

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Comissão de Graduação do curso de Ciências Biológicas

Trabalho de conclusão de curso

**Alterações mitocondriais na resposta à quimioterapia
em células de glioma**

Mardja Manssur Bueno e Silva

Orientador: Dr. Guido Lenz
Co-orientador: Dr. Eduardo C. Filippi-Chiela

Novembro de 2014

Mardja Manssur Bueno e Silva

Alterações mitocondriais na resposta à quimioterapia em células de
glioma

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

Orientador: Dr. Guido Lenz

Porto Alegre
Novembro de 2014

“I am among those who think Science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician, he is also a child placed before natural phenomena, which impress him like a fairy tale. We should not allow it to be believed that all scientific progress can be reduced to mechanisms, machines, gearings, even though such machinery has its own beauty”.

- Marie Curie

Agradecimentos

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Aos meus dois orientadores Guido Lenz e Eduardo Chiela pelo encorajamento
constante, apoio e conhecimentos transmitidos

Aos colegas do Laboratório de Sinalização Celular pelos últimos 3 anos de desafios,
companheirismo e amizade

Aos amigos que independentemente de me conhecerem a vida inteira ou não
sempre me apoiaram e me ajudaram nesses anos de graduação

Aos meus amigos da UoFT por terem feito do meu ano de intercâmbio um ano tão
especial

À minha família, em especial ao meu pai Marco (*in memoriam*) por me incentivar a
fazer do meu amor à ciência uma profissão; e à minha mãe Jane pelo exemplo de
mulher e pelo apoio incondicional

Sumário

Resumo.....	5
1. Introdução	6
1.1 Autofagia	6
1.2 Mitocôndrias e Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	7
1.3 Mitofagia.....	10
1.4 Autofagia, mitofagia e câncer	11
2. Objetivos	15
3. Material e métodos	16
3.1 Cultivo celular e tratamentos	16
3.2 Análise de massa mitocondrial - <i>mitotracker</i>	17
3.3 Análise de viabilidade mitocondrial - <i>JC1</i>	17
3.4 Avaliação de senescência celular	18
3.5 <i>Sorting</i> por citometria de fluxo.....	18
3.6 Análise estatística.....	19
4. Resultados	20
5. Discussão	31
6. Perspectivas	36
7. Referências bibliográficas	37

Resumo

Alterações no funcionamento de mitocôndrias e consequente acúmulo de dano oxidativo contribuem para a patogênese de diversas doenças, entre elas o câncer. Cada vez mais tem se atribuído um papel às mitocôndrias e ao metabolismo celular na resposta e resistência de células tumorais a terapias. A autofagia é o processo intracelular responsável pela degradação de organelas e proteínas envelhecidas ou danificadas com o objetivo de manter a qualidade dos componentes celulares e prover substratos energéticos e estruturais em condições adversas. Autofagia exerce um duplo papel na carcinogênese, podendo mediar a sobrevivência ou a morte das células tumorais. Considerando o papel central das mitocôndrias na homeostase celular, avaliamos as alterações mitocondriais em células de glioma em resposta ao tratamento com o quimioterápico Temozolomida (TMZ). O tratamento agudo com TMZ induziu alterações na massa mitocondrial, com o surgimento de uma população celular com aumento da massa mitocondrial e outra população com quantidades reduzidas de mitocôndrias. 3 dias após o tratamento com TMZ foi observada uma redução na proporção de mitocôndrias com potencial de membrana reduzido, mesmo período em que as células apresentam aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio. Essa queda no potencial de membrana mitocondrial é seguida por um aumento, quando ocorre redução dos níveis de ROS. Ao analisarmos células silenciadas para genes importantes no processo autofágico, constatamos que a autofagia parece não mediar os efeitos do tratamento com Temozolomida nas alterações mitocondriais. Com o intuito de entender como as alterações mitocondriais influenciam na resposta à quimioterapia, separamos diferentes populações celulares por *sorting* em citometria de fluxo para avaliar sua capacidade proliferativa, dinâmica mitocondrial e fenótipo. Resultados parciais sugerem que o fenótipo de aumento de massa mitocondrial não se mantém após 7 dias do tratamento com TMZ, sendo seguido de redução da quantidade de mitocondrias na célula.

1. Introdução

1.1 Autofagia

Autofagia é o processo fisiológico de degradação de componentes celulares próprios através da via lisossomal. As etapas no processo autofágico incluem indução, formação de autofagossomos, maturação, degradação e reutilização dos materiais degradados. O processo autofágico é controlado diretamente por proteínas da família *ATG* de genes, e indiretamente modulado por vias de resposta a estresse celular (ativadoras de autofagia) e vias de proliferação celular (inibidoras da autofagia). Entre as proteínas Atg envolvidas no processo, beclina (Atg6) participa na nucleação da membrana e Atg7 catalisa a ligação de Atg12 com Atg15, que formam um complexo com Atg16 que se liga ao autofagossomos. Juntos, Atg7 e o complexo facilitam a ativação de LC3-I (Atg8), levando à conjugação do lípido fosfatidiletanol-amino (PE) à LC3-I, formando LC3-II que se liga ao autofagossomo em formação induzindo seu fechamento (He & Klionsky 2009).

A autofagia é responsável pela degradação de organelas para manutenção da homeostase celular, bem como para geração de substratos energéticos e estruturais. Autofagia é mantida em níveis basais, sendo ativada em situações de estresse, como privação de nutrientes, hipóxia, presença de toxinas, estresse oxidativo e dano ao DNA (Boya et al. 2013, Yang et al. 2010). Neste sentido, esse processo regula o destino da célula após o dano ao DNA e tem um papel importante na manutenção da integridade genômica nuclear e mitocondrial (Vessoni, Filippi-Chiela et al. 2013).

A autofagia possui um duplo papel, podendo ser citoprotetora ou induzindo morte celular. Se autofagia remove mitocôndrias danificadas, que caso não fossem removidas poderiam ativar caspases e o processo apoptótico, então a autofagia atua de maneira protetora, favorecendo a sobrevivência celular. Porém, o excesso e a desregulação da autofagia podem promover morte celular. Em condições fisiológicas, células utilizam a autofagia para degradar componentes

citoplasmáticos danificados e disfuncionais para manter a homeostase celular. Nesse sentido, a degradação de mitocôndrias por autofagia teria um papel fundamental para manter a funcionalidade mitocondrial e a integridade genética. (Kim, Rodriguez-Enriquez & Lemasters, 2007; Gargini, 2011).

Defeitos no processo autofágico são associados com uma vasta gama de doenças, como câncer, doenças autoimunes e doenças neurodegenerativas (Palikaras & Tavernarakis, 2012; Hattori, Saiki & Imai, 2014; Ivatt & Whitworth, 2014).

1.2 Mitocôndrias e Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Mitocôndrias são organelas celulares fundamentais para a respiração celular oxidativa. Essas organelas apresentam duas membranas fosfolipídicas, uma externa e uma interna formada por cristas resultantes do próprio dobramento da membrana interna. Mitocôndrias produzem ATP via fosforilação oxidativa na membrana mitocondrial interna e, portanto, são cruciais para o funcionamento e sobrevivência celular (Hattori, Saiki & Imai, 2014). Além disso, essas organelas possuem a peculiaridade de terem um DNA próprio e de origem materna, o DNA mitocondrial (mtDNA). Mitocôndrias também exercem papel central atuando no processo de morte celular apoptótica e podem rapidamente mudar de uma fonte de energia para uma organela que promove morte celular. Em resposta a mudanças fisiológicas, a síntese de ATP é interrompida e a mitocôndria se transforma em uma fonte de sinais pró-apoptóticos e elevados níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), liberando proteínas exclusivas do ambiente intramitocondrial que participam da ativação de vias de morte celular, entre as quais destaca-se o citocromo C (Kubli & Gustafsson, 2012).

ROS são produtos do metabolismo mitocondrial e podem causar alterações em proteínas, lipídeos e outros componentes celulares, bem como mutações no mtDNA e consequente disfunção destas organelas. ROS também atacam ácidos nucleicos e portanto são genotóxicos. A falta de histonas no mtDNA faz com que

este tenha de 10 a 20x maior índice de mutações quando comparado com o DNA nuclear. Portanto, manter uma população mitocondrial saudável é essencial para as células (Kim, Rodriguez-Enriquez & Lemasters, 2007). Dano às mitocôndrias pode ativar tanto autofagia, em uma tentativa de eliminar organelas danificadas e manter a homeostase celular, bem como morte celular em contextos de elevado dano ou de redução/deficiência de autofagia, e o balanço entre os dois processos determina a sobrevivência celular (Kubli & Gustafsson, 2012).

Dados preliminares do nosso grupo de pesquisa mostram que a indução aguda de dano ao DNA pelo agente alquilante Temozolomida (TMZ - quimioterápico de primeira escolha no tratamento de gliomas de alto grau) em células de glioma induzem um aumento transitório de ROS, como avaliado pela oxidação da sonda fluorescente H2-DCFDA em citometria de fluxo. O tratamento com o antioxidante N-acetilcisteína (NAC) suprime o aumento de ROS induzido por TMZ e, como consequência, há também redução da autofagia induzida por ROS neste modelo (Bueno e Silva et al, em preparação) **(Figura I.A)**.

