchetto e colaboradores em 2010), e a diferenciação neuronal iniciada. Após cinco semanas, células expressando GFP foram separadas por *FACS-sorting*, o RNA extraído e sequenciado (mais detalhes na seção “Material & Métodos”). Inicialmente, analisamos o perfil de expressão gênica global destas células. Ao contrário do esperado, não notamos uma separação clara entre afetados e não afetados (figura 35A). Na realidade, os dois clones AG06244 (afetados) foram organizados como grupo irmão dos dois clones da 5461 (não afetados). Este grupo, por sua vez, era irmão do conjunto composto pelos clones das linhagens GM00739 e GM00969 (afetado e não afetado, respectivamente). Em seguida, decidimos analisar os genes cujos níveis de expressão eram semelhantes entre linhagens celulares derivadas de pacientes, mas diferentes entre as linhagens controle. Para isso, foi gerado um diagrama de Venn, no qual somente os transcritos que satisfizeram a condição *p-value* ajustado $<0,05$ foram incluídos, numa tentativa de filtrar falsos positivos (figura 35B). Neste diagrama, é possível observar a quantidade de transcritos cuja expressão difere significativamente nos neurônios derivados do paciente GM00739 quando comparados com os neurônios derivados de indivíduos não afetados (NA, grupo que inclui os dois clones derivados dos indivíduos GM00969 e 5461). A mesma análise é feita para os dois clones derivados das células do paciente AG06244, e, por fim, uma comparação entre a expressão gênica entre células dos dois pacientes também encontra-se presente neste diagrama. Como pode ser observado para o grupo “GM00739 vs NA”, a soma dos números dentro

deste círculo (275+240+17+6) indica que 502 transcritos são diferencialmente expressos nos neurônios deste paciente, quando comparados com os neurônios controle. Já para os neurônios do paciente AG06244, esse número é cerca de 10 vezes menor (47). Uma comparação entre as células dos pacientes resulta num valor de 464 transcritos. Assim, apesar do fenótipo destes pacientes ser muito parecido (detalhes na seção “Material & Métodos”), a diferença na expressão gênica entre eles é maior do que a diferença entre células do paciente AG06244 e dos indivíduos não afetados. Ainda neste gráfico, é possível notar que existem 23 transcritos (17 + 6) na intersecção entre os grupos “GM00739 vs NA” e “AG0624 vs NA”. Os 6 transcritos respondem por aqueles que são diferencialmente expressos entre todos (GM00739, AG06244 e GM00969). Já os 17, evidenciam transcritos que são expressos de maneira semelhante entre células dos dois pacientes, mas diferentemente das células controle (NA). Assim, focamos a investigação nesses 17 genes (todos com expressão aumentada em relação às células controle, como pode ser visto na figura 35C), numa tentativa de achar genes cuja expressão pudesse ser associada ao fenótipo dos pacientes. Destes 17 transcritos, 5 são produtos de pseudogenes (cópia de genes que muitas vezes não possuem íntrons ou outras sequências do gene original essencial para sua função, e são, por tanto, potencialmente formas inativas daquele gene). São eles: AP000351.10-201 (ENST00000439866), RP11-1198D22.2-001 (ENST00000521765), AP000350.6-001 (ENST00000439492), RP11-124L9.3-001 (ENST00000571792) e PKD1P5-202 (ENST00000439623). Dos 12 transcritos restantes, 1 deriva do gene TMEM27 (ENST00000380342, *transmembrane protein 27*) e é codificante para proteína, enquanto que 11 são produtos do gene GSTT1, ou *glutathione S transferase 1* (indicados por “*” na figura C), sendo que 4 destes transcritos são codificantes de proteína. Interessantemente, a expressão de GSTT1 é regulada por estresse oxidativo induzido por H₂O₂, e este exerce influência sobre o potencial de membrana mitocondrial (ITO et al., 2011), duas condições reportadas na literatura como estando alteradas nas células de pacientes CS (PASCUCCI et al., 2012; SCHEIBYE-KNUDSEN et al., 2012), como discutido anteriormente. Assim, decidimos confirmar os dados do RNAseq referente à expressão de GSTT1 por PCR (figura 35D). Para isso, utilizamos dois pares de primers para amplificar dois transcritos codificantes para proteínas (001 e 201, ENST00000248935 e ENST00000439996, respectivamente), e notamos que os neurônios controle não expressavam nenhum dos dois

transcritos, enquanto que os neurônios derivados de ambos os pacientes o faziam. Em seguida, investigamos se a expressão deste gene era restrita às células neurais de pacientes, ou se poderiam ser detectadas em outros tipos celulares (fibroblastos). Em paralelo, incluímos amostras de mais dois fibroblastos derivados de indivíduos não afetados (AS405 e FHN), bem como amostras de outros dois pacientes (GM10905 e AS466), e notamos que: i) o padrão de expressão de GSTT1 era o mesmo em fibroblastos dos indivíduos que havíamos obtido neurônios, e ii) a expressão de GSTT1 não era restrita a células derivadas de pacientes CS, uma vez que os fibroblastos AS466 (afetados) não expressavam esse transcrito, e o fibroblasto controle FHN o fazia (figura 35E). Uma nova busca na literatura revelou que diversos estudos de polimorfismos descrevem pessoas com expressão nula de GSTT1, e investigam associação disto com fatores como infertilidade masculina e hipertensão, mas nenhum estudo descreve que estas pessoas apresentam um fenótipo se quer semelhante ao de CS. Logo, os resultados sugerem que dentre os 17 transcritos mais diferencialmente expressos entre os grupos afetados vs. não afetados, 9 estão associado à expressão de um gene que não parece ter nenhuma relação com os aspectos clínicos dos pacientes CS. Por fim, o transcrito TMEM27 (proteína-codificante) desempenha uma importante função na proliferação de células beta pancreáticas, bem como na secreção de insulina, e seus níveis no plasma de pacientes diabéticos (resultante da manifestação autoimune desta doença) foram descritos baixos (PEPAJ et al., 2014). Interessantemente, foi reportado o caso de um paciente com características clínicas de CS que apresentava níveis elevados de insulina (PARK et al., 1994). É possível, por tanto, que TMEM27 apresente alguma relação com este fenótipo, embora investigações para confirmação desta hipótese não tenham sido realizadas.

Figura 35 - Análise da expressão gênica de neurônios CS por sequenciamento do RNA mensageiro (RNAseq). (A) Agrupamento dos diferentes neurônios derivados de indivíduos não afetados (NA), bem como de afetados (CS) baseado no perfil de expressão global (todos os transcritos sequenciados normalizados pelo total de transcritos). (B) Diagrama de Venn mostrando número de transcritos diferencialmente expressos entre os neurônios dos pacientes AG06244 e GM00739, bem como dos indivíduos não afetados (GM00969 e 5461, compondo o grupo “NA”). (p value ajustado <0,05). (C) Agrupamento dos 17 transcritos diferencialmente expressos entre os grupos não afetados versus afetados. Asteriscos indicam transcritos produzidos pelo gene GSTT1. NúERO à direita do gráfico indicam o código do transcrito referente à terminologia do site <http://www.ensembl.org/index.html> (ENST00000 + número indicado na figura). Análise da expressão do gene GSTT1 por PCR, utilizando primers que detectam os transcritos codificantes de proteína ENST00000248935 e ENST00000439996 (001 e 201, respectivamente), em neurônios (D) ou fibroblastos (E).

3.4.6.2 Análise dos transcritos mitocondriais

Foi descrito que fibroblastos do paciente GM00739 transformados por SV40 (linhagem celular conhecida como CS1AN, a qual não expressa a proteína CSB) apresentavam comprometimento da expressão de genes presentes no genoma mitocondrial (BERQUIST et al., 2012). Autores notaram que estas células apresentavam uma redução de 50-90% na transcrição de genes como ATP sintase 6 (*ATP6*), NADH desidrogenase 4L (*NAD4L*) e citocromo C oxidase 1 (*CO1*), e que a complementação destas células com a versão selvagem do gene *CSB* aumentava a expressão destes genes (BERQUIST et al., 2012). Desta forma, foi analisada a expressão dos genes do genoma mitocondrial, através da comparação de neurônios do paciente GM00739 ou do paciente AG06244 com os neurônios de não afetados. Na figura 36A, notamos que os neurônios CS não são agrupados juntos com base na expressão dos genes mitocondriais, sugerindo que a expressão destes 13 genes não é um critério que evidencia diferenças entre pacientes e não afetados. Para facilitar a comparação com o trabalho citado anteriormente, analisamos o nível da expressão relativa (afetados/não afetados) de cada um destes genes, para as células (os dois clones) de ambos os pacientes. Como pode ser visto na figura 36B, as diferenças observadas no trabalho de Berquist e colaboradores por PCR (90% de redução na expressão dos genes *ATP6* e *ND4L*) não foram observadas nos neurônios GM00739. Na realidade, se existe alguma variação, esta indica um pequeno aumento (25-40%) na transcrição destes genes em relação ao observado nas células controle. Somente o gene *CO1* mostrou níveis semelhantes ao descrito pelos autores (redução de cerca de 50% em relação ao controle). Já para as células do paciente AG06244, as alterações foram ainda menores, sugerindo que a expressão de todos os 13 genes mitocondriais nos neurônios CS é praticamente idêntica a das células controle. Assim, nenhuma desregulação evidente na transcrição dos genes mitocondriais foi detectada nos neurônios CS através do sequenciamento do RNA.

Figura 36 - Análise da expressão de genes do genoma mitocondrial em neurônios CS por sequenciamento do RNA mensageiro. (A) Agrupamento dos diferentes neurônios derivados de indivíduos não afetados (NA), bem como de afetados (CS) baseado no perfil de expressão dos 13 genes mitocondriais (todos os transcritos sequenciados foram normalizados pelo total de transcritos). Expressão relativa dos transcritos mitocondriais nos neurônios (dois clones) do paciente GM00739 (B) ou do paciente AG06244 (C) em relação aos neurônios não afetados (dois clones derivados para cada linhagem GM00969 e 5461).

3.4.6.3 Análise de grupos de genes

Uma outra possibilidade de analisar os dados do RNAseq é por meio do estudo da desregulação de vias (conjunto de genes). Para isso, foi utilizado um parâmetro menos restritivo para selecionar transcritos diferencialmente expressos nas células dos pacientes (p -value <0,05 ao invés do p -value <0,05 ajustado), e uma análise de vias alteradas foi realizada por meio do software *Ingenuity pathway analysis*, como indicado na seção “Material e Métodos”. A primeira avaliação feita foi em cima de funções celulares, metabólicas e fisiológicas (*cellular, molecular and physiological functions*). Estão presentes, na figura 37, os 10 grupos com o menor

p-value derivados das análises das células neurais derivadas dos dois clones de cada paciente. Como pode ser observado nesta figura, os neurônios derivados de ambos os pacientes apresentam desregulação em algumas vias em comum. Interessante, a via “Função e desenvolvimento do sistema nervoso central” aparece como desregulada para ambas as duas linhagens celulares dos pacientes.

Figura 37 - Análise comparativa da terminologia “funções fisiológicas, moleculares e celulares” entre neurônios de pacientes CS (GM00739 ou AG06244) em relação a neurônios de indivíduos não afetados, por meio do software *Ingenuity*, com base nos dados do sequenciamento do RNA destes neurônios.

Em seguida, dentro destas categorias (e outras com *p-value* < 0,05, mas não ilustradas na figura anterior), foram analisadas anotações que envolvessem os termos axônios, sinapse, maturação neuronal, ramificação de dendritos, migração, neuritogênese, morfologia de neurônios, enervação, extensão de neuritos, projeção de axônios, cérebro, e outros termos afins. Algumas das anotações, bem como o *p-value*, *z-score* de ativação (calculado pelo software, baseado no status de ativação/inativação dos genes que compõem aquela anotação, permitindo inferir o quão ativada ou inibida está aquela via), bem como o número de genes cuja expressão encontra-se alterada, são mostrados na tabela 4.

Como pode ser observado nesta tabela, os neurônios dos dois pacientes apresentam alterações em diversas vias relacionadas ao funcionamento/comunicação dos neurônios. Para nomear algumas nos neurônios derivados do paciente GM00739, temos: neurotransmissão, transmissão sináptica, potenciação de sinapse, quantidade de vesículas sinápticas, plasticidade sináptica, transmissão sináptica do tecido nervoso, transmissão sináptica de células. Para os neurônios derivados do paciente AG06244 (o qual apresenta um perfil transcricional mais próximo das células controle), ainda assim foi possível identificar diversas vias desreguladas, embora o *z-score* tenha sido muito menos evidente. Para nomear algumas, temos: axogênese, crescimento de neuritos, migração de neurônios, e mielinização das células. Desta forma, foi possível encontrar vias relacionadas à processos neurais desreguladas nos neurônios de ambos os pacientes, embora de maneira mais pronunciada nas células do paciente GM00739, sugerindo, de fato, que processos associados à transcrição podem estar relacionados aos processos degenerativos e de mal funcionamento de funções cognitivas/motoras destes pacientes.

Tabela 4 - Anotação de vias relacionadas ao funcionamento, desenvolvimento e manutenção de células nervosas/cérebro e desreguladas em neurônios derivados de pacientes CS.

GM00739				AG06244			
Anotação (Doença ou Função)	p-Value	Z-score	# de genes	Anotação (Doença ou Função)	p-Value	Z-score	# Genes
morphology of nervous system	4,85E-36	-1,442	394	morphology of nervous system	6,55E-06	0,124	58
development of neurons	4,58E-34	0,021	338	development of neurons	1,10E-05	-0,242	50
abnormal morphology of nervous system	1,80E-32	-1,006	356	neuritogenesis	1,47E-05	-0,579	39
neuritogenesis	6,52E-29	1,457	252	loss of ganglion cells	5,82E-05	-0,673	5
morphology of nervous tissue	4,78E-28	-1,394	231	axonogenesis	1,14E-04	-1,154	18
morphology of neurons	1,11E-27	-0,896	225	complexity of dendrites	1,14E-04	1,467	5
morphology of central nervous system	3,04E-23	-0,800	248	quantity of central nervous system cells	1,16E-04	0,461	15
abnormal morphology of central nervous system	3,27E-22	-0,973	232	morphogenesis of neurites	4,25E-04	-0,073	27
morphology of brain	3,24E-20	-0,647	222	branching of neurons	4,68E-04	-0,452	22
abnormal morphology of brain	1,06E-19	-0,973	212	differentiation of neurons	4,84E-04	1,085	28
neurotransmission	1,75E-17	-2,267	197	growth of neurites	6,09E-04	-0,744	34
morphogenesis of neurons	2,87E-17	1,091	172	quantity of brain cells	8,85E-04	0,366	12
proliferation of neuronal cells	6,16E-17	0,757	261	outgrowth of neurites	9,79E-04	-0,866	30
growth of neurites	7,31E-17	0,930	219	reflex	1,28E-03	0,552	11
morphogenesis of neurites	1,24E-16	1,091	168	branching of neurites	1,56E-03	-0,076	20
outgrowth of neurites	2,15E-16	0,839	195	innervation	2,17E-03	1,067	12
long-term potentiation	3,70E-15	-2,423	125	cell viability of neurons	2,88E-03	1,950	19
axonogenesis	5,73E-15	2,232	97	branching of axons	3,10E-03	-0,610	8
synaptic transmission	5,83E-15	-2,540	160	development of central nervous system	3,26E-03	-0,719	37
coordination	1,94E-14	-2,834	105	quantity of synapse	3,41E-03	0,293	7
development of central nervous system	3,29E-14	-0,495	249	proliferation of neuronal cells	3,94E-03	-0,597	37
formation of neurites	5,87E-14	-0,190	93	migration of neurons	3,97E-03	-1,187	17
morphology of cerebral cortex	9,68E-14	-1,070	96	quantity of cerebral cortex cells	4,64E-03	0,068	4
branching of neurons	1,31E-13	0,912	128	formation of neurons	4,77E-03	0,440	7
abnormal morphology of cerebral cortex	2,94E-13	-1,070	89	synaptic transmission	5,77E-03	-0,128	23
synaptogenesis	3,47E-13	-0,891	86	survival of ganglion cells	6,32E-03	1,921	4
potentiation of synapse	1,60E-12	-1,955	76	neurotransmission	6,44E-03	0,160	27
branching of neurites	1,70E-12	1,069	121	extension of neurites	6,51E-03	0,652	12
long-term potentiation of synapse	3,62E-12	-2,221	74	quantity of sensory neurons	8,08E-03	1,343	7
formation of brain	8,16E-12	-0,776	192	size of neurons	9,53E-03	1,969	4
excitatory postsynaptic potential	9,79E-12	1,923	61	extension of axons	9,92E-03	1,258	7
abnormal morphology of hippocampus	3,30E-11	-1,003	56	formation of brain	1,04E-02	0,468	28
elongation of neurites	1,41E-10	-0,253	36	quantity of anterior pituitary cells	1,22E-02	-0,689	4
morphology of hippocampus	1,80E-10	-1,003	57	dendritic growth/branching	1,26E-02	0,870	14
abnormal morphology of metencephalon	2,59E-10	-0,447	67	myelination of cells	1,63E-02	-1,715	7
abnormal morphology of cerebellum	2,89E-10	0,000	65	growth of axons	1,70E-02	0,609	11
developmental process of synapse	2,95E-10	0,000	44	quantity of neuroglia	1,86E-02	0,047	8
morphology of rhombencephalon	3,57E-10	-0,447	72				
migration of neurons	4,51E-10	0,116	102				
abnormal morphology of rhombencephalon	5,71E-10	-0,447	70				
quantity of synaptic vesicles	6,33E-10	-2,540	28				
differentiation of neurons	6,60E-10	0,877	155				
guidance of axons	6,61E-10	0,000	68				
morphology of cerebellum	7,59E-10	-0,447	66				
plasticity of synapse	1,93E-09	-1,809	55				
dendritic growth/branching	3,23E-09	-0,443	89				
formation of dendrites	3,84E-09	1,726	56				
morphology of nerves	9,66E-09	-1,411	62				
innervation of tissue	1,94E-08	-0,173	52				
synaptic transmission of nervous tissue	1,94E-08	-2,430	52				
innervation of neurons	2,63E-08	-0,554	44				
morphology of forebrain	3,61E-08	0,122	90				
morphology of telencephalon	5,23E-08	0,122	73				
long-term potentiation of brain	5,68E-08	-0,884	59				
branching of axons	6,18E-08	1,824	39				
synaptic transmission of cells	6,69E-08	-2,443	106				
abnormal morphology of forebrain	8,77E-08	-0,593	88				
development of synapse	1,35E-07	-0,632	34				
abnormal morphology of telencephalon	1,37E-07	-0,593	71				

Por fim, tendo conhecimento do trabalho recentemente publicado por Wang e colaboradores, que analisaram, por *microarray*, a expressão de genes neurais em fibroblastos transformados de pacientes CS (usando como controle o fibroblasto CS1AN complementado com a cópia selvagem do gene *CSB*), foi realizada uma comparação entre alguns dos dados obtidos por ele e os apresentados nesta tese. Wang e colaboradores notaram, por exemplo, que os genes *PCLO*, *NGFR*, *NRG2* e *SYT9* eram muito pouco expressos nas células CS. Wang e colaboradores também realizaram uma comparação entre tecido *post mortem* de pacientes e de indivíduos não afetados, e observaram que a expressão de genes como *SYT9*, *SYT1*, *WIF1* e *IL16* era menor no material derivado de pacientes (WANG et al., 2014). Desta maneira, analisamos a expressão de todos os transcritos destes genes nos neurônios derivados da linhagem GM00739 relativo aos neurônios não afetados (5461 e GM00969) (figura 38). Vale ressaltar que o fibroblasto transformado CS1AN (utilizado nas análises de Wang e colaboradores) é resultante da transformação do fibroblasto primário GM00739. Como pode ser observado na figura, é possível identificar genes que apresentaram um perfil transcricional semelhante entre as análises apresentadas nesta tese e as de Wang (todos os transcritos de *SYT9*, por exemplo, aparecem menos expressos nas células dos pacientes). No entanto, existem alvos, como *PCLO* e *NGFR*, cujos transcritos apresentam uma maior expressão nas células CS em nossas análises, contrário do observado por aqueles autores. Em relação aos genes analisados no tecido *post mortem* dos pacientes, observações semelhantes podem ser feitas. A expressão de *SYT1* e *SYT9* é qualitativamente semelhante para ambos os trabalhos, ao passo que a expressão do gene *WIF1* foi muito maior nas células do paciente (dados desta tese), contrário do observado por Wang no tecido *post mortem*. Já o gene *IL16* apresenta tanto transcritos mais expressos nas células do paciente, quanto transcritos menos expressos (resultados desta tese), enquanto que Wang e colaboradores notaram que a expressão deste gene era menor no tecido do paciente. É possível que a técnica do *microarray* permita a detecção apenas dos transcritos menos expressos dos genes *NRG2* e *IL16*, e por isso Wang e colaboradores tenham reportado menor expressão destes genes. Wang e colaboradores também notaram que a expressão de *MAP2* era defeituosa em fibroblastos CS1AN transdiferenciados para neurônios. Assim, também foi analisada a expressão dos transcritos deste gene, e como pode ser observado na figura 38, os neurônios derivados da

linhagem GM00739 apresentam maior expressão de todos os transcritos relacionados ao gene *MAP2*. Por fins comparativos, as mesmas análises foram feitas para os neurônios do paciente AG06244, mostrando que as variações eram muito menores em relação às células controle, como já comentado anteriormente nesta tese (figura 39). Juntos, os dados apresentados nesta tese e no trabalho de Wang refletem uma heterogeneidade transcricional muito grande entre células de pacientes com características clínicas semelhantes, assim como uma heterogeneidade nos achados de diferentes grupos, que utilizam diferentes modelos/métodos para responder perguntas semelhantes. No entanto, resultados sugerem que diferenças no padrão transcricional podem contribuir para as manifestações clínicas de CS, embora a definição de qual gene (ou via) desregulada apresenta maior importância neste processo, ainda não é clara.

Figura 38 - Análise da expressão dos transcritos dos genes PCLO, NGFR, NRG2, IL16, WIF1, SYT1 e MAP2 em neurônios derivados de iPSCs do paciente GM00739. Resultados mostram expressão dos transcritos nos neurônios dos pacientes GM00739 em relação aos neurônios de indivíduos não afetados (GM00969 e 5461), detectados nas análises por RNAseq.

3.4.7 Análise de morte celular em neurônios CS

Por fim, com base nos relatos de neurodegeneração em pacientes CS (detalhes e referências na seção “Introdução” deste capítulo), analisamos a ocorrência de morte celular nos neurônios CS. Para isso, neurônios na terceira semana do processo de diferenciação, e expressando GFP sob controle do promotor do gene *sinapsina I*, foram isolados por *FACS-sorting*, e replaqueados em placas de 96 poços (mais detalhes na seção “Material & Métodos”). Células foram, então, crescidas por quatro dias, e então fixadas para posterior detecção de apoptose (caspase-3 ativada e TUNEL) por imunofluorescência. A etapa de *FACS-sorting* teve como objetivo separar os neurônios (GFP-positivos) das demais células presentes (como astrócitos e outras possíveis células contaminantes). Para esse ensaio, um clone de cada linhagem neuronal (GM00969 e 5461 representando indivíduos não afetados, e GM00739 e AG06244 representando

os indivíduos afetados) foram utilizados. Como pode ser observado na figura (40A & B), a porcentagem de células positivas para caspase-3, bem como para TUNEL, pareceu muito semelhante entre neurônios afetados e não afetados, sugerindo que nas condições empregadas para o cultivo destas células, níveis basais de apoptose entre estas células são semelhantes.

Figura 40 - Análise de morte celular em neurônios CS. Análise da porcentagem de células positivas para caspase-3 ativada (A), bem como de células positivas para TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) (B) por imunofluorescência. (C) Células positivas para caspase-3 ativada são indicadas pela seta vermelha na figura (C) superior, enquanto que as células positivas para TUNEL estão indicadas pela seta branca na mesma figura, parte inferior. O total de células positivas para caspase-3 ou TUNEL foi dividido pelo total de células (evidenciadas pela marcação do núcleo celular com DAPI).

3.5 Discussão

3.5.1 Um novo modelo para estudo de CS

Nesta tese, foi apresentado o primeiro modelo de neurônios humanos derivado de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) de pacientes portadores da síndrome de Cockayne (CS). Foram utilizadas células derivadas dos pacientes AG06244, GM00739 e GM10903, todos com características clínicas típicas desta síndrome (ver seção “Material & Métodos” para mais detalhes). As células neurais obtidas por meio do emprego do método de diferenciação previamente descrito (MARCHETTO et al., 2010) apresentam projeções finas e longas, são positivas para os marcadores típicos de células nervosas Map2, Tuj1, sinapsina I e PSD-95 (figura 29), além de apresentarem potenciais de ação (figuras 33 & 34), sugerindo que todas as células dos pacientes, bem como dos indivíduos não afetados, foram capazes de gerar neurônios.

Neste sentido, vale ressaltar que dois trabalhos recentes sugeriram que a diferenciação de neurônios a partir de células deficientes (mutadas ou silenciadas) no gene *CSB* era defeituosa. No trabalho de Ciaffardini e colaboradores (2014), autores silenciaram o gene *CSB* (por meio de shRNA) em NPCs imortalizadas (ReNcell VM), e analisaram a diferenciação destas células em neurônios e astrócitos. Apesar da diferenciação em astrócitos não parecer comprometida, autores notaram que a formação de neurônios era extremamente defeituosa (células não adquiriam morfologia típica destas células, bem como a expressão do gene *MAP2* era muito reduzida). Em uma linha investigativa semelhante, Wang e colaboradores (2014) transdiferenciaram fibroblastos transformados em neurônios (por meio do silenciamento do gene *PTB1*), e notaram que as células deficientes em *CSB* (CS1AN) não formavam neurônios, e isto era evidente pela falta da expressão de *MAP2* bem como formação de prolongamentos neurais. O emprego de células de neuroblastoma (SH-SY5Y), que se diferenciam em neurônios na presença de ácido retinóico, também foi utilizado, e o silenciamento de *CSB* também comprometeu a diferenciação destas células em neurônios. Estes resultados estão em aparente contradição com os dados reportados nesta tese, pois a obtenção de células com características neurais foi possível a partir de células mutadas para o gene *CSB*. Além disso, os níveis baixos do

RNA_m de *MAP2* detectados por Ciaffardini e colaboradores (2014) está em desacordo com os dados obtidos pelo sequenciamento do RNA (RNAseq) dessas células, sendo que a expressão de *MAP2* é maior nas células do paciente GM00739 (versão não transformada da linhagem CS1AN) do que nas células controle (figura 38). Alguns pontos podem ser salientados numa tentativa de explicar essa contradição. Os trabalhos anteriores (CIAFFARDINI et al., 2014; WANG et al., 2014) empregaram protocolos com tempo de diferenciação neural que variava de 9 a 20 dias, enquanto que o protocolo usado nesta tese promove uma diferenciação por cerca de 35 dias. É possível, por tanto, que a diferenciação (ou transdiferenciação) em neurônios deficientes para o gene *CSB* seja mais lenta do que para células controle. Vale ressaltar que dentro dos 15 primeiros dias de diferenciação utilizando o protocolo descrito nesta tese, foi possível notar a formação de prolongamentos celulares que lembram neuritos, inclusive nas células de pacientes CS (dados não mostrados). No entanto, se a porcentagem de células com essas características é menor nas células dos pacientes, isso precisa ser melhor investigado. Ainda em relação ao *MAP2*, Ciaffardini e colaboradores (2014) mostraram que a expressão deste gene apresenta um pico máximo no dia 12 de diferenciação para as células controle, a partir do qual existe uma queda na expressão desta proteína. Assim, é possível especular que os maiores níveis de expressão de *MAP2* detectados nos neurônios GM00739 por RNAseq no dia 35 de diferenciação podem sugerir que a diferenciação desta célula está, de fato, acontecendo mais tardiamente. No entanto, vale ressaltar que os níveis de expressão de *MAP2* na linhagem do paciente AG06244 (também após 35 dias de diferenciação), detectados por RNAseq, são muito semelhantes aos das células controle (figura 39), indicando que células de pacientes CS (com características clínicas muito semelhantes) não apresentam uma desregulação semelhante na expressão de *MAP2*. Outro ponto que vale ser ressaltado é que, do contrário do nosso modelo, os dois trabalhos anteriores empregaram células transformadas/imortalizadas. O quanto isso pode influenciar a transdiferenciação/diferenciação destas células em neurônios quando *CSB* está mutado/ausente, é meramente especulativo, mas não deve ser descartado. Assim, é possível que nesses casos, o processo de transformação esteja revelando diferenças na geração de neurônios de células CS, que não são evidenciadas em células não transformadas.

De qualquer maneira, a obtenção de células com características neurais de pacientes CS é possível por meio da reprogramação celular, seguida de diferenciação em EBs, rosetas e NPCs. Vale enfatizar que o uso de iPSCs derivadas de pacientes pode ser uma melhor alternativa do que o uso de modelos que empreguem silenciamento/*knockout* dos genes *CSA* ou *CSB*. Sendo assim, é possível trabalhar com células nervosas de pacientes que apresentam problemas clínicos envolvendo o sistema nervoso central. É importante destacar que a mesma mutação em pacientes diferentes pode acarretar em sintomas clínicos diferentes (COLELLA et al., 2000), o que sugere, como já discutido anteriormete, que o *background* genético do paciente (que é recapitulado nos neurônios derivados de iPSCs) possa exercer uma importante influência sobre o fenótipo clínico manifestado. Assim, o modelo apresentado nesta tese torna-se muito adequado para o estudo das características neurológicas de um paciente e a relação disto com processos celulares.

3.5.2 Neurônios CS apresentam menor densidade de *puncta* sináptica e aparente menor sincronia da atividade neural

Por meio da análise da densidade de *puncta* sináptica (co-localização de sinapsina I com PSD-95 sobre filamento [MAP2]), analisamos a presença de proteínas pré- e pós-sináptica nos neurônios, e notamos uma menor quantidade destas nos neurônios CS em relação aos neurônios não afetados (figura 30). Como discutido anteriormente, a menor quantidade de *puncta* sináptica em neurônios já foi associado a outras patologias tanto do neurodesenvolvimento, quanto neurodegenerativas (BUTTINI et al., 2005; MARCHETTO et al., 2010). De fato, a degeneração de sinapses é um dos eventos iniciais observados em doenças neurodegenerativas (CONFORTI; ADALBERT; COLEMAN, 2007). Neste sentido, vale ressaltar que CS apresenta características que evidenciam problemas em processos de neurodesenvolvimento (deficiências linguísticas/retardo mental) e também neurodegeneração (perda de neurônios/surdez e atrofia muscular). Desta forma, a redução na quantidade de sinapses pode ser um mecanismo relacionado a pelo menos alguns desses fenômenos.

Neste sentido, apesar de não existir uma distinção clara entre a atividade de neurônios afetados e não afetados (medida pelo multieletrodo) quando todas as linhagens são comparadas individualmente, é possível notar uma aparente menor sincronia quando todas as linhagens de

neurônios afetados são agrupadas em um conjunto (“afetados”) e comparado com o grupo que contém todas as linhagens neurais derivadas de indivíduos não afetados. De fato, uma menor densidade de *puncta* sináptica pode evidenciar menor capacidade de formação de sinapses, o que pode explicar uma menor sincronia entre suas atividades. Porém, vale ressaltar que a análise das células por MEA fornece resultados muito variados (possíveis explicações para essas variações incluem, principalmente, descolamento de células). Do contrário do experimento de densidade de *puncta*, no qual MAP2 é usado para normalizar as medições, no experimento do MEA não dispõe-se de um normalizador. Uma tentativa de “normalização” foi feita através da aplicação de filtros (como somente analisar poços em que pelo menos 50% dos eletrodos captaram um potencial de ação e/ou poços em que foi detectado pelo menos um *burst*). Dessa maneira, tentou-se comparar poços que satisfaziam um critério mínimo de similaridade. Com base nisto, notou-se que a sincronia dos neurônios apresentou, em todas as análises realizadas (independente da presença ou não destes filtros), a mesma tendência (células de pacientes apresentavam menor sincronia do que células derivadas de indivíduos não afetados) (figura 34). De qualquer forma, mais experimentos são necessários para confirmar esta tendência, especialmente para as células derivadas do paciente GM10903, bem como o clone 2 do indivíduo não afetado 5461, as quais apresentaram valores muito baixo nas leituras, sugerindo problemas metodológicos (figura 33).

3.5.3 Menor densidade de *puncta* em neurônios CS: um problema majoritariamente transcricional?

Com base nos resultados discutidos acima, uma pergunta que se sucede é: o que resulta em uma menor densidade de *puncta* nos neurônios CS? A análise do RNAseq revelou desregulação em diversas vias relacionadas ao funcionamento dos neurônios (figura 37 e tabela 4). Curiosamente, para a linhagem GM00739, algumas das anotações identificadas são: neurotransmissão, potenciação de longa duração das sinapses (o qual refere-se a um aumento da força sináptica, baseada em atividade recente), transmissão sináptica, coordenação, sinaptogênese, quantidade de vesículas sinápticas e densidade de sinapses. Já os neurônios AG06244 apresentam desregulação em uma via em comum com as descritas para a linhagem anterior (transmissão sináptica), além de outras vias também desreguladas como: neuritogênese,

crescimento de neuritos, ramificação de neurônios e mielinização de células. Logo, é possível que a desregulação transcricional de vias envolvidas na formação/manutenção/funcionamento de sinapses, bem como de desenvolvimento neural, possam influenciar a densidade de *puncta* e, conseqüentemente, a aparente menor sincronia observada nos neurônios derivados dos pacientes. No entanto, é preciso manter em mente que a diferença do perfil transcricional das células do paciente GM00739 para as células controle foi muito maior do que a observada para as células do paciente AG06244, embora os dois pacientes apresentem características clínicas semelhantes (figuras 35, 37 e tabela 4). Na realidade, o perfil transcricional da linhagem AG06244 ficou mais próximo das células controle do que das células GM00739 (figura 35B). Logo, estes resultados sugerem alguns dos possíveis cenários: i) a desregulação de algumas poucas vias transcricionais relacionadas a atividade neural já seriam suficientes para acarretar em menor densidade de *puncta* (e possivelmente na manifestação dos sintomas típicos da doença), ou; ii) a desregulação transcricional pode contribuir para a manifestação dos sintomas/menor densidade de *puncta*, mas este não é o mecanismo principal (ou único) causador destes processos.

Neste sentido, foi reportado que o tratamento de neurônios com etoposídeo resultava em despolarização mitocondrial e geração de ERO de maneira dependente de p53 (e possivelmente de BAX, como discutido pelos autores), e conseqüente degeneração sináptica (evidenciado pela redução da proteína sinapsina I) (GILMAN et al., 2003). Também foi reportado que os níveis de p53 são elevados em células CS, pois tanto CSA quanto CSB participam do processo de ubiquitinação de p53 mediado por MDM2, o qual promove degradação de p53 via proteassoma (LATINI et al., 2011). Também foram descritos níveis aumentados de p53 em neurônios no cérebro de um paciente CS (MIYAHARA et al., 2014). Por fim, disfunção mitocondrial e aumento nos níveis basais de ERO também já foram descritos em células CS (PASCUCCI et al., 2012; SCHEIBYE-KNUDSEN et al., 2012). Desta forma, os dados apresentados nesta tese, junto dos relatos da literatura descritos acima, permitem sugerir a hipótese de que os níveis basais altos de p53 em células de pacientes CS promovem (ou pelo menos contribuem) para a menor densidade de *puncta* nas células destes pacientes, como reportada nesta tese. Para dar suporte a esta hipótese, analisamos a quantidade de sinapsina I por filamento, e resultados preliminares

revelaram que a densidade desta proteína era menor nas células dos pacientes (figura 31), sugerindo que a hipótese possa estar correta.