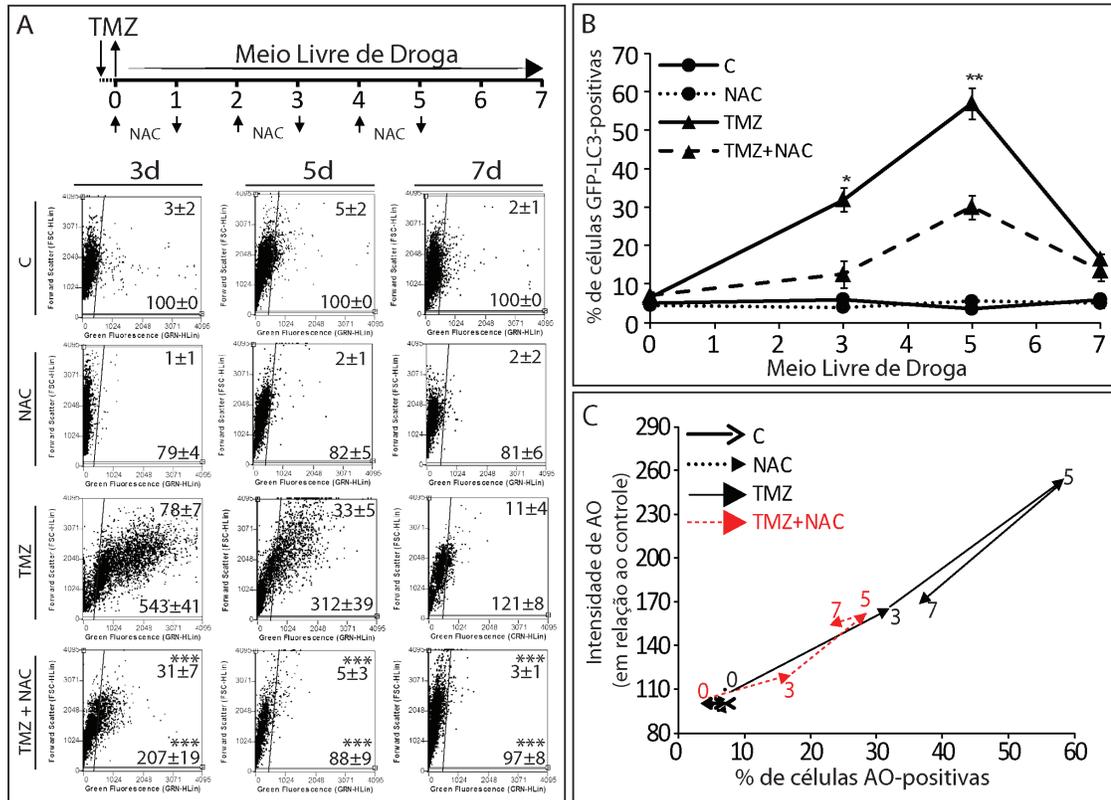


Figura 1A: ROS medeiam parcialmente a autofagia induzida por TMZ em células de glioma. (A - topo) Desenho experimental. Células foram tratadas com TMZ 100µM por 3h, seguido do replaqueamento em meio livre de droga. Células foram tratadas com o antioxidante N-acetilcisteína (NAC) na concentração de 10µM por 24h durante os períodos indicados. (A - plots) Gráficos representativos da citometria de fluxo para DCFH2A. Os níveis de fluorescência verde são proporcionais à quantidade de ROS intracelulares. TMZ induziu aumento de ROS no dia 3, seguido da redução. NAC foi capaz de suprimir consideravelmente os níveis de ROS induzidos por TMZ. Números nos quadrantes: superior = porcentagem de células; inferior = intensidade com relação ao controle. ***p<0.001 em relação à TMZ. (B) Ensaio de agregação de GFP-LC3, utilizado para mensurar a porcentagem de células que apresentam autofagossomos intracelulares. TMZ induziu aumento da porcentagem de células positivamente marcadas para GFP-LC3 até o dia 3, seguido da redução. NAC suprimiu parcialmente a indução de autofagia pela TMZ. *p<0.05 e **p<0.01 em relação à TMZ. (C) Avaliação da quantidade de organelas ácidas vesiculares, entre as quais estão autolisossomos, através da marcação com a sonda fluorescente laranja de acridina (AO), que marca a célula em verde, exceto ambientes ácidos, marcados em vermelho. É mostrada a porcentagem de células positivamente marcadas para AO *versus* intensidade de marcação em relação ao controle. TMZ induziu aumento transitório de AO até o dia 5, seguido de redução; o aumento de AO foi parcialmente suprimido por NAC.

Disfunções mitocondriais e o acúmulo de dano oxidativo também contribuem para a patogênese do câncer (Zhang, 2013), e polimorfismos no mtDNA estão relacionados com a susceptibilidade a câncer de mama e câncer de próstata. Além disso, células cancerígenas tendem a incapacitar a via mitocondrial da apoptose, suprimindo os sinais que podem causar alterações no potencial de membrana mitocondrial (MMP) e a permeabilização da membrana externa, que é reconhecido como um processo crucial no mecanismo de morte celular programada (Galluzzi et al, 2006).

1.3 Mitofagia

Mitofagia é a autofagia específica para a eliminação de mitocôndrias e um processo altamente regulado que requer a função coordenada de proteínas mitocondriais e citosólicas (Youle & Narendra, 2011). A mitofagia é um importante processo celular responsável pela eliminação de mitocôndrias danificadas e ambos os processos são altamente conservados, tendo as proteínas da família Atg como reguladoras (Lu et al. 2013). Como as mitocôndrias são um importante eixo na integração da demanda de energia celular, produção de ROS e sinalização de apoptose, a disfunção mitocondrial com consequente acúmulo de dano oxidativo contribui para a patogênese de doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares e câncer (Hang 2012, Lu et al 2013). Portanto, a remoção de mitocôndrias danificadas através de mitofagia é fundamental para a homeostase e sobrevivência celular. Além disso, mitocôndrias são a principal fonte de geração de ROS e portanto também são seus alvos imediatos. Mitocôndrias disfuncionais que não forem degradadas produzem níveis ainda mais elevados de ROS, o que leva a essa organela ser mais suscetível a liberação de citocromo c e outros fatores indutores de apoptose, o que aumentaria o dano causado por ROS (Twing & Shirihai, 2011).

O processo de mitofagia requer a coordenação de fatores citosólicos e sinais da membrana externa mitocondrial, sendo um processo extremamente específico. Os dois reguladores-chaves da mitofagia são membros da família de genes PARK,

sendo eles PINK1 e Parkin. PINK1 codifica uma proteína de 581 amino ácidos, que contém um domínio transmembrana que ancora a proteína na membrana interna mitocondrial. A estrutura da Parkin é um pouco mais complexa do que a PINK1, com uma domínio responsável pelo recrutamento da mitocôndria para a mitofagia. PINK1 normalmente se localiza na membrana interna mitocondrial, onde imediatamente é clivada pela proteína PARL. Uma vez clivada, é degradada por uma protease. Quando uma mitocôndria é danificada, PINK1 acumula na membrana externa mitocondrial, onde exerce uma atividade de E3 ligase. A ubiquitinação de proteínas da membrana externa, como Mfn1/2, VDAC1 e componentes do complexo TOM asseguram que a mitocôndria seja marcada para degradação. A ubiquitinação de VDAC1 é sugerida como a responsável por acionar o recrutamento e conjugação do autofagossomo, assegurando o encapsulamento da mitocôndria a ser degradada (Osellame & Duchon, 2013).

1.4 Autofagia, mitofagia e câncer

Autofagia é reconhecida como tendo um papel duplo na tumorigênese, de promover a sobrevivência ou a morte de células tumorais dependendo do contexto (**Figura I.B**). Autofagia a níveis basais mantém a homeostase celular e promove a sobrevivência celular por degradar proteínas e organelas danificadas. Neste sentido, atualmente sabe-se que a autofagia induzida por agente citotóxicos em células tumorais atua de maneira citoprotetora em mais de 70% dos casos (Maes et al. 2013). Entre os mecanismos que estão por trás desta citoproteção destacam-se a supressão da morte celular apoptótica e o provimento de substratos energéticos e estruturais para as células tumorais, como demonstrado na Figura I.B. Além disso, recentemente demonstramos que níveis elevados de autofagia permitem que células de glioma expostas à TMZ evitem apoptose e entrem em senescência (Filippi-Chiela et al, 2014 – *in press*). Senescência celular é definida como a parada irreversível na proliferação celular, disparada por redução dos telômeros (senescência 'fisiológica') ou induzida por dano ao DNA, ROS ou dano a outros

componentes celulares como microtúbulos. Este processo é caracterizado por alterações fenotípicas como achatamento celular, aumento do volume e da complexidade intracelular e projeção de prolongamentos celulares (Rodier & Campisi, 2011).

Por outro lado, a autofagia desenfreada eventualmente desencadeia a morte celular quando o equilíbrio do metabolismo celular é perturbado. Similarmente, a mitofagia segue a mesma natureza. Como a mitofagia promove a degradação de mitocôndrias disfuncionais para manter a qualidade mitocondrial celular e controlar o estresse oxidativo, ela conseqüentemente preveniria a carcinogênese. No entanto, a mitofagia também pode proteger as células contra morte por apoptose e necrose e promover a sobrevivência de células tumorais sob algumas condições adversas, como *starvation* e hipóxia (Lu et al. 2013). Além disso, já foi demonstrado que células de câncer de pâncreas resistentes à quimioterapia e que são responsáveis pela reincidência do tumor tem uma expressão proeminente de genes responsáveis pelas funções mitocondriais e autofagia, com essas células apresentando mais mitocôndrias viáveis e uma forte dependência da respiração mitocondrial para a obtenção de energia (Viale et al. 2014).

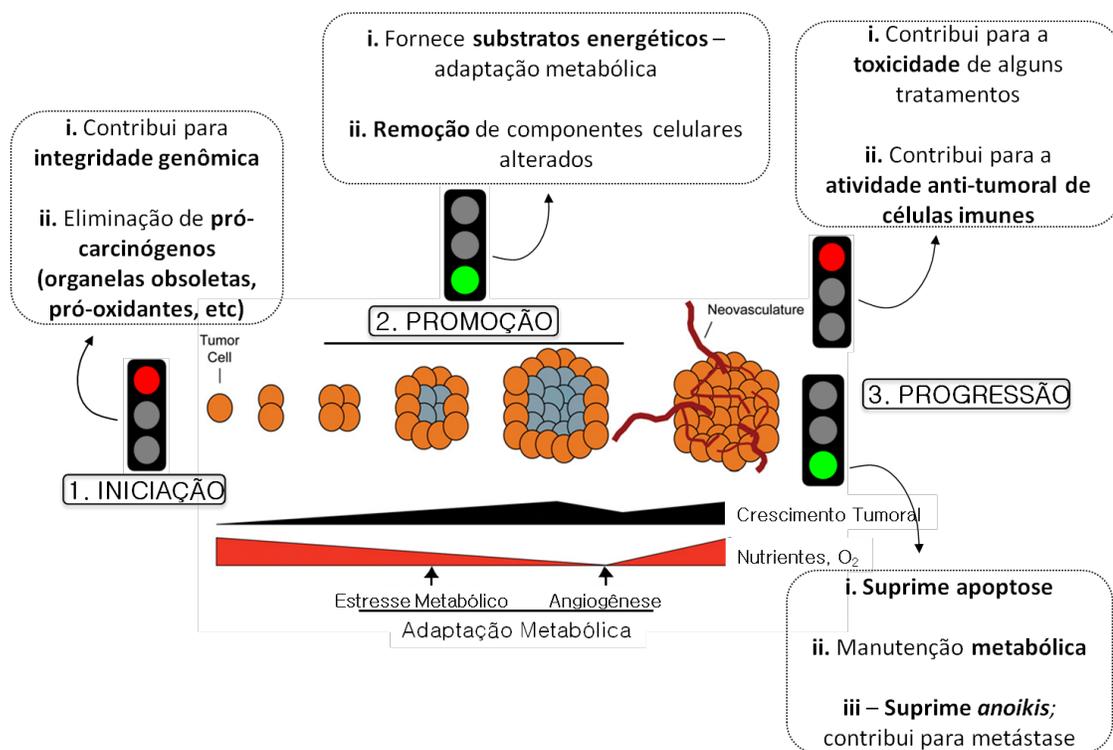


Figura I.B: Retirada da tese de doutorado de Eduardo C. Filippi-Chiela apresentada ao PPGBCM UFRGS em 2014. Esquema representando o papel duplo da autofagia na tumorigênese. O processo autofágico contribui tanto para a manutenção da integridade genômica como na remoção de pró-carcinógenos, evitando assim a iniciação tumoral. No entanto, se mesmo assim houver a iniciação tumoral, a autofagia desempenha um papel na manutenção dessas células, fornecendo substratos para a sobrevivência celular e removendo componentes celulares alterados. Na progressão do tumor, a autofagia pode tanto contribuir para o desenvolvimento tumoral – suprimindo a morte celular apoptótica, mantendo o metabolismo celular – como com a morte das células tumorais – contribuindo com a toxicidade de alguns tratamentos e com a atividade anti-tumoral de células imunes.

Recentemente, demonstramos que a autofagia induzida por TMZ é permissiva à senescência celular induzida por este agente *in vitro*. Baixos níveis de autofagia ou a supressão do mecanismo desviam as células para morte apoptótica (Filippi-Chiela et al, 2014, *in press*). Além disso, como apresentado acima, o tratamento agudo com TMZ induz um aumento transitório de ROS, o qual está envolvido, pelo menos parcialmente, na indução da autofagia pela TMZ (Figura I.A; Bueno e Silva et al, em preparação).

A quimioresistência adquirida é uma das maiores limitação do uso de TMZ, com mais de 90% dos gliomas recorrentes não demonstrando nenhuma resposta ao segundo ciclo de quimioterapia. A quimioresistência adquirida após o tratamento com TMZ pode ser devida a resposta adaptativa da mitocôndria ao estresse genotóxico causado pela TMZ (Oliva et al, 2010), como observado em células de pâncreas resistentes à quimioterapia e responsáveis pela reincidência tumoral (Viale et al. 2014).

Tanto a quimio como a radioterapia causam dano ao DNA, levando à ativação de membros pró apoptóticos da família Bcl2, um processo conhecido como via intrínseca da apoptose, que depende da permeabilização da membrana mitocondrial externa para ocorrer (Galluzzi et al, 2006). As mitocôndrias são responsáveis pelo controle da ativação de mecanismos efetores apoptóticos através da regulação da translocação de proteínas pró-apoptóticas do espaço mitocondrial intermembrana para o citoplasma (Fulda et al, 2010). Além disso, dados preliminares do nosso laboratório sugerem que a indução de senescência por meio do tratamento com TMZ leva a alterações mitocondriais a longo prazo, mas o perfil destas alterações e a causa/consequência destas ainda não são conhecidas (Filippi-Chiela et al, dados não publicados).

Ambos os tratamentos, quimioterapia usando TMZ e radioterapia, podem induzir a resposta autofágica nas células tumorais, a qual pode interferir no desfecho do tratamento. De fato, é sabido que TMZ pode induzir tanto apoptose, quanto catástrofe mitótica e senescência em células de glioma, como descrito pelo nosso grupo (Filippi-Chiela et al, 2013)

Neste sentido, apesar da importância dos conceitos descritos acima, o perfil de alterações mitocondriais que acontecem em células expostas a agentes indutores de dano ao DNA em células tumorais não é conhecido. Da mesma forma, o *crossstalk* entre autofagia, ROS e mitocôndrias, bem como o papel destes mecanismos na senescência e na resistência de células de glioma à TMZ não são conhecidos.

2. Objetivos

2.1 Geral:

Avaliar alterações mitocondriais em resposta a tratamento com TMZ em células de glioma de alto grau.

2.2 Específicos:

- ✓ Avaliar a massa mitocondrial após tratamento com TMZ em células da linhagem de glioma de alto grau U87 selvagens e silenciadas para genes envolvidos na autofagia.
- ✓ Avaliar mudanças no potencial de membrana mitocondrial em células de glioma selvagem tratadas com TMZ.
- ✓ Avaliar a senescência celular após tratamento com TMZ
- ✓ Separar populações celulares com diferentes massas mitocondriais após tratamento com TMZ e avaliar a conservação de fenótipo e o perfil proliferativo destas subpopulações.

3. Material e métodos

3.1 Cultivo celular e tratamentos

Para o presente trabalho foram utilizadas a linhagem selvagem de glioma humano U87 (U87^{wt}) (ATCC) e as linhagens silenciadas com shRNA para os genes de autofagia beclina (U87 Bec^{KD}) e Atg7 (U87 Atg7^{KD}), além da linhagem controle de silenciamento (U87^{PLKO}). As células silenciadas foram gentilmente cedidas pelo aluno de mestrado Marcos Paulo Thomé, e o silenciamento foi confirmado pelo mesmo. As células foram mantidas em cultura em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e mantidas em uma incubadora a 37°C e a 5% de CO₂. Essas linhagens foram utilizadas para avaliar as alterações mitocondriais induzidos pelo quimioterápico Temozolomida. Para tanto, as células foram tratadas por 3h com TMZ (Sigma-Aldrich, #T2577) na concentração de 100µM seguindo replaqueamento de 10.000 células em meio livre de droga. As análises foram realizadas 3, 5 e 7 dias após o replaqueamento. O desenho experimental é descrito esquematicamente abaixo (**Figura I.C**).

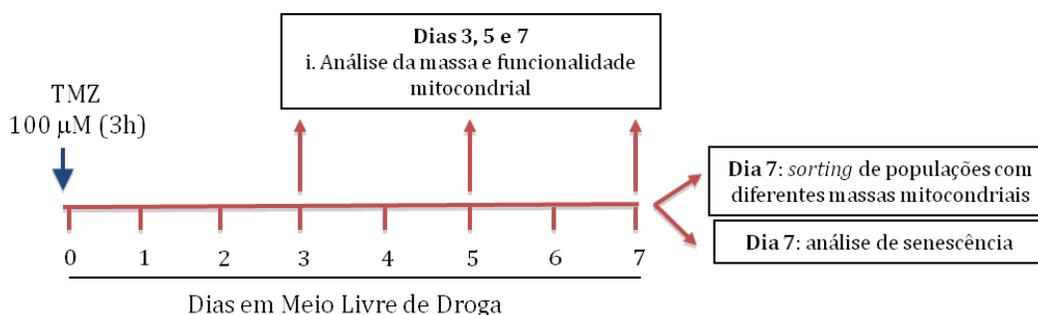


Figura I.C - Desenho do experimento realizado, com tratamento de TMZ 100µM por 3h, seguido do replaqueamento das células em meio livre de droga e experimentos nos dias 3, 5 e 7 após replaqueamento.

3.2 Avaliação da massa mitocondrial através da molécula fluorescente *mitotracker* em células de glioma U87 selvagem como em células silenciadas para Atg7 e Beclina

A sonda fluorescente laranja *mitotracker* (Molecular Probes, #M7514) fica retida no meio intramitocondrial, independentemente da funcionalidade da mitocôndria. Dessa forma, utilizamos citometria de fluxo para avaliar a quantidade total de mitocôndrias em uma determinada população celular. Para tanto, as células foram marcadas com a sonda fluorescente *mitotracker* na concentração de 200nM por 20 minutos a 37°C e 5% de CO₂. A quantidade total de mitocôndrias da população celular foi medida no D3, D5 e D7.

3.3 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial através da marcação com a molécula fluorescente *JC1* na linhagem selvagem

A molécula fluorescente *JC1* (Molecular Probes, #T3168) é usada no estudo do monitoramento da do potencial da membrana mitocondrial (MMP), o qual apresenta-se alterado em mitocôndrias danificadas. Em mitocôndrias despolarizadas, *JC1* se apresenta como um monômero de fluorescência verde, enquanto se acumula no interior de mitocôndrias viáveis/integras em forma de agregados, emitindo fluorescência alaranjada. Consequentemente, a despolarização da mitocôndria é acompanhada por uma diminuição na relação de intensidade das fluorescências vermelho/verde; e essa mudança na fluorescência da molécula pode ser medida através de citometria de fluxo. No presente trabalho foi analisada relação de vermelho e verde da molécula *JC1* em células de glioma tratadas com TMZ, buscando-se avaliar o efeito do tratamento com TMZ na funcionalidade mitocondrial. As células foram marcadas com *JC1* 2µM por 20 minutos a 37°C e 5% de CO₂ e a leitura das fluorescências foi feita usando-se citometria de fluxo. A funcionalidade mitocondrial da população celular foi medida no D3, D5 e D7.

3.4 Avaliação da senescência celular utilizando a molécula fluorescente verde 5-dodecanoylamino fluorescein di-beta-D-galactopyranoside (C12FDG) e o método de Análise Morfométrica Nuclear (NMA).

Senescência celular é o processo de parada irreversível na proliferação, que pode ser induzido em células expostas a estresse. Células senescentes apresentam alterações fenotípicas e metabólicas entre as quais destacam-se o aumento da expressão da enzima beta-galactosidase (beta-gal) e aumento das áreas celular e nuclear em cultura. Para avaliar senescência celular, utilizamos a marcação com o substrato da enzima beta-gal 5-dodecanoylamino fluorescein di-beta-D-galactopyranoside (C12FDG, Life Technologies, #D-2893) o qual emite fluorescência verde quando clivado pela enzima beta-gal. Para tal, células foram incubadas com C12FDG por 2h na concentração de 33 μ M, seguido da leitura da fluorescência em citometria de fluxo. O outro método utilizado para avaliação da senescência celular foi a Análise Morfométrica Nuclear (NMA), método desenvolvido em nosso laboratório (Filippi-Chiela et al. 2012) e que tem como objetivo avaliar o tamanho e a forma de núcleos de células em cultura para inferência de mecanismos como senescência, apoptose e catástrofe mitótica. Para tanto, as células foram fixadas com paraformaldeído 2% seguido de marcação com DAPI e os núcleos das células controles e tratadas foram fotografados. O programa Image Pro Plus foi utilizado para avaliar as medidas de forma e área nucleares.

3.5 Separação das populações celulares com diferentes quantidades de mitocôndrias através de *sorting* em citometria de fluxo

As células com diferentes populações mitocondriais foram separadas por *sorting* em citômetro de fluxo FACS Aria do Departamento de Imunogenética da UFRGS com o auxílio da Dra. Priscila Vianna. Para tanto, as células foram marcadas com *mitotracker* a 200nM no dia 7 e células com diferentes massas mitocondriais

foram separadas e replaqueadas para avaliação de causa e consequência das alterações na massa mitocondrial após tratamentos com TMZ.