Como descrito anteriormente, CSA e CSB participam da degradação de p53, o que explicaria o acúmulo desta proteína em células de paciente CS, e consequente degeneração sináptica (GILMAN et al., 2003). Mas como conciliar esta hipótese com os pacientes XP/CS, os quais apresentam características neurológicas extremamente semelhantes às dos pacientes CS (LINDENBAUM et al., 2001), mas cujos defeitos genéticos encontram-se nos genes XPB, XPD ou XPG? Neste sentido, vale comentar brevemente o trabalho de Clément e colaboradores (2006), no qual autores notaram que células deficientes em XPG, após irradiação com luz UV, apresentavam pronunciado acúmulo de p53, provavelmente causado pela deficiência destas células em transcrever e estabilizar as isoformas de 90 e 92 kda da proteína MDM2, a qual é essencial para promover a degradação de p53 (CLÉMENT; DUNAND-SAUTHIER; CLARKSON, 2006). Desta forma, a proteína XPG parece apresentar, assim como CSA e CSB, uma função regulatória de p53. Vale notar que apesar deste mecanismo ocorrer em células derivadas de pacientes XPG e também de XPG-CS, somente células do último caso apresentavam níveis basais de BAX mais elevados (CLÉMENT et al., 2007). Esta proteína, por sua vez, promove despolarização mitocondrial, evento que precede a degeneração sináptica mediada por p53 (GILMAN et al., 2003).

Desta forma, embora meramente especulativo, é possível que a deficiência na estabilização de MDM2 (permitindo acumular, de maneira muito acentuada, p53 frente a insultos como excitotoxicidade, ERO e/ou danos ao DNA), junto de níveis basais mais altos de BAX, podem sensibilizar células XPG/CS à degeneração sináptica, o que poderia resultar em um fenótipo semelhante ao observado nesta tese para neurônios CS. Neste sentido, é importante ressaltar que tanto células de pacientes CS quanto XPG-CS, mas não de XPG, são sensíveis a estresse oxidativo, e são também deficientes no reparo de lesões oxidativas no seu genoma (KAMENISCH et al., 2010; SOLTYS et al., 2013; TUO et al., 2003). Interessante, alguns anos antes, já havia sido reportado achados similares em células derivadas de uma paciente com mutação no gene CSA, que apresentava sensibilidade à luz UV, mas nenhum dos outros sintomas clássicos de CS, como problemas neurológicos ou de crescimento (NARDO et al., 2009). Células desta paciente

apresentavam sensibilidade á irradiação UV, mas pouca sensibilidade a estresse oxidativo, do contrário de outras células de pacientes CS. Assim, uma segunda hipótese é de que o processo de degeneração sináptica possa ser iniciado pela acúmulo e persistência de lesões oxidadas (resultantes do próprio metabolismo celular), as quais, por não serem reparadas nas células dos pacientes CS e XPG-CS, poderiam exacerbar a ativação/acúmulo de p53, com consequente toxicidade para as sinapses.

De qualquer maneira, a menor densidade de *puncta* sináptica em neurônios CS, independente da via que pode levar à degeneração sináptica, problemas de maturação neuronal devido a desregulação transcricional, ou ambos, constitui um fenótipo que pode ser usado como alvo em uma triagem de drogas com potencial terapêutico, como sugerido para células de pacientes com síndrome de Rett (MARCHETTO et al., 2010).

3.5.4 Morte celular em neurônios CS

Vale comentar que nossas análises de morte celular não permitiram detectar diferenças de apoptose (caspase 3 ou TUNEL) em neurônios CS (figura 40), embora existam relatos de apoptose em células granulares e de Purkinje no tecido *post mortem* de pacientes CS. De fato, a atrofia do cerebelo foi relacionada a esta perda de células (WEIDENHEIM; DICKSON; RAPIN, 2009). Algumas hipóteses para a não-detecção de apoptose nos neurônios em cultura são: i) os neurônios obtidos pelo nosso protocolo de diferenciação não representam o tipo neural sujeito a maior indução de apoptose; ii) o processo de apoptose não é autônomo, mas sim, depende da interação com outras células, como células da microglia; e iii) maior tempo de maturação em cultura pode ser necessário para que os neurônios comecem a entrar em apoptose.

Por fim, um modelo com os principais resultados e hipóteses descritos no presente capítulo desta tese encontram-se na figura 41.

Figura 41 - Neurônios de pacientes CS apresentam menor densidade de *puncta* e comunicação em rede defeituosa. Modelo evidencia a menor densidade de *puncta* sináptica de neurônios derivados de iPSCs de pacientes CS, bem como a comunicação em rede (setas pretas) comprometida. Possíveis causas deste fenótipo incluem desregulação transcricional e degeneração sináptica mediada por p53.

3.6 Conclusões

Os resultados apresentados no presente capítulo desta tese permitem concluir que:

- A reprogramação celular permite obter células com características neuronais de pacientes CS.

- Neurônios derivados de pacientes CS apresentam menor densidade de *puncta* sináptica e aparente menor sincronia de suas atividades. Este fenótipo pode ser usado como alvo para avaliar a eficácia de possíveis drogas terapêuticas.

- Desregulação transcricional de vias associadas à sinapse/atividade neuronal pode estar relacionada à redução na densidade de *puncta* e à comunicação aparentemente deficiente entre células nervosas derivadas de pacientes CS.

Capítulo 4 - Conclusões gerais

Os dados apresentados nos capítulos 2 e 3 desta tese permitem concluir que:

- A resistência de células de glioma humano à cloroquina está estritamente relacionada à capacidade das células em manter o potencial de membrana mitocondrial frente a esta droga, o qual pode ser desfeito por meio da inibição de ATR. O efeito protetor desta proteína independe da ativação de CHK1, sugerindo que a via canônica de ATR não está envolvida no processo. Por fim, a combinação de cloroquina com o silenciamento de ATR induz potente sensibilização de células de glioma ao quimioterápico Temozolomida.

- A reprogramação celular permitiu obter neurônios de pacientes portadores da síndrome de *Cockayne*, e identificar uma menor densidade de *puncta* sináptica, bem como aparente menor sincronia na atividade destas células, evidenciando dois fenótipos que podem ser usados para avaliar a eficácia de drogas terapêuticas. Além disso, este novo modelo de estudos permite avaliar características específicas de células neuronais que recapitulam o genótipo do paciente do qual as células foram originadas, e cujas características clínicas são conhecidas. Assim, este modelo oferece uma alternativa ao uso de fibroblastos, bem como de modelos animais que não simulam as deficiências neurológicas dos pacientes portadores desta síndrome. Por fim, uma investigação do transcriptoma destes neurônios evidenciou desregulação em vias relacionadas ao funcionamento e comunicação neural, sugerindo que deficiências transcricionais podem contribuir para os fenótipos observados nas células.

Referências*

AAMANN, M. et al. Cockayne syndrome group B protein promotes mitochondrial DNA stability by supporting the DNA repair association with the mitochondrial membrane. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 24, n. 7, p. 2334–2346, 2010.

AGNIHOTRI, S. et al. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 61, n. 1, p. 25–41, fev. 2013.

ANDRADE, L. et al. Evidence for premature aging due to oxidative stress in iPSCs from Cockayne syndrome. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 17, p. 3825–3834, 2012.

ANDRADE-LIMA, L. C. DE; ANDRADE, L. N.; MENCK, C. F. M. ATR suppresses apoptosis after UVB irradiation by controlling both translesion synthesis and alternative tolerance pathways. **J Cell Sci**, v. 128, p. 150–159, 2015a.

ANDRADE-LIMA, L. et al. DNA repair and recovery of RNA synthesis following exposure to ultraviolet light are delayed in long genes. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 5, p. 2744–2756, 2015.

ANDRADE-LIMA, L.; ANDRADE, L.; MENCK, C. ATR suppresses apoptosis after UVB irradiation by controlling both translesion synthesis and alternative tolerance pathways. **Journal of cell science**, v. 128, n. 1, p. 150–9, 1 jan. 2015b.

APPELQVIST, H. et al. Lysosome-mediated apoptosis is associated with cathepsin D-specific processing of bid at Phe24, Trp48, and Phe183. **Annals of clinical and laboratory science**, v. 42, n. 3, p. 231–42, jan. 2012.

ARBER, A. et al. A study of patients with a primary malignant brain tumour and their carers: symptoms and access to services. **International Journal of Palliative Nursing**, v. 16, n. 1, p. 24–30, 2010.

ASENSI, K. et al. Reprogramming to a pluripotent state modifies mesenchymal stem cell resistance to oxidative stress. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 18, n. 5, p. 824–831, 2014.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMA TÉCNICA. **NBR 6023**: Informação e documentação. Rio de Janeiro, 2002.

AVERY, O.; MACLEOD, C.; MCCARTY, M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 79, n. 6, p. 137–159, 1944.

BACHOO, R. et al. Epidermal growth factor receptor and Ink4a/ArfConvergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. **Cancer Cell**, v. 1, n. 3, p. 269–277, 2002.

BAILEY, P.; CUSHING, H. A Classification of the Tumours of the Glioma Group on a Histogenetic Basis With a Correlated Study of Prognosis. **British Journal of Surgery**, v. 14, n. 55, p. 554–555, 1926.

BATISTA, L. et al. p53 mutant human glioma cells are sensitive to UV-C-induced apoptosis due to impaired cyclobutane pyrimidine dimer removal. **Molecular cancer research**, v. 7, n. 2, p. 237–246, 2009a.

BATISTA, L. F. Z. et al. Differential sensitivity of malignant glioma cells to methylating and chloroethylating anticancer drugs: P53 determines the switch by regulating xpc, ddb2, and DNA double-strand breaks. **Cancer Research**, v. 67, p. 11886–11895, 2007.

BATISTA, L. F. Z. et al. **How DNA lesions are turned into powerful killing structures: Insights from UV-induced apoptosis** *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 2009b.

BATISTA, L. F. Z. et al. p53 mutant human glioma cells are sensitive to UV-C-induced apoptosis due to impaired cyclobutane pyrimidine dimer removal. **Molecular cancer research : MCR**, v. 7, p. 237–246, 2009c.

BERQUIST, B. et al. Human Cockayne syndrome B protein reciprocally communicates with mitochondrial proteins and promotes transcriptional elongation. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 17, p. 8392–8405, 2012.

BERTOLA, D. et al. Cockayne syndrome type A: Novel mutations in eight typical patients. **Journal of Human Genetics**, v. 51, n. 8, p. 701–705, 2006.

BOVERI, T. Über mehrpolige Mitosen als Mittel zur Analyse des Zellkerns. **Verh. Phys.-Med. Ges. Würzb. N.F.**, v. 35, p. 6–90, 1902.

BOYA, P.; KROEMER, G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. **Oncogene**, v. 27, n. 50, p. 6434–6451, 2008.

BRADSHAW, J. et al. CSB is a component of RNA pol I transcription. **Molecular Cell**, v. 10, n. 4, p. 819–829, 2002.

BRICEÑO, E.; CALDERON, A.; SOTELO, J. Institutional experience with chloroquine as an adjuvant to the therapy for glioblastoma multiforme. **Surgical neurology**, v. 67, n. 4, p. 388–91, abr. 2007.

BRICEÑO, E.; REYES, S.; SOTELO, J. Therapy of glioblastoma multiforme improved by the antimutagenic chloroquine. **Neurosurgical focus**, v. 14, n. 2, p. e3, 2003.

BROOKES, P. The early history of the biological alkylating agents, 1918-1968. **Mutation research**, v. 233, n. 1-2, p. 3–14, 1990.

BUTTINI, M. et al. Beta-amyloid immunotherapy prevents synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. **The Journal of neuroscience**, v. 25, n. 40, p. 9096–9101, 2005.

CAPORALI, S. et al. DNA damage induced by temozolomide signals to both ATM and ATR: role of the mismatch repair system. **Molecular pharmacology**, v. 66, n. 3, p. 478–491, 2004.

CHEN, T. et al. Chloroquine induces the expression of inducible nitric oxide synthase in C6 glioma cells. **Pharmacological research**, v. 51, n. 4, p. 329–36, abr. 2005.

CHESTKOV, I. et al. Patient-specific induced pluripotent stem cells for SOD1-associated amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis studies. **Acta Naturae**, v. 6, n. 20, p. 54–60, 2014.

CIAFFARDINI, F. et al. The cockayne syndrome B protein is essential for neuronal differentiation and neuritogenesis. **Cell death & disease**, v. 5, n. 5, p. e1268, 2014.

CITTERIO, E. et al. ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 20, p. 7643–7653, 2000.

CLEAVER, J. Defective Repair Replication of DNA in Xeroderma Pigmentosum. **Nature**, v. 218, p. 652–656, 1968.

CLÉMENT, V. et al. UV-induced apoptosis in XPG-deficient fibroblasts involves activation of CD95 and caspases but not p53. **DNA Repair**, v. 6, n. 5, p. 602–614, 2007.

CLÉMENT, V.; DUNAND-SAUTHIER, I.; CLARKSON, S. Suppression of UV-induced apoptosis by the human DNA repair protein XPG. **Cell death and differentiation**, v. 13, n. 3, p. 478–488, 2006.

COCKAYNE, E. Dwarfism with retinal atrophy and deafness. **Archives of disease in childhood**, v. 21, n. 105, p. 52–54, 1936.

COCKAYNE, E. Dwarfism with retinal atrophy and deafness. **Archives of disease in childhood**, v. 21, p. 52–54, 1946.

COLELLA, S. et al. Identical mutations in the CSB gene associated with either Cockayne syndrome or the DeSanctis-cacchione variant of xeroderma pigmentosum. **Human molecular genetics**, v. 9, n. 8, p. 1171–1175, 2000.

CONFORTI, L.; ADALBERT, R.; COLEMAN, M. Neuronal death: where does the end begin? **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 4, p. 159–166, 2007.

COOKE, M. et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **FASEB journal**, v. 17, n. 10, p. 1195–1214, 2003.

CORTES, C. et al. Polyglutamine-expanded androgen receptor interferes with TFEB to elicit autophagy defects in SBMA. **Nature neuroscience**, v. 17, n. August, p. 5–8, 2014.

CORTEZ, D. Caffeine inhibits checkpoint responses without inhibiting the ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and ATM- and Rad3-related (ATR) protein kinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 39, p. 37139–37145, 2003.

COSTA, R. M. A et al. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. **Biochimie**, v. 85, n. 11, p. 1083–1099, 2003.

DAVIS, L. SPONGIOBLASTOMA MULTIFORME OF THE BRAIN. **Annals of Surgery**, v. 87, p. 8–14, 1928.

DE SANT'ANNA, G. et al. Síndrome de Cockayne: relato de caso. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, v. 14, p. 57–62, 2012.

DEGTYAREV, M. et al. Akt inhibition promotes autophagy and sensitizes PTEN-null tumors to lysosomotropic agents. **Journal of Cell Biology**, v. 183, p. 101–116, 2008.

DESIDERI, E.; FILOMENI, G.; CIRIOLO, M. Glutathione participates in the modulation of starvation-induced autophagy in carcinoma cells. **Autophagy**, v. 8, n. 12, p. 1769–1781, 2012.

DIANOV, G. et al. Reduced RNA polymerase II transcription in extracts of Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum/Cockayne syndrome cells. **Nucleic acids**, v. 25, n. 9, p. 3636–3642, 1997.

DIANOV, G. et al. Repair of 8-oxoguanine in DNA is deficient in Cockayne syndrome group B cells. **Nucleic acids research**, v. 27, p. 1365–1368, 1999.

DINGLEY, S. Fluorescence-Activated Cell Sorting Analysis of Mitochondrial Content, Membrane Potential, and Matrix Oxidant Burden in Human Lymphoblastoid Cell Lines. **12/22/2011**, p. 231–239, 2012.

DINGLEY, S.; CHAPMAN, K.; FALK, M. Fluorescence-activated cell sorting analysis of mitochondrial content, membrane potential, and matrix oxidant burden in human lymphoblastoid cell lines. **Methods in Molecular Biology**, v. 837, p. 231–239, 2012.

ELMORE, D. et al. The reaction of nucleic acids with mustard gas. **Biochemistry Journal**, v. 42, p. 308–316, 1948.

ERUSLANOV, E.; KUSMARTSEV, S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. **Methods in Molecular Biology**, v. 594, p. 57–72, 2010.

FOLLSTAD, B.; WANG, D.; STEPHANOPOULOS, G. Mitochondrial membrane potential differentiates cells resistant to apoptosis in hybridoma cultures. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 22, p. 6534–6540, 2000.

FOUKAS, L. et al. Direct effects of caffeine and theophylline on p110 delta and other phosphoinositide 3-kinases. Differential effects on lipid kinase and protein kinase activities. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 40, p. 37124–37130, 2002.

FREDERICKSEN, B. et al. Inhibition of Endosomal / Lysosomal Degradation Increases the Infectivity of Human Immunodeficiency Virus. **Journal of Virology**, v. 76, n. 22, p. 11440–11446, 2002.

FRIEDBERG, E. DNA damage and repair. **Nature**, v. 421, n. January, p. 436–440, 2003.

FRIEDMANN-MORVINSKI, D. et al. Dedifferentiation of Neurons and Astrocytes by Oncogenes Can Induce Gliomas in Mice. **Science**, v. 338, n. 6110, p. 1080–1084, 2012.

FURDA, A. M. et al. Analysis of DNA damage and repair in nuclear and mitochondrial DNA of animal cells using quantitative PCR. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 920, p. 111–132, 2012.

FURNARI, F. et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes & development**, v. 21, n. 21, p. 2683–710, 1 nov. 2007.

GENG, Y. et al. Chloroquine-induced autophagic vacuole accumulation and cell death in glioma cells is p53 independent. **Neuro-oncology**, v. 12, n. 5, p. 473–81, maio 2010.

GILMAN, C. et al. p53 is present in synapses where it mediates mitochondrial dysfunction and synaptic degeneration in response to DNA damage, and oxidative and excitotoxic insults. **Neuromolecular medicine**, v. 3, n. 3, p. 159–172, 2003.

GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1757, n. 5-6, p. 639–647, 2006.

GOLDEN, E. et al. Chloroquine enhances temozolomide cytotoxicity in malignant gliomas by blocking autophagy. v. 37, n. 6, p. 1–11, 2014.

GREENHAW, G. et al. Xeroderma pigmentosum and Cockayne syndrome: overlapping clinical and biochemical phenotypes. **American journal of human genetics**, v. 50, n. 4, p. 677–689, 1992.

GRIFFITH, F. The significance of Pneumococcal types. **The Journal of Hygiene**, v. 27, n. 2, p. 113–159, 1928.

GROISMAN, R. et al. CSA-dependent degradation of CSB by the ubiquitin-proteasome pathway establishes a link between complementation factors of the Cockayne syndrome. **Genes and Development**, v. 20, n. 11, p. 1429–1434, 2006.

GUARDIOLA, A. et al. Síndrome de cockayne: Relato de caso. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 57, n. 1, p. 106–110, 1999.

GURDON, J. The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 10, p. 622–640, 1962.

HANAWALT, P.; SPIVAK, G. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 12, p. 958–970, 2008.

HEBRA, F.; KAPOSI, M. **On diseases of the skin including exanthemata, volume III**. [s.l: s.n.].

HEERDT, B.; HOUSTON, M.; AUGENLICHT, L. The intrinsic mitochondrial membrane potential of colonic carcinoma cells is linked to the probability of tumor progression. **Cancer Research**, v. 65, n. 21, p. 9861–9867, 2005.

HEGI, M. et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. **The New England journal of medicine**, v. 352, n. 10, p. 997–1003, 2005.

HODGES, P. Dr. Emil H. Grubbe, pioneer Chicago radiologist. **Postgraduate Medical Journal**, v. 35, p. 85–87, 1964.

HOEIJMAKERS, J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 366–374, 2001.

HORIBATA, K. et al. Complete absence of Cockayne syndrome group B gene product gives rise to UV-sensitive syndrome but not Cockayne syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 43, p. 15410–15415, 2004.

IACOB, G.; DINCA, E. Current data and strategy in glioblastoma multiforme. **Journal of medicine and life**, v. 2, n. 4, p. 386–393, 2009.

INCA. **Estimativa/2014 - Incidência de Câncer no Brasil**. [s.l: s.n.].

ISHII, N. et al. Frequent Co-Alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN Tumor Suppressor Genes in Human Glioma Cell Lines. **Brain Pathology**, v. 9, n. 3, p. 469–479, 1999.

ITO, M. et al. GSTT1 is upregulated by oxidative stress through p38-mk2 signaling pathway in human granulosa cells: Possible association with mitochondrial activity. **Aging**, v. 3, n. 12, p. 1213–1223, 2011.

JAARSMA, D. et al. Cockayne syndrome pathogenesis: Lessons from mouse models. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 134, n. 5-6, p. 180–195, 2013.

JIANG, F. et al. Absence of cardiolipin in the crd1 null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 29, p. 22387–22394, 2000.

JIN, S.; RICHARD, J. PINK1- and Parkin- mediated mitophagy at a glance. **Journal of cell science**, v. 15, n. 125, p. 795–799, 2010.

KAMENISCH, Y. et al. Proteins of nucleotide and base excision repair pathways interact in mitochondria to protect from loss of subcutaneous fat, a hallmark of aging. **The Journal of experimental medicine**, v. 207, n. 2, p. 379–390, 2010.

KARAM, S. et al. Cockayne syndrome: Report of a Brazilian family with confirmation of impaired RNA synthesis after UV-irradiation. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 2, p. 273–275, 2000.

KATAYAMA, M. et al. DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. **Cell death and differentiation**, v. 14, n. 3, p. 548–58, mar. 2007.

KELLY, K.; MIRKWOOD, J.; KAPP, D. Glioblastoma and treatment multiforme : pathology , natural history and treatment. **Cancer Treatment Reviews**, v. 11, n. 1, p. 1–26, 1984.

KIM, E. et al. Chloroquine activates the p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells. **Neuro-Oncology**, v. 12, n. 4, p. 389–400, 2010.

KLEIJER, W. J. et al. Incidence of DNA repair deficiency disorders in western Europe: Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. **DNA Repair**, v. 7, n. 5, p. 744–750, 2008.

KOCH, S. et al. Cockayne syndrome protein A is a transcription factor of RNA polymerase I and stimulates ribosomal biogenesis and growth. **Cell Cycle**, v. 13, n. 13, p. 2029–2037, 2014.

KONDO, T. et al. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. **Cell Stem Cell**, v. 12, n. 4, p. 487–496, 2013.

KOSSEL, A.; NEUMANN, A. Über das thymin, ein spaltungsprodukt der nukleinsäure. **Ber. Deutsch. Chem. Ges.**, v. 26, n. 3, p. 2753–2756, 1893.

KUBOTA, M. et al. Nationwide survey of Cockayne syndrome in Japan: its incidence, clinical course and prognosis. **Pediatrics International**, p. Epub ahead of print, 2015.

LAPOSA, R.; HUANG, E.; CLEAVER, J. Increased apoptosis, p53 up-regulation, and cerebellar neuronal degeneration in repair-deficient Cockayne syndrome mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 4, p. 1389–1394, 2007.

LARJAVAARA, S. et al. Incidence of gliomas by anatomic location. **Neuro-oncology**, v. 9, n. 3, p. 319–325, 2007.

LASSMAN, A.; HOLLAND, E. Glioblastoma Multiforme — Past , Present , and Future. **US oncology review**, v. 1, n. 1, p. 109–111, 2006.

LATINI, P. et al. CSA and CSB proteins interact with p53 and regulate its Mdm2-dependent ubiquitination. **Cell Cycle**, v. 10, n. 21, p. 3719–3730, 2011.

LAUGEL, V. Cockayne syndrome: The expanding clinical and mutational spectrum. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 134, n. 5-6, p. 161–170, 2013.

LAWLEY, P.; BROOKES, P. Molecular mechanism of the cytotoxic action of difunctional alkylating agents and of resistance to this action. **Nature**, v. 206, p. 480–483, 1965.

LAWLEY, P.; WALLICK, C. The action of alkylating agents on DNA and gnanylic acid. **Chemistry and Industry**, v. 633, 1957.

LEHMANN, A. et al. Cockayne's syndrome: correlation of clinical features with cellular sensitivity of RNA synthesis to UV irradiation. **Journal of Medical Genetics**, v. 30, n. 8, p. 679–682, 1993.

LEINER, J.; KRAUS, W. The manner of invasion and destruction of brain tissue by spongioblastoma. **The Journal of Neurology and Psychopathology**, v. 7, n. 27, p. 227–232, 1927.

LEVINSON, E. et al. Cockayne Syndrome. **Journal of Computer Assisted Tomography**, v. 6, n. 6, p. 1172–1174, 1982.

LINDBERG, N. et al. Oligodendrocyte progenitor cells can act as cell of origin for experimental glioma. **Oncogene**, v. 28, n. 23, p. 2266–2275, 2009.

LINDENBAUM, Y. et al. Xeroderma pigmentosum/Cockayne syndrome complex: First neuropathological study and review of eight other cases. **European Journal of Paediatric Neurology**, v. 5, n. 6, p. 225–242, 2001.

LIU, J. et al. Signaling defects in iPSC-derived fragile X premutation neurons. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 17, p. 3795–3805, 2012.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOMAX, M.; FOLKES, L.; O'NEILL, P. Biological consequences of radiation-induced DNA damage: Relevance to radiotherapy. **Clinical Oncology**, v. 25, n. 10, p. 578–585, 2013.

LOUIS, D. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97–109, 2007a.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97–109, ago. 2007b.

LUSHCHAK, V. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. **Journal of Amino Acids**, v. 2012, p. 736837, 2012.

MALLERY, D. et al. Molecular analysis of mutations in the CSB (ERCC6) gene in patients with Cockayne syndrome. **American journal of human genetics**, v. 62, n. 1, p. 77–85, 1998.

MARCHETTO, M. et al. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. **Cell**, v. 143, n. 4, p. 527–39, 2010.

MARCHETTO, M.; WINNER, B.; GAGE, F. Pluripotent stem cells in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. R1, p. 71–76, 2010.

MAYNE, L.; LEHMANN, A. Failure of RNA Synthesis to Recover after UV Irradiation : An Early Defect in Cells from Individuals with Cockayne ' s Syndrome and Xeroderma Pigmentosum Failure of RNA Synthesis to Recover after UV Irradiation : An Early Defect in Cells from Individuals. **Cancer Research**, v. 42, n. 4, p. 1473–1478, 1982.

MCCLUNG, C. The accessory chromosome—Sex determinant? **Biological Buletin**, v. 3, p. 43–44, 1902.

MENCK, C.; MUNFORD, V. DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging? **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 220–233, 2014.

MESHNICK, S.; DOBSON, M. The history of anti-malarial drugs. In: **Antimalarial Chemotherapy Infectious Disease**. [s.l.: s.n.]. p. 15–25.

MICHIHARA, A. et al. Disruptive effect of chloroquine on lysosomes in cultured rat hepatocytes. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 28, n. 6, p. 947–951, 2005.

MIESCHER, F. Über die chemische zusammensetzung der eiterzellen. **Hoppe-Seyler's Med.-chem. Unders**, v. 4, p. 441–460, 1871.

MIESCHER, F. Das protamin, eine neue organische basis aus den samenfäden des rheinlachs. **Ber. Deutsch. Chem. Ges**, v. 7, p. 376–379, 1874a.

MIESCHER, F. No Title Die spermatozoen einiger wilbertiere. Ein Beitrag zur histochemie. **Verh. Naturf. Ges. Basel**, v. 6, n. 138-208, 1874b.

MIYAHARA, H. et al. Overexpression of p53 but not Rb in the cytoplasm of neurons and small vessels in an autopsy of a patient with Cockayne syndrome. **Neuropathology**, n. Epub ahead of print, 2014.

MIZUSHIMA, N. Autophagy : process and function. **Genes & development**, v. 21, n. 22, p. 2861–2873, 2007.

NANCE, M.; BERRY, S. **Cockayne syndrome: review of 140 cases**. **American journal of medical genetics**, 1992.

NARDO, T. et al. A UV-sensitive syndrome patient with a specific CSA mutation reveals separable roles for CSA in response to UV and oxidative DNA damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 15, p. 6209–6214, 2009.

NATALE, V. A comprehensive description of the severity groups in Cockayne syndrome. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 155, n. 5, p. 1081–1095, 2011.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. The definition of primary and secondary glioblastoma. **Clinical cancer research**, v. 19, n. 4, p. 764–72, 15 fev. 2013.

OLIVA, C. R. et al. Acquisition of temozolomide chemoresistance in gliomas leads to remodeling of mitochondrial electron transport chain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 39759–39767, 2010.

OSTROM, Q. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2006-2010. **Neuro-Oncology**, v. 15, n. 2, p. 1–56, 2013.

PARK, B. et al. Chloroquine-induced nitric oxide increase and cell death is dependent on cellular GSH depletion in A172 human glioblastoma cells. **Toxicology Letters**, v. 178, n. 1, p. 52–60, 2008.

PARK, S. et al. Cockayne syndrome: A case with hyperinsulinemia and growth hormone deficiency. **Journal of Korean Medical Science**, v. 9, n. 1, p. 74–77, 1994.

PARKER, N. et al. Molecular Heterogeneity in Glioblastoma: Potential Clinical Implications. **Frontiers in Oncology**, v. 5, n. 55, p. 1–9, 2015.

PASCUCCI, B. et al. An altered redox balance mediates the hypersensitivity of Cockayne syndrome primary fibroblasts to oxidative stress. **Aging Cell**, v. 11, n. 3, p. 520–529, 2012.

PATZEWITZ, E.-M. et al. Glutathione transport: a new role for PfCRT in chloroquine resistance. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, p. 683–95, 2013.

PEPAJ, M. et al. Tmem27 is upregulated by vitamin D in INS-1 cells and its serum concentrations are low in patients with autoimmune diabetes. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**, v. 74, n. 4, p. 358–365, 2014.

PORTIN, P. The birth and development of the DNA theory of inheritance: Sixty years since the discovery of the structure of DNA. **Journal of Genetics**, v. 93, n. 1, p. 293–302, 2014.

PRAY, L. Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p. 100, 2008.

QUINET, A. et al. Gap-filling and bypass at the replication fork are both active mechanisms for tolerance of low-dose ultraviolet-induced DNA damage in the human genome. **DNA Repair**, v. 14, p. 27–38, 2014.

RAJ, D. et al. Disruption of a Plasmodium falciparum multidrug resistance-associated protein (PfMRP) alters its fitness and transport of antimalarial drugs and glutathione. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 12, p. 7687–7696, 2009.

RAJAGOPAL, A.; SIMON, S. Subcellular localization and activity of multidrug resistance proteins. **Molecular biology of the cell**, v. 14, n. 8, p. 3389–3399, 2003.

RAJASEKARAN, M.; HELLSTROM, W.; SIKKA, S. Nitric oxide induces oxidative stress and mediates cytotoxicity to human cavernosal cells in culture. **Journal of andrology**, v. 22, n. 1, p. 34–39, 2001.

RAPIN, I. et al. Cockayne Syndrome in Adults: Review With Clinical and Pathologic Study of a New Case. **Changes**, v. 21, n. 11, p. 991–1006, 2006.

RAVIKUMAR, B. et al. Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 7, p. 1209–1216, 2006.

ROOS, W. P. et al. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. **Oncogene**, v. 26, p. 186–197, 2007.

SAIJO, M. The role of Cockayne syndrome group A (CSA) protein in transcription-coupled nucleotide excision repair. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 134, n. 5-6, p. 196–201, 2013.

SCHEIBYE-KNUDSEN, M. et al. **Cockayne syndrome group B protein prevents the accumulation of damaged mitochondria by promoting mitochondrial autophagy** *Journal of Experimental Medicine*, 2012.

SCHEIBYE-KNUDSEN, M. et al. A high-fat diet and NAD(+) activate Sirt1 to rescue premature aging in cockayne syndrome. **Cell metabolism**, v. 20, n. 5, p. 840–855, 2014.

SCHERER, H. a Critical Review: the Pathology of Cerebral Gliomas. **Journal of neurology and psychiatry**, v. 3, n. 2, p. 147–177, 1940a.

SCHERER, H. Cerebral astrocytomas and their derivatives. **The American Journal of Cancer**, v. 40, n. 2, p. 159–198, 1940b.

SCHERZ-SHOUVAL, R.; SHVETS, E.; ELAZAR, Z. Oxidation as a post-translational modification that regulates autophagy. **Autophagy**, v. 3, n. 4, p. 371–373, 2007.

SCHMICKEL, R. et al. Cockayne Syndrome: A Cellular Sensitivity to Ultraviolet Light. **Pediatrics**, v. 60, n. 2, p. 135–139, 1977.

SELBY, C.; SANCAR, A. Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 21, p. 11205–11209, 1997.

SHERIDAN, C. et al. Bax- or Bak-Induced Mitochondrial Fission Can Be Uncoupled from Cytochrome c Release. **Molecular Cell**, v. 31, n. 4, p. 570–585, 2008.

SOHUR, U. et al. Adult neurogenesis and cellular brain repair with neural progenitors, precursors and stem cells. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 361, n. 1473, p. 1477–1497, 2006.

SOLOMON, V.; LEE, H. Chloroquine and its analogs: A new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. **European Journal of Pharmacology**, v. 625, n. 1-3, p. 220–233, 2009.

SOLTYS, D. et al. Novel XPG (ERCC5) Mutations Affect DNA Repair and Cell Survival after Ultraviolet but not Oxidative Stress. **Human Mutation**, v. 34, n. 3, p. 481–489, 2013.

SOTELO, J.; BRICEÑO, E.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, M. A. Adding chloroquine to conventional treatment for glioblastoma multiforme: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 144, p. 337–343, 2006.

SPIVAK, G.; GANESAN, A. The complex choreography of transcription-coupled repair. **DNA Repair**, v. 19, n. Epub ahead of print, p. 64–70, 2014.

STUPP, R. et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 10, p. 987–96, 2005.

SUTTON, W. The chromosomes in heredity. **The Biological bulletin**, v. 4, p. 231–251, 1903.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–676, 2006.

TANABE, K.; TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotency by defined factors. **Cell**, v. 90, n. 3, p. 83–96, 2014.

TIAN, C. et al. Characterization of induced neural progenitors from skin fibroblasts by a novel combination of defined factors. **Scientific reports**, v. 3, n. 1345, p. 1–7, 2013.

TOLER, S.; NOE, D.; SHARMA, A. Selective enhancement of cellular oxidative stress by chloroquine: implications for the treatment of glioblastoma multiforme. **Neurosurgical focus**, v. 21, n. 6, p. E10, 2006.

TUO, J. et al. Primary fibroblasts of Cockayne syndrome patients are defective in cellular repair of 8-hydroxyguanine and 8-hydroxyadenine resulting from oxidative stress. **The FASEB journal**, v. 17, n. 6, p. 668–674, 2003.

VESSONI, A. et al. Autophagy and genomic integrity. **Cell death and differentiation**, v. 20, n. 11, p. 1444–54, 2013.

VESSONI, A.; MUOTRI, A.; OKAMOTO, O. Autophagy in Stem Cell Maintenance and Differentiation. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 4, p. 513–520, 2012.

VILLA-DIAZ, L. et al. Analysis of the factors that limit the ability of feeder cells to maintain the undifferentiated state of human embryonic stem cells. **Stem cells and development**, v. 18, n. 4, p. 641–651, 2009.

WANG, Y. et al. Dysregulation of gene expression as a cause of Cockayne syndrome neurological disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 40, p. 14454–14459, 2014.

WATSON, J.; CRICK, F. **Molecular structure of nucleic acids**. **Nature**, 1953.

WEI, T. et al. Nitric oxide induces oxidative stress and apoptosis in neuronal cells. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1498, n. 1, p. 72–79, 2000.

WEIDENHEIM, K.; DICKSON, D.; RAPIN, I. Neuropathology of Cockayne syndrome: Evidence for impaired development, premature aging, and neurodegeneration. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 130, n. 9, p. 619–636, 2009.

WEINBERG, R. et al. Comparative binding of p53 to its promoter and DNA recognition elements. **Journal of Molecular Biology**, v. 348, n. 3, p. 589–596, 2005.

WUNDERLICH, J.; ROHRBACH, P.; DALTON, J. The malaria digestive vacuole. **Frontiers in bioscience (Scholar edition)**, v. 4, p. 1424–48, jan. 2012.

YAMADA, Y.; KAWAMURA, E.; HARASHIMA, H. Mitochondrial-targeted DNA delivery using a DF-MITO-Porter, an innovative nano carrier with cytoplasmic and mitochondrial fusogenic envelopes. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 8, 2012.