3.6 Análise estatística

Foram realizados pelo menos três experimentos independentes para cada análise, exceto o *sorting* das células em citômetro de fluxo, realizado apenas uma vez. Foi realizado teste t ou (ANOVA) seguidos de Tukey utilizando o software SPSS 18.0. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

4. Resultados

4.1 Células U87wt tratadas com TMZ apresentam uma alteração na massa mitocondrial.

Após o tratamento agudo de 3h com TMZ e replaqueamento das células em Meio Livre de Droga (**Fig. 1A**), a massa mitocondrial foi avaliada através da marcação com *mitotracker*. Foram determinadas a porcentagem de células em cada quadrante bem como a intensidade de marcação da população celular (a partir da qual pode-se inferir a massa mitocondrial) através de citometria de fluxo. Foi dada ênfase para os quadrantes superior direito (*upper right* – UR) e inferior esquerdo (*lower left* – LL) em um gráfico de fluorescência vermelha x *foward scatter* (a partir do qual se infere tamanho celular) (**Fig. 1B e 1C**). Estes quadrantes representam populações de células com elevada massa mitocondrial e tamanho grande (UR) e células com baixa massa mitocondrial e pequenas (LL). A porcentagem de células no quadrante UR aumentou continuamente do dia 3 até dia 7, com uma máxima de 35% no dia 7 (**Fig. 1D**). Já a porcentagem de células no quadrante LL se manteve estável até o dia 5 e depois apresentou um aumento até o dia 7, chegando a 13% (**Fig. 1E**).

Outro parâmetro analisado foi o de intensidade de fluorescência vermelha de células tratadas com TMZ em relação ao controle, através do qual observamos um aumento contínuo até atingir um nível de intensidade de fluorescência vermelha aproximadamente 4 vezes maior do que o controle no sétimo dia após replaqueamento em meio livre de droga (**Fig. 1F**).

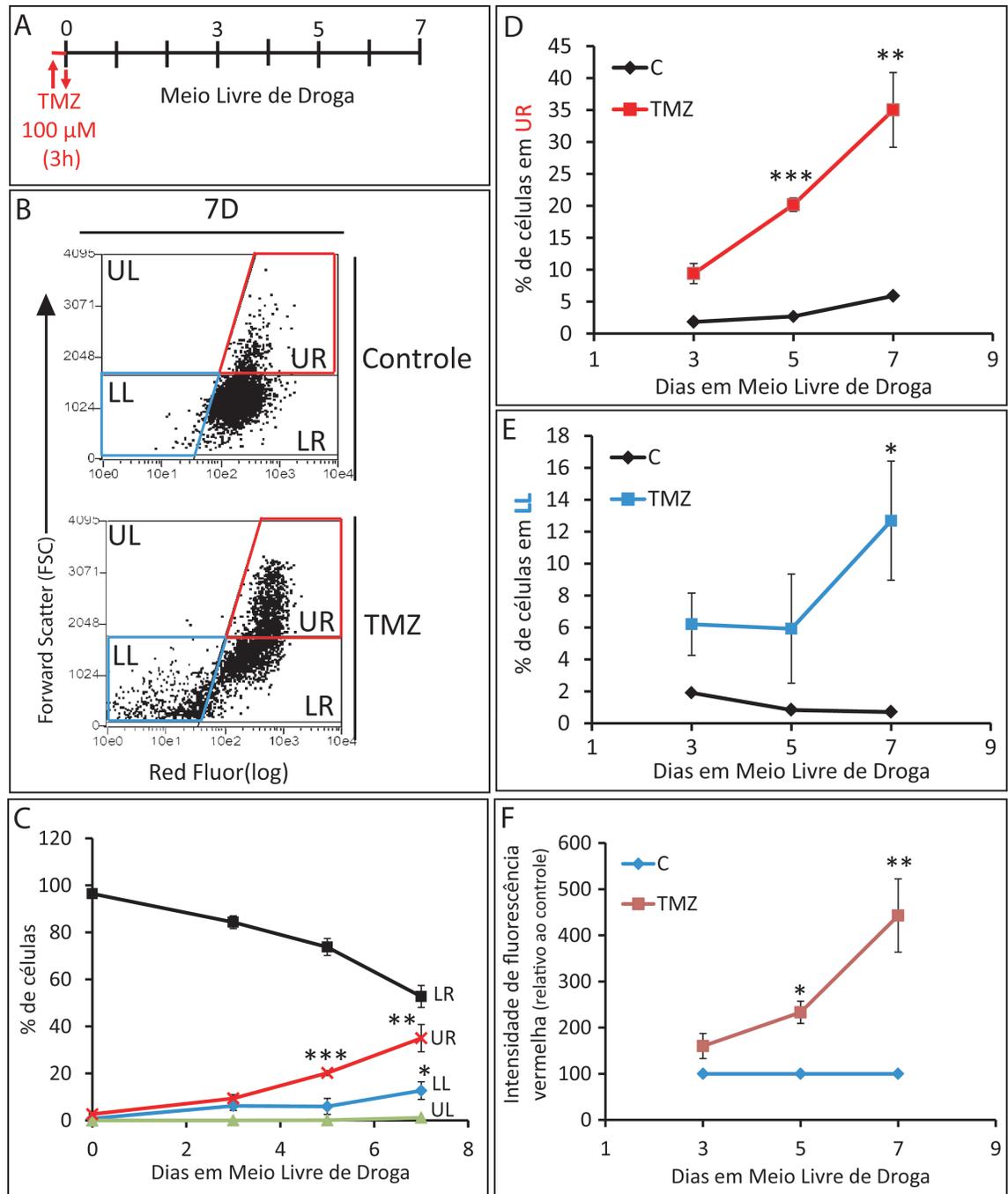


Figura 1: TMZ altera a massa mitocondrial em células tratadas. (A) Desenho representativo do experimento realizado. (B) Plots representativos no D7 das células controle e tratadas com TMZ, com ênfase nos quadrantes *Lower Left* (azul), que representa a população de células pequenas e com baixa massa mitocondrial, e *Upper Right* (vermelho), que representa células grandes e com elevada massa mitocondrial; a análise mostrada é apenas de eventos válidos, selecionados a partir de um gráfico de SSC x FSC. (C) Gráfico com a porcentagem de células em cada quadrante ao longo dos dias em meio livre de droga. (D) Porcentagem de células controle e tratadas com TMZ no quadrante UR

ao longo dos dias. (E) Porcentagem das células controle e tratadas com TMZ no quadrante LL ao longo dos dias. (F) Intensidade de fluorescência vermelha relativa ao controle de células tratadas com TMZ. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

4.2 Células U87wt tratadas com TMZ apresentam uma hiperpolarização da membrana mitocondrial.

Tendo observado um aumento na massa mitocondrial após tratamento com TMZ, o passo seguinte foi inferir a funcionalidade das mitocôndrias através da avaliação do potencial de membrana mitocondrial (MMP) utilizando a sonda fluorescente *JC1*. Para tal, foram avaliadas as intensidades das duas fluorescências emitidas pelo *JC1* (verde e vermelho), bem como a porcentagem de células em cada quadrante em um plot de *green fluor* x *red fluor* obtido a partir da citometria de fluxo (**Fig. 2A**).

Quando avaliamos a porcentagem de células em cada um dos quatro quadrantes observamos que há um aumento na porcentagem de células no quadrante LR em células tratadas, sugerindo aumento da quantidade de mitocôndrias intracelulares à semelhança do dado obtido na análise com *mitotracker*. A partir do terceiro dia foi observado aumento da intensidade de marcação vermelha, levando ao aumento na porcentagem de células no quadrante duplo-positivo (UR) e no quadrante UL (fluorescência vermelha elevada e baixa fluorescência verde) (**Fig. 2A e 2B**).

Com relação à razão entre a intensidade das duas fluorescências (vermelho/verde), a qual indica a razão entre mitocôndrias alto MMP e mitocôndrias com baixo MMP, no dia 3 foi observada uma redução de 30% nesta razão nas células tratadas com TMZ com relação ao controle, sugerindo perda de MMP e dano mitocondrial. A partir do dia 3 foi observado aumento da razão de fluorescências, sugerindo que o tratamento com TMZ acarreta em uma ganho de funcionalidade nas mitocôndrias da população celular (**Fig. 2C**).

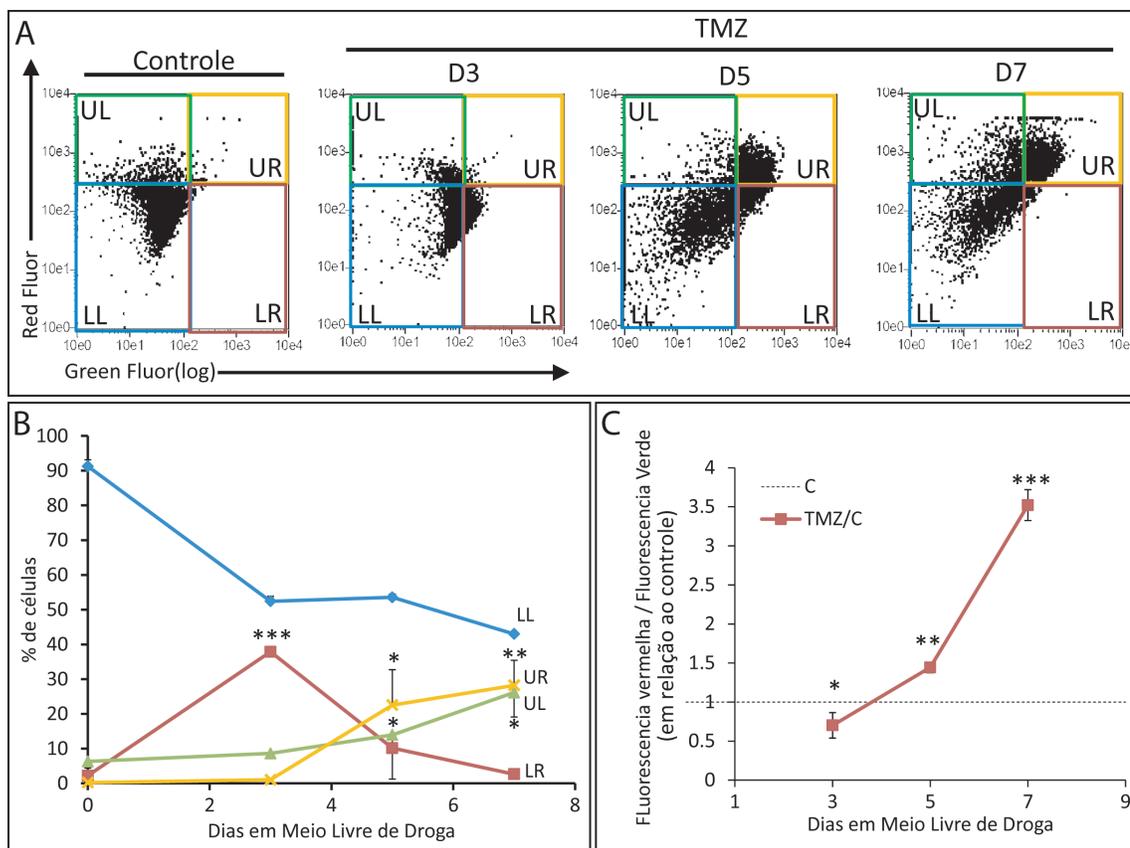


Figura 2: A alteração na massa mitocondrial é acompanhada por um aumento na porcentagem de mitocôndrias com ganho de potencial de membrana mitocondrial (MMP). (A) Plots representativos da intensidade de fluorescência vermelha versus fluorescência verde do controle e dos dias 3, 5 e 7 de células tratadas com TMZ. Divisão entre os quadrantes *Upper Left* (verde), *Upper Right* (amarelo), *Lower Left* (azul) e *Lower Right* (vermelho). (B) Gráfico com a porcentagem de células em cada quadrante ao longo dos dias em meio livre de droga. (C) Razão da fluorescência vermelha pela fluorescência verde em relação ao controle (linha tracejada) de células tratadas com TMZ nos dias indicados. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

4.3 Autofagia não parece estar envolvida na alteração de massa mitocondrial induzida por TMZ em células de glioma.

Dados prévios do nosso grupo mostraram que, utilizando o mesmo protocolo experimental apresentado na Fig. 1A há indução transitória de autofagia por TMZ, com pico no dia 3, seguido de redução (Filippi-Chiela et al, 2014). Além disso, células U87wt tratadas com TMZ também apresentam aumento transitório dos níveis de ROS (Figura 1.A), o que poderia levar à alterações mitocondriais e indução

de mitofagia. Como autofagia é o principal evento celular para eliminação de mitocôndrias, nós testamos o papel da autofagia nas alterações de massa mitocondrial induzidas por TMZ em células e glioma.

As células de glioma silenciadas para os gene beclina (U87 Bec^{KD}) e Atg7 (U87 Atg7^{KD}), fundamentais à autofagia, o controle de silenciamento PLKO (U87^{PLKO}) e a linhagem selvagem de glioma (U87^{wt}) foram avaliadas inicialmente quanto a sua morfologia antes e após o tratamento com TMZ. Observamos que tanto as células U87 Bec^{KD}, U87 Atg7^{KD}, U87^{PLKO} como a linhagem U87^{wt} apresentaram as mesmas características no sétimo dia após o tratamento com TMZ, com uma morfologia característica de células senescentes, apresentando prolongamentos e aumento de tamanho celular (**Fig. 3A**). Esse resultado foi corroborado pelos dados de *forward scatter* (FSC) e *side scatter* (SSC) obtidos na citometria de fluxo, que indicam o tamanho e complexidade celular, respectivamente. Em todas as células foi observado um aumento na média de *forward scatter* após tratamento com TMZ, indicando um aumento no tamanho celular característico de senescência celular (**Fig. 3B**).

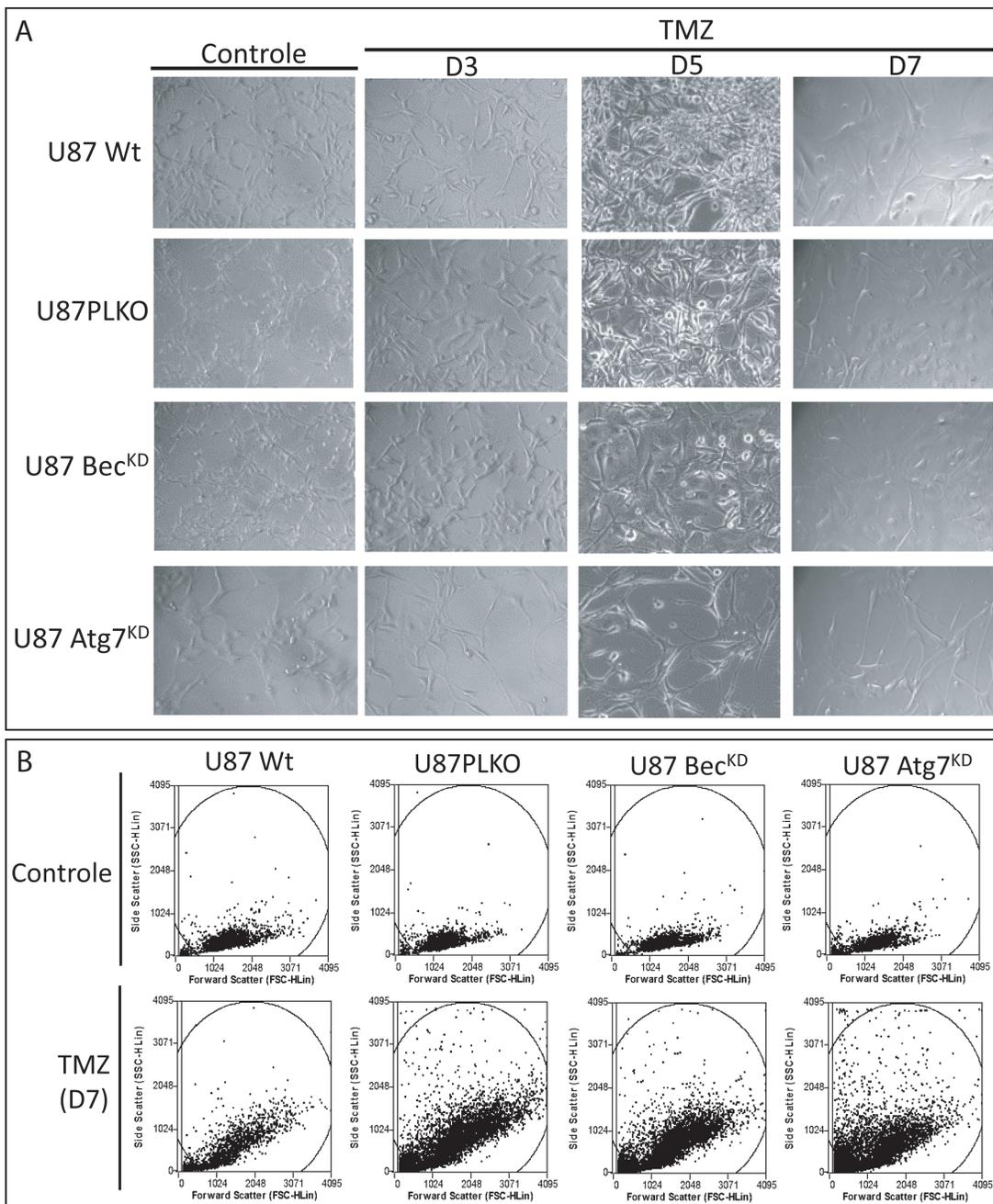


Figura 3: O silenciamento de beclina e Atg 7 não parece influenciar na morfologia celular. (A) Imagens representativas da morfologia celular do controle e de células tratadas com TMZ nos dias 3, 5 e 7; aumento: 200x. (B) Plots representativos de FSC x SSC (ou seja, tamanho x complexidade celular) de células controle e tratadas para TMZ.

Na análise da massa mitocondrial através da sonda *mitotracker* nas células silenciadas observamos que não houve alteração significativa nos níveis basais de massa mitocondrial (**Fig. 4A – esquerda**). Da mesma forma, a resposta à TMZ em

células silenciadas apresenta o mesmo padrão das células controle, com aumento da intensidade da fluorescência vermelha similar às células selvagens no dia 7 (**Fig. 4A - direita; Fig. 4B**). Quando analisamos a cinética de aumento de massa mitocondrial também observamos que não houve diferença entre a célula selvagem e as células silenciadas em resposta à TMZ (**Fig. 4B**). Concluimos, assim, que o silenciamento dos genes autofágicos *beclina* e *Atg7* não influencia nas alterações de massa mitocondrial induzidas por TMZ em células de glioma.