YOON, Y. H. et al. Induction of lysosomal dilatation, arrested autophagy, and cell death by chloroquine in cultured ARPE-19 cells. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 51, p. 6030–6037, 2010.

ZAMAN, G. et al. Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 17, p. 7690–7694, 1995.

ZHANG, F.; LAU, S.; MONKS, T. The cytoprotective effect of N-acetyl-L-cysteine against ROS-induced cytotoxicity is independent of its ability to enhance glutathione synthesis. **Toxicological Sciences**, v. 120, n. 1, p. 87–97, 2011.

ZHANG, J.; STEVENS, M.; BRADSHAW, T. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. **Current Molecular Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 102–114, 2011.

ZHENGKE, L. **New Insights into the Roles of Human DNA Damage Checkpoint Protein ATR in the Regulation of Nucleotide Excision Repair and DNA Damage-Induced Cell Death**. [s.l: s.n.].

ZHOU, T. et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. **Nature protocols**, v. 7, n. 12, p. 2080–9, 2012.

Anexos

Artigos publicados

Na seguinte ordem:

A - *Autophagy in stem cell maintenance and differentiation*. **Vessoni AT**, Muotri AR, Okamoto OK. **Stem Cells and Development**, 2012.

B - *Autophagy and genomic integrity*. **Vessoni AT**, Filippi-Chiela EC, Menck CF, Lenz G. **Cell Death and Differentiation**, 2013.

C - *Gap-filling and bypass at the replication fork are both active mechanisms for tolerance of low-dose ultraviolet-induced DNA damage in the human genome*. Quinet A, **Vessoni AT**, Rocha CR, Gottifredi V, Biard D, Sarasin A, Menck CF, Stary A. **DNA Repair**, 2014.

D - *Three-dimensional microenvironment confers enhanced sensitivity to doxorubicin by reducing p53-dependent induction of autophagy*. Gomes LR, **Vessoni AT**, Menck CF. **Oncogene**, 2015.

Autophagy in Stem Cell Maintenance and Differentiation

Alexandre Teixeira Vessoni,¹ Alysson Renato Muotri,² and Oswaldo Keith Okamoto³

Autophagy is a lysosome-dependent degradation pathway that allows cells to recycle damaged or superfluous cytoplasmic content, such as proteins, organelles, and lipids. As a consequence of autophagy, the cells generate metabolic precursors for macromolecular biosynthesis or ATP generation. Deficiencies in this pathway were associated to several pathological conditions, such as neurodegenerative and cardiac diseases, cancer, and aging. The aim of this review is to summarize recent discoveries showing that autophagy also plays a critical role in stem cell maintenance and in a variety of cell differentiation processes. We also discuss a possible role for autophagy during cellular reprogramming and induced pluripotent stem (iPS) cell generation by taking advantage of ATP generation for chromatin remodeling enzyme activity and mitophagy. Finally, the significance of autophagy modulation is discussed in terms of augmenting efficiency of iPS cell generation and differentiation processes.

Introduction

PLURIPOTENT STEM CELLS are defined by their self-renewal capacity and their ability to develop into cells of all 3 germ layers. Theoretically, those cells hold great promise for regenerative medicine, where they could be used to replace damaged cells of a tissue, thus constituting a powerful tool to treat several diseases [1–5]. The advent of induced pluripotent stem (iPS) cells [6] opened new avenues to model complex diseases in vitro [7–10]. Moreover, resultant iPS cells are isogenic to the donor, thereby allowing transplantation of the reprogrammed cells with theoretically lower risks of immune rejection [11–14].

Mechanisms of cellular homeostasis are important for preventing cellular injuries that could lead to impaired cellular function and ultimately cell death. One of those mechanisms is macroautophagy (hereafter called autophagy), a lysosome-dependent degradation pathway that allows the recycling of damaged or superfluous cytoplasmic content, such as proteins and organelles. During autophagy, an isolation membrane, or phagophore, hijacks portions of the cytoplasm, giving rise to the autophagosome. This double-membrane vesicle subsequently fuses with the lysosome, where the enclosed material will be released and degraded by lysosomal enzymes. Such process yields cell metabolic precursors that can be used for ATP generation or protein synthesis, for example (Fig. 1) [15–19].

The autophagic pathway can be activated under different stimuli, such as starvation [17], endoplasmic reticulum stress

[20], DNA damage [21], and reactive oxygen species (ROS) [22], thereby eliciting a cytoprotective response that helps cells to overcome those stressful situations. Deregulation of this pathway has been linked to several pathologies, such as neurodegenerative and cardiac disorders, cancer, and aging [15,23–25].

In this article, we will summarize recent evidences showing that autophagy plays an important role in stem cell maintenance and differentiation. We will also discuss a possible role for autophagy during cellular reprogramming and iPS cell generation.

Autophagy Acts as a Cell Remodeling Mechanism During Cell Differentiation

As previously described, autophagy acts as an intracellular quality control mechanism through degradation of damaged or obsolete organelles and proteins. For instance, T lymphocytes deficient for the autophagy genes, *Atg3*, *5*, or *7*, show abnormal mitochondria accumulation and expanded endoplasmic reticulum due to impaired organelle homeostasis. As a result, there is an increase in ROS production and elevation in intracellular calcium that further impairs calcium influx, affecting the survival of T lymphocytes [26–28].

Besides acting as quality control mechanism in differentiated cells, autophagy was also shown to participate in differentiation, as a cell remodeling mechanism that promotes morphological and structural changes. During adipogenesis, preadipocytes differentiate into adipocytes, a cell type that

¹Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

²Department of Pediatrics/Rady Children's Hospital, Department of Cellular and Molecular Medicine, School of Medicine, University of California San Diego, La Jolla, California.

³Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

FIG. 1. The autophagic degradation pathway. An isolation membrane (phagophore) sequesters cytosolic components into the autophagosome, a double-membrane vesicle that then fuses with the lysosome, originating the autolysosome. Inside of it, the captured material and the inner membrane of the autophagosome are degraded by lysosomal enzymes, thereby generating metabolic precursors that can be used for generating nutrients and energy (adapted from 15). Color images available online at www.liebertonline.com/scd

accumulates triglycerides inside a single and large cytoplasmic lipid droplet [29]. It was shown that preadipocytes deficient for *Atg5* or *Atg7*, or treated with 3-methyl-adenine (3-MA), a pharmacological inhibitor of autophagy, originate smaller cells with decreased markers of adipocyte differentiation and reduced accumulation of triglycerides (Fig. 2A) [30]. Moreover, those triglycerides were stored inside small multilocular lipid clusters instead of a single large droplet. Authors noticed that those cells displayed a marked increase

in mitochondria number and fatty acid β -oxidation levels, similar to what is found in brown adipose tissue cells (Fig. 2A). Similar results were observed by other authors who hypothesized that autophagy could be responsible for the cytoplasm remodeling activity that takes place during white adipocyte differentiation. Impairment of this pathway led to the accumulation of mitochondria, resulting in elevated rates of fatty acid β -oxidation. As a consequence, fatty acids were depleted, thus, impairing triglyceride synthesis that would

FIG. 2. Autophagy is required during differentiation. **(A)** Adipocytes derived from *Atg7*-deficient (*Atg7*^{-/-}) preadipocytes show increased accumulation of mitochondria, elevated fatty acid β -oxidation rates, and reduced triglycerides accumulation (adapted from 31). **(B)** Erythrocytes derived from *Nix*-deficient (*Nix*^{-/-}) reticulocytes show increased accumulation of mitochondria, reactive oxygen species (ROS) generation, caspase activation, and reduced survival. Color images available online at www.liebertonline.com/scd

accumulate inside the cell [31]. The authors also generated a mouse line carrying an adipocyte-specific *Atg7* knockout allele, and observed that the animals were leaner, highly active, resistant to diet-induced obesity, and showed reduced white adipose tissue (WAT) mass. Low leptin levels and insulin resistance were also observed due to decreased WAT mass in these animals.

Similarly, it was also demonstrated that during terminal differentiation of reticulocytes into erythrocytes, mitochondria are eliminated in an autophagy-dependent fashion [32]. During this process, autophagy could selectively degrade mitochondria (a process called mitophagy) and that Nix, a BH3-only member of the Bcl-2 family, induces loss of mitochondrial membrane potential, an initial and critical step for selective engulfment of mitochondria into autophagosomes [33]. Because of defective mitochondrial removal, *Nix*^{-/-} red blood cells (reticulocytes and erythrocytes) showed decreased survival in mice (probably resulting in the anemia observed in these animals), increased ROS generation, and caspase activation (Fig. 2B). The authors also described that pharmacological inhibitors of autophagy (3-MA, wortmannin, and chloroquine) also suppressed mitochondria removal in reticulocytes, confirming that this process is autophagy-dependent. Moreover, absence of *Atg7* impairs mitophagy in erythroid cells, thereby leading to accumulation of mitochondrial superoxide in basophilic erythroblasts (Ter119⁺/CD71^{High}), suggesting that defective mitophagy results in oxidative stress that may contribute to red blood cell death [34].

The importance of autophagy during cell differentiation is not restricted to mitochondria clearance, but may also extend to amino acid generation and possibly protein degradation. In support of this hypothesis, it was reported that during the oocyte-to-embryo transition, in the early mouse embryogenesis, autophagy is activated within 4 h after fertilization. Inhibition of this pathway (through *Atg5* knockout) results in arrest at the four-to-eight-cell stage. The authors also noticed reduced protein synthesis (~60% of that of the wild-type embryo), probably due to a lack of necessary amino acids provided by autophagy-promoted turnover of cytosolic content [35]. The authors also considered the possibility that autophagy could be responsible for degradation of oocyte-inherited proteins. In this case, defective autophagy would allow accumulation of maternally derived proteins and/or obsolete cytosolic material that could impair further zygote development.

Moreover, considering that some amino acids generated through the autophagic pathway may be used for protein synthesis, or even further processed in the tricarboxylic acid (TCA) cycle in order to provide intermediates that can be converted into nucleotides and sterols [16], it is tempting to speculate that autophagy may help cells undergoing differentiation to synthesize proteins and other cellular constituents, in addition to degrade proteins related to pluripotency maintenance that may impair differentiation.

Other studies support a clear role for autophagy during cell differentiation. It was described that hypoxia-mediated differentiation of RAW264.7 cells into osteoclasts is dependent on autophagy [36]. This process was activated in a HIF-1 α /BNIP3-dependent fashion. Ablation of this pathway, using a specific HIF-1 inhibitor (YC-1), HIF-1 α siRNA, or BNIP-3 miRNA plasmids, markedly prevented autophagy

induction, as well as hypoxia-induced osteoclastogenesis. Autophagy inhibition using the pharmacological inhibitor 3-methyladenine or transfection with dominant-negative plasmids for *Atg5* (DN-*Atg5*^{K130R}) also resulted in abrogation of hypoxia-induced osteoclastogenesis.

Moreover, treatment with rapamycin, a drug commonly used to inhibit the mTOR complex (which regulates protein synthesis, cell growth, and also inhibits autophagy) or mTOR or raptor (*regulatory associated protein of mTOR*) silencing potentiates dbcAMP-mediated differentiation in the neuroblastoma glioma model NG108-15 cell line. The authors observed that rapamycin did not induce an increase in dbcAMP-mediated phosphorylation of p44/p42 ERK or CREB, although they have noticed an increase in cell cycle arrest, ATP generation, and autophagy upon treatment. Moreover, inhibition of the autophagic pathway by 3-MA or through silencing of the autophagy-essential gene *beclin 1* abrogates the potentiation in NG108-15 differentiation mediated by rapamycin, revealing that autophagy might potentiate this process [37].

Autophagy upregulation was also noticed during keratinocyte fate commitment [38]. After inducing nonlethal stress by changing culture medium of HaCat (precancerous human keratinocyte) cells from KFSMTM (which is recommended for keratinocyte culture) to M199, the authors noticed dissociation of Beclin 1 from Bcl-X, an increase in LC3II, ATG5-ATG12 complex, and also in SIRT1, a NAD-dependent deacetylase that participates in cell differentiation and autophagy regulation. They also noticed an increase in the expression of the lysosomal enzyme cathepsin D, suggesting an increase in lysosome-dependent degradation activity during the process.

Although some autophagy genes and widely used pharmacological inhibitors of the autophagic pathway were shown not to be specific to this pathway [39], the data presented in here comprise different cell types, silencing of different autophagy-related genes, and use of different inhibitors. Thus, those results suggest that autophagy may play a pivotal role in a variety of cell differentiation processes.

Autophagy Protects the Genome and Helps to Maintain Hematopoietic Stem and Progenitor Cells

Stem cells need to protect their genome from damage to maintain their pool and self-renewal capacity [40]. It was also shown that intracellular ROS levels influence the long-term self-renewal capacity of hematopoietic stem cells (HSCs) [41,42]. In fact, the authors showed that HSCs deficient for *Atm* (a serine/threonine protein kinase involved in DNA damage response) exhibited high intracellular levels of ROS, reducing the long-term self-renewal capacity in a p38 MAPK-dependent manner. Moreover, long-term repopulating HSCs in murine bone marrow are highly positive for pimonidazole, a hypoxic marker, suggesting that low ROS levels help HSCs to maintain their self-renewal potential. [40] Embryonic stem (ES) cells exhibit fewer mitochondria and, consequently, lower reliance upon oxidative phosphorylation, resulting in fewer ROS generation (an important source of DNA damage) when compared with differentiated cells [43,44].

It was shown that *beclin 1* +/– mice exhibit elevated incidence of spontaneous tumors in comparison with wild-type animals [45]. *beclin 1* +/– or *Atg5* –/– cells engineered to express Bcl2 exhibited elevated DNA damage, gene amplification, chromosomal instability, and aneuploidy, suggesting a contribution for autophagy in maintaining genome integrity [46]. Also, autophagy-defective tumor cells accumulate p62 protein, leading to an increase in ROS levels, thereby contributing to tumorigenesis [47]. It was also proposed that autophagy may degrade defective mitochondria, preventing excessive ROS generation that could induce DNA damage and promote tumorigenesis (Fig. 3A) [48].

In fact, it was shown that conditional deletion of *Atg7* throughout the hematopoietic system in mice (*Vav-Atg7* –/– mice) results in anemia and lymphopenia [34,49]. The authors showed that *Atg7* –/– hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) significantly accumulate more aberrant mitochondria, show elevated mitochondrial superoxide levels, DNA damage (53BP1), and apoptosis (caspase 3 activation) (Fig. 3B). They also showed that those cells failed to form secondary colonies in vitro. Moreover, in an assay to evaluate the reconstitution ability of those cells, *Vav-Atg7* –/– BM cells were transplanted into CD45.1⁺-irradiated hosts, failed to sustain a long-term hematopoiesis, resulting in death of the hosts within 4 weeks. Collectively, these results suggest that autophagy seems crucial to sustain HSC activity. The authors also have noticed that the frequency of myeloid (CD11b+Gr1+) cells was increased in the spleen and bone marrow of *Vav-Atg7* –/– mice, suggesting an atypical myeloproliferation. In fact, those cells were positive for the proliferation marker Ki67, and myeloproliferative infiltrates were found in myeloid and nonmyeloid organs in all *Vav-Atg7* –/– mice analyzed. Those results suggest that impaired aberrant mitochondria removal in *Vav-Atg7* –/– HSPCs led to elevated ROS generation, followed by DNA damage and subsequently genetic alterations that could confer *Vav-Atg7* –/– HSPCs a malignant phenotype.

Those studies support a clear role for autophagy in preventing genomic instability and maintaining adult HSC population, preventing disorders such as anemia, lymphopenia, and also cancer.

A Possible Role for Autophagy-Driven ATP in ES Cell Maintenance and Differentiation

During recycling of cytosolic material, autophagy may provide the cells with amino acids that can be oxidized in the TCA cycle, allowing the generation of FADH₂ and NADH for the electron transport chain, supporting ATP production [15–17]. This phenomenon was shown to be responsible for maintaining viability of cells deprived of nutrients and growth factors. Moreover, this autophagy-driven ATP production was shown to prevent mitotic catastrophe in glioma cell lines treated with the DNA damage-inducing agents Temozolomide or Etoposide [21]. Autophagy was also shown to support glycolysis-mediated ATP production in apoptosis-deficient cells with depolarized mitochondria [50]. These results suggest a protective role for autophagy-mediated ATP generation in cells undergoing different stressful situations.

It was also shown that autophagy plays a crucial role in programmed cell death during mammalian morphogenesis

[51]. In this study, the authors observed that embryoid bodies (EBs) derived from *beclin 1* or *Atg5*-deficient mouse ES cells fail to cavitate, a process in which the proamniotic cavity is formed when the solid embryonic ectoderm undergoes apoptosis. Although apoptotic levels and cavitation signals were normal in these cells, authors noticed that dying cells activate autophagy to generate ATP, which will be used in an energy-dependent mechanism to generate the “eat me” (phosphatidylserine) and to secrete the “come and get me” (lysophosphatidylcholine) signals. Failure to express those signals led to impaired phagocytic removal of dead cells, resulting in their accumulation in the center of the EBs and, consequently, impaired EB cavitation.

In ES cells, the pluripotent state is maintained by different mechanisms, such as key transcription factors (Oct4, Sox2, Nanog, and Klf4), miRNAs, and also by chromatin remodeling enzymes (CREs) [52,53,54]. Those CREs act in an ATP-dependent manner, disrupting interactions between histones and DNA, thereby inducing nucleosome conformational changes. These modifications increase DNA accessibility, allowing gene regulators to induce (or repress) gene expression.

SWI/SNF, ISWI, and CHD are 3 well-characterized families of ATP-dependent CREs. For example, BAF complexes (one of two major subfamilies that compose the SWI/SNF family) are ATP-dependent nucleosome remodeling complexes that were shown to both express and repress gene expression. A specialized embryonic stem (es)BAF complex (defined by the presence of Brg, BAF155, and BAF60A, and absence of BRM, BAF60C, and BAF170 subunits) has been reported necessary for self-renewal and pluripotency of ES cells [55]. In this study, Brg, the core ATPase subunit, was depleted (using shRNA-mediated knockdown) in murine E14ES, resulting in marked reduction in self-renewal and lost of colony morphology and alkaline phosphatase staining.

Besides maintaining the pluripotent state in ES cells, BAF complexes may change its subunit composition and mediate ES cells exit from the self-renewal cycle, allowing differentiation of these cells into neuronal precursors, for example [56].

Taking into account that autophagy provides cells with ATP for essential processes, and also for normal embryonic development, we hypothesize whether autophagy could provide ATP for the activity of those CREs.

Moreover, autophagy could also provide ATP for proper function of several other processes related to pluripotent-state maintenance. For example, ABCG2, an ATP binding cassette transporter of xenobiotic and chemotherapeutics agents that is highly expressed in hematopoietic cells and drug-resistant cancer cells [57], was shown to influence the self-renewal of mouse ES cells [58]. Authors described that inhibition of ABCG2 by Fumitremorgin C in these cells resulted in accumulation of protoporphyrin IX, which in turn leads to an increase in ROS levels, DNA damage, p53 and p53 phosphorylation (ser 18, 23, and 389), and down-regulation of Nanog.

Although merely speculation, autophagy could help ES cells to maintain their self-renewal and pluripotency capacity, or also to differentiate, by providing ATP for CRE activity and ABC transporters, among other ATP-dependent processes.

FIG. 3. Autophagy is required for hematopoietic stem and progenitor cell (HSPC) maintenance. **(A)** Impaired autophagy leads to accumulation of defective mitochondria. As a consequence, there is an increase in reactive oxygen species (ROS), which could induce oxidative damage in the DNA (adapted from 46). **(B)** *Atg7*-deficient (*Atg7*^{-/-}) HSPCs display accumulation of aberrant mitochondria, increased superoxide levels, elevated DNA damage and apoptosis, and reduced capacity to form secondary colonies in vitro. Color images available online at www.liebertonline.com/scd

Does Autophagy Play an Important Role in iPS Cell Generation?

In 2006, Takahashi and Yamanaka showed that introduction of 4 transcription factors (Oct3/4, Sox2, c-Myc, and Klf4) into mouse embryonic or adult fibroblasts was shown to reprogram differentiated cells to an embryonic-like state [6]. Those cells were named iPS cells, and exhibit ES markers and properties. For instance, ES cells have fewer mitochondria that are less active and less developed than those found in differentiated cells [43,44,59]. As a consequence, ES cells rely more on anaerobic than aerobic metabolism, generating fewer ROS that could induce DNA damage and, subsequently, lost of self-renewal capacity. Similar characteristics were recently described in iPS cells generated from human fibroblasts (Fig. 4), such as increased lactate production, reduced ATP generation, and decreased mitochondrial mass and number with an immature phenotype (round shape and underdeveloped cristae) [44,60,61].

The reduction in mitochondria number is likely to be responsible for the observed decrease in superoxide production in the generated iPS cell clones when compared with the fibroblast population from which they were originated. However, the process by which large amounts of mito-

chondria, present in the adult fibroblast, are eliminated during iPS cell generation is currently unclear.

We have previously discussed in this article that autophagy plays an essential role during differentiation of erythrocytes and adipocytes by promoting mitochondria degradation. Here, we hypothesize that autophagy could also play an important role in mediating remodeling of differentiated cells to a pluripotent state during iPS cell generation. In this scenario, autophagy would promote mitochondria degradation during iPS cell generation, allowing differentiated cells to reduce the amount of this organelle to an ES-like level. Moreover, autophagy could also promote degradation of proteins present in the differentiated cells that could impair (or slow) reprogramming, thereby eliminating proteins that should not be present in the pluripotent state. Autophagy-mediated turnover of proteins may also yield amino acids that could be used to boost protein synthesis. Taking into consideration that differentiated cells exhibit different proteome and organelle composition when compared with iPS (and ES) cells, it is tempting to speculate that autophagy may act as a cell remodeling mechanism not only during cell differentiation, but also during cell dedifferentiation.

A simple approach to tackle this problem would be to generate iPS cells from autophagy-deficient (*Atg7*^{-/-})

FIG. 4. Variation of mitochondria content during genetic reprogramming to the pluripotent state. Induced pluripotent stem cells show reduced number of mitochondria, lower reactive oxygen species (ROS) generation, and increased lactate production than their respective somatic cells of origin. (Adapted from [61]) Color images available online at www.liebertonline.com/scd

adult dermal skin fibroblasts. If feasible, mitochondria mass and number, as well as presence of mature or immature mitochondria, and also superoxide levels, should be assessed and compared with the results previously described in this topic. An increase in developed mitochondria number and mass, as well as superoxide levels, in the autophagy-deficient iPS cells generated, would argue for a pivotal role for autophagy during reprogramming. Colony-formation assay followed by alkaline phosphatase staining [6,55,62] should confirm that autophagy-defective iPS cells may exhibit reduced self-renewal capacity due to increased ROS generation, for example. Protein synthesis rates could also be assessed, aiming at identifying whether autophagy-derived amino acids are being used in the newly synthesized proteins during the reprogramming process.

Moreover, human-derived iPS cells could be used as a tool to explore the importance of autophagy in various cell differentiation programs. The enormous variety of protocols describing methods to differentiate iPS cells into various cell types would allow us to study a more precise role of autophagy in several of these processes.

Concluding Remarks

Autophagy is a lysosome-dependent degradation pathway that allows cells to eliminate damaged or obsolete cytosolic components, such as proteins and organelles. Such mechanism provides the cells with metabolic precursors that can be used to maintain homeostasis during stressful conditions.

In this review, we discussed evidences showing that autophagy may also play an important role as a cell remodeling mechanism during cell differentiation and in HSPC maintenance. By degrading organelles and proteins, autophagy may help differentiating cells to degrade unwanted cytosolic material, such as mitochondria during adipocyte or erythrocyte differentiation. Moreover, by preventing accumulation of damaged mitochondria, autophagy contributes to keep low levels of ROS in HSPCs, thereby preventing cellular injuries that could contribute to loss of viability and self-renewal potential of these cells.

We also discussed a possible role for autophagy in mediating generation of ATP that could be used by ATP-dependent CREs, which participate in stem cell maintenance and in cell differentiation processes. Moreover, we suggest a set of experiments to investigate our hypothesis that autophagy may act as a cell remodeling mechanism during iPS cell generation, mediating organelle and protein degradation, thereby helping differentiated cells to achieve an ES-like composition. Finally, we suggest using iPS cells as a model to analyze the importance of autophagy in a wide variety of cell differentiation processes.

In light of the potential value of iPS cells for regenerative medicine, it is tempting to speculate that modulation of autophagy could become an essential component of protocols describing methods to obtain differentiated cells from iPS cells. In this scenario, tight regulation of autophagy during differentiation may have important outcomes, such as an increase in the efficiency of this process. In the same way, generation of iPS cells from differentiated ones may also be positively influenced by autophagy modulation. Finally, considering the differences observed between mitochondria

of differentiated and ES/iPS cells, it is intriguing to imagine that transfer of iPS cell-derived mitochondria to somatic cells may also have a positive impact in reprogramming efficiency.

Acknowledgments

A.T. Vessoni would like to thank Dr. Carlos Frederico Martins Menck for the helpful comments on the manuscript. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-São Paulo, Brazil) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq-Brasília, Brazil).

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Cohen DE and D Melton. (2011). Turning Straw into gold: directing cell fate for regenerative medicine. *Nat Rev Genet* 12:243–252.
2. Shiba Y, KD Hauch and MA Laflamme. (2009). Cardiac applications for human pluripotent stem cells. *Curr Pharm Des* 15:2791–2806.
3. Comyn O, E Lee and RE MacLaren. (2010). Induced pluripotent stem cell therapies for retinal disease. *Curr Opin Neurol* 23:4–9.
4. Hwang DY, DS Kim and DW Kim. (2010). Human ES and iPS cells as cell sources for the treatment of Parkinson's disease: current state and problems. *J Cell Biochem* 109:292–301.
5. Nsair A and WR MacLellan. (2011). Induced pluripotent stem cells for regenerative cardiovascular therapies and biomedical discovery. *Adv Drug Deliv Rev* 63:324–330.
6. Takahashi K and S Yamanaka. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663–676.
7. Marchetto MC, C Carrromeu, A Acab, D Yu, GW Yeo, Y Mu, G Chen, FH Gage and AR Muotri. (2010). A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 143:527–539.
8. Marchetto MC, B Winner and FH Gage. (2010). Pluripotent stem cells in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases. *Hum Mol Genet* 19:R71–R76.
9. Mattis VB and CN Svendsen. (2011). Induced pluripotent stem cells: a new revolution for clinical neurology? *Lancet Neurol* 10:383–394.
10. Han SS, LA Williams and KC Eggan. (2011). Constructing and deconstructing stem cell models of neurological disease. *Neuron* 70:626–644.
11. Muotri, AR. (2009). Modeling epilepsy with pluripotent human cells. *Epilepsy Behav* 14 (Suppl. 1):81–85.
12. Asgari S, B Pournasr, GH Salekdeh, A Ghodsizadeh, M Ott and H Baharvand. (2010). Induced pluripotent stem cells: a new era for hepatology. *J Hepatol* 53:738–751.
13. Carpenter MK and LA Couture. (2010). Regulatory considerations for the development of autologous induced pluripotent stem cell therapies. *Regen Med* 5:569–579.
14. Nakagawa M and S Yamanaka. (2010). Reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Adv Exp Med Biol* 695:215–224.
15. Levine B and G Kroemer. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132:27–42.

16. Lum JJ, RJ DeBerardinis and CB Thompson. (2005). Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:439–448.
17. Singh R and AM Cuervo. (2011). Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab* 13:495–504.
18. He C and DJ Klionsky. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 43:67–93.
19. Mizushima N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21:2861–2873.
20. Yorimitsu T and DJ Klionsky. (2007). Eating the endoplasmic reticulum: quality control by autophagy. *Trends Cell Biol* 17:279–285.
21. Katayama M, T Kawaguchi, MS Berger and RO Pieper. (2007). DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. *Cell Death Differ* 14:548–558.
22. Chen Y, MB Azad and SB Gibson. (2009). Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ* 16:1040–1052.
23. Pattison JS and J Robbins. (2011). Autophagy and proteotoxicity in cardiomyocytes. *Autophagy* 7:1259–1260.
24. Chen HY and E White. (2011). Role of autophagy in cancer prevention. *Cancer Prev Res (Phila)* 4:973–983.
25. Cuervo AM. (2008). Autophagy and aging: keeping that old broom working. *Trends Genet* 24:604–612.
26. Jia W and YW He. (2011). Temporal regulation of intracellular organelle homeostasis in T lymphocytes by autophagy. *J Immunol* 186:5313–5322.
27. Jia W, HH Pua, QJ Li and YW He. (2011). Autophagy regulates endoplasmic reticulum homeostasis and calcium mobilization in T lymphocytes. *J Immunol* 186:1564–1574.
28. Pua HH, J Guo, M Komatsu and YW He. (2009). Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes. *J Immunol* 182:4046–4055.
29. Lafontan M. (2008). Advances in adipose tissue metabolism. *Int J Obes (Lond)* 32 (Suppl. 7):S39–S51.
30. Singh R, Y Xiang, Y Wang, K Baikati, AM Cuervo, YK Luu, Y Tang, JE Pessin, GJ Schwartz and MJ Czaja. (2009). Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *J Clin Invest* 119:3329–3339.
31. Zhang Y, S Goldman, R Baerga, Y Zhao, M Komatsu and S Jin. (2009). Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (*atg7*) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:19860–19865.
32. Takano-Ohmuro H, M Mukaida, E Kominami and K Morioka. (2000). Autophagy in embryonic erythroid cells: its role in maturation. *Eur J Cell Biol* 79:759–764.
33. Sandoval H, P Thiagarajan, SK Dasgupta, A Schumacher, JT Prchal, M Chen and J Wang. (2008). Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* 454:232–235.
34. Mortensen M, DJ Ferguson, M Edelmann, B Kessler, KJ Morten, M Komatsu and AK Simon. (2010). Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:832–837.
35. Tsukamoto S, A Kuma and N Mizushima. (2008). The role of autophagy during the oocyte-to-embryo transition. *Autophagy* 4:1076–1078.
36. Zhao Y, G Chen, W Zhang, N Xu, JY Zhu, J Jia, ZJ Sun, YN Wang and YF Zhao. (2011). Autophagy regulates hypoxia-induced osteoclastogenesis through the HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway. *J Cell Physiol* [Epub ahead of print]; DOI: 10.1002/jcp.22768.
37. Chin TY, CH Kao, HY Wang, WP Huang, KH Ma and SH Chueh. (2010). Inhibition of the mammalian target of rapamycin promotes cyclic AMP-induced differentiation of NG108-15 cells. *Autophagy* 6:1139–1156.
38. Aymard E, V Barruche, T Naves, S Bordes, B Closs, M Verdier and MH Ratinaud. (2011). Autophagy in human keratinocytes: an early step of the differentiation? *Exp Dermatol* 20:263–268.
39. Kroemer G and B Levine. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:1004–1010.
40. Naka K and A Hirao. (2011). Maintenance of genomic integrity in hematopoietic stem cells. *Int J Hematol* 93:434–439.
41. Ito K, A Hirao, F Arai, S Matsuoka, K Takubo, I Hamaguchi, K Nomiyama, K Hosokawa, K Sakurada, et al. (2004). Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 431:997–1002.
42. Ito K, A Hirao, F Arai, K Takubo, S Matsuoka, K Miyamoto, M Ohmura, K Naka, K Hosokawa, Y Ikeda and T Suda. (2006). Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 12:446–451.
43. St John JC, A Amaral, E Bowles, JF Oliveira, R Lloyd, M Freitas, HL Gray, CS Navara, G Oliveira, GP Schatten, E Spikings and J Ramalho-Santos. (2006). The analysis of mitochondria and mitochondrial DNA in human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* 331:347–374.
44. Armstrong L, K Tilgner, G Saretzki, SP Atkinson, M Stojkovic, R Moreno, S Przyborski and M Lako. (2010). Human induced pluripotent stem cell lines show stress defense mechanisms and mitochondrial regulation similar to those of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 28:661–673.
45. Yue Z, S Jin, C Yang, AJ Levine and N Heintz. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15077–15082.
46. Mathew R, S Kongara, B Beaudoin, CM Karp, K Bray, K Degenhardt, G Chen, S Jin and E White. (2007). Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* 21:1367–1381.
47. Mathew R, CM Karp, B Beaudoin, N Vuong, G Chen, HY Chen, K Bray, A Reddy, G Bhanot, et al. (2009). Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 137:1062–1075.
48. Jin S. (2006). Autophagy, mitochondrial quality control, and oncogenesis. *Autophagy* 2:80–84.
49. Mortensen M, EJ Soilleux, G Djordjevic, R Tripp, M Lutteropp, E Sadighi-Akha, AJ Stranks, J Glanville, S Knight, et al. (2011). The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *J Exp Med* 208:455–467.
50. Ferraro E, A Pulicati, MT Cencioni, M Cozzolino, F Navoni, S di Martino, R Nardacci, MT Carri and F Cecconi. (2008). Apoptosome-deficient cells lose cytochrome c through proteasomal degradation but survive by autophagy-dependent glycolysis. *Mol Biol Cell* 19:3576–3588.
51. Qu X, Z Zou, Q Sun, K Luby-Phelps, P Cheng, RN Hogan, C Gilpin and B Levine. (2007). Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* 128:931–946.
52. Fazzio TG and B Panning. (2010). Control of embryonic stem cell identity by nucleosome remodeling enzymes. *Curr Opin Genet Dev* 20:500–504.
53. Lessard JA and GR Crabtree. (2010). Chromatin regulatory mechanisms in pluripotency. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26:503–532.

54. Saladi SV and de IL la Serna. (2010). ATP dependent chromatin remodeling enzymes in embryonic stem cells. *Stem Cell Rev* 6:62–73.
55. Ho L, JL Ronan, J Wu, BT Staahl, L Chen, A Kuo, J Lessard, AI Nesvizhskii, J Ranish and GR Crabtree. (2009). An embryonic stem cell chromatin remodeling complex, esBAF, is essential for embryonic stem cell self-renewal and pluripotency. *Proc Natl Acad U S A* 106:5181–5186.
56. Ho L and GR Crabtree. (2010). Chromatin remodelling during development. *Nature* 463:474–484.
57. de Jonge-Peters SD, F Kuipers, EG de Vries and E Vellenga. (2007). ABC transporter expression in hematopoietic stem cells and the role in AML drug resistance. *Crit Rev Oncol Hematol* 62:214–226.
58. Susanto J, YH Lin, YN Chen, CR Shen, YT Yan, ST Tsai, CH Chen and CN Shen. (2008). Porphyrin homeostasis maintained by ABCG2 regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Plos One* 3:e4023.
59. Facucho-Oliveira JM and JC St John. (2009). The relationship between pluripotency and mitochondrial DNA proliferation during early embryo development and embryonic stem cell differentiation. *Stem Cell Rev* 5:140–158.
60. Suhr ST, EA Chang, J Tjong, N Alcasid, GA Perkins, MD Goissis, MH Ellisman, GI Perez and JB Cibelli. (2010). Mitochondrial rejuvenation after induced pluripotency. *PloS One* 5:e14095.
61. Prigione A, B Fauler, R Lurz, H Lehrach, and J Adjaye. (2010). The senescence-related mitochondrial/oxidative stress pathway is repressed in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 28:721–733.
62. Das S, S Jena and DN Levasseur. (2011). Alternative splicing produces nanog protein variants with different capacities for self-renewal and pluripotency in embryonic stem cells. *J Biol Chem* 286:42690–42703.

Address correspondence to:
Alexandre Teixeira Vessoni
Department of Microbiology
Institute of Biomedical Sciences
University of São Paulo
Av. Prof. Lineu Prestes
1374, Room # 116
São Paulo 05508-900
Brazil

E-mail: alexandre.vessoni@usp.br

Received for publication September 16, 2011

Accepted after revision November 5, 2011

Prepublished on Liebert Instant Online November 8, 2011

Review

Autophagy and genomic integrity

AT Vessoni^{*,1,3}, EC Filippi-Chiela^{2,3}, CFM Menck¹ and G Lenz²

DNA lesions, constantly produced by endogenous and exogenous sources, activate the DNA damage response (DDR), which involves detection, signaling and repair of the damage. Autophagy, a lysosome-dependent degradation pathway that is activated by stressful situations such as starvation and oxidative stress, regulates cell fate after DNA damage and also has a pivotal role in the maintenance of nuclear and mitochondrial genomic integrity. Here, we review important evidence regarding the role played by autophagy in preventing genomic instability and tumorigenesis, as well as in micronuclei degradation. Several pathways governing autophagy activation after DNA injury and the influence of autophagy upon the processing of genomic lesions are also discussed herein. In this line, the mechanisms by which several proteins participate in both DDR and autophagy, and the importance of this crosstalk in cancer and neurodegeneration will be presented in an integrated fashion. At last, we present a hypothetical model of the role played by autophagy in dictating cell fate after genotoxic stress.

Cell Death and Differentiation (2013) 20, 1444–1454; doi:10.1038/cdd.2013.103; published online 9 August 2013

Facts

- Autophagy can be activated by the DNA damage response (DDR) and influences the processing of genomic lesions; in some cases, autophagy may contribute to cell death after genotoxic stress.
- By degrading dysfunctional mitochondria and toxic protein aggregates, autophagy contributes to genomic stability, thereby acting as a tumor suppressor mechanism.
- Genomic stabilizing properties of autophagy can also be achieved through removal of micronuclei and damaged nuclear parts.

- What determines whether autophagy will prevent or contribute to cell death after genotoxic stress?
- Can the interplay between DDR and autophagy be exploited to improve the treatment of cancer or neurodegenerative diseases?

Cells have evolved complex mechanisms to safeguard the genome, which is constantly threatened by environmental and endogenous DNA damage-inducing agents. In the event of genomic assault, the DNA damage response (DDR) takes place, leading to the detection, signaling and repair of lesions. In the case of excessive damage, cells activate apoptosis or senescence, thereby avoiding the proliferation of potentially tumorigenic cells.^{1–4}

Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) is a lysosome-dependent degradation pathway that promotes cell homeostasis in response to stress such as nutrient deprivation, oxidative stress or DNA damage. This mechanism is centrally controlled by the autophagy-related (*atg*) family of genes,⁵ which is modulated by several kinases

Open Questions

- How does autophagy influence the processing of DNA lesions?
- Do different types of DNA lesions activate autophagy through specific or shared pathways?

¹Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil and ²Department of Biophysics and Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

*Corresponding author: AT Vessoni, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 São Paulo, SP 05508-900, Brazil. Tel: +55 11 3091 7499; Fax: +55 11 3091 7354; E-mail: alexandre.vessoni@usp.br or eduardochiela@gmail.com

³These authors contributed equally to this work.

Keywords: autophagy; DNA repair; genomic integrity; oxidative stress

Abbreviations: Ambra1, activating molecule in Beclin1-regulated autophagy; AMPK, AMP-activated protein kinase; ATG, autophagy-related; ATM, ataxia telangiectasia mutated; ATR, ataxia telangiectasia mutated and Rad3 related; BER, base excision repair; Bif-1, endophilin-B1; C-EBP α , CCAAT/enhancer-binding protein alpha; Bnip3, Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3; DDR, DNA damage response; DNAPK, DNA-dependent protein kinase; dNTP, deoxyribonucleoside triphosphate; DRAM, damage-regulated autophagy modulator; DSB, double strand break; E2F1, E2F transcription factor 1; ERK, extracellular signal-regulated protein kinase; FIP200, focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa; γ -H2AX, phosphorylated histone H2AX; HDAC, histone deacetylases; HR, homologous recombination; ISG20L1, interferon stimulated gene 20-like 1; LC3, light chain 3; LKB1, liver kinase B1; 3-MA, 3-methyladenine; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MLH, MutL-homolog; MMP, mitochondrial membrane permeabilization; MMR, mismatch repair; MSH, MutS-homolog; mtDNA, mitochondrial DNA; mTOR, mammalian target of rapamycin; NAC, N-acetyl L-cysteine; nDNA, nuclear DNA; NER, nucleotide excision repair; NHEJ, non homologous end joining; OGG1, 8-oxoguanine DNA glycosylase 1; PALA, N-(phosphonoacetyl)-L-aspartate; PARP, poly (ADP-ribose) polymerase; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PINK1, PTEN-induced kinase 1; PTEN, phosphatase and tensin homolog; p70S6 kinase, p70 ribosomal protein S6 kinase; ROS, reactive oxygen species; SQSTM1, sequestosome 1; SSB, single strand break; TSC2, tuberous sclerosis complex 2; ULK-1, unc-51-like kinase 1; UVIRAG, UV irradiation resistance-associated gene; VPA, valproic acid

Received 28.2.13; revised 07.6.13; accepted 02.7.13; Edited by E White; published online 09.8.13

including mTOR,⁶ PI3k/Akt,⁶ AMPK⁷ and MAPK.⁸ The protective functions of autophagy are achieved through the recycling of damaged and/or obsolete cellular components, such as dysfunctional mitochondria and toxic protein aggregates, thereby generating metabolic precursors for vital processes such as ATP production and macromolecular synthesis.^{9–11} In addition to its role in cell survival, autophagy also contributes to organism homeostasis by clearing apoptotic cells during embryonic development¹² and after certain types of DNA damage.^{13,14}

In this review, we examine the roles proposed for autophagy in preventing genomic instability, as well as the connection of autophagy to DDR and cell fate after DNA damage. We also discuss the roles proposed for autophagy in the development and therapy of cancer and other human diseases.

Autophagy, Mitochondria Metabolism and Tumorigenesis

One of the first evidences linking autophagy to tumorigenesis was described by Schwarze and Seglen in 1985. They observed that the degradation of long-lived proteins during starvation was reduced in hepatocytes from carcinogen-treated rats because of reduced autophagic activity, contributing to cell survival.¹⁵ A few years later, a surprising number of reports highlighted the role of autophagy in tumorigenesis. In 1999, Aita *et al.* reported allelic deletions in the essential autophagy gene *beclin 1* (*atg6*) in a high percentage of breast carcinoma cell lines.¹⁶ In the same year, Liang *et al.* reported that expression of *beclin 1* in MCF7 cells, a metastatic human breast cancer cell line with 17q21 loss of heterozygosity, the region where the *beclin 1* locus maps, increased contact inhibition, reduced proliferation rates and decreased tumor formation *in vivo*.¹⁷ Conversely, heterozygous disruption of *beclin 1* compromised autophagy activation and resulted in increased cellular proliferation¹⁸ and spontaneous tumor formation in mice.¹⁹

These early observations of the role of *beclin 1* in tumorigenesis were extended to other autophagy genes. Expression of the UV irradiation resistance-associated gene (*UVRAG*) protein, which participates in the autophagosome-formation regulatory complex Bcl-2-Beclin1-PI(3)KC3-UVRAG, increased autophagy, reduced proliferation and suppressed tumorigenicity of HCT116 colorectal carcinoma cells in mice.²⁰ Moreover, lack of *Bif-1*, which also participates in autophagosome formation during starvation, increased spontaneous tumor formation in mice.²¹

Despite these evidences, it was not until 2007 that Karantza-Wadsworth *et al.* and Mathew *et al.* shed light on the mechanism behind the tumor suppressive function of autophagy. They described that under conditions of metabolic stress, *beclin 1* +/– cells accumulated mitochondria with structural abnormalities, endoplasmic reticulum chaperones and p62/SQSTM1, which target organelles and proteins to the autophagosome. These cells also underwent a marked increase in reactive oxygen species (ROS) generation, causing DNA damage and increased aneuploidy. Moreover, increased resistance to *N*-(phosphonoacetyl)-L-aspartate (PALA) treatment in autophagy-defective cells suggested higher gene amplification rates, evidence that loss of

autophagy increased genomic instability, a driving force behind tumorigenesis.^{22–24} Accordingly, a significant association between loss of *beclin 1* and amplification of the *HER2/NEU* oncogene was described in breast carcinoma.²⁵ Quenching ROS with *N*-acetyl L-cysteine (NAC) delayed the promotion of aneuploidy and improved survival of *beclin 1* +/– cells, revealing that ROS contributes to genomic instability in these cells.^{23,24} Interestingly, expression of p62 increased ROS and DNA damage in autophagy-defective cells under metabolic stress, thereby revealing that p62 accumulation may potentiate generation of ROS due to dysfunctional mitochondria.²⁶ These evidences suggest that autophagy is an important tumor suppressor mechanism involved in different steps of carcinogenesis (Figure 1).

The mitochondria is central to the model linking autophagy, ROS and DNA (Figure 2). Normal mitochondrial activity inevitably generates ROS as by-products, which may cause damage to cell components, including the DNA. Direct ROS-mediated damage to the mitochondria may result in mitochondrial DNA (mtDNA) damage, alterations in the mitochondrial membrane permeability (MMP) and uncoupling of the respiratory chain, resulting in even more ROS generation in a vicious cycle (Figure 1, box i; Figure 2, #1).^{27,28} Mitophagy of injured organelles has a central role in impeding this vicious cycle (Figure 2, #6), a process in which the protein parkin has a central role. Parkin translocates from the cytosol to the injured mitochondria, signaling for mitophagy,²⁹ a process that involves the BCL2/adenovirus E1B 19kd-interacting protein (BNIP3) in cardiac myocytes (Figure 2, #3).³⁰ Interestingly, mtDNA deletions also trigger autophagy through the increase of oxidized proteins and a reduction of tRNA, leading to reduced levels of ATP and amino acids, triggering AMPK activation and autophagy (Figure 2, #4).^{31–33}

Supporting the importance of autophagy for basal mitochondrial physiology and ROS control, deletion of *atg7* in the mouse hematopoietic system resulted in accumulation of mitochondria with high membrane potential, superoxide production, DNA damage and death of hematopoietic stem cells. Atypical myeloid infiltrates were detected in several organs of these animals, showing that loss of autophagy contributes to development of myeloproliferative disorders.^{34,35} Further, hepatocytes from *atg5* mosaically deleted mice accumulated swollen mitochondria and oxidatively generated DNA damage, in addition to displaying an increase in glutathione-S-transferase in tumor areas as a result of oxidative stress.³⁶ Mice lacking MAP1S, which is involved in autophagosome biogenesis, treated with the hepatocarcinogenesis initiator diethylnitrosamine, displayed similar features.³⁷

ROS can result in genomic instability (Figure 2, #2) through direct damage to the DNA and/or compromising spindle checkpoint maintenance. In contact with DNA, ROS generates base damage, such as 7,8-dihydro-8-oxo-guanine (8-oxo-G), which, if not repaired, increases the chance of mispairing adenine opposite the lesion.³⁸ ROS may also lead to breaks in the phosphodiester chain of DNA, including double-strand breaks (DSBs) that are normally detected by γ -H2AX.³⁹ These extremely toxic and deleterious lesions may cause chromosome alterations or even cell death.

Figure 1 Overview of the genomic instability caused by autophagy impairment. Autophagy impairment leads to the accumulation of hazardous cellular components, such as dysfunctional mitochondria and toxic protein aggregates, which leads to an increase in ROS production (**box i**), cell cycle dynamic alterations, DNA damage and, consequently, genomic instability. Autophagy impairment also interferes with DNA repair (**box ii**) and removal of micronuclei (here referred to as nucleophagy (**box iii**), contributing to genomic instability. The molecular and cellular mechanisms involved in the role of mitophagy in the context of DNA damage are shown in Figure 2. Pathways that are involved in the crosstalk between DDR and autophagy are summarized in Figure 3 and Table 1, whereas the dual role of DDR-induced autophagy is shown on Figure 4 and Table 2

Figure 2 Mitochondria quality control by mitophagy in the context of DNA damage. Details of the processes are given in the main text. A, autophagosomes; L, lysosomes; AL, autophagolysosomes; MMP, mitochondrial membrane potential

The induction of DSBs by oxidative stress is most likely a result of the processing of other types of DNA damage, including the repair of clustered lesions, breakage during the fragile blockage of replication forks by the lesions,^{40,41} or the handling of DNA–DNA and DNA–protein crosslinks induced by ROS.⁴²

A second mechanism by which ROS leads to genomic instability is through the degradation of the anaphase blockers securin and cyclin B1, which impede aneuploidy by ensuring correct segregation of chromosomes during mitosis⁴³ and in checkpoint-arrested cells, thereby suspending the spindle checkpoint. In agreement with this, budding yeast cells activate autophagy after the induction of DSBs, accompanied by anaphase arrest. This arrest persists even when phosphorylation of the checkpoint kinase Rad53 is reduced, but is overcome when autophagy is blocked or vacuolar proteolysis is inhibited, suggesting that autophagy is fundamental for DNA damage-induced anaphase arrest, thus avoiding improper chromosome segregation.⁴⁴ Interestingly, elimination of the mid-body, which is involved in the final stages of cytokinesis, by autophagy was also shown to influence the tumorigenic potential of cancer cells.⁴⁵ Indeed, autophagy-defective cells exhibited nuclear morphometric alterations, centrosome abnormalities and increased chromosome number under normal culture conditions.²⁴

Altogether, these data show that autophagy has a strong impact on genomic stability, contributing to mitochondria quality control and, as a consequence, modulating ROS levels, ATP production and cell death signaling. These mechanisms are all directly involved in the carcinogenic process and may contribute to the tumor suppressor effect attributed to autophagy.

The Role of Autophagy in DNA Repair

In addition to mitigating DNA damage by controlling ROS production, autophagy can also influence the dynamics of DNA repair by recycling key proteins involved in the processing of lesions.⁴⁶ Alternatively, autophagy may also provide metabolic precursors for the generation of ATP, which is employed in several steps of DNA repair,⁴⁷ as well as regulate the supply of dNTPs for DNA synthesis during repair.⁴⁸

By targeting glycogen, lipids and proteins to lysosomes, autophagy guides the breakdown of these macromolecules, thereby producing metabolic precursors that can sustain oxidative phosphorylation and glycolysis.^{49,50} In cancer cells from solid undernourished tumors, response to radiotherapy or DNA-damaging chemotherapy triggers ATP production by autophagy, which may have an essential role in DNA repair (Figure 1, box ii). Supporting this hypothesis, the inhibition of autophagy suppressed ATP generation and increased mitotic catastrophe in glioma cells treated with temozolomide (TMZ). Addition of pyruvate rescued ATP levels and prevented mitotic catastrophe, suggesting that autophagy-sustained ATP generation could be employed by mechanisms that promote genomic integrity, such as DNA repair processes.⁴⁷ In fact, DNA repair requires ATP at several steps, including DNA unwinding by helicases during nucleotide-excision repair (NER),⁵¹ ATP-dependent chromatin remodeling complexes in DSB repair⁵² and PARP activity, which consumes NAD⁺ and can cause energy collapse in DNA-damaged cells.^{53,54} However, direct evidence to corroborate this hypothesis is still lacking.

Autophagy was also implicated in regulating the dNTP pool levels, which are essential for DNA replication and repair. Upon methyl methane sulfonate (MMS) treatment, yeast trigger autophagy, thereby promoting degradation of ribonucleotide reductase 1 (Rnr1), which associates with other Rnr proteins to regulate the reduction of ribonucleotides to deoxyribonucleotides. This reduction in Rnr1 levels may favor assembly of the most catalytically active form of Rnr, Rnr1-Rnr3, instead of Rnr1-Rnr1 in the final RNR complex, resulting in optimization of RNR activity and dNTP levels, which in turn could be employed as substrates during DNA repair processes, such as mismatch repair (MMR).⁴⁸ It is also interesting to note that imbalanced levels of dNTPs can increase mutagenesis.⁵⁵ Thus, it is tempting to speculate that through the degradation of Rnr subunits autophagy may also fight mutagenesis by ensuring a balanced dNTP pool, which is fundamental to avoid stress replication and gene amplification, two characteristics frequently observed in autophagy-deficient cells.^{23,24}

Besides dNTP recycling and ATP generation, autophagy also participates in the turnover of key proteins involved in the regulation/processing of genomic lesions. Recently, an intricate relationship between histone deacetylases (HDACs) – which are involved in DNA repair and apoptosis,^{56,57} – DSB processing and autophagy was shown in budding yeast.^{46,58} Treatment with valproic acid (VPA), an HDAC inhibitor, impaired the activation of Rad53 in response to DSBs. In the VPA-treated cells, Mre11, the first factor recruited to DSB sites, remained bound to the DSB site, accompanied by

reduced levels of Sae2, which is responsible for removing Mre11 from the DSB region, a step required for the progress of lesion repair. In this context, inhibition of autophagy by the serine protease inhibitor PMSF or deletion of *atg1* increased acetylated Sae2 levels, whereas rapamycin, which activates autophagy through mTOR inhibition, decreased it, confirming that autophagy induced by VPA could impair DSB processing through degradation of acetylated Sae2. Moreover, Atg1 inhibition partially rescued sensitivity of an *hda1-rpd3* (HDACs) double mutant (which exhibits low levels of Sae2 as well as impaired DSB resection) to camptothecin. These results suggest that, in one hand, autophagy may be involved in destabilizing key factors, such as the acetylated form of Sae2, impairing DSB repair. On the other hand, clearance of Sae2 by autophagy could also help cells in the control of DSB repair pathway by counteracting extensive DSB resection that may be harmful to cells,⁴⁶ demonstrating the complex role of autophagy in the context of DNA damage and repair.

In the same line of thinking, FIP200 (a focal adhesion kinase that participates in autophagy induction)⁵⁹ KO MEFs showed persistent nuclear γ -H2AX staining after exposure to ionizing radiation (IR), indicating defective DNA damage repair.⁶⁰ Although the initial amount of DNA breaks were similar between *fip200* KO and WT MEFs immediately after IR, the DNA breaks persisted for a longer period in KO cells. Similar results were obtained in response to other DNA damage-inducing agents (camptothecin and etoposide) and also when autophagy was pharmacologically inhibited using 3-methyladenine. Interestingly, silencing p62 in these cells improved DNA repair and cell viability in response to IR and camptothecin. Although accumulation of p62 was shown to increase oxidative stress,²⁶ the antioxidant NAC did not improve cell viability in response to camptothecin or etoposide, revealing that the mechanism underlying persistent DNA damage in *fip200* KO cells is ROS independent.

These data show that autophagy can influence the resolution of DNA injuries. Although several reports showed that inhibition of autophagy can undermine cells' resistance to chemo- and radiotherapy, only a few studies provide a more careful look into the effect of this approach over DNA repair dynamics.⁴⁷ In this sense, spatial and temporal tracking of DNA repair enzymes may provide important clues about the influence of autophagy on the resolution of genomic injuries. In this sense, yeast models can be of great value to create a library of strains in which recruitment of specific DNA repair proteins can be followed. For instance, yeast strains expressing homologous recombination enzymes tagged with fluorescent proteins allowed spatial and temporal localization of these enzymes upon DSB repair activation.⁶¹ Thus, by using such approaches, important clues may be revealed that significantly improve our understanding of this exciting yet obscure role of autophagy in DNA repair.

Nucleophagy as a Way to Eliminate Injured DNA

Autophagic removal of whole nuclei is not as common as removal of other organelles because it may cause deleterious loss of genetic information. However, in multinucleated cells of the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*, nucleophagy of entire nuclei contributes to cell maintenance during nutrient

deprivation.⁶² Similarly, removal of nuclei from intestinal epithelial cells of *Caenorhabditis elegans* also occurs through autophagy.⁶³

Autophagy of nuclear components in eukaryotes, or piecemeal microautophagy of the nucleus (PMN), was initially described in *Saccharomyces cerevisiae*. It is triggered by nutrient deprivation and occurs through the release of nuclear portions into the vacuole,⁶⁴ followed by digestion by hydrolases.⁶⁵ Nuclear components targeted for PMN include granular nucleolus enriched in pre-ribosomes and nuclear envelope, nuclear pore complexes or spindle pole bodies.^{66,67} PMN involves the core Atg proteins involved in macroautophagy and microautophagy, such as Atg4, 5, 7 and 12, as well as macroautophagy-specific proteins such as Atg17, 29 and 31.⁶⁴

In mammalian cells, autophagy can degrade nuclear components, thereby contributing to the maintenance of nuclear function and integrity.⁶⁸ The initial observation of the engulfment of nuclear components points to the presence of perinuclear vacuoles in skeletal and/or cardiac muscle cells from patients or mice with envelopopathies,⁶⁸ disorders caused by mutations in nuclear envelope components.^{69,70} Mutated cells presented higher levels of autophagic flow and the vacuoles were positive for Atg5, Atg16L and Atg9. Cells presented giant autophagosomes and autophagolysosomes containing LC3 and DNA, with the presence of histone H1 and γ -H2AX, but not the markers of nuclear envelope, lamin A and B, confirming that the DNA contained in autophagosomes was extranuclear and damaged. In this case, the contribution of autophagy to nuclear stability was clear since its inhibition increased the incidence of nuclear abnormalities, accompanied by a reduction in cell viability.⁶⁸ Autophagy was also shown to degrade micronuclei generated by treatment with cell cycle blockers. Interestingly, 'autophagic micronuclei' co-localized with p62, besides presenting reduced chromatin content and γ -H2AX foci, a DNA damage marker. However, non-autophagic micronuclei appeared p62-negative, suggesting that the presence of DNA damage directly or indirectly signaled for autophagic engulfment (Figure 1, box iii).⁷¹

Thus, evolutionarily, the process of nucleophagy may represent a physiological mechanism for the removal of damaged nuclear components and micronuclei, thus contributing to genomic stability. In multinuclear eukaryote cells, it is plausible that autophagy of nuclear components can be triggered under metabolically stressful situations or DNA damage, contributing to genomic stability and cellular homeostasis (Figure 1; box iii).

Pathways Connecting DDR to Autophagy

DDR comprises an array of processes triggered by DNA lesions that allows cells to cope with these insults, aiming at safeguarding the integrity of the genome and avoiding propagation of mutated cells.^{4,17} The kinases ATM and ATR have key roles sensing DNA breaks and activating downstream components of DDR, such as Chk1, Chk2 and p53.^{72,73} p53 is an important protein in DDR, inducing the transcription of key genes involved in cell cycle arrest, DNA repair, apoptosis^{74,75} and, more recently described, in autophagy.⁷⁶

Two central components, p53 and mTOR, link DDR to autophagy (Figure 3 and Table 1). p53 can activate autophagy after DNA damage through transcriptional induction of several genes, including damage-regulated autophagy modulator (*dram*), UNC-51-like kinase 1/2, (*ulk1/2*), *sestrin1/2*, *isg20L1* and *bnip3*, among others.⁷⁷ p53 targets can regulate autophagy directly, as is the case with the lysosomal proteins DRAM¹⁴ and ULK1/2, which interact with Atg13 and FIP200 to induce autophagy,¹³ or indirectly through Sestrin 1 and 2, which activate AMPK and the TSC1/2 complex, leading to inactivation of mTORC1 and autophagy induction.⁷⁸ Additionally, ATM was shown to activate AMPK in a p53-independent manner through direct activation of the AMP kinase LKB1.⁷⁹ Interestingly, cytoplasmic p53 is able to repress autophagy, and deletion or pharmacological inhibition of p53 induces, rather than inhibits, autophagy. Accordingly, induction of autophagy by starvation requires destruction of cytoplasmic p53,^{80,81} thereby revealing a complex role for p53 in the regulation of autophagy.

Figure 3 Autophagy modulation in response to DNA damage response (DDR). DDR-activated signaling can result in autophagy modulation. The autophagy box represents the central autophagy regulating genes. DSB, double-strand break; SSB, single-strand break; MMR, mismatch repair

Table 1 Proteins that have functions in both DNA damage response and autophagy

Protein	Functions in DNA damage response (DDR)	Functions in autophagy and/or interplay with DDR
p53	Regulates cell cycle arrest, DNA repair and apoptosis in response to DNA damage. ^{74,75,77}	Induces autophagy in response to DNA damage through transcription of ULK1, ULK2, DRAM, Sestrins 1/2 and ISG20L1. ^{13,14,78,88} In the cytoplasm, inhibits autophagy through AMPK inhibition. ^{81,127}
p73	Promotes apoptosis in response to chemotherapeutic-induced DNA damage. ⁹⁰ Induces transcription of glycosylases (associated to BER) in response to bile acid-induced DNA damage. ⁹¹	Induces autophagy in a DRAM-independent manner. ⁸⁹ Binds to genomic sites near to the autophagy-related genes <i>atg5</i> , <i>atg7</i> , <i>ambra1</i> . ¹²⁸
UVRAG	Was shown to partially complement sensitivity of XPC transformed cells to UVC. ¹²⁹ Binds to and activates DNAPK complex, thereby promoting repair of DNA DSB through NHEJ. ¹²⁴	Participates in the multiprotein complex Bcl-2-Beclin1-PI(3)KC3-UVRAG that regulates autophagosome formation. ²⁰
E2F1	Promotes DNA repair and survival or apoptosis in response to DNA damage. Recruits NER factors to sites of UV-induced DNA damage to augment repair activity. ^{130,131}	Upregulates transcription of <i>atg1</i> , <i>lc3</i> , <i>atg5</i> and <i>dram</i> . Activates autophagy in response to Etoposide. ⁸⁷
Parkin	Was found to associate with PCNA in the nucleus and enhance NER-mediated resolution of UV-induced lesions and BER-mediated resolution of H ₂ O ₂ -induced lesion. ^{115,116}	Recruited to damaged mitochondria (by PINK1) to promote their degradation through mitophagy. ²⁹
ATM	Senses and responds to DNA double strand breaks, thus regulating cell cycle arrest, DNA repair and apoptosis. ^{72,73}	Induces autophagy through of activation of TSC2 and inhibition of mTORC1 in response to ROS. ⁷⁹ Involved in autophagy activation in response to the N-mustard derivative BO-1051-induced DNA damage. ¹³²
HDAC	May influence repair of damaged DNA by regulating accessibility of DNA repair enzymes at sites of lesions. Downregulates expression of apoptotic genes. ^{56,57}	Impairs autophagy activation. ⁵⁸ Inhibition of HDAC by valproic acid was shown to promote autophagic degradation of acetylated Sae2 and further reduction of DNA double strand break repair in yeast. ⁴⁶
PARP	Recruits BER proteins to sites of DNA containing single strand breaks through poly ADP-ribosylation. ^{133,134}	PARP activation consumes NAD ⁺ , which results in ATP depletion, AMPK activation and further autophagy induction. ^{53,54}

The other protein placed in the core of DDR to autophagy signaling, mTOR, is an important repressor of autophagy, and inactivation of the mTOR complex 1 (mTORC1) by AMPK-TSC1/2 has an important role in autophagy induction upon starvation. Interestingly, DDR was also shown to participate in autophagy induced by starvation,⁵³ which may increase mitochondria-dependent ROS generation, causing DNA damage, PARP-1 activation and ATP depletion. As a consequence, AMPK is activated, thereby inhibiting mTOR and inducing autophagy.^{53,54} It is worth noting that autophagy activation was shown to precede phosphorylation of ATM and p53 and activation of DNA repair proteins in response to capsaicin treatment, revealing an intricate pathway in which autophagy acts upstream, and not just as a consequence, of DDR activation.⁸²

BNIP3 is a Bcl-2 homologous protein and is activated after conditions of stress such as hypoxia. MMR induced by 6-thioguanine activates autophagy through MLH1, p53 activation and transcription of *bnip3*. Additionally, the TORC1 target p70S6 kinase 1 promotes translation of BNIP3, which induces loss of mitochondrial outer membrane potential and further autophagy activation, possibly through ROS generation, thus triggering mitophagy and preventing apoptosis.^{83,84} It is worth noting that in this case mTOR activation, rather than inhibition, activates autophagy.

E2F1 transcriptional activity is activated after DNA damage, most likely due to the removal of C-EBP α repression^{85,86} and activates autophagy by directly inducing the transcription of *atg1*, *atg6*, *atg5* and *dram*,⁸⁷ as well as by

inducing p73, which is a transcriptional activator of *atg5*, *atg7*, *ambra*, *dram* and *isg20l1*.^{88,89} Several chemotherapeutic agents induce TA-p73 α and TA-p73 β expression,⁹⁰ which are sufficient to activate autophagy through direct transcriptional regulation of the above-mentioned genes. Moreover, p73 induces the expression of several DNA repair genes,⁹¹ thus positioning p73 in the interface between DNA repair and autophagy. In strong contrast to p53, p73 is rarely mutated in primary tumors.⁹² Thus, it is plausible that p73-induced autophagy has an important role in the resistance of p53-compromised cells, making p73 inhibition a good target for chemotherapy sensitization.

As seen in Figure 3, the signaling that links DNA damage to autophagy is complex and redundant, as is the case for signaling pathways fundamental for life. It is unlikely that all these pathways are activated in a given cell by one type of DNA damage. However, the relative contribution of these pathways to the cellular response to different types of damage is not clear and may be an important part to understand the link between DNA damage and cell fate.

The Dual role of Autophagy in the Context of DNA Damage

As previously discussed, autophagy can either contribute to or prevent cell death in response to DNA damage (Figure 4). As summarized in Table 2, the majority of studies showed that inhibition of autophagy in cells treated with DNA damaging agents leads to increased cell death, supporting a protective

Figure 4 Roles for autophagy in regulating cell fate after DNA damage. We propose that after DNA injury, autophagy can influence cell fate, supporting or impairing cell survival. As a cytoprotective mechanism, autophagy may degrade pro-apoptotic proteins and membrane permeabilized mitochondria, enhance ATP and dNTPs generation for DNA repair and also regulate cell cycle arrest. However, autophagy may favor cell death through degradation of anti-apoptotic and DNA repair-related proteins

role for autophagy. We hypothesize that a mechanism based on the severity and/or type of genomic damage could turn on either a pro-survival or pro-death autophagic role. In this scenario, transcription factors such as p53, p73 and E2F1 would have pivotal roles, as they were not only shown to promote DNA repair, cell cycle arrest or apoptosis in response to different degrees of DNA damage, but also to control autophagy.^{74,75,91,93}

Thus, we hypothesize that after low doses of DNA damage, autophagy activation by these transcription factors would result in clearance of membrane-permeabilized mitochondria,⁹⁴ generation of dNTPs and/or ATP for DNA repair activity,^{47,48} degradation of pro-apoptotic proteins such as active caspase 8⁹⁵ and elimination of p62, thus preventing p38-hyperactivation.⁹⁶ Supporting the role of p53 in autophagy and cell survival, p53 mediates the transcription of parkin,⁹⁷ suggesting that p53 could regulate transcription of mitophagy genes in response to genomic damage, thus counterbalancing mitochondrial apoptotic signaling.

Conversely, autophagy can also promote degradation of anti-apoptotic proteins, thus facilitating cell death. Autophagy-mediated degradation of the inhibitor of apoptosis *dBruce* during late oogenesis in *Drosophila melanogaster*⁹⁸ and degradation of catalase in apoptosis-compromised cells resulting in increased ROS and oxidatively generated damage⁹⁹ reveal how autophagy can have an impact on cell death. As autophagy was also shown to promote degradation of acetylated Sae2 in VPA-treated yeast cells, thereby influencing, in an intricate manner, the dynamics of DNA DSB repair, it is possible that autophagy activation could contribute to perseverance of DNA damage and further enhancement of apoptotic signaling in mammalian cells by controlling turnover of certain DNA repair-related enzymes.⁴⁶ In this scenario, autophagy was shown to degrade OGG1, an enzyme that participates in 8-oxoG base-excision repair, in starved myocytes.¹⁰⁰

Thus, it is tempting to speculate that, the intensity by which autophagy is activated as well as the targets to be degraded can dictate whether it is going to cooperate with or protect from cell death induced by DNA damage (Figure 4). This dual role of autophagy in cell death can be exemplified by the modulation of autophagy by the MAPK pathway. While transient or moderate activity of MEK/ERK results in mTOR inhibition, weakly beclin 1 increase and protective autophagy, sustained MEK/ERK activation results in inhibition of mTORC1 and mTORC2, stronger beclin 1 activation and toxic autophagy.¹⁰¹ Thus, high levels of DNA damage could induce stronger mTORC1 inhibition, followed by stronger beclin 1 activation, thus resulting in levels of autophagy that contribute to cell death. In fact, overexpression of beclin 1, *per se*, is able to increase basal as well as induced autophagy in both normal and cancerous tissue and cells.^{17,102,103}

Thus, understanding the crosstalk between DDR and autophagy may be essential to understand how autophagy has either a positive or negative role in cell death induction after activation of DDR-induced autophagy. Recent advances in the field of transcription factors and effector proteins are addressing these questions and may aid in the understanding of how cells define their fate in this context.^{104,105}

Autophagy-DNA damage crosstalk in neurodegeneration, cancer and aging

All of the aforementioned findings raised a natural interest in the pharmacological modulation of autophagy, which could have a significant impact on mitigating genomic damage. This is of particular interest for human syndromes that arise from genetic deficiency in genes related to DNA repair, such as the premature aging disorder Cockayne Syndrome (CS).¹⁰⁶ In fact, accumulation of dysfunctional mitochondria, mtDNA mutations and oxidatively generated damage were observed in CS type B (CSB) fibroblasts,^{107,108} suggesting that the

Table 2 Main factors regulating autophagy and role of autophagy in cell fate triggered by genotoxic agents

Genotoxic agent	Agent class	Main DNA repair pathway/enzymes involved ¹³⁵	Main factors regulating autophagy induction after DNA damage	Cell type	Autophagy inhibition employed	Effect of autophagy/inhibition	Ref.
ActinomycinD	Topoisomerase and transcription inhibitor	ND	p53, DRAM	RKO Colon Carcinoma	DRAM siRNA; ATG5 siRNA	Increased clonogenic survival	14
Camptothecin	Topoisomerase inhibitor	HR, NHEJ	p53, ULK1/ULK2	U2OS Osteosarcoma	ATG13 shRNA	Increased clonogenic survival	13
Doxorubicin	Topoisomerase inhibitor	HR, NER, NHEJ	PARP-1	3T3 MEFs	Beclin 1 and ATG5 siRNA; 3-MA, CQ	Increased death (Trypan Blue)	54
6-Thioguanine	Nucleoside analog	MMR, BER	MLH1, MSH2, p53, mTOR, BNIP3	HCT116 colon carcinoma and HEC59 endometrial cancer	ATG5 shRNA	Increased apoptosis	136
BO-1051	Alkylating agent	ND	ATM	HA227V/GH Mahlavu Hepatomas	Bafilomycin A1, beclin shRNA	Reduced Viability (MTT)	132
Temozolomide	Alkylating agent	MMR, BER, MGMT	ATM, TSC2, mTORC1	LN-229 and U87 gliomas	3-MA	Increased apoptosis	137
MNNG, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine;	Alkylating agent	MMR, BER, MGMT	ND	Lymphomas	CQ, ATG5 shRNA	Reduced cell number	138
Cisplatin	Alkylating-like agent	MMR, NER, HR, NHEJ	ATM	HA227V/GH Mahlavu Hepatomas	Beclin 1 shRNA	Reduced viability (MTT)	132
5-methoxyflavanone	Methoxylated flavone	ND	MEK	HCT116 Colon Carcinoma	3-MA; bafilomycin A1	Reduced clonogenic survival	139
UVB	Electromagnetic radiation	NER	AMPK, ULK1	MEFs	ATG5 KO 3MA	Increased apoptosis	96

regulation of autophagy may have an impact on CS pathogenesis. Indeed, the induction of autophagy reduced mitochondrial loading and mitochondrial membrane potential in CSB cells, revealing that pharmacological modulation of this pathway is a promising approach.¹⁰⁹ Moreover, autophagy also has a role in stem cells maintenance,¹¹⁰ suggesting that this pathway may also fight accelerated aging by maintaining the health of the stem cell population, avoiding loss of regenerative potential.¹¹¹

Accumulation of oxidatively generated damage has been implicated in several neurodegenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's diseases.^{112,113} Data point to autophagy as an important factor in the context of both the pathogenesis and, consequently, therapy of these pathologies. It has become clear that parkin is necessary for p62 localization to damaged mitochondria and its consequent elimination through beclin-dependent autophagy.^{29,114} Deletion of *parkin* increases ROS generation due to accumulation of dysfunctional organelles, resulting in mtDNA and nDNA damage, which is the basis for parkin deficiency-associated Parkinson's disease.^{115,116} In this sense, induction of autophagy has given promising results in mouse models of Alzheimer's disease¹¹⁷ and other neurodegenerative diseases.¹¹⁸ Further, the increased genomic instability observed in *parkin*-deleted cells could also be explained by the observation that parkin translocates from the cytosol to the nucleus where it participates in DDR after DNA damage.^{115,116} Therefore, the parkin protein is an important factor in both DDR and autophagic removal of injured mitochondria.