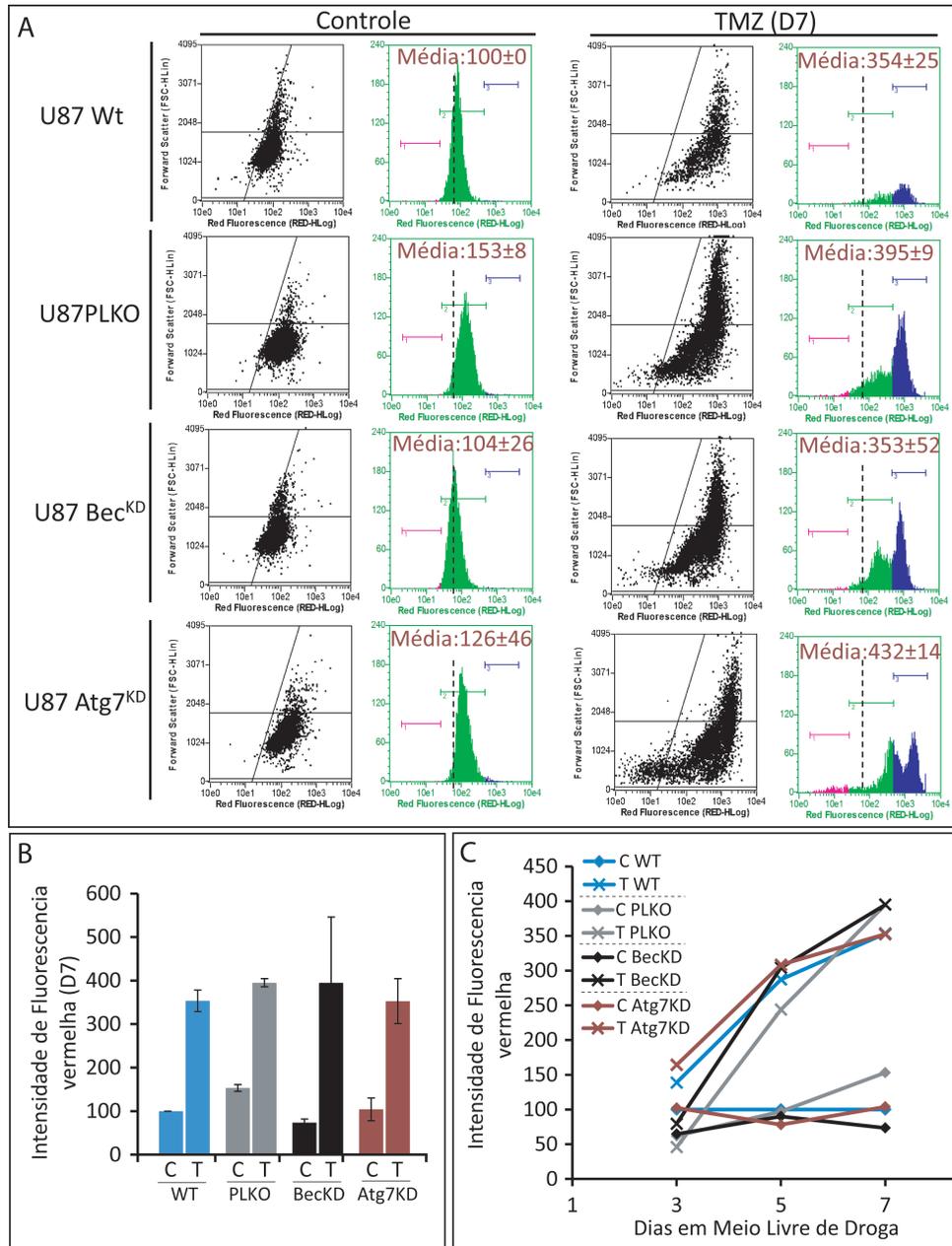


Figura 4: O silenciamento de genes de autofagia nao altera a resposta à TMZ quanto às alterações de massa mitocondrial. Células U87wt, U87 pLKO, U87 Bec^{KD} e U87 Atg7^{KD} foram tratadas com TMZ como indicado na Fig. 1A. (A) Plots representativos do dia 7 de células controle e tratadas com TMZ com os parâmetros forward scatter (tamnho celular) e intensidade de fluorescência vermelha (massa mitocondrial). (B) Gráfico com a intensidade de fluorescência vermelha das células controle e tratadas com TMZ no dia 7. (C) Gráfico da cinética de intensidade de fluorescência vermelha ao longo dos dias de células controle e tratadas com TMZ.

4.5 TMZ induz senescência em células U87wt.

Estudos anteriores do nosso grupo e outros demonstraram que TMZ induz autofagia em células de glioma a longo prazo (Filippi-Chiela et al, 2013; Filippi-Chiela et al, 2014; Hirose et al, 2001). Porém, nestes estudos a indução de senescência foi medida através da marcação *in vitro* com o substrato cromogênico da enzima beta-galactosidase ácida associada à senescência (SA- β -gal) e níveis de expressão de proteínas de senescência. A fim de entender as características das células com diferentes quantidades de mitocôndrias, nós medimos os níveis da enzima SA- β -gal através da incubação com o substrato fluorescente C12-FDG. Através deste método nós observamos um aumento, no dia 7, da porcentagem de células positivamente marcadas para C12-FDG e com elevado FSC (ou seja, células grandes - característica típica de senescência celular) (**Fig. 5A** - gráfico do meio; **Fig. 5B** - gráfico superior). Em histograma este efeito também foi observado, com o surgimento de um pico caracterizando células C12-FDG-positivas (**Fig. 5A** - gráfico da direita; **Fig. 5B** - gráfico de baixo). O tratamento com TMZ fez com que a população tratada aumentasse no quadrante UR de 1% para aproximadamente 25%. Se levarmos em consideração os dois quadrantes com alta intensidade de fluorescência verde (UR e LR), a porcentagem de células sobe para 33%.

Quando fazemos a mesma análise utilizando o NMA, podemos observar que 85% dos núcleos das células tratadas são grandes e regulares, característica de núcleos de células senescentes (**Fig. 5C**). De fato, dados não publicados do nosso laboratório acerca da cinética de alterações fenotípicas presentes em células

senescentes mostram que o aumento da área nuclear, o qual aparece já no dia 3 após o tratamento com TMZ, é a primeira alteração fenotípica de células senescentes e precede o aumento da atividade da enzima beta-galactosidase, a qual aumenta apenas a partir do 5º dia após tratamento com TMZ (Filippi-Chiela et al, em preparação). Dessa forma, é plausível que a porcentagem de células positivamente marcadas para C12-FDG siga aumentando após o dia 7.

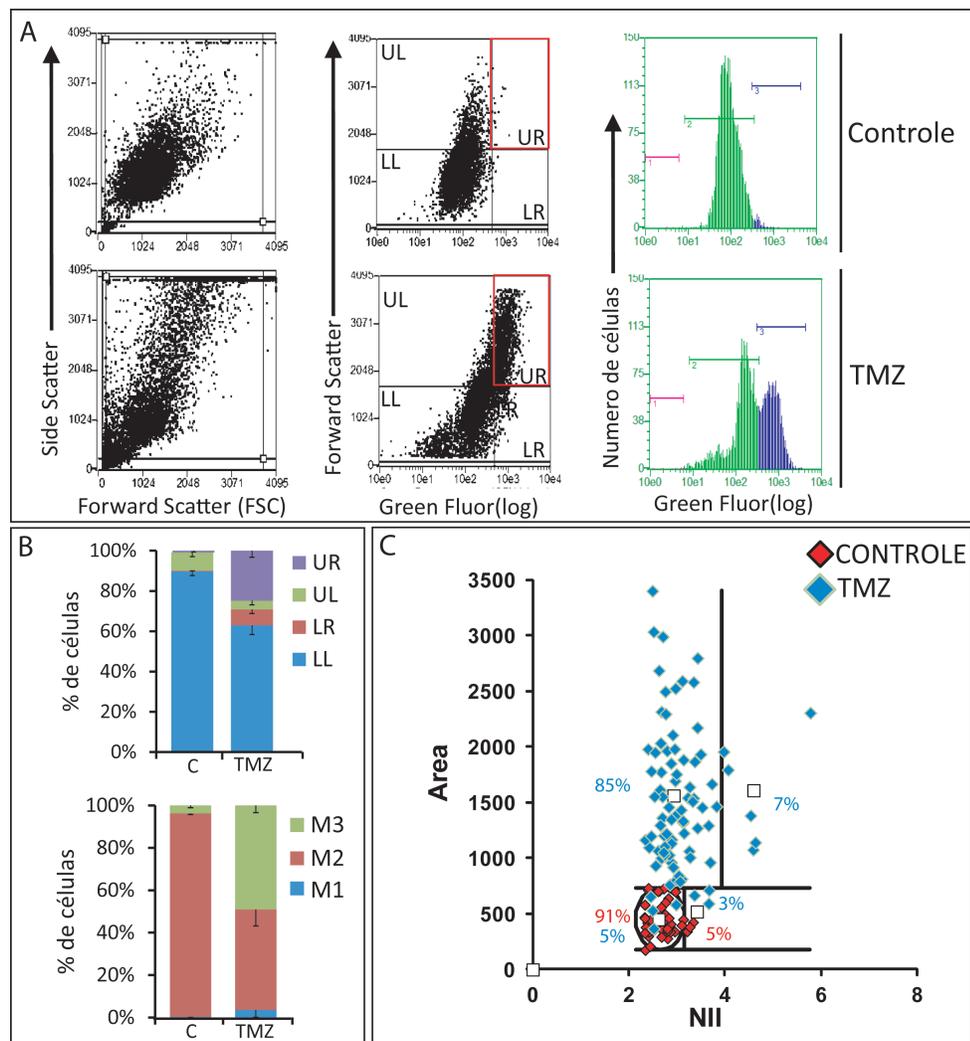


Figura 5: Tratamento com TMZ induz senescência celular. (A) Plots e histograma representativos de células controle e tratadas com TMZ no dia 7. *Esquerda:* gráfico de SSC x FSC. *Meio:* marcação com C12FDG, substrato fluorescente da enzima beta-galactosidase marcadora de células senescentes; divisão entre os quadrantes *Upper Left*, *Upper Right* (vermelho – células grandes e positivamente marcadas), *Lower Left* e *Lower Right*. *Direita:* separação de três populações com base nos níveis de fluorescência baseada na marcação com C12FDG. (B) Gráfico de barras

representando a porcentagem de células controle e tratadas em cada quadrante analisado (com base no gráfico do meio da Fig. 6A) e a porcentagem de células controle e tratadas com TMZ em cada um dos três marcadores no histograma (com base no gráfico da direita da Fig. 6A). (C) Resultado do NMA mostrando a distribuição dos núcleos das células controle (diamantes vermelhos) e das tratadas com TMZ (diamante azul).

4.6 Diferenças nas populações mitocondriais parecem influenciar no fenótipo e na capacidade proliferativa das células tratadas com TMZ.

A partir dos dados obtidos com a sonda *mitotracker*, passamos a questionar o significado biológico das subpopulações celulares com diferentes níveis de massa mitocondrial. Para avaliar o perfil proliferativo e outras características destas subpopulações, células tratadas com TMZ foram separadas por *sorting* em citômetro de fluxo no sétimo dia após o tratamento. A separação foi feita marcando-se as células com *mitotracker* na concentração de 200nM e observando-se o padrão formado por *side scatter* (complexidade celular) *versus* fluorescência vermelha (**Fig. 6B**). Também foram separadas células U87wt não tratadas com TMZ que foram utilizadas como controle (**Fig. 6A**). Em ambos os casos foram separadas 4 subpopulações distintas (P3, P4, P5 e P6) e essas foram replaqueadas para avaliação de causa e consequência das alterações na massa mitocondrial após tratamento.

Tanto para a população controle (**Fig. 6A** - imagens representativas) como para as tratadas com TMZ (**Fig. 6B** - imagens representativas), células das subpopulações P3, P4 e P5 aderiram à placa de cultura após o *sorting* e continuam em cultura no nosso laboratório para avaliação comparativa da proliferação celular de cada uma das populações celulares. Além disso, um experimento piloto já foi realizado para avaliar a distribuição e quantidade de mitocôndrias das populações separadas usando *mitotracker*. Resultados preliminares demonstram que a distribuição mitocondrial parece seguir uma cinética de aumento da massa mitocondrial (P5) seguido da redução de mitocôndrias (P4), uma vez que as células

da subpopulação P5 do tratamento com TMZ apresentou perfil semelhante à P4 (baixa massa mitocondrial) 5 dias após o *sorting*.