In cancer, heterozygous disruption of *beclin 1* compromised autophagy activation and resulted in increased cellular proliferation and increased spontaneous as well as induced tumor formation. Contrary to the normal genetic behavior of classical tumor suppressors, the remaining wild-type allele was neither mutated nor silenced in the formed tumors.^{18,19} Accordingly, 40–75% of cases of human sporadic breast, ovarian and prostate cancer had monoallelic deletion of *beclin 1*.¹⁶ Further, genes involved in autophagy are monoallelically inactivated in human cancers or occur in genes whose deletion only partially reduces autophagy. Moreover, frameshift mutations were identified in *UVRAG*, *atg2B*, *atg5* and *atg9B* in colorectal and in gastric carcinomas with microsatellite instability (MSI), but not in DNA from normal tissues of the same patients,^{119–121} although the effects of these mutations on autophagic flux were not determined.

This genetic evidence points to the scenario in which reduced levels of autophagy favor tumor development, whereas the complete absence of autophagy is anti-tumoral.¹²² However, it is important to keep in mind that several members of the classical autophagic pathway have autophagy-independent roles. For instance, ATG4C KO mice did not present altered basal or starvation-induced autophagy in several tissues, but an increased methylcholanthrene-induced fibrosarcoma formation.¹²³ Similarly, MSI-positive colon cancer cells with monoallelic deletions of *UVRAG* or *UVRAG*-KD HEK cells did not show reduced autophagy. Indeed, *UVRAG* participates in an autophagy-independent manner in preventing centrosome overduplication and chromosome missegregation during anaphase¹²⁴ as well as

in endocytic trafficking of EGFR, whose accumulation may enhance growth factor receptor signaling, thus supporting tumor growth.¹²⁵ Therefore, an autophagy-centric interpretation must always bear in mind these other functions described for the 'autophagy' genes.¹²⁶

Concluding Remarks

The crosstalk between autophagy and DDR, as well as its role in defining cell fate, is a hot topic that is just beginning to be explored, as can be evidenced by the new and fast-growing body of work related to this theme. Understanding this complex and intricate relationship will have profound impacts on several fields of medical interest, such as cancer, aging and neurodegeneration. Additionally, the majority of studies mentioned in this review focus on cell biology and the roles played by autophagy in response to DNA damage in DDR and survival of the cell. Much more difficult and therefore less clear is the impact of the link between DNA damage and autophagy on the physiology of the whole organism, mainly on aging and cancer, in which elimination of cellular components by high levels of mitophagy or nucleophagy may, in fact, be very beneficial. Notwithstanding, the current evidence linking DNA damage to autophagy indicates that both are involved in the normal physiology as well as in pathological processes and that modulation of the pathways linking DDR to autophagy has to be considered in therapeutic interventions for several diseases.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

- Ljungman M. Activation of DNA damage signaling. *Mutat Res* 2005; **577**: 203–216.
- Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 2012; **481**: 287–294.
- Lenz G. Endogenous anticancer mechanisms (EACMs). *Front Biosci (Schol Ed)* 2012; **4**: 1017–1030.
- Ljungman M. The DNA damage response-repair or despair? *Environ Mol Mutagen* 2010; **51**: 879–889.
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; **27**: 107–132.
- Shanware NP, Bray K, Abraham RT. The PI3K, metabolic, and autophagy networks: interactive partners in cellular health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2013; **53**: 89–106.
- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 2011; **13**: 132–141.
- Corcelle E, Djerbi N, Mari M, Nebout M, Fiorini C, Fenichel P *et al*. Control of the autophagy maturation step by the MAPK ERK and p38: lessons from environmental carcinogens. *Autophagy* 2007; **3**: 57–59.
- Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* 2011; **333**: 1109–1112.
- Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 2010; **40**: 280–293.
- Singh R, Cuervo AM. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab* 2011; **13**: 495–504.
- Qu X, Zou Z, Sun Q, Luby-Phelps K, Cheng P, Hogan RN *et al*. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* 2007; **128**: 931–946.
- Gao W, Shen Z, Shang L, Wang X. Upregulation of human autophagy-initiation kinase ULK1 by tumor suppressor p53 contributes to DNA-damage-induced cell death. *Cell Death Differ* 2011; **18**: 1598–1607.
- Crichton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR *et al*. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 2006; **126**: 121–134.
- Schwarze PE, Seglen PO. Reduced autophagic activity, improved protein balance and enhanced *in vitro* survival of hepatocytes isolated from carcinogen-treated rats. *Exp Cell Res* 1985; **157**: 15–28.
- Aita VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL, Yu W, Cayanis E *et al*. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* 1999; **59**: 59–65.
- Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H *et al*. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999; **402**: 672–676.
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A *et al*. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 2003; **112**: 1809–1820.
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 15077–15082.
- Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh BH *et al*. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol* 2006; **8**: 688–699.
- Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cuaing HD, Sun M, Sato Y *et al*. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 2007; **9**: 1142–1151.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144**: 646–674.
- Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S *et al*. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev* 2007; **21**: 1621–1635.
- Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K *et al*. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* 2007; **21**: 1367–1381.
- Negri T, Tarantino E, Orsenigo M, Reid JF, Gariboldi M, Zambetti M *et al*. Chromosome band 17q21 in breast cancer: significant association between beclin 1 loss and HER2/NEU amplification. *Genes Chromosomes Cancer* 2010; **49**: 901–909.
- Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY *et al*. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 2009; **137**: 1062–1075.
- Lenaz G. Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? *Adv Exp Med Biol* 2012; **942**: 93–136.
- Lenaz G, Bovina C, D'Aurelio M, Fato R, Formigini G, Genova ML *et al*. Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Ann N Y Acad Sci* 2002; **959**: 199–213.
- Geisler S, Holmstrom KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ *et al*. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 2010; **12**: 119–131.
- Lee Y, Lee HY, Hanna RA, Gustafsson AB. Mitochondrial autophagy by Bnip3 involves Drp1-mediated mitochondrial fission and recruitment of Parkin in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; **301**: H1924–H1931.
- Prigione A, Cortopassi G. Mitochondrial DNA deletions and chloramphenicol treatment stimulate the autophagic transcript ATG12. *Autophagy* 2007; **3**: 377–380.
- Alemi M, Prigione A, Wong A, Schoenfeld R, DiMauro S, Hirano M *et al*. Mitochondrial DNA deletions inhibit proteasomal activity and stimulate an autophagic transcript. *Free Radic Biol Med* 2007; **42**: 32–43.
- Prigione A, Cortopassi G. Mitochondrial DNA deletions induce the adenosine monophosphate-activated protein kinase energy stress pathway and result in decreased secretion of some proteins. *Aging Cell* 2007; **6**: 619–630.
- Mortensen M, Soilleux EJ, Djordjevic G, Tripp R, Lutteropp M, Sadighi-Akha E *et al*. The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *J Exp Med* 2011; **208**: 455–467.
- Mortensen M, Watson AS, Simon AK. Lack of autophagy in the hematopoietic system leads to loss of hematopoietic stem cell function and dysregulated myeloid proliferation. *Autophagy* 2011; **7**: 1069–1070.
- Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S *et al*. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* 2011; **25**: 795–800.
- Xie R, Wang F, McKeenan WL, Liu L. Autophagy enhanced by microtubule- and mitochondrion-associated MAP1S suppresses genome instability and hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2011; **71**: 7537–7546.
- van Loon B, Markkanen E, Hubscher U. Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *DNA Repair (Amst)* 2010; **9**: 604–616.
- Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* 2008; **36**: 5678–5694.
- Greiner R, Volkmer B, Henning S, Breitbart EW, Greulich KO, Cardoso MC *et al*. UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages. *Nucleic Acids Res* 2012; **40**: 10263–10273.
- Eccles LJ, O'Neill P, Lomax ME. Delayed repair of radiation induced clustered DNA damage: friend or foe? *Mutat Res* 2011; **711**: 134–141.
- Cadet J, Ravanat JL, TavernaPorro M, Menoni H, Angelov D. Oxidatively generated complex DNA damage: tandem and clustered lesions. *Cancer Lett* 2012; **327**: 5–15.
- D'Angiolella V, Santarpia C, Grieco D. Oxidative stress overrides the spindle checkpoint. *Cell Cycle* 2007; **6**: 576–579.
- Dotiwala F, Eapen VV, Harrison JC, Arbel-Eden A, Ranade V, Yoshida S *et al*. DNA damage checkpoint triggers autophagy to regulate the initiation of anaphase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: E41–E49.

45. Kuo TC, Chen CT, Baron D, Onder TT, Loewer S, Almeida S *et al*. Midbody accumulation through evasion of autophagy contributes to cellular reprogramming and tumorigenicity. *Nat Cell Biol* 2011; **13**: 1214–1223.
46. Robert T, Vanoli F, Chiolo I, Shubassi G, Bernstein KA, Rothstein R *et al*. HDACs link the DNA damage response, processing of double-strand breaks and autophagy. *Nature* 2011; **471**: 74–79.
47. Katayama M, Kawaguchi T, Berger MS, Pieper RO. DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. *Cell Death Differ* 2007; **14**: 548–558.
48. Dyavaiah M, Rooney JP, Chittur SV, Lin Q, Begley TJ. Autophagy-dependent regulation of the DNA damage response protein ribonucleotide reductase 1. *Mol Cancer Res* 2011; **9**: 462–475.
49. Ferraro E, Pulicati A, Cencioni MT, Cozzolino M, Navoni F, di Martino S *et al*. Apoptosome-deficient cells lose cytochrome c through proteasomal degradation but survive by autophagy-dependent glycolysis. *Mol Biol Cell* 2008; **19**: 3576–3588.
50. Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism. *Science* 2010; **330**: 1344–1348.
51. de Laat WL, Jaspers NG, Hoeijmakers JH. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* 1999; **13**: 768–785.
52. Bao Y, Shen X. Chromatin remodeling in DNA double-strand break repair. *Curr Opin Genet Dev* 2007; **17**: 126–131.
53. Rodriguez-Vargas JM, Ruiz-Magana MJ, Ruiz-Ruiz C, Majuelos-Melguizo J, Peralta-Leal A, Rodriguez MI *et al*. ROS-induced DNA damage and PARP-1 are required for optimal induction of starvation-induced autophagy. *Cell Res* 2012; **22**: 1181–1198.
54. Munoz-Gamez JA, Rodriguez-Vargas JM, Quiles-Perez R, Aguilar-Quesada R, Martin-Oliva D, de Murcia G *et al*. PARP-1 is involved in autophagy induced by DNA damage. *Autophagy* 2009; **5**: 61–74.
55. Kumar D, Abdulovic AL, Viberg J, Nilsson AK, Kunkel TA, Chabes A. Mechanisms of mutagenesis in vivo due to imbalanced dNTP pools. *Nucleic Acids Res* 2011; **39**: 1360–1371.
56. Henderson C, Mizzau M, Paroni G, Maestro R, Schneider C, Brancolini C. Role of caspases, Bid, and p53 in the apoptotic response triggered by histone deacetylase inhibitors trichostatin-A (TSA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). *J Biol Chem* 2003; **278**: 12579–12589.
57. Kruszewski M, Szumiel I. Sirtuins (histone deacetylases III) in the cellular response to DNA damage—facts and hypotheses. *DNA Repair (Amst)* 2005; **4**: 1306–1313.
58. True O, Matthias P. Interplay between histone deacetylases and autophagy—from cancer therapy to neurodegeneration. *Immunol Cell Biol* 2012; **90**: 78–84.
59. Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura S, Natsume T, Guan JL *et al*. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol* 2008; **181**: 497–510.
60. Bae H, Guan JL. Suppression of autophagy by FIP200 deletion impairs DNA damage repair and increases cell death upon treatments with anticancer agents. *Mol Cancer Res* 2011; **9**: 1232–1241.
61. Moore DM, Karlin J, Gonzalez-Barrera S, Mardiros A, Lisby M, Doughty A *et al*. Rad10 exhibits lesion-dependent genetic requirements for recruitment to DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 2009; **37**: 6429–6438.
62. Shoji JY, Kikuma T, Arioka M, Kitamoto K. Macroautophagy-mediated degradation of whole nuclei in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *PLoS One* 2010; **5**: e15650.
63. McGee MD, Weber D, Day N, Vitelli C, Crippen D, Herndon LA *et al*. Loss of intestinal nuclei and intestinal integrity in aging *C. elegans*. *Aging Cell* 2011; **10**: 699–710.
64. Krick R, Muehe Y, Prick T, Bremer S, Schlotterhose P, Eskelinen EL *et al*. Piecemeal microautophagy of the nucleus requires the core macroautophagy genes. *Mol Biol Cell* 2008; **19**: 4492–4505.
65. Kvam E, Gable K, Dunn TM, Goldfarb DS. Targeting of Tsc13p to nucleus-vacuole junctions: a role for very-long-chain fatty acids in the biogenesis of microautophagic vesicles. *Mol Biol Cell* 2005; **16**: 3987–3998.
66. Kraft C, Reggiori F, Peter M. Selective types of autophagy in yeast. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1793**: 1404–1412.
67. Millen JL, Krick R, Prick T, Thumm M, Goldfarb DS. Measuring piecemeal microautophagy of the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy* 2009; **5**: 75–81.
68. Park YE, Hayashi YK, Bonne G, Arimura T, Noguchi S, Nonaka I *et al*. Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells. *Autophagy* 2009; **5**: 795–804.
69. Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Becane HM, Hammouda EH, Merlini L *et al*. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 1999; **21**: 285–288.
70. Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L *et al*. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 2003; **423**: 293–298.
71. Rello-Varona S, Lissa D, Shen S, Niso-Santano M, Senovilla L, Marino G *et al*. Autophagic removal of micronuclei. *Cell Cycle* 2012; **11**: 170–176.
72. Smith J, Tho LM, Xu N, Gillespie DA. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res* 2010; **108**: 73–112.
73. Tichy A, Vavrova J, Pejchal J, Rezacova M. Ataxia-telangiectasia mutated kinase (ATM) as a central regulator of radiation-induced DNA damage response. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2010; **53**: 13–17.
74. Batista LF, Roos WP, Kaina B, Menck CF. p53 mutant human glioma cells are sensitive to UV-C-induced apoptosis due to impaired cyclobutane pyrimidine dimer removal. *Mol Cancer Res* 2009; **7**: 237–246.
75. Vousden KH, Prives C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell* 2009; **137**: 413–431.
76. Tasdemir E, Chiara Maiuri M, Morselli E, Criollo A, D'Amelio M, Djavaheri-Mergny M *et al*. A dual role of p53 in the control of autophagy. *Autophagy* 2008; **4**: 810–814.
77. Ryan KM. p53 and autophagy in cancer: guardian of the genome meets guardian of the proteome. *Eur J Cancer* 2011; **47**: 44–50.
78. Budanov AV, Karin M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* 2008; **134**: 451–460.
79. Alexander A, Cai SL, Kim J, Nanez A, Sahin M, MacLean KH *et al*. ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 4153–4158.
80. Morselli E, Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Kepp O, Criollo A *et al*. Mutant p53 protein localized in the cytoplasm inhibits autophagy. *Cell Cycle* 2008; **7**: 3056–3061.
81. Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M *et al*. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol* 2008; **10**: 676–687.
82. Yoon JH, Ahn SG, Lee BH, Jung SH, Oh SH. Role of autophagy in chemoresistance: regulation of the ATM-mediated DNA-damage signaling pathway through activation of DNA-PKcs and PARP-1. *Biochem Pharmacol* 2012; **83**: 747–757.
83. Zeng X, Kinsella TJ. BNIP3 is essential for mediating 6-thioguanine- and 5-fluorouracil-induced autophagy following DNA mismatch repair processing. *Cell Res* 2010; **20**: 665–675.
84. Zeng X, Kinsella TJ. Mammalian target of rapamycin and S6 kinase 1 positively regulate 6-thioguanine-induced autophagy. *Cancer Res* 2008; **68**: 2384–2390.
85. Guo R, Chen J, Zhu F, Biswas AK, Berton TR, Mitchell DL *et al*. E2F1 localizes to sites of UV-induced DNA damage to enhance nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 2001; **276**: 19308–19315.
86. Marabese M, Vikhanskaya F, Rainelli C, Sakai T, Brogini M. DNA damage induces transcriptional activation of p73 by removing C-EBPalpha repression on E2F1. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 6624–6632.
87. Polager S, Ofir M, Ginsberg D. E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. *Oncogene* 2008; **27**: 4860–4864.
88. Eby KG, Rosenbluth JM, Mays DJ, Marshall CB, Barton CE, Sinha S *et al*. ISG20L1 is a p53 family target gene that modulates genotoxic stress-induced autophagy. *Mol Cancer* 2010; **9**: 95.
89. Crighton D, O'Prey J, Bell HS, Ryan KM. p73 regulates DRAM-independent autophagy that does not contribute to programmed cell death. *Cell Death Differ* 2007; **14**: 1071–1079.
90. Irwin MS, Kondo K, Marin MC, Cheng LS, Hahn WC, Kaelin WG Jr. Chemoresensitivity linked to p73 function. *Cancer Cell* 2003; **3**: 403–410.
91. Zaika E, Wei J, Yin D, Andl C, Moll U, El-Rifai W *et al*. p73 protein regulates DNA damage repair. *FASEB J* 2011; **25**: 4406–4414.
92. Ikawa S, Nakagawara A, Ikawa Y. p53 family genes: structural comparison, expression and mutation. *Cell Death Differ* 1999; **6**: 1154–1161.
93. Guo R, Chen J, Zhu F, Biswas AK, Berton TR, Mitchell DL *et al*. E2F1 localizes to sites of UV-induced DNA damage to enhance nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 2010; **285**: 19308–19315.
94. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW *et al*. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2010; **90**: 1383–1435.
95. Hou W, Han J, Lu C, Goldstein LA, Rabinowich H. Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy* 2010; **6**: 891–900.
96. Qiang L, Wu C, Ming M, Viollet B, He YY. Autophagy controls p38 activation to promote cell survival under genotoxic stress. *J Biol Chem* 2013; **288**: 1603–1611.
97. Zhang C, Lin M, Wu R, Wang X, Yang B, Levine AJ *et al*. Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 16259–16264.
98. Nezis IP, Shrivastava BV, Sagana AP, Lamark T, Bjorkoy G, Johansen T *et al*. Autophagic degradation of dRb controls DNA fragmentation in nurse cells during late Drosophila melanogaster oogenesis. *J Cell Biol* 2010; **190**: 523–531.
99. Yu L, Wan F, Dutta S, Welsh S, Liu Z, Freundt E *et al*. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 4952–4957.
100. Siggins L, Figg N, Bennett M, Foo R. Nutrient deprivation regulates DNA damage repair in cardiomyocytes via loss of the base-excision repair enzyme OGG1. *FASEB J* 2012; **26**: 2117–2124.
101. Wang J, Whiteman MW, Lian H, Wang G, Singh A, Huang D *et al*. A non-canonical MEK/ERK signaling pathway regulates autophagy via regulating Beclin 1. *J Biol Chem* 2009; **284**: 21412–21424.
102. Wang ZH, Xu L, Duan ZL, Zeng LQ, Yan NH, Peng ZL. Beclin 1-mediated macroautophagy involves regulation of caspase-9 expression in cervical cancer HeLa cells. *Gynecol Oncol* 2007; **107**: 107–113.
103. Nascimento-Ferreira I, Santos-Ferreira T, Sousa-Ferreira L, Auregan G, Onofre I, Alves S *et al*. Overexpression of the autophagic beclin-1 protein clears mutant ataxin-3 and alleviates Machado-Joseph disease. *Brain* 2011; **134**(Pt 5): 1400–1415.

104. Rodríguez-Rocha H, García-García A, Panayiotidis MI, Franco R. DNA damage and autophagy. *Mutat Res* 2011; **711**: 158–166.
105. Hughson LR, Poon VI, Spowart JE, Lum JJ. Implications of therapy-induced selective autophagy on tumor metabolism and survival. *Int J Cell Biol* 2012; **2012**: 872091.
106. Stevens T, Muftuoglu M, Aamann MD, Bohr VA. The role of Cockayne Syndrome group B (CSB) protein in base excision repair and aging. *Mech Ageing Dev* 2008; **129**: 441–448.
107. Stevens T, Nyaga S, de Souza-Pinto NC, van der Horst GT, Gorgels TG, Hogue BA *et al*. Mitochondrial repair of 8-oxoguanine is deficient in Cockayne syndrome group B. *Oncogene* 2002; **21**: 8675–8682.
108. Aamann MD, Sorensen MM, Hvitby C, Berquist BR, Muftuoglu M, Tian J *et al*. Cockayne syndrome group B protein promotes mitochondrial DNA stability by supporting the DNA repair association with the mitochondrial membrane. *FASEB J* 2010; **24**: 2334–2346.
109. Scheibye-Knudsen M, Ramamoorthy M, Sykora P, Maynard S, Lin PC, Minor RK *et al*. Cockayne syndrome group B protein prevents the accumulation of damaged mitochondria by promoting mitochondrial autophagy. *J Exp Med* 2012; **209**: 855–869.
110. Vessoni AT, Muotri AR, Okamoto OK. Autophagy in stem cell maintenance and differentiation. *Stem Cells Dev* 2012; **21**: 513–520.
111. García-Prat L, Sousa-Victor P, Muñoz-Canoves P. Functional dysregulation of stem cells during aging: a focus on skeletal muscle stem cells. *FEBS J* 2013; e-pub ahead of print 2 March 2013; doi:10.1111/febs.12221.
112. Filipcik P, Cente M, Ferencik M, Hulin I, Novak M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Bratisl Lek Listy* 2006; **107**: 384–394.
113. Nakabeppu Y, Tsuchimoto D, Yamaguchi H, Sakumi K. Oxidative damage in nucleic acids and Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 2007; **85**: 919–934.
114. Khandelwal PJ, Herman AM, Hoe HS, Rebeck GW, Moussa CE. Parkin mediates beclin-dependent autophagic clearance of defective mitochondria and ubiquitinated Abeta in AD models. *Hum Mol Genet* 2011; **20**: 2091–2102.
115. Kao SY. DNA damage induces nuclear translocation of parkin. *J Biomed Sci* 2009; **16**: 67.
116. Kao SY. Regulation of DNA repair by parkin. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **382**: 321–325.
117. Majumder S, Richardson A, Strong R, Oddo S. Inducing autophagy by rapamycin before, but not after, the formation of plaques and tangles ameliorates cognitive deficits. *PLoS One* 2011; **6**: e25416.
118. Taylor R, Goldman SJ. Mitophagy and disease: new avenues for pharmacological intervention. *Curr Pharm Des* 2017; **17**: 2056–2073.
119. Ionov Y, Nowak N, Perucho M, Markowitz S, Cowell JK. Manipulation of nonsense mediated decay identifies gene mutations in colon cancer cells with microsatellite instability. *Oncogene* 2004; **23**: 639–645.
120. Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, Song SY, Kim SS *et al*. Frameshift mutations of autophagy-related genes ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *J Pathol* 2009; **217**: 702–706.
121. Kim MS, Jeong EG, Ahn CH, Kim SS, Lee SH, Yoo NJ. Frameshift mutation of UVRAG, an autophagy-related gene, in gastric carcinomas with microsatellite instability. *Hum Pathol* 2008; **39**: 1059–1063.
122. Maiuri MC, Tasdemir E, Ciriello A, Morselli E, Vicencio JM, Carnuccio R *et al*. Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell Death Differ* 2009; **16**: 87–93.
123. Marino G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, Knecht E, Mizushima N, Lopez-Otin C. Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *J Biol Chem* 2007; **282**: 18573–18583.
124. Zhao Z, Oh S, Li D, Ni D, Pirooz SD, Lee JH *et al*. A dual role for UVRAG in maintaining chromosomal stability independent of autophagy. *Dev Cell* 2012; **22**: 1001–1016.
125. Knaevelsrud H, Ahlquist T, Merok MA, Nesbakken A, Stenmark H, Lothe RA *et al*. UVRAG mutations associated with microsatellite unstable colon cancer do not affect autophagy. *Autophagy* 2010; **6**: 863–870.
126. Ni Chonghaile T, Letai A. Who put the "A" in Atg12: autophagy or apoptosis? *Mol Cell* 2011; **44**: 844–845.
127. Green DR, Kroemer G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 2009; **458**: 1127–1130.
128. Rosenbluth JM, Pietenpol JA. mTOR regulates autophagy-associated genes downstream of p73. *Autophagy* 2009; **5**: 114–116.
129. Teitz T, Penner M, Eli D, Stark M, Bakhnanashvili M, Naiman T *et al*. Isolation by polymerase chain reaction of a cDNA whose product partially complements the ultraviolet sensitivity of xeroderma pigmentosum group C cells. *Gene* 1990; **87**: 295–298.
130. Biswas AK, Johnson DG. Transcriptional and nontranscriptional functions of E2F1 in response to DNA damage. *Cancer Res* 2012; **72**: 13–17.
131. Stevens C, La Thangue NB. The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control. *DNA Repair (Amst)* 2004; **3**: 1071–1079.
132. Chen LH, Loong CC, Su TL, Lee YJ, Chu PM, Tsai ML *et al*. Autophagy inhibition enhances apoptosis triggered by BO-1051, an N-mustard derivative, and involves the ATM signaling pathway. *Biochem Pharmacol* 2011; **81**: 594–605.
133. Leung M, Rosen D, Fields S, Cesano A, Budman DR. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibition: preclinical and clinical development of synthetic lethality. *Mol Med* 2011; **17**: 854–862.
134. Javle M, Curtin NJ. The role of PARP in DNA repair and its therapeutic exploitation. *Br J Cancer* 2011; **105**: 1114–1122.
135. Casorelli I, Bossa C, Bignami M. DNA damage and repair in human cancer: molecular mechanisms and contribution to therapy-related leukemias. *Int J Environ Res Public Health* 2012; **9**: 2636–2657.
136. Zeng X, Yan T, Schupp JE, Seo Y, Kinsella TJ. DNA mismatch repair initiates 6-thioguanine-induced autophagy through p53 activation in human tumor cells. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 1315–1321.
137. Knizhnik AV, Roos WP, Nikolova T, Quiros S, Tomaszowski KH, Christmann M *et al*. Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. *PLoS One* 2013; **8**: e55665.
138. Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, Bui T, Christophorou MA, Evan GI *et al*. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest* 2007; **117**: 326–336.
139. Shin SY, Hyun J, Yu JR, Lim Y, Lee YH. 5-Methoxyflavone induces cell cycle arrest at the G2/M phase, apoptosis and autophagy in HCT116 human colon cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; **254**: 288–298.

Gap-filling and bypass at the replication fork are both active mechanisms for tolerance of low-dose ultraviolet-induced DNA damage in the human genome

Annabel Quinet^{a,b,*}, Alexandre T. Vessoni^a, Clarissa R.R. Rocha^a, Vanesa Gottifredi^c, Denis Biard^d, Alain Sarasin^b, Carlos F.M. Menck^{a,**}, Anne Stary^b

^a Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508-900, Brazil

^b CNRS-UMR8200, Université Paris Sud, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France

^c Fundación Instituto Leloir, CONICET, Buenos Aires, Argentina

^d CEA, DSV-iMETI-SEPIA, BP6, 92265 Fontenay-aux-Roses, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 June 2013

Received in revised form

26 November 2013

Accepted 10 December 2013

Available online 28 December 2013

Keywords:

UV damage bypass

NER

TLS DNA polymerase η

Cell cycle progression

Replication fork

DNA strand breaks

γ H2AX

ABSTRACT

Ultraviolet (UV)-induced DNA damage are removed by nucleotide excision repair (NER) or can be tolerated by specialized translesion synthesis (TLS) polymerases, such as Pol η . TLS may act at stalled replication forks or through an S-phase independent gap-filling mechanism. After UVC irradiation, Pol η -deficient (XP-V) human cells were arrested in early S-phase and exhibited both single-strand DNA (ssDNA) and prolonged replication fork stalling, as detected by DNA fiber assay. In contrast, NER deficiency in XP-C cells caused no apparent defect in S-phase progression despite the accumulation of ssDNA and a G2-phase arrest. These data indicate that while Pol η is essential for DNA synthesis at ongoing damaged replication forks, NER deficiency might unmask the involvement of tolerance pathway through a gap-filling mechanism. ATR knock down by siRNA or caffeine addition provoked increased cell death in both XP-V and XP-C cells exposed to low-dose of UVC, underscoring the involvement of ATR/Chk1 pathway in both DNA damage tolerance mechanisms. We generated a unique human cell line deficient in XPC and Pol η proteins, which exhibited both S- and G2-phase arrest after UVC irradiation, consistent with both single deficiencies. In these XP-C/Pol η ^{KD} cells, UVC-induced replicative intermediates may collapse into double-strand breaks, leading to cell death. In conclusion, both TLS at stalled replication forks and gap-filling are active mechanisms for the tolerance of UVC-induced DNA damage in human cells and the preference for one or another pathway depends on the cellular genotype.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ultraviolet (UV) light induces DNA damage that blocks replication and transcription [1–3] triggering either cell death or genetic instability. These lesions are removed through the nucleotide excision repair (NER) pathway which is defective in xeroderma pigmentosum (XP) syndrome characterized by UV hypersensitivity [2]. The NER pathway is subdivided into global genome repair (GG-NER) and transcription-coupled repair (TC-NER) [4]. Briefly,

GG-NER removes lesions throughout the genome in a manner that depends on the XPC protein [3], whereas TC-NER targets lesions that stall RNA polymerase II. UV irradiation induces mainly (6–4) photoproducts (6–4PPs) and cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) in the DNA. Although 6–4PPs are formed 3 times less frequently than CPDs, they cause a more pronounced distortion in the DNA helix and are therefore more rapidly repaired by the GG-NER pathway (full removal within 3–6 h after irradiation). In contrast, only 60% of CPDs are excised within the first 24 h after UVC exposure in normal human cells [5,6].

Given the time required for full removal of UV-induced lesions, replication forks frequently encounter such distortions and processes that tolerate such replication barriers are activated. The most studied tolerance pathway in human cells is translesion DNA synthesis (TLS), a process involving specialized translesion polymerases capable of using damaged DNA as replicative templates [7]. Two models are currently proposed for TLS: at the blocked replication fork or via a post-replicative gap-filling mechanism

* Corresponding author. Present address: Department of Microbiology, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508-900, Brazil. Tel.: +55 11 3091 7499; fax: +55 11 3091 7354.

** Corresponding author. Tel.: +55 11 3091 7499; fax: +55 11 3091 7354.

E-mail addresses: annabel.quinet@usp.br (A. Quinet), alexandre.vessoni@usp.br (A.T. Vessoni), calismah@usp.br (C.R.R. Rocha), vgottifredi@leloir.org.ar (V. Gottifredi), denis.biard@cea.fr (D. Biard), sarasin@gustaveroussy.fr (A. Sarasin), cfmmenck@usp.br (C.F.M. Menck), stary@gustaveroussy.fr (A. Stary).

[8,9]. In the former, the stalled replicative polymerase is replaced by a TLS polymerase that inserts nucleotides opposite the lesion. The replicative polymerase is thereafter reassembled to allow the resumption of DNA replication following the lesion bypass. According to the second hypothesis, when encountering the lesions the replication forks are reinitiated after the damage, giving rise to single-stranded DNA (ssDNA) gaps opposite the lesions. In this scenario, fork progression should not directly depend on TLS, while TLS is in charge of filling ssDNA gaps [8,10–13] in a manner that is spatially and temporally dissociated from the replication fork [14–16]. If the ssDNA gaps are left unfilled, checkpoint signals are activated leading to a G2-phase cell cycle arrest [17–19].

DNA polymerase η (Pol η , encoded by the *POLH* gene) is the prototypic TLS polymerase and the only TLS polymerase known which defects lead to a human syndrome [20], the variant form of XP (XP-V) [11]. It is well established that Pol η ensures accurate replication of TT-CPDs [21,22] and this bypass may act at the stalled replication fork [23,24] but also through a post-replicative gap-filling pathway [15,25]. Pol η may also be involved in the bypass of 6-4PPs as suggested by plasmids assays performed both in yeast and human cells [26,27]. However, Temviriyankul and colleagues recently reported that Pol η is mainly restricted to the TLS of CPDs, and they proposed that the bypass of 6-4PPs in the mammalian genome is performed by other TLS polymerases such as Rev1 and Pol ζ [24]. Therefore, the role of Pol η in the TLS of 6-4PPs remains controversial.

In this work, we investigated the DNA damage response (DDR) in human cell lines deficient in GG-NER (XP-C cells) or Pol η (XP-V cells) exposed to low-dose UVC irradiation. Indeed, we used a UVC dose that induced a mild sensitivity to both single-deficient cell lines but no detectable toxicity in wild-type cells (defined as low-dose UVC, in agreement with other authors, e.g. [28]). We analyzed the effects of UVC irradiation on the cell cycle progression, induction of DNA single- and double-strand breaks (DSBs) by alkaline and neutral comet assay, and the phosphorylation of the histone H2AX. Moreover, to gain further insights into the contribution of Pol η in the DDR of XP-C cells to UVC exposure, we established a novel clonal human cell line stably knocked down (KD) for the *POLH* gene expression in an XPC-deficient background. Herein, we show that GG-NER- and/or Pol η -deficient cell lines accumulate ssDNA after UVC irradiation, and cells lacking Pol η arrest in early S-phase, while XP-C cells arrest in G2-phase. Importantly, upon UVC exposure, XP-V cells had a more pronounced replication fork stalling than DNA repair-deficient and control cells, and the KD of Pol η in XP-C cells decreased fork elongation. Altogether, we report that according to the cellular genotype, both bypass at the replication fork and through a gap-filling pathway are active mechanisms that prevent the collapse of ssDNA into DSBs and ultimately cell death.

2. Material and methods

2.1. Cell culture and gene silencing

The SV40-transformed human fibroblasts XP4PA (XP-C), XP30RO (XP-V, kindly gifted by Dr. James Cleaver), MRC5, a NER-proficient clone derived from the XP4PA cell line, in which one copy of the causal XPC gene mutation has been corrected by homologous gene targeting, replaced by the XPC gene wild-type sequence (XP-C^{cor} cells, unpublished results) and XP-C/Pol η ^{KD} were routinely grown in DMEM (LGC) supplemented with 10% FCS (Cultilab) and 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Life Technologies) at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. To stably switch off the *POLH* gene in XP-C human fibroblasts, Epstein–Barr-derived vectors carrying a short hairpin RNA

(pEBVsiRNA) and a hygromycin B resistance gene were used as previously described [29–31]. The pEBVsiRNA vectors were transfected into XP-C cells using FugeneHD (Promega), and knock down (KD) populations and clones were selected and maintained in culture with 125 µg/mL of hygromycin B (Invitrogen, Life Technologies). We selected a clone that exhibited the most efficient gene silencing over time and termed it as XP-C/Pol η ^{KD} cells. XP-C/Pol η ^{KD} cells were cultivated for more than 30 passages, and gene silencing was regularly checked using western blotting. As controls, we used XP-C and XP-C^{cor} cells stably transfected with a pEBVsiRNA plasmid expressing an impaired shRNA sequence (shCTL) as previously mentioned [29]. All experiments were performed at the same time with XP-C/Pol η ^{KD}, XP-C shCTL and XP-C^{cor} shCTL cells. XP-C/Pol η ^{KD} cells were found to proliferate slower than their XP-C isogenic counterparts (Fig. S1), which is in agreement with previously reported data in U2OS cells that showed a Pol η KD using the same pEBV-siRNA [30]. For transient depletion of ATR, 3×10^5 cells were plated in 60 mm dishes and were transfected, the next day, with 20 nM of specific small interfering RNA (siRNA) using Oligofectamine (Invitrogen, Life Technologies), according to the manufacturer's instruction. The following day, a second transfection was performed and 24 h later, cells were replated for subsequent experiments. The siRNA targeting ATR and the negative control sequences used were: ATR 5'-UUAACAUGUUCUACCCUCAGUGG-3' (ATR-HSS100878 Stealth, Invitrogen, Life Technologies) [32] and control (CT) 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUA-3' (1027310, Qiagen). The human cells used in this work belong to a collection that has been approved by the Ethical Committee for Human Research at the University of São Paulo.