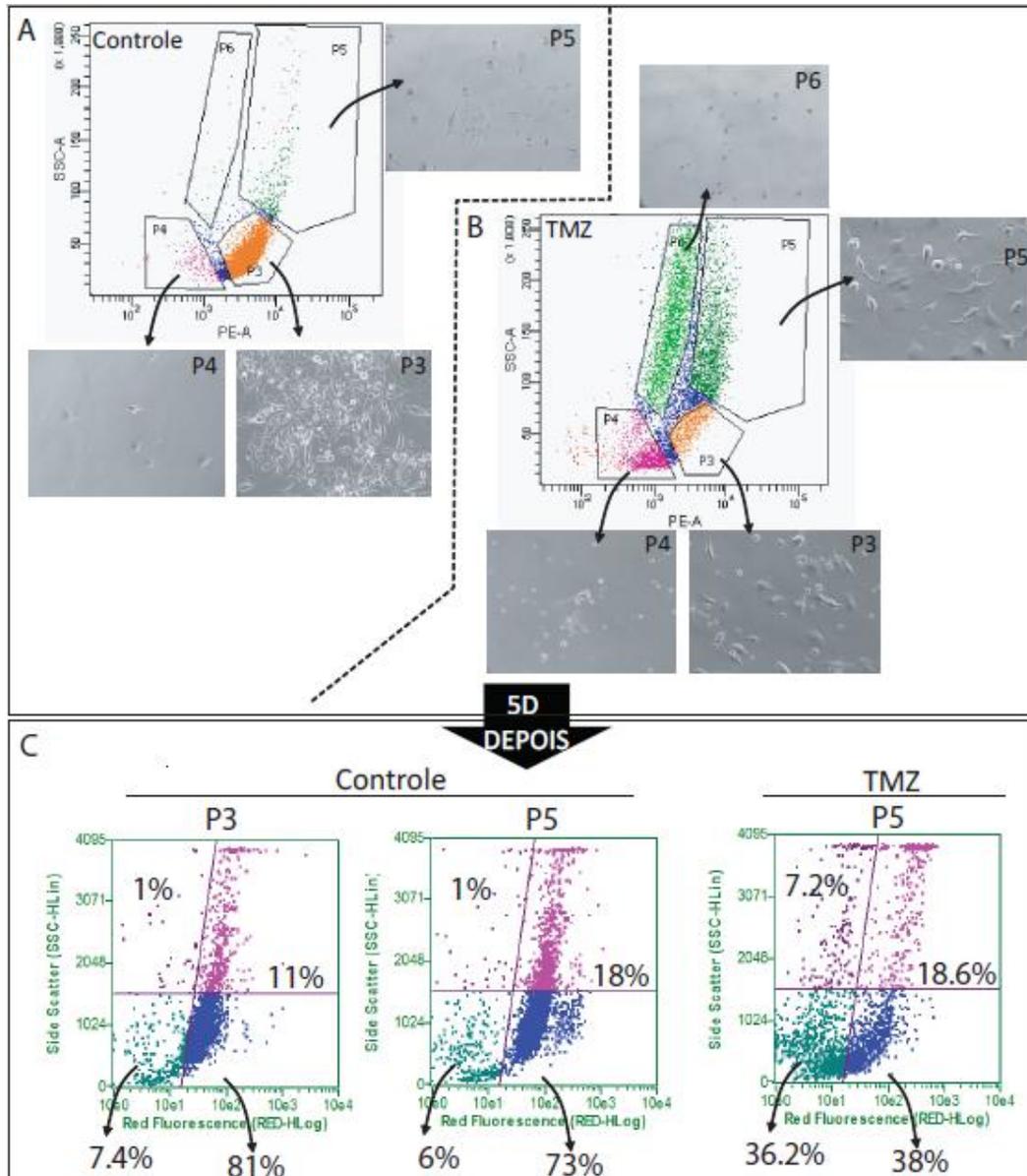


Figura 6: Separação das células tratadas com TMZ com relação a sua massa mitocondrial.

Células foram separadas no dia 7 através da marcação com Mitotracker, baseado em gráfico de SSC (complexidade celular) e marcação vermelha (quantidade de mitocôndrias). (A) Plot representativo do *sorting* por citômetro de fluxo de células controle com imagens representativas da população celular 3 dias após o *sorting*. (B) Plots representativos do *sorting* por citômetro de fluxo de células tratadas com TMZ e imagens representativas da população celular 3 dias após o *sorting*. (C) As

populações P3 e P5 do controle e P5 da TMZ foram marcadas para Mitotracker 5 dias após o sorting e analisadas em citometria de fluxo para análise da estabilidade do fenótipo das células.

5. Discussão

Mitocôndrias são organelas altamente dinâmicas e seu funcionamento é crucial para a manutenção da homeostase celular. Além disso, são as organelas que atuam no cerne da resposta à produção de espécies reativas de oxigênio, autofagia e morte celular. Disfunções mitocondriais e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio contribuem para a patogênese e resposta de células tumorais a terapia. A remoção de mitocôndrias é, portanto, fundamental para a homeostase celular. Quando o mecanismo de controle de qualidade mitocondrial é ineficaz ou inexistente, pode ocorrer aumento do estresse oxidativo, ativação de sinais apoptóticos e subsequente morte celular. Recentemente demonstramos que o tratamento agudo com TMZ (3h) induz autofagia transitória e senescência a longo prazo (7 dias) em células de glioma (Filippi-Chiela et al, 2014). Resultados do nosso grupo de pesquisa sugerem que células de glioma expostas a este mesmo tratamento apresentam aumento transitório de ROS, atingindo pico 3 dias após o tratamento com TMZ, seguido da redução. Além disso, resultados preliminares sugerem que estas células parecem apresentar alterações na massa mitocondrial total. Neste sentido, no presente trabalho nós objetivamos elucidar as alterações mitocondriais, considerando tanto a quantidade quanto a funcionalidade (inferida através do MMP), disparadas por TMZ em células de glioma, bem como investigar o efeito biológico de causa e consequência destas alterações nas células tumorais e o papel da autofagia neste processo.

Para tal, avaliamos tanto a massa como a manutenção do MMP na viabilidade mitocondrial em células selvagens e silenciadas para genes importantes no processo autofágico tratadas com o quimioterápico TMZ. Após tratamento agudo com TMZ (3h), observamos um aumento na média relativa de *mitotracker* e

na porcentagem de células que apresentavam uma alta intensidade de fluorescência vermelha a partir do dia 5, o que indica um aumento na massa mitocondrial da população celular. Além disso, no dia 7 observamos o aumento de uma população de células com baixa quantidade de mitocôndrias, sugerindo ou que existem subpopulações celulares que respondem de maneira diferente à TMZ quanto a massa mitocondrial, ou que existe uma dinâmica de alterações da massa mitocondrial pela qual a maioria das células tratadas com TMZ passa.

Quando comparamos as células U87wt com as células silenciadas para beclina e Atg7 não observamos diferença tanto na média relativa de *mitotracker* como na porcentagem de células com alta intensidade de fluorescência vermelha em resposta à TMZ, indicando que a autofagia parece não estar envolvida diretamente nas alterações mitocondriais induzidas por TMZ em células de glioma. Da mesma forma, estes dados sugerem que TMZ não induz mitofagia em células U87. Já existem trabalhos que descrevem que, sob condições de estresse metabólico, células epiteliais renais *Bec^{+/-}* acumulam mitocôndrias com anormalidades estruturais. Além disso, essas células também apresentam um aumento na geração de ROS, causando dano ao DNA e aneuploidias (Takahashi et al. 2007). Células *Bec^{+/-}* também apresentaram acúmulo da proteína p62, a qual atua como marcadora de componentes celulares a serem degradados por autofagia, o que pode potencializar a geração de ROS por causa da disfunção mitocondrial (Mathew et al. 2009). Quanto a proteína Atg7, já foi mostrado que sua deleção em células do sistema hematopoiético em camundongos resulta no acúmulo de mitocôndrias, produção de superóxido e morte de células tronco hematopoiéticas (Mortensen et al. 2011). Outro estudo mostrou que o silenciamento de Atg7 e Atg12 em células de câncer de mama expostas a tratamento agudo com o quimioterápico indutor de dano ao DNA Doxorubicina (Doxo) causa um aumento na massa mitocondrial total, sugerindo que mitofagia esteja envolvida na resposta à Doxorubicina. Neste modelo, o silenciamento de genes de autofagia em contexto de dano ao DNA levou à diminuição na viabilidade das mitocôndrias (Cho et al. 2011). Por outro lado, no presente estudo, o silenciamento de beclina e Atg7 não alterou significativamente a massa mitocondrial presente nas células tratadas com TMZ.

Dessa forma, como o tipo de dano ao DNA e a sinalização de resposta de dano e reparo de DNA é diferente entre Doxo e TMZ, seria plausível assumirmos que esta sinalização module o desfecho final que envolve mitofagia. Porém, dados preliminares obtidos ao longo do presente trabalho utilizando Doxo nas células U87 sugerem que o perfil de resposta destas células com relação à massa mitocondrial é semelhante à resposta à TMZ, com aumento da massa mitocondrial e do MMP.

Na análise de MMP utilizando a molécula fluorescente *JC1*, através da qual inferimos a integridade da organela, observamos uma redução inicial (3d) de aproximadamente 30% na razão de fluorescência vermelha pela fluorescência verde, sugerindo uma perda no potencial de membrana mitocondrial e consequente perda de viabilidade da organela ou uma diminuição na porcentagem de mitocôndrias com potencial de membrana normal. Esta cinética é semelhante à cinética de aumento de ROS observada após o tratamento com TMZ, bem como ao aumento transitório de autofagia observado após tratamento com TMZ. Isto sugere que, apesar do aumento da massa mitocondrial observado já no 3º dia após o tratamento com TMZ, estas organelas apresentam uma redução do MMP, potencialmente causada pelo aumento de ROS intracelular. Após o dia 5, por outro lado, houve um aumento na porcentagem de mitocôndrias com aumento de MMP em células tratadas com TMZ.

Tanto o aumento da massa como de MMP podem estar relacionados com o aumento da célula causado pela entrada em senescência celular, já que o aumento celular que ocorre na senescência sinaliza para a produção de novas organelas, incluindo mitocôndrias (Nisoli et al. 2005). A indução de senescência em células tratadas com TMZ foi comprovada pelos dois métodos utilizados, o aumento de fluorescência verde emitida por C12FDG (substrato fluorescente da enzima beta-galactosidase) e um aumento no tamanho dos núcleos analisados por NMA.