2.2. Ultraviolet irradiation

Exponentially growing cells were seeded 16 h prior to irradiation. For UVC irradiation, cells were washed with pre-heated phosphate buffer saline (PBS) and exposed to a germicide lamp (UVC, maximal emission at 254 nm). The UVC dose was monitored by a VLX-3W radiometer (Vilber Lourmat) and the rate used was 0.1 J/m²/s. After the irradiation, cells received fresh medium and were incubated for the indicated times. For UVC irradiation concomitant with caffeine (Sigma–Aldrich) treatment, the drug was added in the complete culture medium at 1 mM final concentration caffeine (from a stock solution at 77.2 mM in PBS) after the UVC exposure.

2.3. Cell proliferation

Cell proliferation was assessed 72 h after UVC irradiation with or without caffeine using a Cell Proliferation Kit II (XTT, Roche) as described elsewhere [33]. Briefly, cells were seeded at 2×10^4 per well in a 12-well plate prior to treatment. 72 h after UVC irradiation, 400 µL of XTT labeling mixture was added to the cells and incubated for approximately 2 h at 37°C. The absorbance was measured at 492 nm and 650 nm and the final result corresponds to the difference between these measures. Cell proliferation is expressed as percentage of unirradiated cells.

2.4. Flow cytometry (SubG1, γ H2AX, active Caspase 3 and cell cycle analyses)

For concomitant SubG1 and γ H2AX analyses, after the indicated recovery times, detached dying cells and trypsinized adherent cells were fixed with 1% formaldehyde in ice, washed with PBS, resuspended in 70% ice-cold ethanol and stored for at least 24 h at –20°C. After blocking and permeabilization with BSA-T buffer (0.2% Triton X-100, Sigma–Aldrich, 1% bovine serum albumin,

BSA, Sigma–Aldrich, in PBS), samples were incubated with 1/500 anti- γ H2AX antibody (05-636 Millipore) overnight at 4 °C or for 3 h at room temperature (RT). Samples were then washed twice with BSA-T buffer and incubated with 1/200 anti-mouse fluorescein iso-thiocyanate (FITC) antibody (Sigma–Aldrich) for 1 h at RT in the dark. After two washings, the DNA content was stained with 20 μ g/mL propidium iodide (PI), 200 μ g/mL de RNase A (Invitrogen, Life Technologies) and 0.1% Triton X-100 in filtered PBS for 40 min at RT. We defined a gate for γ H2AX positive cells based on unirradiated cells that were considered negative to this staining. To detect and quantify the formation of the active form of Caspase 3, the immunostaining was performed at RT for 1 h and 30 min using a FITC-conjugated anti-active Caspase 3 antibody (559341 BD Pharmingen) diluted at 1/10. To study the cell cycle, cells were treated, let recover for the indicated times and labeled with 10 μ M of bromodeoxyuridine (BrdU, Sigma–Aldrich), a thymidine analog, for 20 min prior to harvesting. Cells were then detached, washed twice with PBS, fixed with 75% chilled ethanol and stored at –20 °C. The day before the acquisition, DNA was treated with pepsin (14 μ M, 1.5% HCl 2 M in water, 250 U/mg, Sigma–Aldrich) for 20 min at 37 °C and then with HCl 2 M for 20 min at RT. Cells were then washed with PBS and blocked and permeabilized with Bu buffer (0.5% FBS, 0.5% Tween-20, 20 mM Hepes in PBS), before incubation with 1/100 anti-BrdU (mouse, Invitrogen, Life Technologies) for 1 h. Samples were then washed and incubated 45 min at the dark in 1/200 anti-mouse FITC (Sigma–Aldrich). Finally, DNA was stained with PI as described above. We defined gates for G1-, S- and G2-phases based on BrdU and DNA content staining. G1- and G2-phase cells are BrdU negative, in contrast to S-phase cells that are BrdU positive. G2-phase cells present twice DNA content than G1-phase cells. Samples were applied on a Guava Flow Cytometer (Millipore) and the data analyzed with CytoSoft Data Acquisition and Analysis Software (Millipore). For SubG1 and γ H2AX analyses, 10,000 cells were counted for each sample and 5000 cells were acquired for cell cycle.

2.5. Immunofluorescence

For local UVC irradiation, cells were covered with a 5 μ m pore-diameter filter (Millipore) during exposure, and immunostaining was subsequently performed as previously described [34] with the following antibodies: rabbit anti- γ H2AX (ab-2893 Abcam) at 1/100 and mouse anti-RPA p34 (MS-691-P0 Neomarkers) at 1/2000. For ssDNA staining, cells were cultivated in the presence of BrdU for 48 h (two doubling times) before UVC exposure. Cells were then immunostained with a mouse anti-BrdU (347580 BD Biosciences) at 1/50 and a rabbit anti-Cyclin A (sc-751 Santa Cruz) antibody at 1/100 in non denaturing conditions. The secondary antibodies used were anti-mouse Alexa Fluor 594 and anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Life Technologies). Slides were imaged with a fluorescence microscope (Axiovert 200, Zeiss) at a magnification of 1000 $\times$.

2.6. DNA fiber assay

The analyses of replication forks progression after UVC irradiation were performed as previously described [35]. Briefly, 3×10^5 cells were seeded in 35 mm plates. The next day, cells were pulsed with 20 μ M chlorodeoxyuridine (CldU, Sigma–Aldrich), a thymidine analog, for 20 min, washed twice with PBS, irradiated with 20 J/m² UVC (or non irradiated as control), then incubated with 200 μ M of another thymidine analog, Iododeoxyuridine (IdU, Sigma–Aldrich), for 20 or 60 min. Cells were then trypsinized and resuspended in PBS for final concentration of 1250 cells/ μ l. A total of 2.5×10^3 cells were placed onto glass slide and lysed with 6 μ l of

Fig. 1. XP-C cells temporarily accumulate in the G2-phase of the cell cycle after a low UVC dose exposure. The cell cycle phases distribution of wild-type and XP-C cells after 2 J/m² UVC was evaluated by BrdU and propidium iodide (PI) staining and was detected by flow cytometry. Briefly, S-phase cells are BrdU positive, while G1 and G2-phase cells are negative for BrdU. PI, a DNA intercalating agent, indicates that G2-phase cells contain two-fold more DNA content than G1-phase cells. (A) Quantification of the flow cytometry data showing the percentage of cells in each cell cycle phase at the indicated times after a 2 J/m² UVC dose. At least two independent flow cytometry experiments were performed in duplicate. (B) Representative graphics are shown and the average percentages of cells in G1-, S- and G2-phases obtained via three independent experiments are indicated. At the top right, the corresponding cell cycle distributions determined by PI staining are shown.

0.5% SDS, 200 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 50 mM EDTA. To unwind DNA, slides were tilted allowing a stream of DNA to run slowly down the slide. Then, slides were fixed in methanol-acetic acid (3:1) and kept overnight in ethanol 70% at 4 °C. The samples were then denatured (2.5 M HCl for 1 h) and blocked in BSA 5%. IdU incorporation was detected using mouse anti-BrdU (1/40, BD Biosciences) and anti-mouse Alexa Fluor 594 secondary antibody. Rat anti-BrdU (1/40, Accurate Chemicals) and anti-rat FITC secondary antibody were used for CldU detection. Finally, slides were mounted with Fluoroshield (Sigma–Aldrich) and DNA fibers were image using confocal microscopy (Zeiss LSM-780 NLO). The lengths of DNA tracts were analyzed by using Zeiss LSM Image Browser software. The experiments were performed twice independently and at least 100 fibers were measure for each sample.

Fig. 2. XP-C/Polη^{KD} cells present both XP-C and XP-V phenotypes and are more sensitive to low-dose UVC irradiation than XP-C cells. (A) *POLH* was stably knocked down in XP-C human fibroblasts as assessed by western blotting. (B) The proliferation of XP-C^{cor}, XP-V, XP-C and XP-C/Polη^{KD} cells was determined 72 h after 0, 1, 2 and 3 J/m² doses of UVC with or without 1 mM caffeine (CAF). The significance of the difference between each cell line irradiated with 2 J/m² UVC without CAF compared to UVC + CAF was determined by Two-way ANOVA (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). (C) The cell cycle phases of XP-V and XP-C/Polη^{KD} cells were evaluated by BrdU and DNA content (PI) staining as detected by flow cytometry at the indicated times after UVC treatment. Representative graphics are shown, and the averages of the percentages of cells in G1-, S- and G2-phases from three independent experiments are indicated. At the top right, the cell cycle distribution determined by PI staining is shown. (D) Averages of the percentages of cells in each cell cycle phase from three independent flow cytometry experiments. (E) SubG1 fractions were detected by flow cytometry 72 h after treatment. Each value represents the mean ($\pm$ s.e.m.) of at least three independent experiments. The significance of the differences between 0 and 2 J/m² for each cell line was evaluated with unpaired *t*-test (ns, non significant; * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$).

2.7. Western blot

The detection of endogenous proteins was performed as previously described [23]. The following antibodies were used: rabbit anti-Polη (ab-17725 Abcam), mouse anti-XPC (ab-6264 Abcam), rabbit anti-p-Chk1 Ser345 (2348 Cell Signaling) and mouse anti-GAPDH (sc-32233 Santa Cruz).

2.8. Alkaline and neutral comet assays

To detect DNA strand breaks, either immediately or 24 h after treatment, 10^5 cells, seeded in 35 mm plates, were trypsinized and resuspended in 180 μ L of 0.5% low melting point (LMP) agarose at 37 °C. Cells were then homogeneously spread onto two microscope slides precoated with 1.5% agarose and were immediately covered with coverslips. To solidify the LMP agarose, the slides were kept at 4 °C for 10 min. After carefully removing the coverslips, cells were lysed overnight in chilled lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris and freshly added 1% Triton X-100 and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) pH 10) at 4 °C. The slides were then placed horizontally in an electrophoresis chamber with cold alkaline buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH >13) for 25 min, and electrophoresis was performed for 25 min at 25 V and 300 mA. For the neutral comet assay, after the overnight lysis, the slides were washed three

times with chilled neutral electrophoresis buffer (300 mM sodium acetate, 100 mM Tris, acetic acid, pH 8.5) and equilibrated for 1 h horizontally in this cold buffer before being subjected to electrophoresis for 1 h at 14 V and 12 mA. Subsequently, slides were neutralized with three 5-min washes with neutralization buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) and fixed with ice-cold 100% ethanol. Finally, the slides were stained with ethidium bromide and imaged with a fluorescence microscope (Axiovert 200, Zeiss) at a magnification of 400 $\times$. At least 100 comets per slide were scored with the Comet Assay IV software (Perceptive Instruments).

2.9. Statistical analysis

Statistical significance was assessed using unpaired test, one-way ANOVA or two-way ANOVA followed by the Bonferroni test (Prism 5, GraphPad Software Inc.).

3. Results

3.1. XP-C human cells temporarily accumulate in G2-phase after low-dose UVC irradiation

To study the DDR in GG-NER-deficient cells, the effects of UVC irradiation on XP-C fibroblasts were investigated and compared to

the isogenic cell line corrected for the expression of a wild-type XPC protein (XP-C^{cor} cells) as described in Section 2. First, we used a “low UVC dose” (2 J/m²) that we defined as a UVC dose that does not induce any detectable sensitivity in XP-C^{cor} cells and only a mild effect on XP-C cells (70% of cell proliferation compared to untreated XP-C cells, Fig. S2). Flow cytometry analysis showed that 7 h after 2 J/m², the percentage of S-phase cells increased in both XP-C and XP-C^{cor} fibroblasts (Fig. 1A). At later time, this S-phase accumulation was no longer detected in both cell lines. In fact, 24 h after treatment, despite resumption of a normal cell cycle progression in NER-proficient cells, we detected a two-fold increase in the number of XP-C fibroblasts in G2-phase relative to control cells (Fig. 1). This accumulation of XP-C cells in G2-phase was less pronounced 72 h after UVC exposure, although it did not return to basal levels. Interestingly, 24 h after irradiation, DNA replication proceeded normally in XP-C cells, as evidenced by no decrease in either BrdU incorporation or cell accumulation in S-phase (Fig. 1B). Moreover, following a higher UVC dose irradiation (5 J/m²), XP-C cells accumulated in both late S- and G2-phases, unlike NER-proficient cells (Fig. 1B). This suggests that defects in GG-NER might impair events required for the completion of S-phase after UVC irradiation, leading to a G2-phase accumulation.

3.2. Deficiency in both XPC and Polη proteins triggers accumulation in S- and G2-phases after low-dose UVC irradiation

We next sought to determine the role of Polη in low-dose UVC-irradiated human cells deficient in GG-NER. Polη was stably knocked down (Polη^{KD}) in XP-C fibroblasts using a pEBVsiRNA vector targeting the *POLH* gene [30,36]. From transfected cells, the clone with the highest KD efficiency and nearly undetectable Polη protein level was selected and named XP-C/Polη^{KD} (Fig. 2A). Because UVC sensitization by caffeine (CAF) is a hallmark of the XP-V cell phenotype [11,22,37], we characterized the Polη KD phenotype through its sensitivity to UVC irradiation in the presence of 1 mM CAF (Fig. 2B). Although the proliferation of XP-C^{cor} fibroblasts after UVC treatment was not affected by this drug, XP-C, XP-V and XP-C/Polη^{KD} fibroblasts displayed a strong decreased proliferation after combined UVC irradiation (2 and 3 J/m²) and CAF treatment (Fig. 2B). Importantly, consistent with the defect of Polη, only XP-V and XP-C/Polη^{KD} cells were sensitized by CAF with an irradiation as low as 1 J/m² UVC. Strikingly, after 2 J/m² UVC dose, the proliferation rate of fibroblasts was disrupted to a greater extent in the XP-C/Polη^{KD} cells as compared to their isogenic XP-C counterparts, even in the absence of CAF (Fig. 2B and Fig. S2). This result highlighted the crucial contribution of Polη deficiency toward the sensitivity of XP-C cells to UVC irradiation. To better characterize the low-dose UVC-induced DDR in this double-deficient cell line, the cell cycle and SubG1-phase were analyzed by flow cytometry (Fig. 2C, D and E). At 24 h post 2 J/m², while XP-C and XP-V cells accumulated in G2 and early S-phase, respectively (compare Figs. 1B and 2C), XP-C/Polη^{KD} fibroblasts accumulated in both G2- and S-phases. At 72 h, BrdU incorporation assay showed a clear disrupted S- to G2-phase transition in XP-C/Polη^{KD} cells, and a greater accumulation of cells in G2-phase than that observed 24 h after UVC (36% compared to 24%). It is noteworthy that irradiated XP-V cells moderately accumulated in G2-phase (21%, Fig. 2C) at this time point. Besides, XP-C/Polη^{KD} cells exhibited an increased SubG1 fraction (24%) as compared to XP-V cells (5.8%) and XP-C cells (10.5%, Fig. 2E).

While at a dose of 5 J/m² UVC, XP-V cells accumulated in early S-phase, to a greater extent than that observed at 2 J/m² (77% versus 65% respectively) (Fig. 2C), XP-C/Polη^{KD} cells exhibited a robust impairment in the amount of BrdU incorporation, indicating a strong defect in the ability to maintain active fork progression in cells transiting S-phase (also shown in the cell cycle profile

Fig. 3. NER- and Polη-deficient cells present persistent γH2AX formation upon a low UVC dose. (A) γH2AX immunostaining was detected by flow cytometry at the indicated times after a 2 J/m² UVC dose. Cells showing a more intense γH2AX signal than untreated cells were considered positive. Data are shown as the mean (± s.e.m.) of percentages of γH2AX-positive cells excluding cells in the SubG1 fraction from three independent experiments. The significance of the differences between XP-C/Polη^{KD} cells versus XP-C cells and between XP-C and XP-V cells versus MRC5 cells were evaluated by Two-way ANOVA (****P* < 0.001). (B) Histograms show representative γH2AX staining as a function of DNA content at the indicated times after 2 J/m² UVC. The percentages of γH2AX-positive cells (including SubG1 cells) are indicated at the top right of each panel. G1-, S-, G2-phases and SubG1 fraction are shown and the rectangles indicate cells with a more intense and distinguishable γH2AX staining, defined as high levels of γH2AX.

inset in the upper corner of the panels). Altogether, these results indicate that human fibroblasts deficient in both XPC and Polη proteins exhibited the combined XP-C and XP-V phenotypes and were extremely sensitive to low-dose UVC irradiation.

3.3. Persistent H2AX phosphorylation in XP-V, XP-C and XP-C/Polη^{KD} human cells exposed to low-dose UVC

The variant histone H2AX is phosphorylated at serine 139 (forming γH2AX) in the vicinity of single-stranded DNA (ssDNA), DNA single- or double-strand breaks (SSBs and DSBs, respectively) [38–40]. Because UVC irradiation induces γH2AX formation [39–43], this was investigated in NER- and/or Polη-deficient human cells. Firstly, we sought to study the formation of γH2AX in spatially restricted UVC-irradiated sites within the nuclei by irradiating cells with 150 J/m² UVC through 5-μm diameter isopore

Fig. 4. Pol η -deficient cells exhibit single-strand breaks and single-strand DNA while XP-C cells only present single-strand DNA. DNA strand breaks (single-strand breaks, SSB and double-strand breaks, DSB) (A) and only DSB (B) were detected 24 h after UVC treatment using the alkaline (Alk) and neutral (Neut) comet assay, respectively. Data are presented as means of comet tail moment ($\pm$ s.e.m.) from at least two experiments performed in triplicate; 100 comets per sample were scored. Statistical analyses were applied by comparing treated versus untreated cells with unpaired *t*-test. (ns, non significant; **P* < 0.05; ****P* < 0.001). (C) Cells were exposed to a 150 J/m² UVC dose through 5 μ m-diameter isopore filters and were immunostained for γ H2AX and RPA p34 7 h later. (D) Cells incorporated BrdU for 48 h and were co-immunostained 6 h after 20 J/m² in non denaturing conditions for Cyclin A and BrdU, revealing the presence of single-strand DNA (ssDNA) in S/G2-phase cells. The percentages of ssDNA-positive cells are indicated in the ssDNA panels and the percentages of ssDNA-positive cells that were also positive for Cyclin A are shown in the Merge panel. At least 100 nuclei were scored per condition. (E) The phosphorylated form of Checkpoint 1 at Serine 345 (p-Chk1) was detected by western blotting 6 h after the indicated UVC doses.

filters. Immediately after local irradiation, no γ H2AX staining was detected, although signals specific to CPD photoproducts were intense (Fig. S3). At later time points after UVC irradiation (2 and 7 h), γ H2AX staining reached strong intensities in areas containing CPDs and 6-4PPs in both NER-proficient and deficient cell lines. Next, we assessed the phosphorylation of H2AX after low UVC dose exposure (Fig. 3). In agreement with the local UVC irradiation experiments, flow cytometry analysis showed that immediately after exposure to 2 J/m² UVC there was no γ H2AX formation in any cell lines (Fig. 3A). While at 2 h after irradiation γ H2AX staining increased in all cell lines, 24 h later γ H2AX was no longer detected in XP-C^{cor} cells. In contrast, a strong accumulation of γ H2AX-positive XP-V (31%) and XP-C (38%) cells was observed. Moreover, at that time XP-C/Pol η^{KD} cells exhibited two fold more γ H2AX-positive cells than XP-C and XP-V fibroblasts (Fig. 3A). A slight decrease in γ H2AX staining intensity was detected in the two NER-deficient cell lines 72 h after UVC treatment. In the NER-proficient XP-V cells, this decrease was more evident, although it did not return to its basal level. These data suggest that H2AX is phosphorylated as a consequence of the persistence of unrepaired photoproducts in the genome.

To gain further insights into the formation of γ H2AX in these deficient cell lines, we analyzed the γ H2AX signal as a function of the DNA content as shown by propidium iodide staining (Fig. 3B).

In all deficient cell lines, the formation of γ H2AX was observed in all cell cycle phases, although the staining appeared in an arc-form, revealing a more pronounced signal mainly in S-phase. Interestingly, a more intense γ H2AX staining, distinguishable from the staining exhibited by the majority of cells, (see Fig. 3B, indicated as high levels of γ H2AX), was detected in S- and G2-phase XP-V and XP-C/Pol η^{KD} cells 24 h after UVC, which was persistent and much more pronounced in the double-deficient cell line.

3.4. Low-dose UVC induces ssDNA in XP-V, XP-C and XP-C/Pol η^{KD} cells, while SSBs are detected only in Pol η -deficient cells

The relevance of γ H2AX staining as a witness of DNA strand breaks was assessed by the alkaline comet assay, which detects both SSB and DSB. Importantly, no DNA strand breaks were detected immediately after UVC exposure, indicating that they are not directly induced by this irradiation (Fig. S4). Surprisingly, 24 h after 2 J/m² UVC, when γ H2AX staining was at a maximum for all the three deficient cell lines, DNA strand breaks were significantly induced only in Pol η -deficient cell lines (XP-V and XP-C/Pol η^{KD} cells) but not in the XP-C fibroblasts (Fig. 4A). To distinguish between SSBs and DSBs, we next assessed DSB formation using the neutral comet assay (Fig. 4B). We did not detect a significant induction of DSBs in any of the three deficient cell lines, although

there was a slight increase of DSBs in XP-V and XP-C/ $\text{Pol}\eta^{\text{KD}}$ cells (Fig. 4B and Fig. S5). Thus, a low UVC dose induced mainly SSBs in both XP-V and XP-C/ $\text{Pol}\eta^{\text{KD}}$ cells, although they were two-fold more pronounced in the double-deficient cell line. Interestingly, the representation of tail moment as a function of DNA content indicates that under alkaline conditions DNA strand breaks are formed during the S-phase of XP-V and XP-C/ $\text{Pol}\eta^{\text{KD}}$ cells (Fig. S5), which is in agreement with the γH2AX staining detected predominantly in S-phase cells.

Previous work has shown that UVC-induced γH2AX formation was linked to the presence of ssDNA [40,42,44]. Moreover, it has been shown that ssDNA can be detected as SSB by the alkaline comet assay [39,45]. To investigate if SSBs result from ssDNA in replicating DNA, we used local UVC irradiation with immunofluorescence to follow the co-localization of γH2AX with replication protein A (RPA), a protein that binds ssDNA, and is therefore widely used as an ssDNA marker. Strikingly, γH2AX and RPA co-localized in all cell lines 7 h after local UVC treatment (Fig. 4C). However, we cannot exclude that the high UV dose, employed for local UV, may also induce the formation of DSBs. As a further assay, the presence of ssDNA was also investigated by labeling both DNA strands with a thymidine analog, BrdU, for 48 h and subsequent BrdU immunostaining in non denaturing conditions 6 h after 20 J/m² of UVC (Fig. 4D). In these conditions, BrdU antibody identifies only single-stranded molecules, staining the cells when ssDNA are present. The formation of ssDNA was observed in all cell lines only after UVC-irradiation of the cells. The results show that, following 20 J/m², deficient cell lines presented slightly more ssDNA than XP-C^{cor} cells, and also that, for the three deficient cell lines, the large majority (more than 90%) of the ssDNA-positive cells were also stained positive for Cyclin A, a protein that is expressed during S- and G2-phases [46].

The formation of ssDNA was shown to activate the Ataxia Telangiectasia and Rad-3 related (ATR) pathway [23,24], thus we investigated, in these cells, the phosphorylation at Serine 345 of Checkpoint 1 (Chk1), a downstream target for the ATR kinase (Fig. 4E). Indeed, 6 h after 2, 5 and 20 J/m² UVC, all cell lines exhibited phosphorylated Chk1 (p-Chk1). Interestingly, after 2 J/m² UVC, XP-C, XP-V and XP-C/ $\text{Pol}\eta^{\text{KD}}$ cells showed similar and pronounced levels of p-Chk1 when compared to XP-C^{cor} cells.

In summary, the different cell cycle progression defects resulting from XPC or $\text{Pol}\eta$ deficiency are both associated with ssDNA accumulation and γH2AX formation after low doses of UVC.

3.5. UVC irradiation induces a pronounced stalling of replication forks in $\text{Pol}\eta$ -deficient cells

Considering that (i) low-dose UVC irradiated XP-V and XP-C/ $\text{Pol}\eta^{\text{KD}}$ cells were arrested in the S-phase of cell cycle, while XP-C cells exhibited a G2-phase arrest (Figs. 1 and 2C and D), and (ii) in all these three cell lines low UVC doses induced ssDNA (Fig. 4), we hypothesized that the lack of $\text{Pol}\eta$ would lead to the stall of replication forks at the DNA damage, while deficiency of XPC protein would lead to gap formation, with no replication fork stalling. To address this question, replication fork elongation was assessed using the DNA stretching technology (fiber assay) for all cell lines, 20 or 60 min after irradiation with 20 J/m² (Fig. 5). Briefly, two thymidine analogs were incorporated in nascent DNA strand during an initial 20 min pulse (CldU) and a subsequent pulse (IdU) of 20 or 60 min after UVC irradiation (Fig. 5A). In the first settings (20 min CldU/20 min IdU), a CldU/IdU ratio of 1 is expected in the absence of replication fork arrest, and a value higher than 1 indicates the stalling of the nascent DNA fibers at the damage. In the second settings (60 min IdU pulse), a smaller ratio of 0.33 is expected in the absence of arrest. With an IdU pulse of 20 min, irradiated XP-C

Fig. 5. UVC irradiation stalls replication forks in $\text{Pol}\eta$ -deficient cells in a more pronounced way than in XP-C and XP-C^{cor} cells. (A) Scheme of the DNA fiber experiment. Cumulative frequency distribution of CldU/IdU ratio expressed as percentage of cumulative forks for fibroblasts irradiated with 20 J/m² (UV) or non irradiated (NI) and pulsed with IdU for 20 min (B) or 60 min (C) from two independent experiments; at least 100 fibers per sample were scored.

cells exhibited a slightly increased CldU/IdU ratio when compared to XP-C^{cor} cells, although at 60 min this difference was abolished (Fig. 5B and C). In contrast, XP-V and XP-C/ $\text{Pol}\eta^{\text{KD}}$ cells exhibited a more pronounced replication fork stalling than XP-C and XP-C^{cor} cells (indicated by a CldU/IdU ratio increase) (Fig. 5B and C) at both 20 and 60 min after UVC. It is noteworthy that XP-C/ $\text{Pol}\eta^{\text{KD}}$ cells seem to exhibit the shortest CldU track length among all cell lines (Fig. S6), in agreement with the slow growth upon KD of $\text{Pol}\eta$ in XP-C cells (Fig. S1).

3.6. Caffeine highly sensitizes GG-NER-deficient cells exposed to low-dose UVC irradiation

The effect of CAF on the proliferation of XP-C cells exposed to 2 J/m² of UVC was unexpected (Fig. 2B). We therefore investigated the effects of CAF on cell cycle progression using quantitative flow cytometry experiments. Such assays revealed that upon CAF treatment irradiated XP-V cells clearly accumulated in early S-phase (Fig. 6A), while XP-C cells accumulated in both S- and

Fig. 6. UVC-irradiated Polη-deficient and GG-NER-deficient cells are highly sensitized by caffeine. Cells were treated with 2 J/m² UVC in the presence of 1 mM of caffeine (CAF). (A) Cell cycle progression was assessed 24 h after treatment by co-staining cells with anti-BrdU and propidium iodide (PI) followed by flow cytometry analysis. At the top right, the correspondent cell cycle distribution determined only by PI staining is shown. Flow cytometry analyses were done at least three times independently in duplicate. Representative graphics are shown and the averages of the percentages of cells in G1-, S- and G2-phases from three individual experiments are indicated. (B) The SubG1 fraction was detected by flow cytometry 72 h after the exposure. Each value represents the mean (±s.e.m.) of at least three independent experiments. The significance of the differences between CAF only versus UVC + CAF were evaluated for each cell line with unpaired *t*-test (ns, non significant, ****P* < 0.001). (C) The formation of the active form of Caspase 3 was quantified by flow cytometry 72 h after the indicated treatments. Data correspond to the means (±s.e.m.) of three independent experiments. Statistical analyses between 0 and 2 J/m² for each cell line were performed with unpaired *t*-test, while those between irradiated cells treated or not with CAF were done with One-way ANOVA (**P* < 0.05; ****P* < 0.001).

G2-phases. Finally, XP-C/Polη^{KD} fibroblasts subjected to combined UVC and CAF treatments showed steep accumulation in S-phase with decreased BrdU incorporation (Fig. 6A). Moreover, CAF induced an increase in SubG1 cells in all irradiated deficient cell lines, correlating with the increase in cell sensitivity to UVC irradiation (Fig. 6B). Indeed, 72 h after this concomitant treatment, XP-V and XP-C cells presented 28% and 33% of SubG1 fraction, respectively, and 41% of XP-C/Polη^{KD} cells were observed in the SubG1 fraction at this time point (Fig. 6B). To gain further insights into the mechanisms of low-dose UVC and CAF-induced cell death in these deficient cell lines, active Caspase 3-positive cells were quantified by flow cytometry, indicating apoptosis (Fig. 6C). UVC significantly increased the percentage of active Caspase 3-positive cells in XP-V (5%), XP-C (7%) and XP-C/Polη^{KD} (43%). CAF highly sensitized XP-V (46%) and XP-C (37%) cells to UVC, while the levels of active Caspase 3 remained high in XP-C/Polη^{KD} cells. Therefore, CAF impaired DNA replication (measured by BrdU incorporation) and resulted in cell death by apoptosis (revealed by DNA fragmentation and Caspase 3 activation) in XP-V, XP-C and XP-C/Polη^{KD} human cells irradiated with low UVC dose.

3.7. Caffeine induces high levels of γH2AX and DNA double-strand breaks in XPC- and Polη-deficient fibroblasts after a low UVC dose exposure

To further investigate the mechanism by which UVC and CAF sensitized XP-C, XP-V and XP-C/Polη^{KD} fibroblasts, we studied the phosphorylation of H2AX and the formation of SSB and DSB by comet assay (Fig. 7). CAF did not increase UVC-induced γH2AX in XP-C^{cor} cells at any time analyzed (Fig. S7), while all deficient cell lines showed a more pronounced accumulation of γH2AX 24 h after this co-treatment. Furthermore, flow cytometry analysis showed

that CAF increased the number of cells with intense γH2AX staining, which was particularly evident at longer time points (24 and 72 h, Fig. S8). Importantly as well, CAF led to an increase on the amount of cells presenting an intense pan-nuclear γH2AX staining in UVC-irradiated XP-C/Polη^{KD} cells detected by immunofluorescence (Fig. S9), similar to the γH2AX staining in human fibroblasts exposed to 20 J/m² UVC previously reported by Cleaver et al. [42,47]. These observations support that, in our study, cells presenting intense γH2AX staining in flow cytometry assays correspond to cells with “high levels of γH2AX” as defined by Cleaver’s group [47].

We also classified γH2AX staining as “moderate” or “high” (Fig. S8). The CAF-induced increase in the percentage of γH2AX-positive cells was caused mainly by an increase in the cell population with high levels of γH2AX (Fig. 7A). These cells were predominantly observed in S- and G2-phases of cell cycle (Fig. S8). Strikingly, CAF also increased UVC-induced DNA breaks in XP-V and XP-C/Polη^{KD} cells 24 h after treatment (Fig. 7B). Indeed, CAF treatment induced (in XP-C cells) or amplified (in XP-V or XP-C/Polη^{KD} cells) the tail moment in UVC-irradiated cells as compared to cells treated with UVC only (compare Figs. 7B and 4A). CAF also generated DSBs in all deficient cell lines (Fig. 7C and S10), which were only barely detected in UVC-exposed cells in the absence of CAF (Fig. 4C). Together, the data show that CAF enhanced UVC-induced DNA replication arrest, production of DSBs and high levels of γH2AX in both XP-V and XP-C/Polη^{KD} cells. In irradiated XP-C cells, on the other hand, S-phase stalling, high levels of γH2AX and DNA breaks appeared only in the presence of CAF.

3.8. ATR inhibition yields DNA damage effects similar to caffeine

Previous work has suggested that the effects of CAF in UVC-exposed human cells are due to the inhibition of the ATR/Chk1

Fig. 7. Caffeine induces high levels of γ H2AX and DNA strand breaks in the XP-C and Pol η -deficient fibroblasts exposed to a low UVC dose. Cells were treated with 2 J/m² UVC in the presence of 1 mM of caffeine (CAF). (A) Percentages of cells positive for γ H2AX staining and specifically cells presenting high levels of γ H2AX were quantified by flow cytometry. The gates for high levels of γ H2AX were defined from the 24 h after 2 J/m² UVC time point staining. γ H2AX-positive cells, which did not present high levels of this staining, were defined as cells with “moderate levels of γ H2AX”. (B) DNA strand breaks (single-strand breaks, SSB and double-strand breaks, DSB) and only DSB (C) were detected 24 h after UVC + CAF treatment using the alkaline and neutral comet assay, respectively. Data are presented as means of comet tail moment ($\pm$ s.e.m.) from at least two experiments performed in triplicate; 100 comets per sample were scored.

pathway [19,23]. In agreement with this hypothesis, CAF attenuated the phosphorylation of Chk1 in XP-C cells irradiated with 2 J/m² (Fig. 8A). Thus, the participation of this pathway in UVC-damaged cells was more specifically investigated, by promoting transient ATR KD with siATR. In fact, UVC-induced p-Chk1 levels were decreased in cells transfected with siATR, functionally confirming the silencing of ATR gene (Fig. 8B). ATR KD induced an S-phase arrest (data not shown) and an increase in the SubG1 fraction (Fig. 8C) in XP-C, XP-V and XP-C/Pol η ^{KD} cells exposed to 2 J/m². Finally, siATR increased the percentage of UVC-induced γ H2AX-positive cells, particularly of cells with high levels of γ H2AX (Fig. 8D), in a similar manner to CAF upon UVC (Fig. 7A). Thus, the similarity in the UVC responses of these cells to CAF and ATR KD suggests that the caffeine effect may be mediated by ATR inhibition. Unfortunately, simultaneous treatment with CAF and siATR was toxic to cells in the absence of any additional treatment (Fig. S11), hampering further investigation on this matter.

4. Discussion

Although much is known about how UVC-induced DNA lesions are removed by NER or tolerated by specific TLS polymerases, several questions are still to be answered. For instance, are the different

UVC-induced photoproducts bypassed by similar mechanisms and at the same moment of cell cycle? The analysis of the effects of low-dose UVC irradiation in human cells allowed us to observe that unrepaired lesions can be differentially processed by replication machinery, which leads to distinct consequences on cell cycle progression. Indeed, our data indicate that Pol η is mainly responsible for lesion bypass during S-phase, leading to a prolonged S-phase arrest in its absence. In its presence, gaps may arise in the newly synthesized strand opposing the UVC damage in the template strand, which are filled independently of replication forks progression.

Quantitative flow cytometry analysis showed that irradiated XP-V fibroblasts were arrested early during replication (Fig. 2C and D) and presented γ H2AX staining mainly in the S-phase of the cell cycle (Fig. 3). Although γ H2AX is commonly used as double-strand break (DSB) marker, UVC-induced γ H2AX in Pol η -deficient cells has also been previously associated with the generation of single-stranded DNA (ssDNA) caused by the uncoupling between the replicative DNA polymerase and the helicase at stalled replication forks [23,40,48]. Indeed, we detected single-strand breaks (SSBs), but not DSBs, in XP-V cells (Fig. 4A and B). Also, it has been shown that H2AX is phosphorylated at the vicinity of ssDNA coated with RPA at stalled replication forks [49] and, in fact, not only we showed that the ssDNA-binding protein RPA is recruited to locally irradiated sites presenting γ H2AX in XP-V cells (Fig. 4C), but we also detected ssDNA in S/G2-phase cells (Fig. 4D). Considering these results, we hypothesized that in XP-V cells, UVC-induced damage would stall replication forks. Indeed, DNA fiber analyses confirmed a much more pronounced fork elongation arrest in XP-V cells when compared to the control cell line, XP-C^{cor}, or even the XP-C cell line (Fig. 5). Altogether, our observations indicate that γ H2AX induced by low-dose of UVC is associated to ssDNA, rather than DSB. Consistent with this, the prolonged stalling of replication forks at UVC damage sites in XP-V cells generated ssDNA. This blockage is probably due to CPDs, as Pol η is known to bypass efficiently only this type of photoproduct.