Para que seja mantida a homeostase celular, é importante que exista um balanço entre a biogênese e a degradação mitocondrial. A biogênese de mitocôndrias é um evento celular complexo que envolve a síntese coordenada de proteínas codificadas pelo DNA nuclear e pelo mtDNA. Assim sendo, quando o

conteúdo presente no mtDNA reduz, o mesmo deveria acontecer com a biogênese de mitocôndrias (Luo et al. 2012). A biogênese de mitocôndrias em células eucariotas é mediada pelo fator de transcrição PGC1alfa (Wu et al 1999), que pode ser induzido por estresse oxidativo (Austin & St-Pierre 2012). PGC1alfa é um coativador transcricional que interage e ativa fatores de transcrição responsáveis pela síntese de novas mitocôndrias em células eucariotas e, de maneira não menos importante, pela indução de enzimas antioxidantes. Dessa forma, em resposta ao aumento de ROS e dano mitocondrial, PGC1a poderia favorecer uma adaptação metabólica acompanhada pela supressão de ROS nas células (Austin & St-Pierre, 2012), como demonstrado pelos nossos dados preliminares (redução de ROS a partir do dia 3). O tratamento com TMZ pode ter levado ao aumento dos níveis e atividade de PGC1alfa, levando à biogênese mitocondrial e assim contribuindo para o aumento da massa mitocondrial em células tratadas. Este aspecto é uma perspectiva importante do presente trabalho

Por outro lado, observamos o aumento de uma população de células com massa mitocondrial reduzida no dia 7. Neste sentido, a proteína pró-apoptótica da família Bcl2 BNIP3 é importante para o aumento da mitofagia induzido por estresse oxidativo (Gustafsson, 2011). BNIP3 se localiza na membrana de mitocôndrias e contribui para a remoção mitofágica das mesmas por interagir com a proteína LC3. O gene BNIP3 é induzido em situações de estresse pela proteína p53, que se encontra superexpressa em células U87wt tratadas com TMZ, portanto BNIP3 pode estar envolvida na resposta ao quimioterápico (Hiroshi et al. 2001). Logo, uma das perspectivas do trabalho é estudar os níveis de PGC1alfa e BNIP3 em células tratadas com TMZ para avaliar a relação biogênese/degradação presente nessas células.

Como discutido acima, o tratamento com TMZ induziu alterações importantes na massa mitocondrial de células de glioma. A partir destes dados, algumas questões centrais emergiram: (a) qual o perfil proliferativo das diferentes subpopulações celulares?; e (b) Qual a estabilidade do fenótipo das subpopulações presentes após 7d do tratamento agudo com TMZ? Através do *sorting* por citometria de fluxo separamos quatro subpopulações celulares distintas com base

na quantidade de mitocôndrias e complexidade celular (SSC). A análise das subpopulações separadas a partir do *sorting* está em andamento, mas resultados preliminares sugerem que: (a) as subpopulações possuem diferentes taxas proliferativas, o que pode ser um indicativo que diferentes massas mitocondriais podem determinar a resistência ou não a TMZ; e (b) que o fenótipo de aumento da massa mitocondrial (população P5 nas células tratadas com TMZ) é transitório, uma vez que a re-análise da massa mitocondrial após 5 dias mostrou que as células haviam reduzido a massa mitocondrial, deslocando-se para a região de P4 (células com reduzida massa mitocondrial).

Em um estudo recente, a atividade da cadeia respiratória mitocondrial já foi correlacionada com a manutenção de melanomas e pelo fenótipo resistente a múltiplas drogas, e propondo que terapias envolvendo a modulação da atividade mitocondrial poderiam aumentar a eficiência de tratamentos já existentes e reduzir a recorrência de tumores (Roesch et al. 2013). Já foram propostos tratamentos usando terapias indutoras de mitofagia e que afetem o funcionamento mitocondrial (Galluzzi et al 2006, Fulda et al 2010), porém, maiores estudos são necessários para entender a correlação existente entre biogênese e degradação mitocondrial e suas respostas a diferentes quimioterápicos hoje utilizados.

6. Perspectivas

- ✓ Acompanhamento por um período maior de tempo de células tratadas com TMZ para avaliar alterações de massa e funcionalidade mitocondrial.
- ✓ Análise usando JC1 nas células silenciadas para Atg7 e beclina para verificar se o aumento na massa mitocondrial não é seguido de uma diminuição na no potencial de membrana das mitocôndrias.
- ✓ Medir os níveis de ATP celulares nas células selvagens e silenciadas para genes autofágicos.
- ✓ Avaliação do dano ao mtDNA por PCR quantitativo em tempo real .
- ✓ Western blot para as proteínas BNIP3, PGC1alfa e p62 em células separadas por *sorting* em citômetro de fluxo e em linhagens em cultura.
- ✓ Avaliar a capacidade proliferativa das 4 subpopulações separadas por *sorting* e se a distribuição da massa mitocondrial é alterada (em andamento).
- ✓ Transfectar células U87wt com o plasmídeo pDsREd2 que marca mitocôndrias em vermelho e com o plasmídeo da proteína verde fluorescente GFP fusionado a proteína LC3 para marcar autofagossomos de verde. Usar microscopia de fluorescência para tentar co-localizar os dois em células tratadas com TMZ e avaliar a indução de mitofagia.

7. Referências bibliográficas

Zhang J (2013) Autophagy and mitophagy in cellular damage control. *Redox Biology* **1**, 19-23.

Youle R & Narendra D (2011) Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**, 9-14.

Kubli D & Gustafsson A (2012) Mitochondria and mitophagy: the Yin and Yang of cell death control. *Circulation Research* **111**, 1198-1207.

Galluzzi L, Larochette N, Zamzami N & Kroemer G (2006) Mitochondria as therapeutic targets for cancer therapy. *Oncogene* **25**, 4812-4830.

Oliva C, Nozell S, Diers A, McClugage S, Sarkaria J, Markert J, Darley-Usmar V, Bailey S, Gillespie G, Landar A & Griguer C (2010) Acquisition of Temozolomide Chemoresistance in gliomas leads to remodeling of mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem* **285**, 39759-39767.

Palikaras K & Tavernarakis N (2012) Mitophagy in neurodegeneration and aging. *Frontiers in Genetics* **3**, 1-7.

Zhang J & Ney P (2009) Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy and mitophagy. *Cell Death and Differentiation* **16**, 939-946.

Kim I, Rodriguez-Enriquez S & Lemasters J (2007) Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **462**, 245-253.

Fulda S, Galluzzi L & Kroemer G (2010) Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nature Review – Drug Discovery* **9**, 447-464.

Twig G & Shirihai O (2011) The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxidants & redox signaling* **14**, 1939-1951.

Gargini R, Garcia-Escudero V & Izquierdo M (2011) Therapy mediated by mitophagy abrogates tumor progression. *Autophagy* **7**, 466-476.

He C & Klionsky DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual Review of Genetics* **43**, 67-93.

Boya P, Reggiori F & Codogno P (2013) Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol* **15**, 713-720.

Yang Z, Klionsky DJ (2010) Eaten alive: history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* **12**, 814-822.

Vessoni AT, Filippi-Chiela EC, Menck CF, Lenz G (2013) Autophagy and genomic integrity. *Cell Death Differ* **20**, 1444-1454.

Hattori N, Saiki S, Imai Y (2014) Regulation by mitophagy. *The Inter Jour of Biochem and Cell Biol* **53**, 147-150.

Ivatt RM & Whitworth AJ (2014) The many faces of mitophagy *EMBO Rep*, **15**, 5-6.

Lu H, Li G, Liu L, Feng L, Wang X & Jin H (2013) Regulation and function of mitophagy in development and cancer. *Autophagy* **9**, 1720-36.

Hang C, Yahui K & Zhang H (2011) Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and aging. *Journal of Sign Transd* **2012**, 1-13.

Osellame, LD; Duchen, MR; (2013) Defective quality control mechanisms and accumulation of damaged mitochondria link Gaucher and Parkinson diseases. *Autophagy* **9**, 1633-1635.

Maes H, Rubio N, Garg AD & Agostinis P (2013). Autophagy: shaping the tumor microenvironment and therapeutic response. *Trends Mol Med* **19**, 428-446.

Filippi-Chiela EC, Bueno e Silva MM, Thomé MP & Lenz G (2014) Single cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. *Autophagy* – *in press*.

Rodier F & Campisi J (2011) Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* **192**, 547-56.

Viale A, Pettazzoni P, Lyssiotis C, Ying H, Sanchez N, Marchesini M, Carugo A et al (2014) Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature* **514**, 628-632.

Filippi-Chiela EC, Oliveira MM, Jurkovski B, Callegari-Jacques SM, Silva VD, Lenz G, Lebedeva IV (2012) Nuclear Morphometric Analysis (NMA): Screening of Senescence, Apoptosis and Nuclear Irregularities. *Plos One* **7**, 42522.

Fulda S, Galluzi L & Kroemer G (2010) Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 447-64.

Filippi-Chiela EC, Thomé MP, Bueno e Silva MM, Pelegrini AL, Ledur PF, Garicochea B, Zamin LL & Lenz G (2013) Resveratrol abrogates the Temozolomide induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the Temozolomide induced senescence in glioma cells. *BMC Cancer* **13**, 147-156.

Hirose Y, Berger MS & Pieppner RO (2001) p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of Temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer Res* **61**, 1957-1963.

Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cualing HD, Sun M, Sato Y, Liang C, Jung JU, Cheng JQ, Mulé JJ, Pledger WJ & Wang HG (2007) Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol* **9**, 1142-51.

Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, Bray K, Reddy A, Bhanot G, Gelinas C, Dipaola RS, Karantza-Wadsworth V & White E (2009) Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* **137**, 1062-75.

Mortensen M, Soilleux EJ, Djordjevic G, Tripp R, Lutteropp M, Sadighi-Akha E, Stranks AJ, Glanville J, Knight S, Jacobsen SE, Kranc KR & Simon AK (2011) The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *J Exp Med* **208**, 455-67.

Cho DH, Nakamura T & Lipton SA (2011) Mitochondrial dynamics in cell death and neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci* **67**, 3435-3447.

Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S & Carruba MO (2005) Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* **310**, 314-17.

Luo C, Li Y, Wang H, Feng Z, Li Y, Long J & Liu J (2012) Mitochondrial accumulation under oxidative stress is due to defects in autophagy. *J Cell Biochem* **114**, 212-219

Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC & Spiegelman BM (1999) Mechanisms controlling

mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **9**, 115-24.

Austin S & St-Pierre J (2012) PGC1a and mitochondrial metabolism – emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *J Cell Sci* **125**, 4963-71.

Gustafsson A (2011) BNIP3 as a dual regulator of mitochondrial turnover and cell death in the myocardium. *Pediatr Cardiol* **32**, 267-274.

Roesch A, Vultur A, Bogeski I, Wang H, Zimmermann KM, Speicher D, Korbel C, Laschke MW et al (2013) Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B (high) cells. *Cancer Cell* **23**, 811-25.

Galluzzi L, Larochette N, Zamzami N & Kroemer G (2006) Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy. *Oncogene* **25**, 4812-30.