Because most CPDs and 6-4PPs are not repaired in GG-NER-deficient cells, we were surprised to find that low-dose UVC irradiation did not induce early S-phase arrest in XP-C cells as in XP-V cells. Instead, we noticed an accumulation of XP-C cells in G2-phase after 2 J/m² and in late S- and G2-phases upon 5 J/m² (Fig. 1), suggesting progression of replication forks across UVC damage. Therefore, ssDNA regions (Fig. 4D) and γ H2AX formation (Fig. 3) induced by UVC cannot be associated with prolonged replication fork arrest in XP-C cells. Indeed, at 20 min after irradiation, XP-C cells exhibited a more pronounced replication fork stalling, compared to XP-C^{cor} cells, that was overcome at 60 min time point (Fig. 5). Altogether, these data indicate that in XP-C cells the excess of unrepaired UVC damage that initially arrest replication forks are bypassed by a pathway that results in the formation of ssDNA regions, consistent with the gap-filling mechanism of DNA damage tolerance.

Considering that previous work has shown activation of the ATR pathway by ssDNA formed by the uncoupling of the stalled replicative polymerase and helicase [23], we explored whether ssDNA regions which are not associated with prolonged replication forks stalling would have the same effect. Indeed, after low-dose UVC exposure, we detected a similar extent of phosphorylation of the ATR downstream target, Chk1, in XP-V and XP-C cells (Fig. 4E). In UVC-irradiated XP-C cells, ATR activation might be triggered by the accumulation of ssDNA gaps during DNA replication, leading to a mild and temporary G2-phase arrest, in agreement with previous work [18,19,24,50]. Jansen et al. reported an irreversible G2-phase arrest in UVC-exposed *Xpc*^{-/-}/*Rev1*^{-/-} MEFs [18] which indicates that the resolution of the G2-phase arrest observed may be due to the gap-filling mechanism involving the TLS polymerase Rev1 in

Fig. 8. ATR silencing highly sensitizes XP-V, XP-C and XP-C/Polη^{KD} cells and induces high levels of γH2AX upon low-dose UVC irradiation. Detection of the phosphorylated form of Chk1 (p-Chk1) 6 h after 2 J/m² in cells treated with caffeine (CAF) (A) and cells transfected with an siRNA control (siCT) or an siRNA targeting ATR mRNA (siATR) (B). (C) SubG1 fractions were quantified 72 h after 2 J/m² in cells transfected with siCT or siATR. Values represent the means (±s.e.m.) of two independent experiments performed in duplicate and the statistical analyses between siCT and siATR for each cell line exposed to UVC were performed with Two-way ANOVA (ns, non significant; **P* < 0.05; ****P* < 0.001). (D) γH2AX staining was quantified by flow cytometry 24 and 72 h after 2 J/m² in cells transfected with siATR (+) or siCT (-). Data represent means (±s.e.m.) of percentages of cells positive for γH2AX staining and specifically cells presenting moderate or high levels of γH2AX from two independent experiments done in duplicate.

this cell cycle phase, also in agreement with other reports [15,24]. However, these authors did not observe any defect in cell cycle progression in UVC-treated *Xpc*^{-/-} MEFs [18] and, to our knowledge, this is the first time that a temporary G2-phase arrest is detected in non-synchronized human cells proficient in TLS exposed to UVC. Interestingly, the presence of unrepaired 6-4PPs is the major difference in terms of lesions in XP-C cells compared to NER-proficient cells, since persistent CPDs can be efficiently bypassed by Polη in GG-NER-deficient cells. Therefore, the different responses between XP-C and XP-V cells observed after UVC irradiation (cell cycle arrest, generation of SSBs and replication fork progression) may indicate that the UVC-DDR observed in XP-C cells is due to the persistence of 6-4PPs rather than CPDs. One possibility is that 6-4PP lesions are mainly bypassed through a post-replicative gap-filling process while CPDs are replicated by Polη directly at the replication fork.

Polη is known to rapidly replicate CPDs, although some data suggest that Polη can also play a role in the bypass of 6-4PPs [26,27]. When the expression of Polη was stably knocked down in XP-C cells, in which most CPDs and 6-4PPs are not repaired, we observed a combined XP-C and XP-V phenotype as inferred from cell cycle arrest in both S- and G2-phases (Fig. 2C and D) and an increase in the γH2AX formation in XP-C/Polη^{KD} cells when compared to XP-C or XP-V cells (Fig. 3). Moreover, in strong contrast with their XP-C counterparts, XP-C/Polη^{KD} cells exhibited SSBs with a higher DNA tailing than the one detected in XP-V cells (Fig. 4A). These results suggest that in the double-deficient cells, besides ssDNA gaps, UVC irradiation also induced prolonged replication fork stalling. Indeed, replication forks elongation was reduced after UVC irradiation in XP-C cells when Polη was depleted (Fig. 5). Surprisingly, at 60 min upon UVC, fork stalling in XP-C/Polη^{KD} cells was apparently less

pronounced when compared to XP-V cells. However, the average speed of replication fork progression of the double-deficient cell line is lower than in other cell lines used in this study including XP-V cells (Fig. S6). This suggests that in the XP-C/Polη^{KD} cells the probability of encountering the same amount of DNA lesions within the same time period is reduced.

Taken together, our results may indicate that in XP-C/Polη^{KD} cells there is a superposition of both XP-C and XP-V phenotypes and in this case Polη would not be involved in the gap-filling pathway in irradiated XP-C cells. More precisely, the results can be explained by the fact that in a *XPC*-deficient background, unrepaired CPDs in the genome might block replication forks in the absence of Polη. However, another hypothesis is that because Polη is able to insert the first nucleotide during replication of 6-4PPs with bypass being completed by Polζ [26,27], in Polη-deficient cells, part of unrepaired 6-4PPs could also stall replication forks as CPDs do.

Unlike XP-C and XP-V cells, XP-C/Polη^{KD} cells showed an irreversible cell cycle disruption (Fig. 2C), DSBs (Fig. 4B) and apoptosis induction (Figs. 2E and 6C) after a low UVC dose. Thus, in NER- and Polη-deficient human cells, both ssDNA gaps and prolonged replication forks stalling are generated, although they collapse into DSB, finally leading to cell death.

The UVC-induced phosphorylation of H2AX was related to ATR [40,51], and it is thus intriguing that the inhibition of this kinase by ATR silencing did not abolish the formation of γH2AX, but rather induced an increase in γH2AX formation after UVC irradiation (Fig. 8C). In fact, the increase in γH2AX staining was due to the emergence of a cell population exhibiting high levels of γH2AX in all UVC-irradiated deficient cell lines depleted for ATR but also in XP-C/Polη^{KD} cells exposed to UVC irradiation only (Figs. 3B and 8C).

Fig. 9. Model for replicating damaged DNA in GG-NER- and/or Pol η -deficient human cells. The black part of the model corresponds to the consequences of UVC irradiation on human fibroblasts while the gray one represents the effects of caffeine or ATR silencing upon UVC exposure. In GG-NER-deficient cells, the replication fork arrest would be resolved by fork restart downstream the lesion. This would generate single-strand DNA (ssDNA) gaps during and after DNA replication. In Pol η -deficient cells, replication fork stalling would be prolonged and therefore the uncoupling between the replicative polymerase and the helicase would also lead to the formation of ssDNA region. In cells deficient in both NER and Pol η , both ssDNA gaps and ssDNA due to replicative polymerase stalling would be induced at the same time by UVC irradiation and thus there would be a more important amount of ssDNA regions in these double-deficient cells than in both single-deficient cell lines (represented by the thick arrow). In either case, the induction of ssDNA would lead to Ser139 H2AX phosphorylation, generating moderate levels of γ H2AX. According to a recent work, the formation of γ H2AX mediates ATR/Chk1 pathway over-activation [49], which in turn, may stabilize ssDNA and induce cell cycle arrest. In the case of ssDNA gaps, this checkpoint activation may lead to a G2-phase arrest while stalled replication forks would induce intra-S-phase arrest. ATR inhibition (by CAF or ATR silencing) could induce double-strand breaks (DSB) in UVC-exposed cells as a consequence of the collapse of ssDNA structures. In this case, another kinase than ATR could phosphorylate H2AX, leading to high levels of γ H2AX. In this scenario, UVC-induced DSB would mainly conduct cells to death. Strikingly, the presence of unresolved ssDNA structures in GG-NER/Pol η -deficient cells may lead to collapse into DSB, represented by the dotted line.

These results show that the generation of high levels of γ H2AX is independent of the ATR kinase. Interestingly, similar results were obtained with cells co-treated with CAF and UVC (Fig. 7A and S8), underscoring that the effect of CAF in UVC-exposed cells might be mainly associated with the inhibition of ATR/Chk1. This is in agreement with previous reports [19,23,47,52,53] and in line with the observation that CAF abolishes the activation of Chk1 upon low-dose UVC treatment (Fig. 8A). Intriguingly, we detected low levels of DSB by the neutral comet assay in XP-C and XP-V cells co-treated with CAF and UVC and in irradiated XP-C/Pol η ^{KD} both treated or not with CAF (Figs. 4B and 7C), which correlates to the emergence of high levels of γ H2AX (Fig. 7A) mainly in S- and G2-phases (Fig. 3B and S7), therefore suggesting that only cells with high levels of γ H2AX actually present DSBs. Moreover, we also observed a strong correlation between DSB formation and apoptosis induction (compare Figs. 4B, 6B, 6C and 7C). It has been shown that co-treatment with CAF and UVC redirect S-phase cells into an apoptotic pathway [43,47,54,55]. Therefore, it is likely that CAF and UVC-exposed S/G2-phases cells switched to a DSB pathway inducing intense γ H2AX staining [43], represented here by the high levels of γ H2AX. These results indicate that for XP-C and XP-V cells co-treated with CAF and UVC irradiation, DSBs are generated from the collapse of ssDNA structures that are no longer stabilized by the ATR pathway, leading to cell death. For XP-C/Pol η ^{KD} cells, UVC-induced ssDNA replicative intermediates collapse directly into DSBs even in the absence of ATR inhibition, increasing the sensitivity of these cells to UVC irradiation.

In conclusion, based on the results presented herein and those previously published elsewhere, we propose a model in which

both damage tolerance at the replication fork and post-replicative gap-filling bypass mechanism play an essential role in the recovery of human cells after UVC exposure. In this model (Fig. 9), ssDNA gaps are generated in the genome of human XP-C cells, which allow cells to go through S-phase and arrest in G2-phase. These gaps would then be filled independently of DNA replication, thus resolving the cell cycle arrest. In contrast, XP-V cells accumulate in S-phase due to the blockage of fork progression by DNA damage. The ssDNA formed in both cell types result in signaling for H2AX phosphorylation. In cells deficient in GG-NER and Pol η , both ssDNA replicative intermediates (replication fork blockage and ssDNA gaps) are generated and part of these structures collapse into DSBs, resulting in the formation of high levels of γ H2AX and cell death. ATR inhibition exacerbates these effects, underscoring the role of checkpoint activation in the stabilization of both replication intermediates. The possibility that CPDs and 6-4PPs are responsible for the different responses in XP-V (prolonged blockage of fork progression) or XP-C (ssDNA gaps) cells, respectively, is currently under investigation. Although the effects observed in this work were certainly strengthened by the lack of a functional G1/S checkpoint and DNA repair defects, these processes probably reflect the consequences of a small number of lesions in human cells and disclose the involvement of DNA damage tolerance at the replication fork and also after replication fork restart. The establishment of a stable XP-C/Pol η ^{KD} human cell line has paved the way to further investigations regarding the role of Pol η in the bypass of 6-4PPs in the human genome.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors thank Leonardo C. Andrade-Lima for indications for siRNA and active Caspase 3 experiments, the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brazil); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, DF, Brazil); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, DF, Brazil); Centre National de Recherche Scientifique (CNRS, France), Association Française des Myopathies (Evry, France), Association Française des Enfants de la Lune (Tercis, France) and ANPCyT (Argentina) for Grant support. ATV and CRRR had a fellowship from FAPESP and AQ had a fellowship from French government (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.12.005>.

References

- [1] J. Hoeijmakers, Genome maintenance mechanisms for preventing cancer, *Nature* 411 (2001) 366–374.
- [2] J.E. Cleaver, Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair, *Nat. Rev. Cancer* 5 (2005) 564–573.
- [3] R. Costa, V. Chiganças, R.S. Galhardo, H. Carvalho, C. Menck, The eukaryotic nucleotide excision repair pathway, *Biochimie* 85 (2003) 1083–1099.
- [4] P.C. Hanawalt, Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation, *Oncogene* 21 (2002) 8949–8956.
- [5] S. Tornaletti, G. Pfeifer, UV damage and repair mechanisms in mammalian cells, *Bioessays* 18 (1996) 221–228.
- [6] L. Riou, L. Zeng, O. Chevallier-Lagente, A. Sary, O. Nikaido, A. Taïeb, G. Weeda, M. Mezzina, A. Sarasin, The relative expression of mutated XPB genes results in xeroderma pigmentosum/Cockayne's syndrome or trichothiodystrophy cellular phenotypes, *Hum. Mol. Genet.* 8 (1999) 1125–1133.

- [7] J.E. Sale, A.R. Lehmann, R. Woodgate, Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (2012) 141–152.
- [8] A.R. Lehmann, R.P. Fuchs, Gaps and forks in DNA replication: rediscovering old models, *DNA Repair (Amst)* 5 (2006) 1495–1498.
- [9] C.E. Edmunds, L.J. Simpson, J.E. Sale, PCNA ubiquitination and REV1 define temporally distinct mechanisms for controlling translesion synthesis in the avian cell line DT40, *Mol. Cell* 30 (2008) 519–529.
- [10] J.G. Jansen, M.I. Foustier, N. de Wind, Send in the clamps: control of DNA translesion synthesis in eukaryotes, *Mol. Cell* 28 (2007) 522–529.
- [11] A.R. Lehmann, S. Kirk-Bell, C.F. Arlett, M.C. Paterson, P.H. Lohman, E.A. de Weerd-Kastelein, D. Bootsma, Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 72 (1975) 219–223.
- [12] M. Lopes, M. Foiani, J.M. Sogo, Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV lesions, *Mol. Cell* 21 (2006) 15–27.
- [13] R. Meneghini, Gaps in DNA synthesized by ultraviolet light-irradiated WI38 human cells, *Biochim. Biophys. Acta* 425 (1976) 419–427.
- [14] Y. Daigaku, A.A. Davies, H.D. Ulrich, Ubiquitin-dependent DNA damage bypass is separable from genome replication, *Nature* 465 (2010), 951–U913.
- [15] N. Diamant, A. Hendel, I. Vered, T. Carell, T. Reissner, N. de Wind, N. Geaciov, Z. Livneh, DNA damage bypass operates in the S and G2 phases of the cell cycle and exhibits differential mutagenicity, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 170–180.
- [16] G.I. Karras, S. Jentsch, The RAD6 DNA damage tolerance pathway operates uncoupled from the replication fork and is functional beyond S phase, *Cell* 141 (2010) 255–267.
- [17] A.J. Callegari, E. Clark, A. Pneuman, T.J. Kelly, Postreplication gaps at UV lesions are signals for checkpoint activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 107 (2010) 8219–8224.
- [18] J.G. Jansen, A. Tsaalbi-Shtylik, G. Hendriks, H. Gali, A. Hendel, F. Johansson, K. Erixon, Z. Livneh, L.H. Mullenders, L. Haracska, N. de Wind, Separate domains of Rev1 mediate two modes of DNA damage bypass in mammalian cells, *Mol. Cell Biol.* 29 (2009) 3113–3123.
- [19] M. Wigan, A. Pinder, N. Giles, S. Pavey, A. Burgess, S. Wong, R.A. Sturm, B. Gabrielli, A UVR-induced G2-phase checkpoint response to ssDNA gaps produced by replication fork bypass of unrepaired lesions is defective in melanoma, *J. Invest. Dermatol.* 132 (2012) 1681–1688.
- [20] S.S. Lange, K. Takata, R.D. Wood, DNA polymerases and cancer, *Nat. Rev. Cancer* 11 (2011) 96–110.
- [21] C. Masutani, R. Kusumoto, S. Iwai, F. Hanaoka, Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase η , *EMBO J.* 19 (2000) 3100–3109.
- [22] A.M. Cordonnier, R.P. Fuchs, Replication of damaged DNA: molecular defect in xeroderma pigmentosum variant cells, *Mutat. Res.* 435 (1999) 111–119.
- [23] E. Despras, F. Daboussi, O. Hyrien, K. Marheineke, P.L. Kannouche, ATR/Chk1 pathway is essential for resumption of DNA synthesis and cell survival in UV-irradiated XP variant cells, *Hum. Mol. Genet.* 19 (2010) 1690–1701.
- [24] P. Temviriyankul, S. van Hees-Stuivenberg, F. Delbos, H. Jacobs, N. de Wind, J.G. Jansen, Temporally distinct translesion synthesis pathways for ultraviolet light-induced photoproducts in the mammalian genome, *DNA Repair (Amst)* 11 (2012) 550–558.
- [25] I. Elvers, F. Johansson, P. Groth, K. Erixon, T. Helleday, UV stalled replication forks restart by re-priming in human fibroblasts, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 7049–7057.
- [26] J.H. Yoon, L. Prakash, S. Prakash, Error-free replicative bypass of (6–4) photoproducts by DNA polymerase ζ in mouse and human cells, *Genes Dev.* 24 (2010) 123–128.
- [27] A. Bresson, R.P. Fuchs, Lesion bypass in yeast cells: Pol η participates in a multi-DNA polymerase process, *EMBO J.* 21 (2002) 3881–3887.
- [28] D. Huang, B.D. Piening, A.G. Paulovich, The preference for error-free or error-prone postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to low-dose methyl methanesulfonate is cell cycle dependent, *Mol. Cell Biol.* 33 (2013) 1515–1527.
- [29] D.S. Biard, Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 3535–3550.
- [30] L. Rey, J.M. Sidorova, N. Puget, F. Boudsocq, D.S. Biard, R.J. Monnat, C. Cazaux, J.S. Hoffmann, Human DNA polymerase η is required for common fragile site stability during unperturbed DNA replication, *Mol. Cell Biol.* 29 (2009) 3344–3354.
- [31] R. Bétous, L. Rey, G. Wang, M.J. Pillaire, N. Puget, J. Selves, D.S. Biard, K. Shin-ya, K.M. Vasquez, C. Cazaux, J.S. Hoffmann, Role of TLS DNA polymerases η and κ in processing naturally occurring structured DNA in human cells, *Mol. Carcinog.* 48 (2009) 369–378.
- [32] S. Koundrioukoff, S. Carignon, H. Técher, A. Letessier, O. Brison, M. Debatisse, Stepwise activation of the ATR signaling pathway upon increasing replication stress impacts fragile site integrity, *PLoS Genet.* 9 (2013) e1003643.
- [33] M.C. Moraes, A.Q. de Andrade, H. Carvalho, T. Guecheva, M.H. Agnoletto, J.A. Henriques, A. Sarasin, A. Sary, J. Saffi, C.F. Menck, Both XPA and DNA polymerase η are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions, *Cancer Lett.* 314 (2012) 108–118.
- [34] J. Saffi, M.H. Agnoletto, T.N. Guecheva, L.F. Batista, H. Carvalho, J.A. Henriques, A. Sary, C.F. Menck, A. Sarasin, Effect of the anti-neoplastic drug doxorubicin on XPD-mutated DNA repair-deficient human cells, *DNA Repair (Amst)* 9 (2010) 40–47.
- [35] J. Speroni, M.B. Federico, S.F. Mansilla, G. Soria, V. Gottifredi, Kinase-independent function of checkpoint kinase 1 (Chk1) in the replication of damaged DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 109 (2012) 7344–7349.
- [36] D. Biard, E. Despras, A. Sarasin, J. Angulo, Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimic human syndromes: application to NER gene silencing, *Mol. Cancer Res.* 3 (2005) 519–529.
- [37] C.F. Arlett, S.A. Harcourt, B.C. Broughton, The influence of caffeine on cell survival in excision-proficient and excision-deficient xeroderma pigmentosum and normal human cell strains following ultraviolet-light irradiation, *Mutat. Res.* 33 (1975) 341–346.
- [38] E. Rogakou, D. Pilch, A. Orr, V. Ivanova, W. Bonner, DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 5858–5868.
- [39] M.G. Vrouwe, A. Pines, R.M. Overmeer, K. Hanada, L.H. Mullenders, UV-induced photolesions elicit ATR-kinase-dependent signaling in non-cycling cells through nucleotide excision repair-dependent and -independent pathways, *J. Cell Sci.* 124 (2011) 435–446.
- [40] I. Ward, J. Chen, Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 47759–47762.
- [41] C. Limoli, E. Giedzinski, W. Bonner, J. Cleaver, UV-induced replication arrest in the xeroderma pigmentosum variant leads to DNA double-strand breaks, gamma-H2AX formation, and Mre11 relocalization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99 (2002) 233–238.
- [42] T. Marti, E. Hefner, L. Feeney, V. Natale, J. Cleaver, H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103 (2006) 9891–9896.
- [43] J.E. Cleaver, L. Feeney, I. Revet, Phosphorylated H2AX is not an unambiguous marker for DNA double-strand breaks, *Cell Cycle* 10 (2011) 3223–3224.
- [44] C. Godon, S. Mourgues, J. Nonnekens, A. Mourcet, F. Coin, W. Vermeulen, P.O. Mari, G. Giglia-Mari, Generation of DNA single-strand displacement by compromised nucleotide excision repair, *EMBO J.* 31 (2012) 3550–3563.
- [45] Y. Yang, M. Durando, S.L. Smith-Roe, C. Sproul, A.M. Greenwalt, W. Kaufmann, S. Oh, E.A. Hendrickson, C. Vaziri, Cell cycle stage-specific roles of Rad18 in tolerance and repair of oxidative DNA damage, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 2296–2312.
- [46] N. Bendris, B. Lemmers, J.M. Blanchard, N. Arsic, Cyclin A2 mutagenesis analysis: a new insight into CDK activation and cellular localization requirements, *PLoS One* 6 (2011) e22879.
- [47] S. de Feraudy, I. Revet, V. Bezrookove, L. Feeney, J.E. Cleaver, A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of gammaH2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 107 (2010) 6870–6875.
- [48] D.J. Chang, P.J. Lupardus, K.A. Cimprich, Monoubiquitination of proliferating cell nuclear antigen induced by stalled replication requires uncoupling of DNA polymerase and mini-chromosome maintenance helicase activities, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 32081–32088.
- [49] J. Wang, Z. Gong, J. Chen, MDC1 collaborates with TopBP1 in DNA replication checkpoint control, *J. Cell Biol.* 193 (2011) 267–273.
- [50] S. Yan, W.M. Michael, TopBP1 and DNA polymerase α -mediated recruitment of the 9-1-1 complex to stalled replication forks: implications for a replication restart-based mechanism for ATR checkpoint activation, *Cell Cycle* 8 (2009) 2877–2884.
- [51] M. Matsumoto, K. Yaginuma, A. Igarashi, M. Imura, M. Hasegawa, K. Iwabuchi, T. Date, T. Mori, K. Ishizaki, K. Yamashita, M. Inobe, T. Matsunaga, Perturbed gap-filling synthesis in nucleotide excision repair causes histone H2AX phosphorylation in human quiescent cells, *J. Cell Sci.* 120 (2007) 1104–1112.
- [52] I. Elvers, A. Hagenkott, F. Johansson, T. Djureinovic, A. Lagerqvist, N. Schultz, I. Stoimenov, K. Erixon, T. Helleday, CHK1 activity is required for continuous replication fork elongation but not stabilization of post-replicative gaps after UV irradiation, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 8440–8448.
- [53] T.P. Heffernan, M. Kawasumi, A. Blasina, K. Anderes, A.H. Conney, P. Nghiem, ATR-Chk1 pathway inhibition promotes apoptosis after UV treatment in primary human keratinocytes: potential basis for the UV protective effects of caffeine, *J. Invest. Dermatol.* 129 (2009) 1805–1815.
- [54] H. Halicka, X. Huang, F. Traganos, M. King, W. Dai, Z. Darzynkiewicz, Histone H2AX phosphorylation after cell irradiation with UV-B: relationship to cell cycle phase and induction of apoptosis, *Cell Cycle* 4 (2005) 339–345.
- [55] J.E. Cleaver, γ H2AX: biomarker of damage or functional participant in DNA repair “all that glitters is not gold!”, *Photochem. Photobiol.* 87 (2011) 1230–1239.

ORIGINAL ARTICLE

Three-dimensional microenvironment confers enhanced sensitivity to doxorubicin by reducing p53-dependent induction of autophagy

LR Gomes, AT Vessoni and CFM Menck

Preclinical studies of anticancer drugs are typically performed using cancer cell lines maintained in two-dimensional (2D) cultures, ignoring the influences of the extracellular matrix (ECM) and three-dimensional (3D) microenvironment. In this study, we evaluated the microenvironmental control of human breast cancer cells responses to doxorubicin (DOXO) using the 3D laminin-rich ECM (3D IrECM) cell culture model. Under 3D culture conditions, MCF-7 cells displayed drastic morphological alterations, a decrease in proliferation and elevated sensitivity to DOXO. Interestingly, the chemotherapy-mediated activation of autophagy was compromised in the 3D matrix, suggesting an association between the increased cytotoxicity of DOXO and hindered autophagy induction. Indeed, while chloroquine or ATG5 knockdown potentiated DOXO-induced cell death under the 2D culture conditions, the autophagy inducer rapamycin improved the resistance of 3D-cultured cells to this drug. Moreover, in the monolayer-cultured cells, DOXO treatment led to increases in p53 and DRAM-1 expression, which is a p53-dependent activator of autophagy that functions in response to DNA damage. Conversely, p53 and DRAM-1 expression was impaired in 3D-cultured cells. The knockdown of p53 by shRNA blocked DRAM-1 activation, impaired autophagy induction and sensitized only those cells maintained under 2D conditions to DOXO. In addition, 2D-cultured MDA-MB-231 cells (a p53-mutated breast cancer cell line) not only showed increased sensitivity to DOXO compared with MCF-7 cells but also failed to induce DRAM-1 expression or autophagy. Similar to p53 silencing, DRAM-1 knockdown potentiated DOXO cytotoxicity only in 2D-cultured cells. These results suggest that the 3D tissue microenvironment controls tumor cell sensitivity to DOXO treatment by preventing p53-DRAM-autophagy axis activation.

Oncogene advance online publication, 26 January 2015; doi:10.1038/onc.2014.461

INTRODUCTION

Breast cancer is the second highest cancer-related cause of death in women.¹ The anthracycline doxorubicin (DOXO) remains one among the most effective drugs available for the treatment of this disease.² Its major cytotoxic effect relies on the induction of DNA damage, which is mediated by at least three distinct mechanisms, including interaction with topoisomerase II, intercalation into DNA and free radical formation. Despite the recent reduction in breast cancer mortality rates, the development of resistance to chemotherapy remains a crucial barrier to the development of an effective cure.³

Several mechanisms have been previously reported to be involved in cancer-related multiple drug resistance, including macroautophagy (hereafter, referred to as autophagy). This process promotes the recycling of damaged or obsolete proteins and organelles,^{4,5} preventing the accumulation of dysfunctional mitochondria and toxic protein aggregates and also generating metabolic precursors for ATP synthesis.⁶ The autophagy pathway can be activated by starvation,⁷ oxidative stress⁸ and DNA damage-inducing agents,⁹ such as DOXO.¹⁰ Because autophagy is a protective response that allows cells to cope with stressful situations, it is well known that cancer cells may exploit this process as a survival mechanism against radio- and chemotherapy.^{11,12} However, autophagy can also act in concert with cell death in response to genotoxic stress and during

embryonic development, revealing the complexity and context dependence of this pathway.^{9,13}

Although numerous studies have attempted to elucidate the mechanisms of tumor progression, the development of tumor chemotherapy resistance remains poorly understood. Most of these studies have been performed on isolated tumor cells cultured as flat monolayers on plastic substrata. However, these cells were originally part of an integrated three-dimensional (3D) unit surrounded by a complex microenvironment, which collectively determined organ specificity.^{14,15} Despite the relevant findings of studies performed using two-dimensional (2D)-cultured cells, tissue architecture and cell-extracellular matrix (ECM) interactions cannot be recapitulated with this cellular model.

In the present study, we aimed to elucidate the influence of microenvironment on the response of human breast cancer cells to DOXO using a 3D laminin-rich ECM (3D IrECM) cell culture model.¹⁶ Autophagy blockage functioned in synergy with DOXO to decrease cell survival, although this only occurred in monolayer-cultured cells. In contrast, rapamycin, which activates autophagy by inhibiting the mammalian target of rapamycin, increased the resistance of 3D-cultured cells to DOXO-induced cytotoxicity. Moreover, the p53-dependent transcription of damage-regulated autophagy modulator 1 (DRAM-1), which is a lysosomal protein that regulates autophagy in response to DNA damage,^{9,17} occurred in 2D-cultured but not in 3D-cultured cells,

and it played a crucial role in this context-dependent mechanism of DOXO resistance mediated by autophagy. Thus, we have demonstrated that the microenvironment drives chemotherapy-stimulated cell death by controlling autophagy levels in response to DOXO treatment.

RESULTS

3D microenvironment increases cell sensitivity to low doses of DOXO

The phenotypic differences in MCF-7 cells cultured on plastic (2D) and on top of a commercial basement membrane (3D) were analyzed. When maintained in the 3D context, these cells formed multicellular spheroidal structures, whereas MCF-7 cells cultured on the 2D plastic substrata grew as flat monolayers (Figure 1a). The 3D IrECM culture conditions led to a significant decrease ($P < 0.01$) in cellular proliferation compared with the 2D-cultured cells (Figure 1b), increasing the MCF-7 doubling time from 1.3 to 1.8 days.

On the basis of DOXO fluorescence detection by flow cytometry,¹⁸ we observed a decrease in drug uptake in the 3D-grown cells regardless of the dose tested (Figure 1c). DOXO-induced DNA damage was further quantified by γ -H2AX detection using flow cytometry (Figure 1d). The 2D-cultured cells displayed higher levels of DNA damage compared with those grown under 3D culture conditions (after 24 h of treatment). However, γ -H2AX levels decreased with increasing time (at 48 and 72 h after treatment) in the cells cultured as a monolayer in contrast with the 3D-cultured cells, in which DNA damage persisted (Figure 1d). The effect of DOXO on cell cycle progression was also evaluated (Figure 1e). Under both conditions, treatment with 250 nM of DOXO induced G2-M cell cycle arrest, but it was increased in the cells grown as a monolayer (Figure 1e).

Despite the increases in DOXO uptake, γ -H2AX levels and cell cycle arrest, we observed significant ($P < 0.001$) drug resistance in 2D cells treated with 250 and 625 nM DOXO compared with those maintained in the 3D matrix (Figure 1f), similar to previous reports.¹⁹ Indeed, the monolayer-grown MCF-7 cells displayed significant decreases in survival only when subjected to higher doses of DOXO (1250 and 2500 nM), reaching rates lower than, or similar to, those detected for the cells grown on the 3D substrata. However, these higher doses of DOXO were not physiological, as pharmacokinetic studies have indicated that the plasma DOXO concentration is approximately 0.05 μ g/ml (equivalent to 85 nM) at 24 h after drug administration in human patients.^{20,21,22}

DOXO-induced autophagy is compromised in 3D-cultured cells

Autophagy stimulation has been associated with chemotherapy resistance in several cancer cell lines, including MCF-7.²³ We investigated whether the detected differences in DOXO-associated cell survival between the 2D and 3D culture models may be correlated with differential levels of drug-induced autophagy activation. LC3-II expression was assessed by western blot assays because the increased level of this protein has been associated with the induction of autophagy.²⁴ Co-treatment with chloroquine, which blocks the final stage of autophagy and causes autophagic vacuole accumulation, was used to measure autophagic flux, as previously described.²⁴ In the 2D context, the MCF-7 cells showed significant ($P < 0.001$) LC3-II accumulation after 72 h of treatment with low (250 nM) or high (1250 nM) doses of DOXO. Addition of 2.5 μ M chloroquine potentiated the accumulation of LC3-II at both dosages (Figure 2a), confirming the DOXO-induced increase in autophagic flux in the 2D-cultured cells. In strong contrast, under 3D conditions, 250 nM DOXO did not alter LC3-II levels, not even in the presence of chloroquine. Moreover, chloroquine alone was able to increase LC3-II levels only under monolayer conditions, indicating differences in basal autophagy

levels between the 2D and 3D culture models (Figure 2a). Similar LC3-II expression profiles were observed after 24 and 48 h of treatment with chloroquine and DOXO and also upon 24 h of co-treatment with bafilomycin, another pharmacological inhibitor of autophagy (Supplementary Figures 1A and 1B). We confirmed these results by fluorescence microscopy using MCF-7 cells stably expressing an EGFP-LC3 construct (Figure 2b). Cell exposure to 250 nM DOXO led to formation of a bright green punctate fluorescence (likely due to the formation of autophagosomes) in the 2D-cultured cells, which was enhanced by co-treatment with 2.5 μ M of chloroquine. In contrast, cells cultured using the 3D IrECM model showed substantially fewer autophagosomes upon treatment (Figure 2b).

A slight increase in LC3-II levels was also observed at 1250 nM DOXO in the 3D-cultured cells, suggesting that autophagy could only be achieved at doses that were much higher than those actually used for breast cancer treatment (Figure 2a).^{20,21,22} Thus, the correlation between higher autophagy induction and increased DOXO resistance in 2D-cultured compared with 3D-cultured cells was not observed at this saturating and non-physiological DOXO dose.

Autophagy inhibition potentiates DOXO cytotoxicity only under 2D culture conditions

Given the reported role of autophagy in tumor survival, its inhibition has been proposed as an attractive therapeutic strategy for the treatment of cancer patients. We sought to evaluate the effects of autophagy blockage on DOXO-induced cytotoxic effects in the 2D and 3D culture models. Although autophagy inhibition by chloroquine co-treatment did not affect DOXO-induced γ -H2AX levels or its removal over time (Supplementary Figure 1C), substantial alterations in cell survival were observed when MCF-7 cells were co-treated with chloroquine (2.5 μ M) and DOXO (250 nM) for 72 h (Figure 3a). Chloroquine significantly increased ($P < 0.001$) the sensitivity of the 2D-cultured MCF-7 cells to DOXO, but not those in 3D culture conditions. Similar results were obtained using 10 μ M chloroquine (data not shown). Moreover, the synergistic effect of bafilomycin (another chemical inhibitor of autophagy) on DOXO-induced cell death was also totally abolished in 3D-cultured cells (Figure 3b).

DOXO-induced cell death and autophagy inhibition were confirmed by fluorescence microscopy (Figure 3c). Corroborating the XTT data (Figure 1f), 250 nM DOXO was not able to induce a significant increase in cell death in the 2D-cultured MCF-7 cells, whereas the same dose resulted in high levels of cell death ($P < 0.01$) in the 3D-cultured MCF-7 cells (Figure 3c). Moreover, co-treatment with chloroquine also significantly increased ($P < 0.01$) cell death in the DOXO-treated cells grown as a monolayer but not in the cells maintained in the 3D matrix (Figure 3c).

On the basis of morphological evidence and the fluorescence staining profile, it was also possible to differentiate between apoptotic and necrotic cells.^{25,26} Only necrosis was observed in the MCF-7 cells exposed to DOXO, independent of the cell culture method used, which was likely due to a genetic deficiency of caspase-3.²⁷ XTT assays demonstrated that no changes in DOXO cytotoxicity were induced by apoptosis blockage, using a pan-caspase inhibitor (Z-VAD-FMK) (Supplementary Figure 2B).

The consequence of ATG5 depletion, which is an important mediator of autophagosome biogenesis,²⁸ was also investigated. By transducing MCF-7 cells with a specific shRNA sequence, ATG5 protein expression was significantly reduced ($P < 0.01$) compared with that in cells expressing scramble shRNA (Figure 3d). The results from the XTT assays showed a significant ($P < 0.05$) decrease in DOXO-associated cell survival in the 2D-cultured shATG5 cells, although no change was detected when these ATG5-deficient cells were exposed to this drug under 3D culture

Figure 1. Growth in 3D culture conditions altered the morphology, proliferation and cellular responses of MCF-7 cells to DOXO treatment. **(a)** Phase-contrast images of MCF-7 cells cultured under 2D and 3D conditions. **(b)** Growth curves of cells maintained in 2D and 3D environments as assessed by XTT assays. **(c)** DOXO uptake quantification by fluorescence detection using flow cytometry in cells exposed to different doses of this drug for 24 h. **(d)** γ -H2AX evaluation by flow cytometry for quantification of DNA damage caused by different durations of exposure to 250 nM DOXO. **(e)** Cell cycle analysis after treatment with 250 nM DOXO for 24 h using double staining with BrdU and PI followed by flow cytometry. **(f)** Cellular survival analysis after 72 h of treatment with different doses of DOXO as assessed by XTT assays. The results are presented as the means $\pm$ s.e. from at least two independent experiments performed in duplicate. ns, not significant; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. **(a)** Scale bar, 20 μ m.

conditions (Figure 3e), similar to what was observed for chloroquine (Figure 3a) and bafilomycin (Figure 3b).

Rapamycin attenuates the DOXO-induced cell death of 3D-cultured cells

The results suggest that 3D-cultured MCF-7 cells are more susceptible to the cytotoxic effects of DOXO because of the impaired induction of autophagy. To confirm this hypothesis, autophagy was induced by rapamycin treatment, increasing LC3-II expression in cells under both culture conditions (Supplementary Figure 3A). Autophagy induction was also observed by

fluorescence microscopy in rapamycin-treated EGFP-LC3-expressing cells (Supplementary Figure 3B).

DOXO-associated cell survival was not altered by co-treatment with 50 nM of rapamycin (Figure 4a) in the 2D culture model, whereas it was able to significantly ($P < 0.05$) reduce the sensitivity of 3D-cultured MCF-7 cells to DOXO (Figure 4a). Similar results were obtained using 200 nM of rapamycin (data not shown). Fluorescence microscopy observation confirmed that rapamycin did not alter the levels of cell death in the DOXO-treated 2D cultured cells. In contrast, co-treatment with rapamycin significantly protected ($P < 0.01$) the 3D IrECM cells from DOXO-induced death (Figure 4b), suggesting that autophagy activation was able to protect the 3D-cultured MCF-7 cells.

Figure 2. 3D culture conditions impair DOXO-induced activation of autophagy. Autophagy levels were measured in MCF-7 cells treated with 2.5 μ M chloroquine (pharmacological inhibitor of autophagy) and DOXO (250 nM or 1250 nM) for 72 h. **(a)** Total protein lysates were used to measure LC3-II expression levels by western blotting. The graph shows densitometric analysis of the LC3-II protein levels normalized to the endogenous control (GAPDH). **(b)** The formation of autophagosomes was assayed in EGFP-LC3 MCF-7 cells under distinct treatment conditions using confocal microscopy. The figures are representative of two independent experiments performed in duplicate. In the graph, the results are presented as the means $\pm$ s.e. from two independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. **(b)** Scale bar, 50 μ m.

Figure 3. Autophagy inhibition did not potentiate DOXO-induced cell death in MCF-7 cells maintained under 3D culture conditions. **(a)** and **(c)** Cells under both culture conditions were exposed to 2.5 μ M chloroquine (pharmacological inhibitor of autophagy) and 250 nM DOXO for 72 h. **(a)** Cellular survival analysis was performed by XTT assay, and **(c)** total cell death was quantified by fluorescence microscopy. **(b)** 2D- and 3D-cultured MCF-7 cells were treated with 10 nM bafilomycin (another pharmacological inhibitor of autophagy) and 250 nM DOXO for 24 h. Differences in cellular survival were assessed at 48 h after medium replacement by XTT assays. **(d)** Analysis of ATG5 protein expression by western blotting in ATG5-deficient MCF-7 cells (shATG5) and scramble control cells (ctrl). The graph shows densitometric analysis of the ATG5 levels normalized to the endogenous control (GAPDH). **(e)** As shown by XTT assays, the cell survival rates of shATG5 and scramble control MCF-7 cells following DOXO exposure were assessed under 2D and 3D culture conditions. The figures are representative of a minimum of two independent experiments. The results are presented as the means $\pm$ s.e. from at least two independent experiments performed in duplicate. ns, not significant; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. **(c)** The red arrows indicate dead cells.

Autophagy induction and DOXO resistance in 2D-cultured cells are p53-dependent
The roles of p53 in DNA damage and response to chemotherapy have been well established.^{29,30,31} Recent reports have also

revealed that this tumor suppressor is an important upstream regulator of autophagy.^{9,32,33} In fact, a clear difference in DOXO-induced p53 levels was detected between the two cell culture models tested (Figure 5a). After 24 h of treatment with 250 nM

Figure 4. Rapamycin protects 3D-cultured MCF-7 cells from DOXO-induced death. MCF-7 cells maintained under 2D and 3D culture conditions were subjected to co-treatment with rapamycin (50 nM) and DOXO (250 nM) for 72 h. **(a)** XTT assays were performed to assess cell survival. **(b)** Cell death was quantified by fluorescence microscopy; the red arrows indicate dead cells. The results are presented as the means $\pm$ s.e. from three independent experiments performed in duplicate. ns, not significant; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

DOXO, p53 protein expression was significantly increased ($P < 0.01$) only in MCF-7 cells under the monolayer culture conditions (Figure 5a). The involvement of p53 in this microenvironment-dependent chemotherapy response was further assessed by the silencing of p53 expression in MCF-7 cells. Induction of this protein by DOXO was significantly ($P < 0.001$) impaired in the shp53 MCF-7 cells (Figure 5b). Depletion of p53 led to increased DOXO-associated lethality (Figure 5c) and blockage of DOXO-induced autophagy (Figure 5d and Figure 5e) in these cells compared with those expressing scramble control shRNA. The cell survival data demonstrated that p53 silencing potentiated ($P < 0.05$) DOXO cytotoxicity in cells grown in the 2D microenvironment but attenuated ($P < 0.05$) the effects of this drug in the 3D model (Figure 5c). Decreased resistance to DOXO paralleled reduced autophagy stimulation only

in the p53-silenced monolayer-cultured cells, suggesting a central role of this protein in autophagy activation and the protection of cells from DOXO toxicity under these culture conditions.

p53-mutated cells fail to induce autophagy and DOXO resistance even under 2D culture conditions

The microenvironment-dependent response to DOXO was further examined in p53-mutated (p53mt) MDA-MB-231 breast cancer cells. The MDA-MB-231 mesenchymal morphology observed in the flat monolayers changed to a stellated architecture in the 3D IrECM model (Figure 6a). The proliferation rate of the 2D- and 3D-cultured p53-mutated cells was very similar, with doubling times of 1.4 and 1.5 days (no significant difference), respectively (Figure 6b). Curiously, there was a 2-day lag period observed

Figure 5. Depletion of p53 reduces autophagy induction and cellular resistance to DOXO as detected in 2D-cultured cells. **(a)** Analysis of p53 protein expression levels in MCF-7 cells treated with 250 nM DOXO for 24 h. **(b)** The p53 protein expression levels in p53-deficient (shp53) and scramble control (ctrl) MCF-7 cells following 24 h of treatment with DOXO. **(c)** Cell survival of DOXO-treated shp53 and control MCF-7 cells cultured under 2D and 3D conditions as assessed by XTT assays. **(d)** LC3-II and **(e)** p62 protein expression in the shp53 and control MCF-7 cells following treatment with 250 nM DOXO and/or 2.5 μ M chloroquine. Protein expression levels were measured by western blotting. The p53 (**a** and **b**) and LC3-II (**d**) protein levels obtained by densitometric analysis were normalized to the endogenous control (GAPDH). The figures are representative of two independent experiments. In the graphs, the results are presented as the means $\pm$ s.e. from two independent experiments performed in duplicate. ns, not significant; * P < 0.05, ** P < 0.01 and *** P < 0.001.

before the 3D IrECM culture began to proliferate, which may have been due to the barrier promoted by the new environment.

Cell survival analyses revealed that p53 status is an important contributor to the microenvironment-mediated effect on DOXO cytotoxicity. Similar to the MCF-7 cell line, ZR-75-1 cells (another p53-wild-type breast cancer cell line) presented with higher DOXO resistance in the monolayer compared with the 3D culture at all chemotherapy doses tested (Supplementary Figure 4). In contrast, MDA-MB-231 cells were significantly (P < 0.001) more sensitive to 250 nM DOXO than MCF-7 cells under the 2D culture conditions (Figure 6c). Similar to the 3D-cultured MCF-7 cells, impaired autophagy induction (Figure 6d) and the failure of chloroquine to enhance DOXO sensitivity (Figure 6e) were also observed in the 2D-cultured p53-mutated cells. It is important to note that this

chloroquine dose did not alter cell viability in contrast with the doses used by Maycotte and colleagues.³⁴

Depletion of DOXO-induced DRAM expression sensitizes only 2D-cultured cells to DOXO

DRAM has been shown to drive autophagy activation in a p53-dependent manner following exposure to DNA-damaging agents, including DOXO.^{9,17} As demonstrated by qRT-PCR, 250 nM DOXO was able to induce a significant increase (P < 0.05) in DRAM-1 mRNA levels in the 2D-cultured MCF-7 cells but not in the 3D-cultured cells (Figure 7a). In addition to exhibiting microenvironment dependence, DOXO-induced DRAM-1 expression was also influenced by p53 status. In both p53mt (MDA-MB-231) (Figure 7b) and p53-silenced (shp53 MCF-7) (Figure 7c) cells, DOXO treatment

Figure 6. p53-mutated cells display decreased autophagy activation and resistance to DOXO. (a) Phase-contrast images of MDA-MB-231 cells (p53-mutated) cultured under 2D and 3D conditions. (b) Growth curves of MDA-MB-231 cells maintained under 2D and 3D conditions as assessed by XTT assays. (c) Survival of p53-wild-type (MCF-7) and p53-mutated (MDA-MB-231) breast cancer cells following exposure to 250 nM DOXO as evaluated by XTT assays. (d) Total protein lysates from MDA-MB-231 cells under distinct culture and treatment conditions were used to measure LC3-II expression levels by western blotting. The graph shows densitometric analysis of the LC3-II protein levels normalized to the endogenous control (GAPDH). (e) Effect of 2.5 μM chloroquine (pharmacological inhibitor of autophagy) on MDA-MB-231 cell survival following exposure to 250 nM DOXO as shown by XTT assays. The results are presented as the means ± s.e. from three independent experiments performed in duplicate. ns, not significant; *** $P < 0.001$. (a) Scale bar, 200 μm.

was unable to induce DRAM-1 mRNA expression. To clarify the role of DRAM-1 in cell survival after DOXO treatment, we generated DRAM-1-silenced (shDRAM-1) MCF-7 cells. The significant ($P < 0.01$) induction in DRAM-1 transcriptional levels detected in the control (scramble) MCF-7 cells (after exposure to 250 nM DOXO for 24 h) was completely abolished in the shDRAM-1 cells (Figure 7d). Downregulation of DRAM-1 mRNA expression significantly ($P < 0.05$) potentiated the cytotoxic effect of DOXO only in the shDRAM-1 cells maintained under the 2D culture conditions, and no effects were observed in the 3D-grown cells (Figure 7e). These results indicate that in addition to chloroquine (Figure 3a), bafilomycin (Figure 3b), ATG5 depletion (Figure 3e) and p53 expression blockage (Figure 5c), DRAM-1 (Figure 7e) silencing decreased cellular resistance to DOXO only in the MCF-7 cells grown under the traditional 2D culture conditions.

DISCUSSION

Autophagy has been implicated in the resistance of cancer cells to a broad spectrum of anticancer drugs.^{23,35} Consequently, pharmacological inhibitors of autophagy in combination with

radio- and chemotherapy have been proposed as promising strategies for the treatment of cancer.³⁶ Nevertheless, a limited number of studies have been performed considering the complexity of the *in vivo* microenvironment. Recent studies by Bristol and colleagues³⁷ have demonstrated that neither pharmacologic nor genetic interference with autophagy are able to increase the radiation sensitivity of the 4T1 syngeneic murine breast tumor model. Thus, the recognized protective effect of autophagy has been suggested to be context-dependent, and the use of 3D cell culture models has emerged as an interesting approach for tissue microenvironment analyses that recreates a more physiological niche *in vitro*^{14,16} compared with the traditional 2D cell culture methodology. As an alternative to animal testing, 3D culture assays are adequate for studying chemotherapy response mechanisms and the associated involvement of autophagy.³⁸

The ECM, which is comprised of macromolecules such as collagen, non-collagenous proteins, elastic fibers and proteoglycans, is an important component of the tissue microenvironment that provides mechanical support for cells and promotes tissue integrity. The ECM also plays a role in signaling by binding to

Figure 7. DOXO induces DRAM-1 expression in p53- and microenvironment-dependent manners, and its depletion increases the DOXO sensitivity of 2D-cultured but not 3D-cultured MCF-7 cells. **(a, b and c)** The relative mRNA expression of DRAM-1 was analyzed by qRT-PCR in **(a)** MCF-7, **(b)** MDA-MB-231, **(c)** p53-deficient (shp53) and control (scramble) (ctrl) MCF-7 cells treated with 250 nM DOXO for 24 h. **(d)** Analysis of DRAM-1 transcriptional levels in DRAM-1-deficient (shDRAM-1) and scramble (ctrl) MCF-7 cells following 24 h of treatment with DOXO using qRT-PCR. **(e)** Cell survival following exposure to DOXO in shDRAM-1 and control MCF-7 cells cultured under 2D and 3D conditions as assessed by XTT assays. The expression of GAPDH mRNA was used as the endogenous control for the qRT-PCR **(a, b, c and d)** assays. The results are presented as the means $\pm$ s.e. of two independent experiments performed in duplicate. ns, not significant; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

adhesion receptors, such as integrins and other cell surface molecules. Furthermore, ECM remodeling controls the release and/or activation of essential growth factors and cytokines. Thus, cellular exposure to ECM elements leads to morphological and biochemical signal modulations that may result in changes in gene expression.^{15,39}

Recently, diverse ECM compounds have been shown to regulate autophagy.^{40,41} The growth of prostate cancer cells on laminin 5-coated surfaces confers protection against apoptosis by autophagy induction.⁴⁰ Moreover, collagen I and collagen IV are able to control HeLa autophagy under both basal and nutrient-deprived conditions.⁴¹ However, each of the studied basal membrane elements modulated autophagy in unique manners. Owing to the organ specificity of different tissue microenvironments, a combination of ECM molecules that is as similar as possible to physiological conditions should be employed for more relevant analyses.

In the present study, we investigated the effects of 3D culture conditions on the response of breast cancer cells to DOXO. To recapitulate the mammary gland extracellular matrix, which contains collagen IV, laminin, ectactin, proteoglycans and other glycoproteins,⁴² we used Matrigel, which is a commercially available reconstituted basement membrane that is essentially composed of these same molecules. In addition to contact with mammary-specific ECM elements, the 3D IrECM model also provides a three-dimensional architecture, which is essential for achieving physiologically similar cell-cell and cell-matrix communications.

We observed that basal autophagy levels were lower in the 3D-cultured compared with the 2D-cultured cells for both cellular lineages tested (MCF-7 and MDA-MB-231). These findings corroborate previous reports regarding autophagy stimulation by ECM deprivation in non-tumorigenic mammary epithelial

cells.^{43–45} Increased autophagy has also been described during mammary lumen development in ECM-detached cells present in the central acinar region.⁴³ However, no difference in autophagy was detected between the matrix-attached and matrix-detached cell populations. Thus, increased autophagy was not observed within the 3D structures obtained by growth on Matrigel, which was likely due to the failure of the breast cancer cells (MCF-7, for instance) to form a lumen in the 3D IrECM model.¹⁵

With regard to the chemotherapy response, we demonstrated that the 3D microenvironment impaired autophagy activation by DOXO and increased the sensitivity of the MCF-7 cells to this drug. Despite the previously reported association between autophagy induction and epirubicin (a DOXO analog) resistance in MCF-7 cells,²³ our results suggest that this relationship is significant only under circumstances in which microenvironment-induced cell changes are absent, such as that which occurs in monolayer-cultured cells. Thus, significant DOXO-induced autophagy was detected exclusively in the cells grown under the 2D conditions. Consequently, autophagy inhibition (by chloroquine and bafilomycin treatment or ATG5 depletion) potentiated DOXO cytotoxicity, which occurred exclusively in the monolayer-cultured cells. Autophagy stimulation (by treatment with rapamycin) conferred significant protection against DOXO cytotoxicity to the 3D-cultured cells, confirming the role of autophagy in preventing chemotherapy-induced cell death. Therefore, these results suggest that the 3D microenvironment affects the manner by which cancer cells exhibit drug sensitivity by regulating autophagy.

The control of autophagy levels and DOXO sensitivity have been shown to be associated with p53-DRAM-1 axis activation. Several studies have demonstrated that these proteins play a central role in autophagy regulation, particularly in response to genotoxic agents.^{46,47} Solely under ECM deprivation and monolayer culture conditions, DOXO was able to induce the increased

expression of the p53 protein and its transcriptional target DRAM-1, leading to elevated cellular resistance by autophagy activation. Although the impact of p53 status on the chemotherapy response has been previously investigated, this topic is very controversial and remains under debate.⁴⁸ Using cell lineages with distinct p53 backgrounds, the present study showed that the large differences in DOXO-induced cell death and autophagy activation observed between the 2D-cultured p53wt and p53mt cancer cells were completely abolished under the 3D culture conditions. These results suggest that the influence of p53 status on the chemotherapy response may be less prominent than those of tissue architecture and cell-ECM interactions.

In summary, the present study suggests that the reduction of p53-DRAM-autophagy signaling pathway increases cell sensitivity to chemotherapeutic treatment with DOXO, following growth in a 3D microenvironment. The high DOXO-induced γ -H2AX levels detected in the 2D-cultured cells were correlated with a high drug uptake rate and cell doubling time. However, an efficient autophagy increase led to DOXO resistance, which likely occurred because of the reestablishment of homeostasis. Although DOXO-induced γ -H2AX levels were reduced in the 3D-cultured cells, these changes were permanent, possibly because of impaired DNA repair, which, together with compromised autophagy, may be responsible for the high mortality rates observed. The silencing of p53 expression impaired DRAM-1 transcription and autophagy activation, resulting in the increased sensitivity of the 2D-cultured MCF7 cells to the DOXO treatment. DRAM-1 silencing also increased DOXO-induced cytotoxicity under similar conditions. Interestingly, no changes in DRAM-1 transcription or autophagy activation were observed in response to DOXO in the p53-mutated MDA-MB-231 cells grown in either the 2D or 3D conditions. Moreover, similar to what was observed following chloroquine or bafilomycin co-treatment and ATG5 knockdown, DRAM-1 silencing had no effect on DOXO-induced cell death in the 3D IrECM model, probably because neither DRAM-1 expression nor autophagy were induced under this culture condition. These observations suggest that p53, DRAM-1 and autophagy belong to the same molecular signaling cascade activated in response to DOXO and that 3D culture conditions impair DRAM-1 transcription and autophagy activation by modulating p53 expression. It would be interesting to assess the manner by which reactive oxygen species may influence the effects observed in 3D cell cultures.

In contrast with the 2D phenotype, the silencing of p53 expression in the 3D-cultured MCF-7 cells decreased DOXO cytotoxicity. Although this finding was unexpected (because ATG5 or DRAM-1 knockdown did not alter the survival of the 3D-cultured cells following DOXO treatment), it suggests that although p53 is expressed at lower levels, this protein may also play a crucial role in the DOXO response in these cells. In agreement with these findings, recent reports have described a dual role for p53 in autophagy regulation.⁴⁹ Differences in p53 subcellular localization may explain these data. Poor p53 nuclear translocation accompanied by high levels of its cytoplasmic (autophagy-suppressive) form⁵⁰ would result in the behavior of the 3D-grown cells observed in this study. In addition to its control by subcellular compartmentalization, other autophagy-independent mechanisms may be responsible for this switch in p53 function from pro-survival to pro-cell death promotion in distinct microenvironmental contexts. With regard to the permanent DOXO-induced DNA damage observed in the 3D-cultured cells, p53 may be more involved in the cell death process. As previously demonstrated, despite the well-documented persistence of DNA damage in p53-deficient cells, loss of p53 can reduce the cell death caused by DNA damage.⁵¹ Therefore, our results indicate that the 3D culture condition may alter not only p53 expression but also the role played by this protein in response to DOXO treatment.

In summary, the present study has confirmed that ECM compounds influence the protective role of autophagy against drug-induced DNA damage. Although monolayer culture conditions are commonly used to assess the potential for chemotherapy treatments to induce cell death, these pre-clinical data are incomplete and simplistic.³⁷ The 3D IrECM cultures may better reflect true physiological conditions, leading to more confident predictions of the therapeutic successes of new drugs.³⁸ Thus, we propose that this model enables the more assertive use of autophagy pathway interference as an anti-cancer strategy.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and reagents

The MCF-7, ZR-75-1 and MDA-MB-231 cells were maintained according to ATCC recommendations. For the 3D IrECM assays, the cells were seeded on top of Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)-coated surfaces in phenol red-free medium supplemented with 2.5% fetal bovine serum (Vitrocell Embriolife, Campinas, Sao Paulo, Brazil) and 5% Matrigel. The 2D assays were also performed in 2.5% fetal bovine serum-supplemented DMEM. DOXO, chloroquine, bafilomycin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and/or rapamycin (LC Laboratories, Woburn, MA, USA) were added only after the cells were maintained for 4 days in culture. This period of time was chosen as the minimal time for the cells to achieve 3D structures. Over longer periods of time, LC3-II levels may vary.⁵² Antibodies against the LC3, p62 and GAPDH proteins were purchased from Sigma-Aldrich, Cell Signaling (Danvers, MA, USA) and Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), respectively. Apoptosis inhibition by Z-VAD-FMK (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) was confirmed in HeLa cells co-treated with 500 nM staurosporine (Sigma-Aldrich) (Supplementary Figure 2A).

Cell proliferation, survival and death assays

Proliferation and cellular survival analyses were performed using a Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. Cell death was determined as previously reported.¹² Negative controls without PI incorporation were employed, and no fluorescence due to the DOXO treatment was detected by fluorescence microscopy (data not shown).

Western blotting

MCF-7 and MDA-MB-231 cells were lysed, and total protein extracts were analyzed as previously described.⁵³

Cell cycle analysis

Flow cytometry to assess BrdU (Sigma-Aldrich) incorporation and PI staining was performed as previously described by Quinet and collaborators.⁵³ Negative controls without PI incorporation were utilized, which showed that DOXO fluorescence did not interfere with PI DNA staining detection (data not shown).

Generation of cells stably expressing GFP-LC3

HEK293T cells were co-transfected with a Mission Lentiviral Packaging Mix (Sigma-Aldrich) and EGFP-LC3 plasmid using Superfect (Qiagen, Valencia, CA, USA). The lentivirus-containing supernatant was collected, filtered and added to the cells in the presence of 8 μ g/ml polybrene (Sigma-Aldrich). The transfected cells were selected using 1.5 μ g/ml puromycin (Sigma-Aldrich). GFP fluorescence was analyzed in the EGFP-tagged LC3 cells using Zeiss LSM-780 NLO confocal microscopy (Carl Zeiss AG, Oberkochen, BW, Germany).

Viral transduction and shRNA experiments

All shRNA vectors and helper plasmids used were a part of Mission shRNA system (Sigma-Aldrich). Viral recombinant particles were generated by co-transfection of the 293FT cell line with these recombinant lentiviral vectors and packaging vectors. Transduced cells were selected by the addition of puromycin.

Quantitative RT-PCR analysis

Total RNA was extracted using a Pure Link RNA Mini Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). After DNase treatment (Promega, Madison, WI, USA), cDNA was synthesized using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies). Quantitative RT-PCR was performed using SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) and a 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies). The sequences of the primers used for the specific amplification of DRAM-1 (forward, ATTCCAGAGGAAGAAGC AGCCCTT; and reverse, ACTTGGCCACACATGGGTTTATGC) have been previously reported.⁵⁴ RNA expression of GAPDH (forward, ACCCACTCTCCACCTTTGA; and reverse, CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT) was used as an endogenous control.⁵⁵ Relative expression levels were calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.⁵⁶

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, USA). The results are presented as the mean $\pm$ s.e. Statistical significance was determined using a two-way analysis of variance and Bonferroni post-test. A $P < 0.05$ was considered statistically significant.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Professor Maria S. Solengas (Department of Dermatology, University of Michigan Comprehensive Cancer Center) for kindly providing the pEGFP-LC3 construct. We are grateful for the excellent technical assistance provided by the Core Facility for Scientific Research-USP (CEFAP-USP) in conducting the confocal fluorescence microscopy assays. This work was supported by FAPESP (Sao Paulo, Brazil), CAPES and CNPq (Brasilia, Brazil).

REFERENCES

- 1 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; **62**: 10–29.
- 2 Khasraw M, Bell R, Dang C. Epirubicin: is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review. *Breast* 2012; **21**: 142–149.
- 3 DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2014; **64**: 52–62.
- 4 Ahn JH, Lee M. Suppression of autophagy sensitizes multidrug resistant cells towards Src tyrosine kinase specific inhibitor PP2. *Cancer Lett* 2011; **310**: 188–197.
- 5 Liang B, Kong D, Liu Y, Liang N, He M, Ma S *et al*. Autophagy inhibition plays the synergetic killing roles with radiation in the multi-drug resistant SKVCR ovarian cancer cells. *Radiat Oncol* 2012; **7**: 213.
- 6 Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; **132**: 27–42.
- 7 Singh R, Cuervo AM. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab* 2011; **13**: 495–504.
- 8 Chen Y, Azad MB, Gibson SB. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ* 2009; **16**: 1040–1052.
- 9 Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR *et al*. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 2006; **126**: 121–134.
- 10 Manov I, Pollak Y, Broneshter R, Iancu TC. Inhibition of doxorubicin-induced autophagy in hepatocellular carcinoma Hep3B cells by sorafenib—the role of extracellular signal-regulated kinase counteraction. *FEBS J* 2011; **278**: 3494–3507.
- 11 Mathew R, White E. Autophagy, stress, and cancer metabolism: what doesn't kill you makes you stronger. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2011; **76**: 389–396.
- 12 Kimmelman AC. The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev* 2011; **25**: 1999–2010.
- 13 Qu X, Zou Z, Sun Q, Luby-Phelps K, Cheng P, Hogan RN *et al*. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* 2007; **128**: 931–946.
- 14 Weaver VM, Bissell MJ. Functional culture models to study mechanisms governing apoptosis in normal and malignant mammary epithelial cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999; **4**: 193–201.

- 15 Kenny PA, Lee GY, Myers CA, Neve RM, Semeiks JR, Spellman PT *et al*. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol* 2007; **1**: 84–96.
- 16 Lee GY, Kenny PA, Lee EH, Bissell MJ. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat Methods* 2007; **4**: 359–365.
- 17 Valbuena A, Castro-Obregon S, Lazo PA. Downregulation of VRK1 by p53 in response to DNA damage is mediated by the autophagic pathway. *PLoS One* 2011; **6**: e17320.
- 18 Mohan P, Rapoport N. Doxorubicin as a molecular nanotheranostic agent: effect of doxorubicin encapsulation in micelles or nanoemulsions on the ultrasound-mediated intracellular delivery and nuclear trafficking. *Mol Pharm* 2010; **7**: 1959–1973.
- 19 Li Q, Chow AB, Mattingly RR. Three-dimensional overlay culture models of human breast cancer reveal a critical sensitivity to mitogen-activated protein kinase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; **332**: 821–828.
- 20 Woodley-Cook J, Shin LY, Swystun L, Caruso S, Beaudin S, Liaw PC. Effects of the chemotherapeutic agent doxorubicin on the protein C anticoagulant pathway. *Mol Cancer Ther* 2006; **5**: 3303–3311.
- 21 Swenson CE, Bolcsak LE, Batist G, Guthrie TH Jr, Tkaczuk KH, Boxenbaum H *et al*. Pharmacokinetics of doxorubicin administered i.v. as Myocet (TLC D-99; liposome-encapsulated doxorubicin citrate) compared with conventional doxorubicin when given in combination with cyclophosphamide in patients with metastatic breast cancer. *Anticancer Drugs* 2003; **14**: 239–246.
- 22 Bramwell VH, Morris D, Ernst DS, Hings I, Blackstein M, Venner PM *et al*. Safety and efficacy of the multidrug-resistance inhibitor biricodar (VX-710) with concurrent doxorubicin in patients with anthracycline-resistant advanced soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res* 2002; **8**: 383–393.
- 23 Sun WL, Chen J, Wang YP, Zheng H. Autophagy protects breast cancer cells from epirubicin-induced apoptosis and facilitates epirubicin-resistance development. *Autophagy* 2011; **7**: 1035–1044.
- 24 Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 2007; **3**: 542–545.
- 25 Cortat B, Garcia CC, Quinet A, Schuch AP, de Lima-Bessa KM, Menck CF. The relative roles of DNA damage induced by UVA irradiation in human cells. *Photochem Photobiol Sci* 2013; **12**: 1483–1495.
- 26 Moraes MC, de Andrade AQ, Carvalho H, Guecheva T, Agnoletto MH, Henriques JA *et al*. Both XPA and DNA polymerase η are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions. *Cancer Lett* 2012; **314**: 108–118.
- 27 Cheng YJ, Lee CH, Lin YP, Huang JY, Su CC, Chang WT *et al*. Caspase-3 enhances lung metastasis and cell migration in a protease-independent mechanism through the ERK pathway. *Int J Cancer* 2008; **123**: 1278–1285.
- 28 Pyo JO, Yoo SM, Ahn HH, Nah J, Hong SH, Kam TI *et al*. Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan. *Nat Commun* 2013; **4**: 2300.
- 29 Batista LF, Roos WP, Christmann M, Menck CF, Kaina B. Differential sensitivity of malignant glioma cells to methylating and chloroethylating anticancer drugs: p53 determines the switch by regulating xpc, ddb2, and DNA double-strand breaks. *Cancer Res* 2007; **67**: 11886–11895.
- 30 Beckta JM, Ahmad SF, Yang H, Valerie K. Revisiting p53 for cancer-specific chemo- and radiotherapy: Ten years after. *Cell Cycle* 2014; **13**: 710–713.
- 31 Bertheau P, Lehmann-Che J, Varna M, Dumay A, Poirot B, Porcher R *et al*. p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *Breast* 2013; **22**: S27–S29.
- 32 Li DD, Sun T, Wu XQ, Chen SP, Deng R, Jiang S *et al*. The inhibition of autophagy sensitizes colon cancer cells with wild-type p53 but not mutant p53 to topotecan treatment. *PLoS One* 2012; **7**: e45058.
- 33 Scherz-Shouval R, Weidberg H, Gonen C, Wilder S, Elazar Z, Oren M. p53-dependent regulation of autophagy protein LC3 supports cancer cell survival under prolonged starvation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 18511–18516.
- 34 Maycotte P, Gearheart CM, Barnard R, Aryal S, Mulcahy Levy JM, Fosmire SP *et al*. STAT3-mediated autophagy dependence identifies subtypes of breast cancer where autophagy inhibition can be efficacious. *Cancer Res* 2014; **74**: 2579–2590.
- 35 Selvakumar M, Amaravadi RK, Vasilevskaya IA, O'Dwyer PJ. Autophagy inhibition sensitizes colon cancer cells to antiangiogenic and cytotoxic therapy. *Clin Cancer Res* 2013; **19**: 2995–3007.
- 36 Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin XM, Weiss WA, Takebe N, Timmer W *et al*. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res* 2011; **17**: 654–666.
- 37 Bristol ML, Emery SM, Maycotte P, Thorburn A, Chakradeo S, Gewirtz DA. Autophagy inhibition for chemosensitization and radiosensitization in cancer: do the preclinical data support this therapeutic strategy? *J Pharmacol Exp Ther* 2013; **344**: 544–552.

- 38 Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 839–845.
- 39 Bissell MJ, Weaver VM, Lelievre SA, Wang F, Petersen OW, Schmeichel KL. Tissue structure, nuclear organization, and gene expression in normal and malignant breast. *Cancer Res* 1999; **59**: 1757–1763s discussion 1763s–1764s.
- 40 Edick MJ, Tesfay L, Lamb LE, Knudsen BS, Miranti CK. Inhibition of integrin-mediated crosstalk with epidermal growth factor receptor/Erk or Src signaling pathways in autophagic prostate epithelial cells induces caspase-independent death. *Mol Biol Cell* 2007; **18**: 2481–2490.
- 41 Tuloup-Minguez V, Greffard A, Codogno P, Botti J. Regulation of autophagy by extracellular matrix glycoproteins in HeLa cells. *Autophagy* 2011; **7**: 27–39.
- 42 Novaro V, Roskelley CD, Bissell MJ. Collagen-IV and laminin-1 regulate estrogen receptor alpha expression and function in mouse mammary epithelial cells. *J Cell Sci* 2003; **116**: 2975–2986.
- 43 Debnath J. Detachment-induced autophagy during anoikis and lumen formation in epithelial acini. *Autophagy* 2008; **4**: 351–353.
- 44 Lock R, Debnath J. Extracellular matrix regulation of autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 2008; **20**: 583–588.
- 45 Fung C, Lock R, Gao S, Salas E, Debnath J. Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Mol Biol Cell* 2008; **19**: 797–806.
- 46 Crighton D, Wilkinson S, Ryan KM. DRAM links autophagy to p53 and programmed cell death. *Autophagy* 2007; **3**: 72–74.
- 47 Velez JM, Miriyala S, Nithipongvanitch R, Noel T, Plabplueng CD, Oberley T *et al*. p53 Regulates oxidative stress-mediated retrograde signaling: a novel mechanism for chemotherapy-induced cardiac injury. *PLoS One* 2011; **6**: e18005.
- 48 Jackson JG, Pant V, Li Q, Chang LL, Quintas-Cardama A, Garza D *et al*. p53-mediated senescence impairs the apoptotic response to chemotherapy and clinical outcome in breast cancer. *Cancer Cell* 2012; **21**: 793–806.
- 49 Tasdemir E, Chiara Maiuri M, Morselli E, Criollo A, D'Amelio M, Djavaheri-Mergny M *et al*. A dual role of p53 in the control of autophagy. *Autophagy* 2008; **4**: 810–814.
- 50 Green DR, Kroemer G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 2009; **458**: 1127–1130.
- 51 Bhana S, Lloyd DR. The role of p53 in DNA damage-mediated cytotoxicity overrides its ability to regulate nucleotide excision repair in human fibroblasts. *Mutagenesis* 2008; **23**: 43–50.
- 52 do Amaral JB, Rezende-Teixeira P, Freitas VM, Machado-Santelli GM. MCF-7 cells as a three-dimensional model for the study of human breast cancer. *Tissue Eng Part C Methods* 2011; **17**: 1097–1107.
- 53 Quinet A, Vessoni AT, Rocha CR, Gottifredi V, Biard D, Sarasin A *et al*. Gap-filling and bypass at the replication fork are both active mechanisms for tolerance of low-dose ultraviolet-induced DNA damage in the human genome. *DNA Repair (Amst)* 2014; **14**: 27–38.
- 54 Ghavami S, Mutawe MM, Sharma P, Yeganeh B, McNeill KD, Klonisch T *et al*. Mevalonate cascade regulation of airway mesenchymal cell autophagy and apoptosis: a dual role for p53. *PLoS One* 2011; **6**: e16523.
- 55 Gomes LR, Terra LF, Wailemann RA, Labriola L, Sogayar MC. TGF-beta1 modulates the homeostasis between MMPs and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast cancer cells. *BMC Cancer* 2012; **12**: 26.
- 56 Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method. *Nat Protoc* 2008; **3**: 1101–1108.

Supplementary Information accompanies this paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)